



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

Análise das seqüências do gene *ompA* de *Chlamydia trachomatis* isoladas do trato genital de mulheres inférteis e gestantes em Manaus – Amazonas

Norma Suely de Lima Freitas

Manaus / AM

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

Análise das seqüências do gene *ompA* de *Chlamydia trachomatis* isoladas do trato genital de mulheres inférteis e gestantes em Manaus – Amazonas

Norma Suely de Lima Freitas

Tese apresentada ao **Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas**, na área de concentração Biotecnologias para a Saúde e na linha de pesquisa Diagnóstico de Patógenos de Doenças de Impacto Social na Amazônia.

Orientadora: Prof^a Dra Cristina Maria Borborema dos Santos

Manaus / AM

2012

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Freitas, Norma Suely de Lima

F866a Análise das sequências do gene *ompA* de *Chlamydia trachomatis* isoladas do trato genital de mulheres férteis e gestantes em Manaus – Amazonas / Norma Suely de Lima Freitas. - Manaus: UFAM, 2012.
126 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologias para a Saúde) —
Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientadora: Prof^a. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos

1. *Chlamydia trachomatis* – Manifestações clínicas 2. Bactérias
3. Doenças sexualmente transmissíveis 4. Aparelho genital feminino -
Doenças 5. Infertilidade I. Santos, Cristina Maria Borborema dos
(Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 579.84(043.2)

NORMA SUELY DE LIMA FREITAS

Análise das seqüências do gene *ompA* de *Chlamydia trachomatis* isoladas do trato genital de mulheres inférteis e gestantes em Manaus – Amazonas

Tese apresentada ao **Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas**, na área de concentração Biotecnologias para a Saúde e na linha de pesquisa Diagnóstico de Patógenos de Doenças de Impacto Social na Amazônia.

Aprovado em 28 de agosto de 2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos, Presidente
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Profa. Dra. Cintia Mara Costa Oliveira
Universidade do Estado do Amazonas (UEA) / Fundação Medicina Tropical (FMTAM)

Profa. Dra. Aya Sadahiro
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Profa. Dra. Juliana Vianna Pereira
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof. Dr. Lioney Nobre Cabral
Universidade do Estado do Amazonas (UEA)

Dedico a Deus Pai

Razão de Tudo o que somos e fazemos...

Não tenho palavras pra agradecer Tua bondade;

Dia após dia me cercas com fidelidade;

Nunca me deixes esquecer que Tudo o que tenho, Tudo o que eu sou, o que vier a ser, vem de Ti, Senhor;

Dependo de Ti, Preciso de Ti, Sozinho NADA posso fazer;

Descanso em Ti, Espero em Ti;

Nunce me deixes esquecer que Tudo o que tenho, Tudo o que eu sou, o que vier a ser, vem de Ti e entrego a Ti Senhor.

Ana Paula Valadão

DEDICATÓRIA

*Dedico esta Tese ao meu esposo e companheiro de todos os momentos, **Josias Coriolano de Freitas**, que contribuiu imensamente para que esta Tese pudesse ser realizada e finalizada; por ter me proporcionado segurança em todos os momentos;*

Agradeço a ti, meu marido, por ter sido compreensível em todos os momentos e por me fazer sentir uma pessoa tão amada e especial.

*A minha filha **Ana Victoria**,*

Simplesmente a razão da minha vida, a continuidade da minha história, a minha melhor parte, o meu orgulho, o meu maior sonho, a verdadeira definição de Amor!

*Dedico essa conquista para o mais novo membro da família, **ao meu bebê Victor**, o segundo coração que já está batendo dentro de mim.*

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Israel Florêncio de Lima e Eudália B. de Moura Lima e irmão Davi Gerson de Lima, pelo amor, apoio e compreensão nos momentos difíceis, por estarem sempre presentes na minha vida e pelas palavras de persistência na realização dos meus sonhos.

*A minha saudosa, estimável e inesquecível **Brigithe**.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela vida, pelas oportunidades dadas a mim, pela proteção e por TUDO que tenho na vida, por estar sempre presente nos momentos de alegria e principalmente nos momentos de aflição, por estar sempre me guiando nos caminhos da vida e mostrar que TUDO TORNA POSSÍVEL;

Ao meu esposo **Josias Coriolano de Freitas**, obrigada pelo amor, pelo constante companheirismo e compreensão, pelo apoio e incentivo sem tamanho, pela presença durante o curso do doutorado, especialmente na fase de conclusão deste trabalho;

Agradeço à minha amada e querida filha, **Ana Victoria**, pela a certeza que toda minha luta para que fosse concluída a tese não foi em vão, para que futuramente compreenda os momentos de ocupação e ausência do doutorado que a privaram da minha companhia;

Aos meus **pais** e **meu irmão**, obrigada pelo imenso amor, apoio e incentivo constante para que fosse terminada esta difícil e conquistada caminhada;

À minha orientadora, professora Dra **Cristina Maria Borborema dos Santos**, por ter dividido comigo momentos importantes durante meu mestrado e no doutorado, e que apesar da distância sempre acreditou e confiou no meu potencial nesta difícil jornada...Muito obrigada!;

À **Dra Dária Barroso Serrão das Neves**, pela amizade e confiança depositada em mim, pela disponibilidade, apoio, atenção e pelas fundamentais contribuições para a obtenção das minhas valiosas amostras;

À equipe e amigos do Laboratório de Diagnóstico Molecular do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia - UFAM, **Cíntia Mara Costa de Oliveira, André Santos Silva, Évelyn Costa Lira e Roberto Alexandre Barbosa Alves Filho**, muitíssima obrigada pela amizade e trocas de experiências que vocês me concederam. O apoio de vocês foi fundamental e imprescindível para que eu chegasse ao fim dessa caminhada.

Aos Professores **Dr José Odair Pereira** e **Dr Spartaco Astolfi Filho** pelo apoio acadêmico e pelas fundamentais contribuições à realização deste trabalho;

À **Dra Cintia Mara, Dina Assunção e Mário Nunes**, pela colaboração na parte das reações de sequenciamento, sem vocês não seria possível concretizar parte deste trabalho;

A **Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC) - UFAM** e ao **CNPq** pela oportunidade e que possibilitou a realização deste trabalho;

A **todos**, que direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Tudo posso Naquele que me fortalece. Filipenses 4:13

Enquanto houver vontade de lutar, haverá esperança de vencer. Santo Agostinho

Não se deve medir o sucesso pela posição que a pessoa alcançou na vida, mas pelos obstáculos que ela teve de superar. Booker Washington

