



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

ANA CLAUDIA CAMARGO CAMPOS

**AVALIAÇÃO DE CITOCINAS NA SECREÇÃO ENDOCERVICO-
VAGINAL DE PACIENTES COM VAGINOSE BACTERIANA E
PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

ORIENTADOR: Prof. Dr. CLEOMENES REIS - IPTSP/UFG

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. EDDIE FERNANDO CANDIDO MURTA-IPON/DGO/UFTM

Tese de Doutorado

Goiânia-GO, 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

ANA CLAUDIA CAMARGO CAMPOS

**AVALIAÇÃO DE CITOCINAS NA SECREÇÃO ENDOCERVICO-
VAGINAL DE PACIENTES COM VAGINOSE BACTERIANA E
PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

ORIENTADOR: Prof. Dr. CLEOMENES REIS - IPTSP/UFG

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. EDDIE FERNANDO CANDIDO MURTA-IPON/DGO/UFTM

Projeto submetido ao CPGMTSP/
IPTSP/ UFG como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor na área de concentração de
Microbiologia.

Goiânia-GO, 2010

"A educação faz com que as pessoas sejam fáceis de guiar, mas difíceis de arrastar; fáceis de governar, mas impossíveis de escravizar"
(Henry Peter)

DEDICATÓRIA

Dedico toda a minha vida, meu trabalho, minha consciência, ética, respeito, sabedoria e amor aos meus pais que foram e continuam sendo a fonte de toda a minha força interior e que são totalmente responsáveis por qualquer vitória que eu venha a alcançar. Obrigada por tudo que fizeram, contribuíram e se dedicaram, vocês são dignos do meu amor eterno.

In memoriam

AGRADECIMENTOS

À banca de qualificação composta pelos Prof^o. Drs. André kipnis, Ruffo de Freitas Junior, Ruy de Souza Lino Junior, José Daniel Gonçalves Vieira, Joaquim Caetano de Almeida Netto e Márcia Antoniazzi Michelin que com certeza contribuíram substancialmente, a fim de melhorar o conteúdo dessa tese de doutorado.

Aos Prof^o. Drs. Álvaro Bisol Serafini, José Daniel Gonçalves Vieira e Fabrícia Paula de Faria por constituírem parte da Banca de Seleção no Concurso para Doutorado, 2007; possibilitando minha aprovação como doutoranda nessa instituição.

Aos membros da equipe interprofissional do Serviço de Ginecologia e Mama do Hospital Araújo Jorge onde iniciamos a nossa coleta de amostras: Drs. Ruffo de Freitas Junior, Luiz Fernando Jubé Ribeiro e Rossana de Araújo Catão e à técnica de enfermagem Suezê Moraes Viana pela amizade, presteza e colaboração na idealização do projeto.

Ao responsável pelo laboratório Médico Papanicolaou Joaquim I. Pimenta da Silva por realizar a leitura das lâminas de colpocitologia contribuindo com seus conhecimentos e experiência nas análises citológicas das amostras coletadas e à técnica Sebastiana pelo auxílio na coleta das amostras.

À Biomédica responsável pelo Laboratório de Microbiologia do IPTSP-UFG Lêda Maria Almeida Valadão, pelo profissionalismo e auxílio na realização da parte prática da presente obra.

Aos Servidores da PPGMT-IPTSP/UFG José Clementino de Oliveira Neto e Kariny Vieira Soares que com toda a sua dedicação cuidou com carinho de cada passo durante o curso de pós-graduação, auxiliando-nos com informações importantes, pessoalmente ou por e-mails.

À Biomédica responsável pelo Laboratório de Micologia do IPTSP-UFG Hildene Menezes e Silva pela realização das culturas de fungos e pelos conhecimentos e disponibilidade oferecidos.

À chefe da Divisão de Saúde da Mulher, Criança e Adolescente - SMS de Goiânia Inácia Araújo Silva e à médica do mesmo serviço Dra. Ana Cristina de Castro por ser a introdutora do projeto na SMS-GO.

Ao Prof^o Dr. Régis Resende Paulinelli pelo auxílio na análise estatística do projeto de pesquisa e a disponibilidade em sempre me atender.

Ao Prof^o. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta, meu co-orientador e à Prof^a Dr^a Márcia Antoniazzi Michelin pela confiança em me orientarem, pelos conhecimentos e experiências repassados e por acreditarem neste projeto de pesquisa, possibilitando a realização prática

no Laboratório de Pesquisa em Oncologia - IPON da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM.