RESUMO

Apesar da alta prevalência e dos riscos associados à *Chlamydia trachomatis* no Brasil e outros países do mundo, pouco se conhece sobre a distribuição dos genótipos no Brasil e a variabilidade biológica deste importante agente transmissor de doenças sexualmente transmissíveis (DST). A ausência de uma investigação rotineira para *C. trachomatis* e tratamentos efetivos pode originar sérias complicações e conseqüências para os indivíduos como doença inflamatória pélvica, infertilidade, gravidez ectópica e infecções neonatais. Atualmente, a *C. trachomatis* apresenta 19 sorotipos: A-C associados ao tracoma, D-K responsáveis por infecções urogenitais e L1, L2 e L3, agentes responsáveis pela síndrome do linfogranuloma venéreo. A MOMP, reconhecida como o antígeno imunodominante codificado pelo gene *ompA*, exibe uma extensa área de variação nucleotídica sendo por sua vez, conferido por quatro domínios variáveis (VDI a VDIV). Estudos sugerem que as mutações ocorrem frequentemente entre os genótipos e que essas mutações podem indicar diferenças imunogênicas entre as MOMP de genótipos de *C. trachomatis*. O presente trabalho tem por objetivo identificar os genótipos a partir de amostras positivas por PCR para *C. trachomatis* de mulheres com diagnóstico de infertilidade e em gestantes na cidade de Manaus, Amazonas – Brasil, além de sequenciar e analisar o gene *ompA*. A população de estudo consistiu de 96 mulheres inférteis e 53 mulheres gestantes. A genotipagem foi feita pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) a partir da seqüência do gene *ompA* e os seguintes genótipos foram identificados em gestantes: D [50,0%]; E [25,0%]; F [12,5%] e I [12,5%]. Em mulheres inférteis os genótipos identificados foram: E [16,7%], F [16,7%] e K [66,7%]. A freqüência de genótipo K e D encontrada neste estudo são consideradas elevadas (66,7%) e (50,0%) e quanto à análise filogenética, verificamos que os genótipos analisados compartilham do mesmo ancestral. Sugere-se que as variações encontradas nas seqüências dos genótipos identificados surgem dos pontos de mutação ou possivelmente pela recombinação dos VD na MOMP. A região VDII foi que mais apresentou variações nas seqüências analisadas.

PALAVRAS – CHAVE: *Chlamydia trachomatis*, genotipagem, gene *ompA*, domínios variáveis, Brasil.

ABSTRACT

Despite the high prevalence and the risks associated with *Chlamydia trachomatis* in Brazil and other countries, little is known about the distribution of genotypes in Brazil and the biological variability of this important transmitting agent of sexually transmitted diseases (STDs). The absence of an inquiry routine for *C. trachomatis* and effective treatments can cause serious complications and consequences for individuals as pelvic inflammatory disease, infertility, ectopic pregnancy and neonatal infections. Currently, *C. trachomatis* presents 19 serotypes A-C associated with trachoma, D-K responsible for urogenital infections and L1, L2 and L3, agents responsible for lymphogranuloma venereum syndrome. The MOMP, which is recognized as the immunodominant antigen encoded by the *ompA* gene displays a large area of nucleotide variation of four variable domains (VDI to VDIV). Studies suggest that mutations occur frequently among genotypes and that these mutations may indicate differences between the immunogenic MOMP genotypes of *C. trachomatis*. The present work aims to identify the genotypes from samples positive by PCR for *C. trachomatis* in women diagnosed with infertility and with pregnant women in the city of Manaus, Amazonas - Brazil, in addition to sequence and analyze the *ompA* gene. The study population consisted of 96 infertile women and 53 pregnant women. Genotyping was performed by the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) from the *ompA* gene sequence and the following genotypes were identified in pregnant women: D [50.0%], E [25.0%] and F [12.5%] and I [12.5%]. In infertile women genotypes were identified: E [16.7%] F [16,7%] and K [66,7%]. The frequency of genotype K and D found in this study are considered high (66,7%) and (50,0%) and for phylogenetic analysis, we found that the genotypes analyzed shares the same ancestor. It is suggested that these variations in the sequences of genotypes identified arise from point mutations, or possibly by VD recombination in MOMP. The VDII region showed to be the most variable in the sequences analyzed.

KEY - WORDS: *Chlamydia trachomatis*, genotyping, *ompA* gene, variable domains, Brazil.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Registro de diferentes genótipos associadas às repercussões clínicas.....	42
Tabela 2- Proteínas de <i>Chlamydia trachomatis</i> reconhecidas por células T humanas e por ratos.....	53
Tabela 3- Sequência dos iniciadores KL1 e KL2 / CTP1 e CTP2.....	63
Tabela 4- Iniciadores usados na PCR do <i>ompA</i>	66
Tabela 5- Iniciadores desenhados usados na PCR do <i>ompA</i>	68
Tabela 6- Distribuição segundo a frequência da faixa de idade e estado civil das gestantes e mulheres em tratamento para infertilidade em duas Unidades de Saúde da cidade de Manaus – AM, 2012.....	76
Tabela 7- Distribuição segundo a frequência dos dados de aborto e tratamento para engravidar por parte das gestantes e mulheres em tratamento para infertilidade atendidas em duas Unidades de Saúde da cidade de Manaus – AM, 2012.....	77
Tabela 8- Distribuição segundo a frequência do resultado do exame especular em relação ao grupo de gestantes e mulheres em tratamento para infertilidade atendidas em duas unidades de saúde da cidade de Manaus – AM, 2012.....	78
Tabela 9- Distribuição segundo a frequência do resultado do PCR para <i>Chlamydia trachomatis</i> em relação ao grupo de gestantes e mulheres em tratamento para infertilidade atendidas em duas unidades de saúde da cidade de Manaus – AM, 2012.....	81
Tabela 10- Distribuição segundo a frequência do resultado do PCR da genotipagem em relação ao grupo de gestantes e mulheres com diagnóstico de infertilidade atendidas em duas unidades de saúde da cidade de Manaus – AM, 2012.....	82
Tabela 11- Tipos de <i>C. trachomatis</i> identificados por <i>BLAST</i> no <i>Genbank</i> (Manaus – AM, 2012).....	85
Tabela 12- Tipos de <i>C. trachomatis</i> identificados por <i>BLAST</i> no <i>Genbank</i> (Manaus – AM, 2012).....	86
Tabela 13- Distribuição segundo a frequência do genótipo identificado em relação ao grupo de gestantes e mulheres em tratamento para infertilidade atendidas em duas unidades de saúde da cidade de Manaus – AM, 2012.....	87
Tabela 14- Número de acesso no <i>GenBank</i> dos domínios variáveis do gene <i>ompA</i> de <i>C. trachomatis</i>	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estimativa de casos de infecção pela <i>Chlamydia trachomatis</i>	26
Figura 2- Ciclo de desenvolvimento da <i>Chlamydia trachomatis</i>	33
Figura 3- Principal proteína da membrana externa (MOMP) da <i>Chlamydia trachomatis</i>	36
Figura 4- Representação esquemática do gene <i>ompA</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i>	36
Figura 5- Infecção do trato genital feminino pela <i>Chlamydia trachomatis</i>	39
Figura 6- Fluxograma da obtenção e processamento de amostras biológicas.....	61
Figura 7- Distribuição segundo a frequência do tipo de infertilidade em mulheres atendidas em uma unidade de saúde da cidade de Manaus – AM, 2012.....	77
Figura 8- Distribuição segundo a frequência das mulheres atendidas em uma unidade de saúde para tratamento de infertilidade que tiveram gravidez ectópica, Manaus – AM, 2012.....	78
Figura 9- Distribuição segundo a frequência das mulheres cujo o exame HSG detectou fator tubário, atendidas em uma unidade de saúde para tratamento de infertilidade, Manaus – AM, 2012.....	79
Figura 10- Perfil eletroforético em gel de Agarose 2,5% corado com brometo de etídeo (1 µg/µL) evidenciando uma banda de 270 pb correspondente a amplificação de uma região microsatélite (GATA) ₁₃ do cromossoma 15 humano.....	80
Figura 11- Perfil eletroforético em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídeo (1 µg/µL) dos produtos amplificados por PCR para detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i> utilizando-se os iniciadores CTP1 e CTP2.....	80
Figura 12- Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (1µg/µL) dos produtos amplificados de <i>C. trachomatis</i> por <i>nested</i> -PCR genotipagem utilizando-se os iniciadores <i>ompAns1</i> e <i>ompAns2</i>	83
Figura 13- Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (1µg/µL) dos produtos amplificados de <i>C. trachomatis</i> por <i>nested</i> -PCR genotipagem utilizando-se os iniciadores <i>ompAns1</i> e <i>ompAns2</i>	84
Figura 14- Árvore filogenética de análises de domínio variável II do gene <i>ompA</i> de <i>C. trachomatis</i> analisadas a partir das sequências obtidas no <i>GenBank</i> de amostras de mulheres gestantes e inférteis (Manaus – AM, 2012).....	92

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1- Distribuição dos tipos de mutação por genótipo de acordo com as amostras de infertilidade e gestante na cidade de Manaus – AM, 2012.....88
- Gráfico 2- Distribuição do total de mutações por amostra de infertilidade e gestante na cidade de Manaus – AM, 2012.....89
- Gráfico 3- Distribuição do total de mutações por grupo estudado na cidade de Manaus – AM, 2012.....89

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CADD	<i>Chlamydia</i> protein associating with death domains
CAM	Centro de Apoio Multidisciplinar
Cap1	<i>Class I accessible protein 1</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control</i> – Centro de Controle de Doenças e Prevenção
CE	Corpos Elementares
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHSP60	<i>Chlamydial Heat Shock Protein 60</i>
Clininfert	Clínica de Reprodução Humana
CP	Corpo Persistente
CR	Corpos Reticulares
CrpA	<i>cysteine-rich protein A</i>
DIP	Doença Inflamatória Pélvica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DP	Desvio Padrão
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Exo	Exonuclease
FAPEAM	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
HCl	Ácido Clorídrico
HSG	Histerossalpingografia
HSV	Herpes genital
HPV	Papilomavírus Humano
HSPs	<i>Heat Shock Proteins</i> – Proteína de Choque Térmico
IDO	indoleamine 2,3-dioxygenase
IFD	Imunofluorescência Direta
IFN- γ	Interferon- γ

IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
iNOS	óxido nítrico sintetase
Kb	Quilobase
LGV	Linfogranuloma venéreo
LPS	Lipopolissacarídeo
MAbs	Anticorpos monoclonais
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
MHC	Moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
µm	Micrometro
mM	Milimolar
MOMP	<i>Mayor Outer Membrane Protein</i> - Proteína de Membrana Externa
NAAT	<i>Nucleic Acid Amplification Tests</i> - Testes de Amplificação de Ácidos Nucléicos
ng	Nanograma
NHS	National Health Service
NO	Óxido Nítrico
OMP2	<i>Outer-membrane protein 2</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open Reading Frames</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia de Polimerase
pCT	Plasmídeo críptico
pmol	Picomol
Pmp	Proteínas polimórficas de membrana
RFLP	Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição
RN	Recém-Nascido
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNA _r	Ácido ribonucléico ribossomal