Aos alunos de pós-graduação da UFTM Ariana de Melo Borges, Bruna França Matias, Cláudia Rodrigues Mendonça, Douglas Reis Abdalla e Nelson Ranieri Tirone pela amizade e por me apoiarem no Laboratório IPON auxiliando imensamente a realização da pesquisa.

Às coordenadoras de Enfermagem Sue Christine Siqueira e Edicassia Cardoso de Rezende e ao gerente acadêmico Adriano Luis Fonseca por permitirem me ausentar por um período da Faculdade Estácio de Sá de Goiás para que eu pudesse realizar a pesquisa no Laboratório IPON da UFTM e em especial à Prof^a Dr^a. Denise Gonçalves Pereira pela amizade incondicional.

Por fim, ao Prof. Dr. Cleomenes Reis que continua sendo o grande responsável por mais esta obra, “tudo combinado e nada resolvido” famosa frase tantas vezes repetidas. Agradeço pela constante paciência, amizade, experiência, conhecimento, sabedoria e incentivo nos momentos de desânimo e de tentativas de abandono, viabilizando um sonho hoje concretizado, mesmo com tantos obstáculos mais uma vez ultrapassados.

SUMÁRIO

Lista de tabelas e gráfico.....	ix
Lista de símbolos, siglas e abreviaturas.....	x
1. RESUMO.....	xiii
2. ABSTRACT.....	xv
3. INTRODUÇÃO.....	17
3.1 - Considerações gerais sobre as infecções genitais.....	17
3.2 - Etiologia das vaginose bacterianas.....	18
3.3 - Componentes microbianos do biofilme.....	18
3.4 - Classificação dos elementos de defesa imune.....	20
3.4.1 - Imunidade Inata.....	20
3.4.2 - O papel das citocinas na resposta imunológica.....	20
3.4.3 - Perfil de citocinas durante as fases do ciclo menstrual.....	21
3.4.4 - Imunidade Adaptativa.....	22
3.4.4.1 - Resposta imune Th1 e Th2.....	22
3.4.5 - Defesa imunológica no trato genital feminino.....	23
3.4.6 - Ação das citocinas nas infecções bacterianas e virais.....	24
3.5 - Eventos que poderiam alterar as respostas do sistema imunológico.....	25
4. OBJETIVOS.....	27
4.1 - Objetivo geral.....	27
4.2 - Objetivos específicos.....	27
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
5.1 Área e população de estudo.....	28
5.2 Coleta e Transporte das amostras:.....	29
5.3 - Diagnóstico das vaginose bacterianas.....	30
5.3.1 - Isolamento e identificação das bactérias.....	31
5.4 - Dosagem de citocinas.....	31
5.4.1 - Quantificação de citocinas.....	31
5.5 - Tipagem do HPV.....	33
5.5.1 - Extração do DNA.....	33
5.5.2 - PCR para HPV.....	34
5.5.3 - Ciclo de Amplificação de DNA.....	35
5.5.4 - Detecção dos Produtos Amplificados.....	35

5.6 - Análise Estatística.....	36
6 - RESULTADOS.....	37
7 - DISCUSSÃO.....	43
8 - CONCLUSÕES.....	48
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ARTIGO CIENTÍFICO: Evaluation of cytokines in vaginal secretions of women with bacterial vaginosis associated with human papillomavirus.....	57
ANEXO I: NORMAS PARA PUBLICAÇÃO: American Journal of Reproductive Immunology.....	73
ANEXO II: Documento de submissão à American Journal of Reproductive Immunology.....	75
ANEXO III: Questionário.....	76
ANEXO IV: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	79
ANEXO V: Protocolo de Coleta do Material.....	81
ANEXO VI: Protocolo CEPACCG nº 069/06.....	82

TABELAS E GRÁFICO

➤ Tabela 1 - Fatores comportamentais e fisiológicos das mulheres atendidas nas Unidades Básicas de Saúde da cidade de Goiânia-GO, de acordo com a análise univariada.....	38
➤ Tabela 2 - Fatores comportamentais e fisiológicos das mulheres atendidas nas Unidades Básicas de Saúde da cidade de Goiânia-GO, de acordo com a análise multivariada.....	39
➤ Tabela 3 - Concentração de citocinas em mulheres com vaginose bacteriana.	41
➤ Tabela 4 - Concentração de citocinas em mulheres com Papilomavírus humano.....	41
➤ Tabela 5 - Concentração de citocinas em mulheres com Papilomavírus humano de alto risco.....	42
➤ Tabela 6 - Concentração de citocinas em mulheres com Papilomavírus humano de baixo risco.....	42
➤ Gráfico 1 - Análise da frequência de HPV de alto risco (16,18,31,33,35) e baixo risco (6,11) durante o ciclo menstrual das mulheres analisadas nas Unidades Básicas de Saúde da cidade de Goiânia- GO.....	40