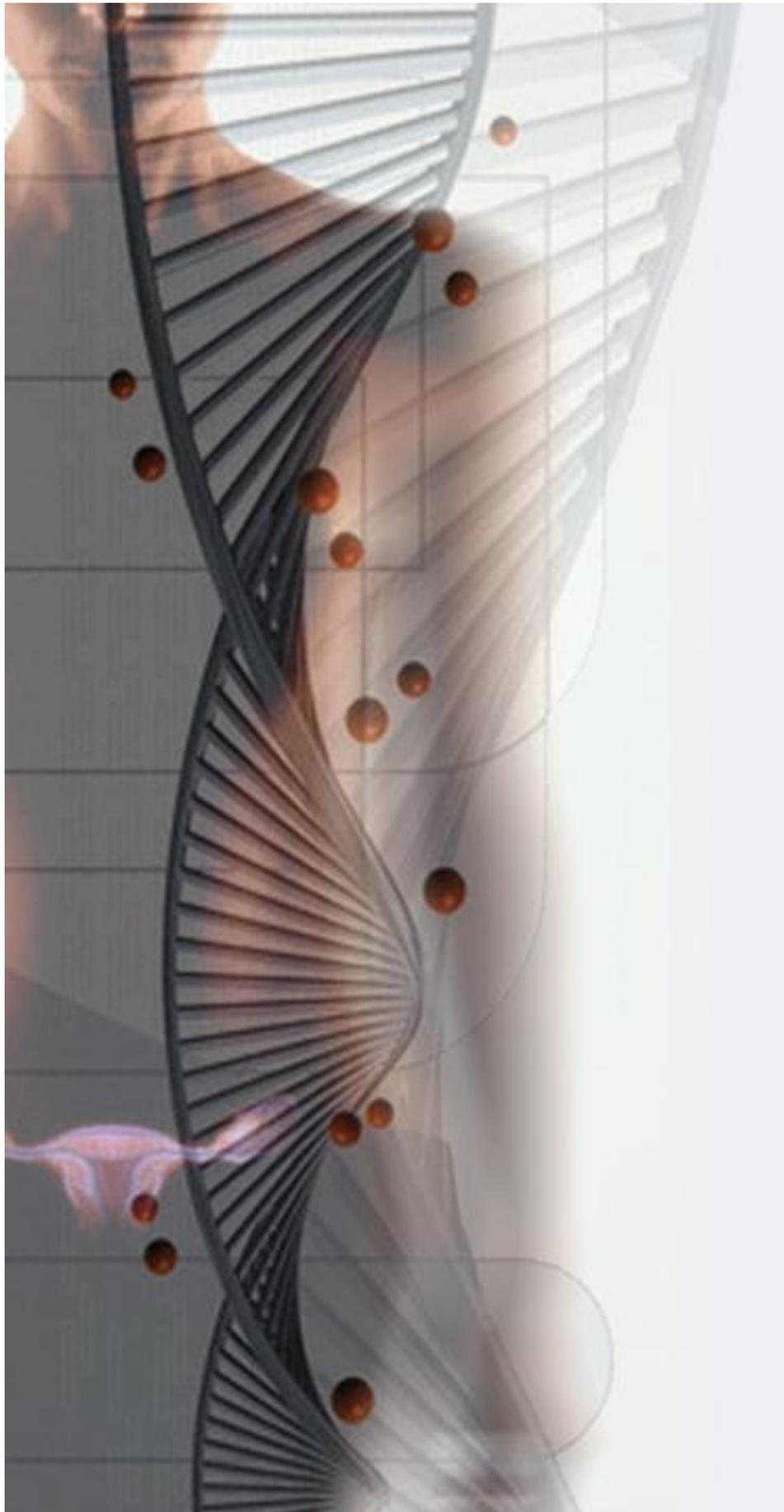
RNAt	Ácido ribonucléico transportador
rpm	Rotações por minuto
Sap	Fosfatase Alcalina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tampão de Tris-HCl e EDTA
TEB 5X	Azul de Bromofenol
Th	Células T <i>helper</i> (auxiliares)
TNF	Fator de necrose tumoral
TPK	Tampão Proleotítico
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UV	Ultravioleta
VD	Domínios Variáveis
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	23
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
2.1- Epidemiologia.....	26
2.2- Biologia e o Ciclo de Desenvolvimento da <i>Chlamydia</i>	30
2.3- Manifestações clínicas e seqüelas no trato reprodutivo da mulher causadas pela <i>Chlamydia trachomatis</i>	37
2.4- Infecção em gestantes e no recém-nascido.....	39
2.5- Infertilidade.....	40
2.6- Câncer cervical.....	42
2.7- Métodos de Tipagens em amostras clínicas de <i>Chlamydia trachomatis</i>	43
2.8- Genotipagem de <i>Chlamydia trachomatis</i>	44
2.9- Imunobiologia.....	46
2.9.1- Imunopatogênese da <i>Chlamydia trachomatis</i>	46
2.9.2- Desenvolvimento de vacina anti-clamidal e a identificação de proteínas imunodominantes reconhecidas por células T humanas.....	50
2.10- Gene <i>ompA</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i>	56
3 - OBJETIVOS.....	58
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.1 - Considerações éticas.....	59
4.2 - População em estudo.....	59
4.3 - Critérios de Inclusão (INFERTILIDADE).....	59
4.4 - Critérios de Exclusão (INFERTILIDADE).....	60
4.5 - Critérios de Inclusão (MULHERES GESTANTES).....	60
4.6 - Critérios de Exclusão (MULHERES GESTANTES).....	60
4.7 - Obtenção e processamento de amostras biológicas.....	60
4.8 - Extração do DNA das amostras.....	62
4.9 - Amplificação Controle do DNA Humano (PCR).....	62

4.10- Sistema de PCR para Controle do DNA Humano.....	62
4.11- Amplificação do DNA Plasmidial da <i>Chlamydia trachomatis</i> (PCR).....	63
4.12- Sistema de PCR para detectar DNA plasmidial da <i>Chlamydia trachomatis</i>	64
4.13- Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos de PCR para pesquisa de <i>C. trachomatis</i> com iniciadores desenhados.....	65
4.14- Genotipagem através da seqüência do <i>ompA</i> em amostras isoladas de <i>C. trachomatis</i>	65
4.14.1- Iniciadores usados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a amplificação do <i>ompA</i>	65
4.15- Sistema de PCR para a amplificação do <i>ompA</i>	66
4.16- Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos de PCR para análise do gene <i>ompA</i> do DNA de <i>C. trachomatis</i>	67
4.17- Desenho dos iniciadores que amplificam o gene <i>ompA</i> de <i>C. trachomatis</i>	67
4.18- Teste dos iniciadores desenhados.....	68
4.19- Sistema de PCR para a amplificação do <i>ompA</i> com os iniciadores desenhados.....	68
4.20- Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos de PCR para análise do gene <i>ompA</i> do DNA de <i>C. trachomatis</i> com iniciadores desenhados.....	70
4.21- Purificação dos produtos amplificados.....	70
4.22- Reação de Sequenciamento dos produtos amplificados.....	70
4.23- Precipitação dos produtos da reação de sequenciamento.....	71
4.24- Preparo das amostras para análise no ABI.....	72
4.25- Análises de tipos de mutações e dos domínios variáveis do gene <i>ompA</i> de <i>C. trachomatis</i>	72
4.26- Análise filogenética.....	73
4.27- Metodologia Estatística.....	73
5 – RESULTADOS.....	75
5.1- Características da população do estudo.....	75
5.2- Resultados Moleculares.....	79
5.2.1- Amplificação do DNA plasmidial da <i>Chlamydia trachomatis</i>	79
5.3- Genotipagem do gene <i>ompA</i>	81

5.4- Análise de diferentes iniciadores (<i>primers</i>) utilizados na PCR de genotipagem.....	82
5.5- Confirmação e análise de sequenciamento dos produtos amplificados.....	84
5.6- Análises de tipos de mutações e dos domínios variáveis do gene <i>ompA</i> de <i>C. trachomatis</i>	87
5.7- Análise Filogenética.....	91
6 – DISCUSSÃO.....	93
6.1- Análises de variáveis das características das populações estudadas.....	93
6.2- Análise de amplificação do gene <i>ompA</i> de <i>C. trachomatis</i> pelo método de PCR.....	96
6.3- Identificação de genótipos do gene <i>ompA</i> de <i>C. trachomatis</i>	97
6.4- Análise das sequências dos Domínios Variáveis e de tipos de mutações do gene <i>ompA</i> de <i>C. trachomatis</i>	99
6.5- Análise filogenética dos Domínios Variáveis de <i>C. trachomatis</i>	100
7 – CONCLUSÕES.....	102
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
9 – ANEXOS.....	121
9.1- ANEXO A.....	122
9.2- ANEXO B.....	123
10 - APÊNDICES	124
10.1 APÊNDICE A.....	125
10.2 APÊNDICE B.....	126



1 - INTRODUÇÃO

A *Chlamydia trachomatis* é reconhecida como o patógeno mais comum de transmissão sexual em todo o mundo (MOLANO et al., 2004). A infecção por clamídia é uma preocupação importante da saúde pública devido os efeitos desfavoráveis que este patógeno intracelular obrigatório poderá causar com relação à reprodução humana e em gestantes (ADETUNDE et al., 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). Em mulheres, a infecção por *C. trachomatis* causa Doença Inflamatória Pélvica (DIP) e as conseqüências devido aos longos períodos de infecção ocasiona infertilidade, gravidez ectópica e dor crônica pélvica (ADETUNDE et al., 2009; BRUNHAM e REY-LADINO, 2005; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012). Complicações como parto prematuro, ruptura prematura de membranas, infecção puerperal, conjuntivite e pneumonia neonatal são as complicações apresentadas pela infecção clamidial em gestantes e em neonatos (ADETUNDE et al., 2009; BRUNHAM e REY-LADINO, 2005; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; MMWR, 2009). A infecção genital por *C. trachomatis* também é estudada como um cofator no desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais em mulheres com história de infecção por papilomavírus humano (HPV) (ANTTILA et al., 2001; IGANSI, 2005).