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

➤ α	Alfa
➤ Abs	Absorvância
➤ Ac	Anticorpo
➤ ACV	Ausculata cardiovascular
➤ ACCG	Associação de Combate ao Câncer em Goiás
➤ ACO	Anticoncepcional oral
➤ AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
➤ AR	Ausculata respiratória
➤ BHI PRAS	Brain Heart Infusion – PRAS (pré-reduzido e esterilizado em anaerobiose).
➤ Ca	Câncer
➤ CAIS	Centro de atenção integrada à saúde
➤ CPEMHA	Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal
➤ CO₂	Gás carbônico
➤ CNA	Colistina – ácido nalidíxico
➤ DGO	Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia
➤ DNA	Ácido desoxirribonucleico
➤ DNP	Substrato dinitrofenil fosfato
➤ dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
➤ DR	Dia relativo
➤ DST	Doenças sexualmente transmissíveis
➤ DUM	Data da última menstruação
➤ et al	e colaboradores
➤ E2	Oncoproteína
➤ E6,E7	Genes do HPV
➤ ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
➤ EUA	Estados Unidos da América
➤ °C	Graus Celsius
➤ g	Força gravitacional
➤ G, P, A	Gestação, paridade e aborto
➤ GO	Goiás

➤ h	hora e horas
➤ H ₂ O	Água
➤ H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
➤ HD	Hipótese diagnóstica
➤ HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
➤ HPV	Papilomavírus humano
➤ IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia Estatística
➤ IC	Intervalo de confiança
➤ ICAM	Moléculas de adesão intercelular
➤ IFN- γ	Interferon - gama
➤ IgA	Imunoglobulina A
➤ IgG	Imunoglobulina G
➤ IL	Interleucina
➤ IPON	Instituto de Pesquisa em Oncologia
➤ IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
➤ JEC	Junção escamo-colunar
➤ KOH	Hidróxido de potássio
➤ M	Molar
➤ Milli-Q	Água deionizada purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore Corporation®)
➤ MgCl ₂	Cloreto de magnésio
➤ MHC	Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade
➤ mM	Mili molar
➤ ml	Militros
➤ n ou N	Número de pacientes
➤ NaOH	Hidróxido de sódio
➤ NIC	Neoplasia intra-epitelial cervical
➤ NK	Célula <i>Natural Killer</i>
➤ nm	Nanômetros
➤ NO	Óxido nítrico
➤ OR	Odds ratio
➤ PA	Pressão arterial
➤ pb	Pares de base
➤ PBS	Salina tamponada com fosfato
➤ PBS T	Salina tamponada com fosfato acrescido de tween 20
➤ PCR	Reação em cadeia da polimerase
➤ pg	Picogramas
➤ pH	Potencial de hidrogênio
➤ PPGMTSP	Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
➤ PSF	Programa de saúde da família
➤ %	Porcentagem
➤ q.s.p	Quantidade suficiente para
➤ ®	Marca registrada
➤ sp	Espécies
➤ T CD4+	Células T com <i>cluster of differentiation 4</i>
➤ T CD8+	Células T com <i>cluster of differentiation 8</i>
➤ TAF	Tríplice açúcar ferro
➤ Taq	Enzima Taq DNA polimerase

➤ TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
➤ TLR4	Toll-like receptor 4
➤ TMB	Tetramethyl benzidine
➤ TNF- α	Fator de necrose tumoral - alfa
➤ Th0	Linfócitos T auxiliares do tipo 0
➤ Th1	Linfócitos T auxiliares do tipo 1
➤ Th2	Linfócitos T auxiliares do tipo 2
➤ Tr	Linfócitos T reguladores
➤ UFG	Universidade Federal de Goiás
➤ UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
➤ μ l	Microlitro
➤ VB	Vaginose bacteriana
➤ VM	Vermelho de metila
➤ WHO	World Health Organization
➤ χ^2	Teste do qui-quadrado