A identificação dos 19 sorotipos e as variantes de *C. trachomatis* (A, B/Ba, C, D/Da, E, F, G, Ga, H, I/Ia, J, K) e (L1, L2/L2a e L3) foram baseadas em análises de imunotipagem dos epítomos da Proteína de Membrana Externa – *Major Outer Membrane Protein* (MOMP) através de anticorpos monoclonais e policlonais (BÉBÉAR e DE BARBEYRAC, 2009; CEVENINI; DONATI e SAMBRI, 2002; JURSTRAND et al., 2001; NGANDJIO et al., 2004; PEDERSEN, et al., 2000; WANG e GRAYSTON, 1991;1998; YUAN, et al., 1989). A MOMP é o principal antígeno de superfície imunodominante de *C. trachomatis* com presença de determinantes antigênicos localizados nos domínios variáveis (VDI a VDIV). Esses domínios são codificados pelo gene *ompA* e as suas seqüências nucleotídicas exibem variações distintas em diferentes genótipos. Subseqüentemente, a análise dessas seqüências distintas tem sido amplamente usada para genotipagem de *C. trachomatis* (BANDEA et al., 2001; JURSTRAND et al., 2001).

Com relação ao potencial patogênico, os genótipos A, B, Ba e C são comumente associados ao tracoma e o genótipo Ba também é encontrado no trato urogenital. Os genótipos D a K estão ligados às infecções do trato urogenital, sendo que os genótipos D, E e F são mais frequentes e os genótipos L1, L2, L2a e L3 são responsáveis pela síndrome do linfogranuloma venéreo (ALBRECHT et al., 2010; BÉBÉAR e DE BARBEYRAC, 2009; CEVENINI; DONATI e SAMBRI, 2002; GOMES et al., 2004; MILLMAN et al., 2004; RHOTON-VLASAK, 2000; SCHACHTER, 1999; YUANG, et al., 1989).

Alguns autores sugeriram que as infecções causadas por *C. trachomatis*, pertencentes aos genótipos G, I e D são associadas ao carcinoma cervical de células escamosas e a infecção crônica associada ao genótipo K em mulheres tem sido reconhecidos como causa de infertilidade (ANTTILA et al., 2001; KOSKELA et al., 2000; MARRAZZO e STAMM, 1998; MORRE et al., 2000).

Com as informações relatadas acima e considerando que a infecção por clamídia em mulheres pode levar a sérias complicações como a infertilidade, gravidez ectópica, dor crônica pélvica e sequelas responsáveis por complicações em gestantes, verificamos a necessidade de aprofundar esse estudo tendo como principal linha de investigação análise da seqüência do gene *ompA* que codifica a Proteína de Membrana Externa e identificar genótipos de *C. trachomatis*.

De acordo com Bandea et al. (2001); Dean et al. (1995); Millman et al. (2004); Stothard; Boguslawski e Jones (1998), a tipagem de cepas pertencente a *C. trachomatis* é imprescindível para estudos epidemiológicos e para pesquisa clínica de infecção causado por esse patógeno. Atualmente, os métodos de imunotipagem estão sendo substituídos por métodos de genotipagem como análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (Restriction Fragment Length Polymorphism) e/ou análise de seqüência de DNA da MOMP, o gene *ompA*. Os métodos de genotipagem, principalmente em relação ao sequenciamento do gene *ompA*, são considerados mais sensíveis e precisos na identificação de variantes de genótipos pertencente a *C. trachomatis*.

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR), a definição dos iniciadores com características específicas da seqüência alvo do DNA são fatores determinantes para uma reação bem sucedida. Neste estudo a aplicação dos iniciadores na reação de genotipagem do *ompA* de *C. trachomatis* apresentou alguns resultados variáveis, sobretudo em relação à sensibilidade na amplificação do *ompA*. Diferentes iniciadores

com sequências alvo do *ompA* foram utilizados e, no entanto, algumas amostras clínicas positivas na detecção de *C. trachomatis* por plasmídeo tiveram resultados negativos na reação de genotipagem do *ompA*.

A partir do momento que constatamos através dos estudos citados acima e em outras literaturas, que a infecção por *C. trachomatis* é atualmente reconhecida como a doença sexualmente transmissível mais freqüente em todo o mundo e a alta taxa de assintomatologia na maioria das mulheres (70% - 80%) e 50% em homens WHO (2001), verificamos a necessidade de aprofundar este estudo sequenciando e analisando o gene *ompA* codificador da membrana externa de clamídia. Portanto, o conhecimento da patogênese e genótipos de clamídia é imprescindível para a pesquisa clínica. O gene *ompA*, por ser considerado um fator importante na patogênese da infecção por *C. trachomatis*, é considerado alvo de busca de novos conhecimentos para contribuir na futura produção de novos fármacos ou vacina anti-clamidial. Como não há relato de estudo de genotipagem usando a técnica de PCR em mulheres no estado do Amazonas e a necessidade de conhecer a realidade local dessa infecção em mulheres, esta é a primeira vez a se sequenciar e analisar um dos genes responsáveis pela antigenicidade de clamídia na região Amazônica.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Epidemiologia

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a estimativa de novos casos de infecção pela *C. trachomatis* em adultos era de 92 milhões em 1999, sendo que 9,5 milhões ocorreram na América Latina e Caribe (Figura 1). Nas estimativas dos Centros de Controle de Doenças e Prevenção, nos Estados Unidos da América (EUA), existem mais casos novos diagnosticados de infecção pela clamídia do que qualquer outra DST (MMWR, 2009; WEINSTOCK; BERMAN e CATES, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). Marques et al. (2007); Weinstock; Berman e Cates (2004) e World Health Organization (2010) relataram uma estimativa de ocorrência entre 4 e 5 milhões de casos novos de clamídia a cada ano nos Estados Unidos, enquanto que Guaschino e Seta (2000) referiram-se a uma estimativa de 10 milhões de novos casos na Europa.

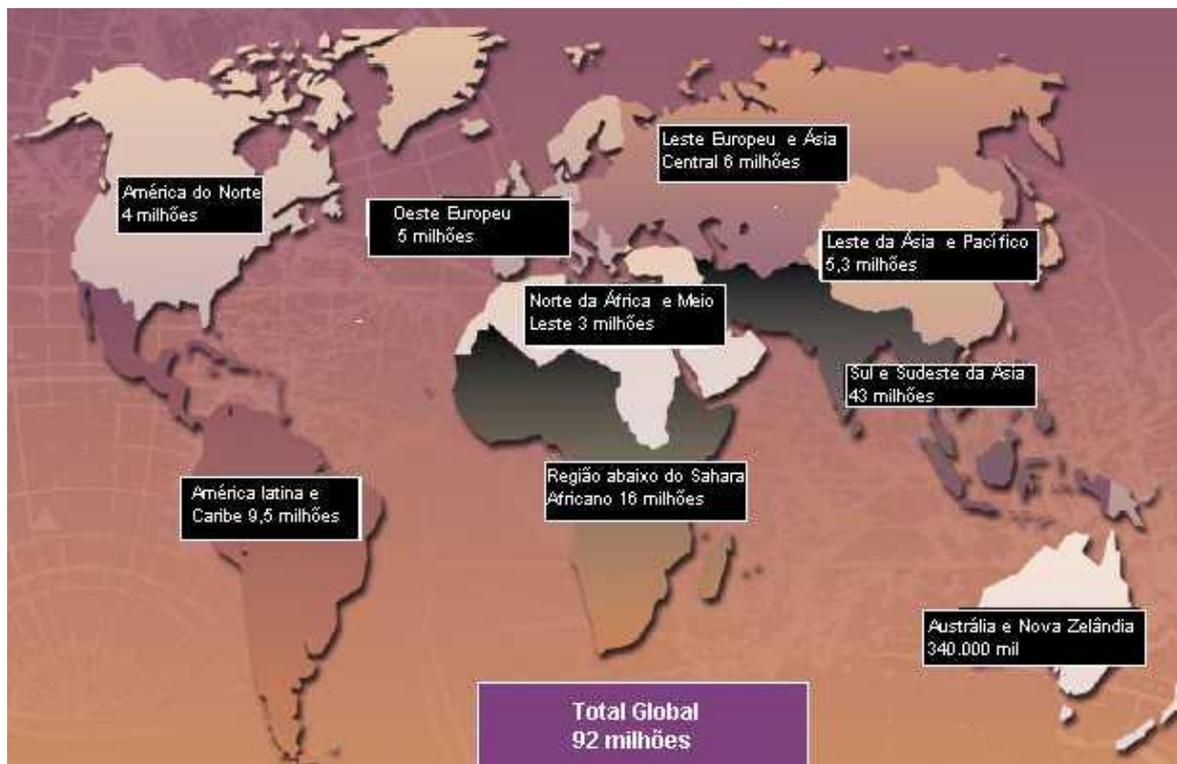


Figura 1 – Estimativa de casos de infecção pela *Chlamydia trachomatis*.

FONTE: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999; 2001.

Desde a década de 80, a infecção por *C. trachomatis* é considerada como uma das Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) mais frequentes em todo o mundo (WHO, 2001). A *C. trachomatis* é a causa mais comum de doença de transmissão sexual bacteriana, a mais notificada nos Estados Unidos e está entre as mais prevalentes DST. Desde 1994, esta infecção tem sido a de maior proporção de todas as DST reportadas no CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006; GALVIN e COHEN, 2004; MMWR, 2009).

Várias regiões demonstraram um acréscimo do número de pessoas infectadas por clamídia. Este acréscimo reflete em parte, no progresso de diagnóstico (uso de testes altamente sensíveis) e/ou mudanças no comportamento sexual (BRUNHAM e REY-LADINO, 2005; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006). Entretanto, de acordo com as informações obtidas do CDC, muitas mulheres que estão em risco de se infectarem por clamídia continuam a não serem testadas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006).

Estudos apontam que a infecção por clamídia é mais comum entre mulheres, principalmente entre adolescentes do sexo feminino e jovens senhoras do que em homens (ADETUNDE et al., 2009; MMWR, Outubro 2004). Em 2005, 976.445 casos de infecções por clamídia foram comunicados ao “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC). Muitos casos não são registrados ou diagnosticados e a estimativa é de 2,8 milhões de novos casos de infecção por clamídia a cada ano (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC, 2012). Nos Estados Unidos, numa população de 100.000 mulheres, a taxa de casos de infecção por clamídia encontrou-se três vezes maior em comparação aos homens. Adolescentes do sexo feminino nas idades de 15 a 19 anos apresentaram taxas mais elevadas de clamídia (2.796,6/100.000 habitantes), seguindo as jovens com idades de 20 a 24 anos (2.691,1/100.000 habitantes) (CDC, 2006). Foi relatado nos últimos 20 anos (1989 a 2008) no CDC, um acréscimo de 102,5 para 401,3 casos de infecção por clamídia em uma população de 100.000 pessoas, (CDC, 2008).

Segundo Frias, 2001, no Reino Unido e Estado Unidos foi demonstrada uma incidência entre 2% e 47% de endocervicite por clamídia em gestantes. Estas infecções têm um importante impacto sobre a saúde reprodutiva devido às complicações que podem acarretar (MARQUES e MENEZES, 2005).

Mulheres afro-americanas são também bastante afetadas pela infecção clamidiana. Em 2005, foram reportadas 1.729,0 casos de infecção por clamídia numa

população de 100.000 mulheres negras. Esse dado demonstrou ser 7 vezes maior em relação as mulheres brancas (237,2) e mais de que o dobro ao comparar com mulheres hispânicas (733,2) (CDC, 2006).

De acordo com a WHO, entre 8% e 12% de casais ou 50 a 80 milhões de pessoas no mundo passam de alguma forma a experiência de infertilidade durante o seu período reprodutivo. A Doença Inflamatória Pélvica (DIP) é a principal causa de infertilidade, gravidez ectópica e dor pélvica crônica. Maioria dos casos da DIP é causada pela *C. trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*. Estudos realizados sobre a prevalência de *C. trachomatis* em pacientes com DIP demonstraram que mais da metade dos casos são causados pela clamídia (PAAVONEN e LEHTINEN, 1996). Através de informações obtidas pelo CDC (2006), 40% das mulheres que não recebem tratamento para a infecção clamidial, desenvolverão DIP, e 20% delas poderão tornar-se inférteis.