1 - RESUMO

A vagina e a cérvix são as primeiras linhas de defesa física e imunológica contra patógenos sexualmente transmissíveis. No entanto, os processos infecciosos na vagina causados por micro-organismos potencialmente patogênicos como nas vaginoses bacterianas (VB) são muito comuns. Podendo estar associados a uma entidade mórbida como o papilomavírus humano (HPV). Avaliou-se a relação existente entre a presença de VB e o HPV no trato genital inferior, identificando os aspectos clínicos e laboratoriais das mulheres atendidas em um hospital e em 5 unidades básicas de saúde da cidade de Goiânia-GO e verificou-se a concentração de citocinas na secreção endocervical nos casos com VB e HPV. O estudo incluiu 173 mulheres sexualmente ativas entre 16 e 48 anos de idade, divididas em grupos: controle, com VB e com HPV de alto e baixo riscos. Aplicou-se um questionário onde foram analisados os fatores de riscos extrínsecos e intrínsecos destas pacientes. Realizou-se exames de cultura e identificação microbiana, verificando o pH vaginal, seguido da identificação do HPV de alto e baixo riscos pelo PCR e dosagem de citocinas. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com cálculos do *odds ratio*, intervalo de confiança e *p* de 0,05. Foram identificados 47 casos de VB. A presença de pH vaginal > 4,5 mostrou resultado estatisticamente significativo ao aparecimento de HPV, $p=0,001$. Ao se analisar a regressão logística multivariada, os fatores de risco independentes para a presença de VB foram: ter mais de um parceiro sexual nos últimos 5 anos $p<0,001$ e ter mais de 3 relações sexuais por semana $p=0,002$. Já na presença de HPV

os fatores independentes foram: estado civil casado $p=0,029$ e $\text{pH} \leq 4,5$ $p<0,001$ e no caso de ser HPV de alto risco o único fator considerado independente foi o $\text{pH} \leq 4,5$ $p=0,006$. Ao se relacionar as infecções pelo HPV de alto e baixo risco e pela presença de VB com alguns fatores imunológicos, através da dosagem das citocinas locais, verificou-se que as IL-2 e IL-12 mostraram maior concentração nos casos de VB e HPV se comparadas ao grupo controle. A IL-6 mostrou-se elevada somente para HPV, seguidos pelo IFN-gama e a IL-10 embora estas duas últimas próximas ao estatisticamente significativo. Concluiu-se que na análise univariada que ter mais de um parceiro sexual nos últimos 5 anos e realizar mais de 3 relações sexuais por semana são fatores independentes associados à presença de VB e a alcalinização da vagina provavelmente seja um fator predisponente às infecções pelo HPV e a resposta imune, através das citocinas tipo Th1 da secreção vaginal na presença de VB e/ou HPV, possivelmente seja semelhante.

Palavras-chave: citocina, papilomavírus humano, vaginose bacteriana.

2 - ABSTRACT

The vagina and the cervix are the first immune and physical line of defense against sexually transmitted pathogens. However infectious process in the vagina, caused by potentially pathogenic microorganism such as bacterial vaginosis (BV), are very often. This may be associated with a morbid entity as Human Papillomavirus (HPV). It was evaluated the association between the presence of BV and HPV in the lower female genital tract, identifying the clinical and lab aspects in women who received medical attention at emergency rooms in the city of Goiânia-GO and observed the production of cytokines in endocervical secretions in cases with VB associated with HPV. This study included 173 sexually active women, between 16 and 48 years old, divided into groups: control, with BV and with high and low risk of HPV. A survey was conducted to collect the intrinsic and extrinsic factors associated with the patients. Microbial cultures, vaginal pH, identification of high and low risk of HPV by PCR, and the concentration of cytokines were performed. The result of the research data was submitted to a statistical analysis, calculating the *odds ratio*, confidence intervals and *p of 0,05*. Forty seven cases of BV were diagnosed. Besides, the presence of a vaginal pH > 4.5, showed a result statistically significant for the presence of HPV, $p = 0.001$ was also observed. When analyzing the multivariate logistic regression, the independent risk factors for the presence of VB were: having more than one sexual partner in the last 5 years $p < 0,001$ and have more than 3 sexual intercourses per week $p = 0,002$. But in HPV infection the independent risk factors were: being married $p = 0,029$ and $pH \leq 4.5$ $p < 0,001$ and in the case of high-risk HPV the only independent factor

considered was the $\text{pH} \leq 4.5$ $p=0,006$. Relating HPV infections with high and low risk and the presence of VB with some immune factors by the strength of local cytokines, it was found that, IL-2 and IL-12 were significantly elevated in cases of BV and HPV. The IL-6 was high only for HPV, followed by IFN-gamma and IL-10 although the last two showed a trend towards statistical significance in HPV cases. It was concluded through the univariate analysis that the factors, having more than one sexual partner in the last 5 years, a failure in the use of condoms and the presence of leucorrhoea and dyspaurenia were related to the presence of BV and the level of alkaline in the vagina which could possibly predispose to infections HPV, and the immune response Th1-type cytokines in vaginal secretions in the presence of BV and/or HPV may also be similar.

Key-words: cytokines, Human papillomavirus, bacterial vaginosis.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)