A estimativa de custo anual de tratamento para os casos de DIP nos Estados Unidos chega a ser de US\$ 10 bilhões (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010) e segundo Eng e Butler (1997) a estimativa de custo para os casos de infecções por clamídia nos Estados Unidos é mais de US\$ 2,4 bilhões por ano. O *National Health Service* (NHS) gasta mais que £ 50 milhões (US\$ 79 milhões; € 72 milhões) anualmente para tratar infertilidade feminina associada à infecção clamidiana (TEMPLETON, 2002). No Brasil, não há um cálculo oficial da prevalência da infecção (GONÇALVES, et al., 2009; SEADI et al., 2002). Entretanto, no período de janeiro de 2003 até outubro de 2004, foram internadas 93.040 mulheres com DIP em todo o Brasil, representando custo total de R\$ 25.462.880,53, considerando apenas o tratamento hospitalar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

As estimativas da Coordenação Nacional de DST/AIDS demonstram a existência de 1.967,200 casos novos de clamídia a cada ano no Brasil. A incidência em mulheres e homens sexualmente ativos é de 3,5% (1.508,500 casos novos/ano) e 2,32% (478.700 casos novos/ano), respectivamente (PASSOS; VARELLA e MIRANDA, 2005; PN-DST/AIDS, 2003).

Estimativas do CDC, nos Estados Unidos, demonstram que a infecção pela *C. trachomatis* está amplamente disseminada e que existem mais casos novos desta infecção do qualquer outra DST (PASSOS; VARELLA e MIRANDA, 2003).

Segundo Manavi (2006) e MMWR (2002), para a maioria dos autores a baixa idade é considerada como um dos fatores de risco mais importantes nas pesquisas realizadas. Portanto, idade inferior a 25 anos, dependendo da população estudada, é

considerada o principal fator de risco. São incluídos também como fatores de risco mudança constante de parceiros, múltiplos parceiros e sexo sem segurança.

Na região Amazônica, há poucos dados que demonstrem a situação real da infecção por clamídia. Ishak e Ishak (2001) realizaram um estudo soroepidemiológico de populações indígenas da Amazônia e constataram uma prevalência de anticorpos para clamídia de 48,6%. De acordo com a Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST)/AIDS (1999); Ministério da Saúde (2005) e Sardinha et al. (1999) são escassos os dados epidemiológicos relativos as DST no Brasil e, especialmente, no estado do Amazonas devido a sub-notificação de casos. Com isso, não existem dados que demonstrem a verdadeira situação das infecções por *C. trachomatis*. Segundo o Ministério da Saúde (2006), apenas a AIDS, HIV na gestante e criança, sífilis na gestante e a sífilis congênita são notificadas compulsoriamente.

Foi demonstrado em estudos no Brasil uma variação bem significativa na prevalência de *C. trachomatis*, considerando-se as técnicas laboratoriais e a análise de fatores sócio-demográficos e comportamentais (MARQUES et al., 2007). Por exemplo, no trabalho de Araújo (2002), foi realizado um estudo utilizando o método de diagnóstico da PCR na cidade de Goiânia onde foi encontrada a taxa de 19,6% para clamídia no canal cervical de mulheres atendidas num ambulatório de ginecologia.

Em Manaus / Amazonas, estudiosos encontraram 27,1% dos exames positivos para *C. trachomatis*, usando a técnica de imunofluorescência direta e anticorpos monoclonais em esfregaços endocervicais, confirmando-se então a alta prevalência da infecção por clamídia em mulheres sexualmente ativas (ALENCAR; FERREIRA; LOUREIRO, 1993).

Observou-se uma positividade de 20,6% usando a técnica por PCR em esfregaços endocervicais em mulheres sexualmente ativas na cidade de Manaus / Amazonas (SANTOS et al., 2003).

Estudos recentes realizados por Alfaia (2005) e de Lima Freitas et al. (2011), encontraram resultado de 11,0% e 52,8% de gestantes atendidas em uma clínica de baixo risco e em uma clínica de infertilidade infectada por clamídia, respectivamente, em Manaus/Amazonas usando também a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase.

Em 2008, Jalil e colaboradores publicaram resultado de uma pesquisa de DST na população geral e em grupos vulneráveis (em gestantes) de seis capitais de cinco regiões do Brasil (Manaus/AM, Fortaleza/CE, Goiania/GO, Rio de Janeiro/RJ, São Paulo/SP e

Porto Alegre/RS). O estudo demonstrou uma prevalência de clamídia de 9,4%. A técnica usada para detectar clamídia no estudo citado acima foi de captura híbrida.

Pelo que já foi mencionado, mesmo em países desenvolvidos, como EUA, as infecções por *C. trachomatis* ainda são inadequadamente controladas pelos serviços de saúde, apesar da ênfase na prevenção. Conscientes da real situação, o CDC e a Associação Americana de Saúde Social, no ano passado passaram a indicar rastreamento de rotina para todas as mulheres sexualmente ativas (MMWR, 2002; 2011; PASSOS; VARELLA e MIRANDA, 2005).

No Brasil, nos serviços públicos, são raros os locais que oferecem a pesquisa desse patógeno. Nos serviços privados, geralmente só se pesquisa clamídia em casos sintomáticos ou quando um dos parceiros sexuais relata a presença da infecção. Mesmo nessas situações, infelizmente, a pesquisa de *C. trachomatis* ainda não faz parte da rotina da maioria dos profissionais de saúde que atendem DST (ELEUTÉRIO et al., 2007; PASSOS; VARELLA e MIRANDA, 2005). Portanto, a prevalência de infecção por *C. trachomatis* entre mulheres em várias cidades no Brasil ainda é uma realidade desconhecida (ELEUTÉRIO et al., 2007).

2.2 - Biologia e o Ciclo de Desenvolvimento da *Chlamydia*

A *C. trachomatis* pertence à família Chlamydiaceae e é responsável pela etiologia de patologias diferentes, associadas às biovariedades como tracoma, linfogranuloma venéreo e infecções genitais (BÉBÉAR e BARBEYRAC, 2009; CEVENINI; DONATI e SAMBRI, 2002; MOLANO et al., 2004).

Os membros da família Chlamydiaceae, assim como os vírus, são parasitas intracelulares obrigatórios, o que significa que não podem crescer em meio artificial livre de células. As principais características desta bactéria são: apresentam parede celular semelhante a das bactérias gram-negativas, a qual é composta por fosfolipídios, lipídios, lipopolissacarídeos e proteínas; são patógenos intracelulares obrigatórios que parasitam exclusivamente as células eucarióticas (ADETUNDE et al., 2009; BÉBÉAR e BARBEYRAC, 2009; CARVALHO; ANGELI e KRAJEDEN, 2004; CDC, 2002; CEVENINI; DONATI e SAMBRI, 2002; LONGBOTTON e COULTER, 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Além do mais, as *Chlamydias* possuem comprimento aproximado de 0,2–1,5 µm (BIROS et al., 2007) e são apresentadas como

um dos mais prevalentes patógenos bacterianos que podem ser transmitidos por contato sexual (ADETUNDE et al., 2009; CANADA COMMUNICABLE DISEASES REPORT–CCDR, 2005; PEELING e KING, 1999; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Em função do parasitismo obrigatório e à sua pequena dimensão, as clamídias foram consideradas por muito tempo como vírus (MIRANDA; GADELHA e PASSOS, 2003), pois, a presença de *C. trachomatis* em células eucarióticas requer energia para desenvolvimento do seu ciclo (KALTENBOECK; KOUSOULAS e STORZ, 1993). Diferem também dos vírus, pois possuem um DNA e um RNA, ribossoma que evidencia uma atividade de síntese de proteínas (MIRANDA; GADELHA e PASSOS, 2003).

Chavez et al. (2011), em seu texto de revisão sobre as características das clamídias, descreveram que são consideradas parasitas antigênicamente fracas, portanto requerem um quadro de infecção persistente causando danos no trato genital superior. Segundo Kulkarni et al. (2001), as células infectadas pela *C. trachomatis* secretam maior quantidade de citocinas resultando em um estado inflamatório mais acentuado.

Quanto a classificação taxonômica destes parasitos, uma nova classificação foi proposta com base na análise da sequência dos genes que codificam para 16SrRNA e 23SrRNA dividindo assim a ordem *Chlamydiales* em 4 famílias: *Chlamydiaceae* contendo dois gêneros: *Chlamydia* e *Chlamidophila*; *Simkaniaceae*; *Parachlamydiaceae* e *Waddliaceae* (EVERETT; BUSH e ANDERSON, 1999). Carvalho; Angeli e Krajeden (2004); Cevenini; Donati e Sambri (2002) e Murray et al. (2004) descreveram que estes parasitos são desprovidas de motilidade e apenas três espécies são classificadas como patógenos humanos: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* e *C. psittacci*. As espécies *trachomatis*, *pneumoniae* e *psittacci* são reconhecidas como patógenos humanos, embora a *psittacci* é reconhecida também como patógeno animal. A *Chlamidophila psittacci* infecta primeiramente as aves, bovinos e ovinos e pode desencadear em humanos uma doença respiratória por exposição ao material infeccioso (geralmente fezes de aves infectadas).

A clamídia possui um ciclo de desenvolvimento bifásico de replicação dentro de vacúolos na célula hospedeira, formando inclusões citoplasmáticas características, algo considerado exclusivo entre as clamídias (BÉBÉAR e BARBEYRAC, 2009; BRUNHAM e REY-LADINO, 2005; CEVENINI; DONATI e SAMBRI, 2002; GRIMWOOD; OLINGER e STEPHENS, 2001; MURRAY et al., 2004; PAAVONEN e

EGGERT-KRUSE, 1999). Conforme já escrito, os membros da ordem *Chlamydiales* são bactérias filogeneticamente distintas de todas as bactérias conhecidas, porque possuem um ciclo de desenvolvimento bifásico único que as diferencia de todos os outros procariotos (CEVENINI; DONATI e SAMBRI, 2002). O ciclo de desenvolvimento da clamídia ocorre dentro da célula hospedeira, garantindo com isso um meio ambiente livre da competição com outros microrganismos e preservação da ação do sistema imune (SILVA e LONGATTO, 2000). A replicação apresenta um ciclo multimórfico e sem sincronismo de desenvolvimento. Dentro deste ciclo multimórfico ocorrem duas formas bem distintas: os corpos elementares (CE) e os corpos reticulares (CR) (BÉBÉAR e BARBEYRAC, 2009; BRUNHAM e REY-LADINO, 2005; HALL, 1997; MOULDER, 1991; SCHACHTER e STAMM, 1999). O corpo elementar é um pequeno coco eletro-denso de 300 nm a 400 nm de diâmetro com numerosos ribossomos circundados por uma rígida parede trilaminar. É uma forma infecciosa, metabolicamente inativa, que não se divide e é capaz de sobreviver na região extracelular (GREGORY; GARDNER e BYRNE, 1979; MURRAY et al., 2004). Esta partícula, que é considerada infecciosa e metabolicamente inativa, penetra no organismo através de solução de continuidade na pele ou mucosas. Logo a seguir, essa partícula adere a célula do hospedeiro suscetível, que parece envolver uma interação específica entre receptores de membrana (Figura 2). Embora os receptores de membrana celulares ainda sejam desconhecidos, estudos correlacionam a proteína dissulfeto isomerase do complexo receptor de estrogênio de células epiteliais humanas com o polissacarídeo sulfatado (*heparan sulfate*) pertencente a *C. trachomatis* sorotipo E. Essa associação atua como mediador na adesão e invasão celular (DAVIS et al., 2002). Ainda mais, a molécula *heparan sulfate* já identificada no corpo elementar, adere a fibronectina da célula hospedeira. Portanto, esta adesão forma uma ponte molecular que facilita a entrada da bactéria na célula hospedeira (KLEBA et al., 2002).

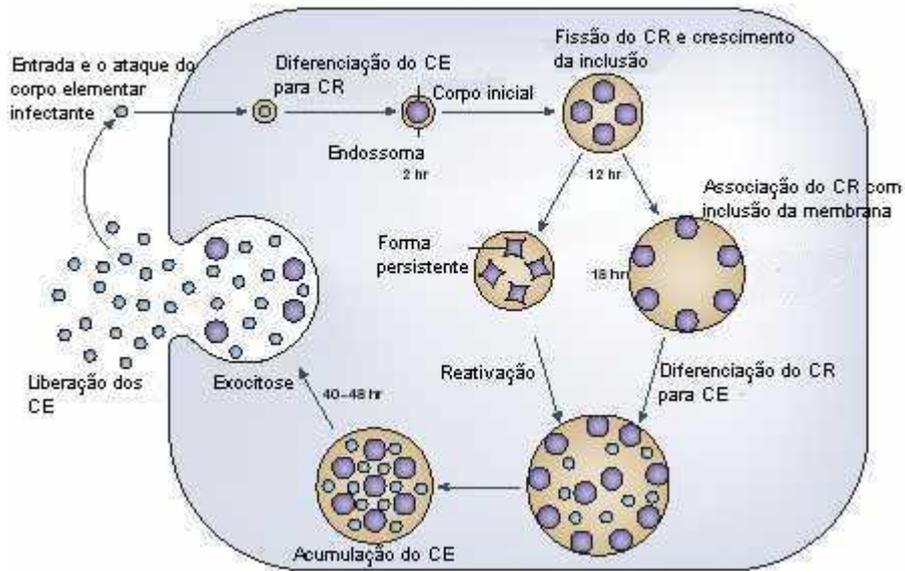


Figura 2 – Ciclo de desenvolvimento da *Chlamydia trachomatis*.

FONTE: BRUNHAM E REY-LADINO, 2005.

Uma vez aderida à célula hospedeira, através das microvilosidades, a clamídia penetra na célula hospedeira por um mecanismo de endocitose e é rapidamente internalizada pelo macrófago inibindo a fusão fagolisossômica. O corpo inicial internalizada na célula hospedeira divide-se por fissão binária e origina novos CE. O conjunto de novos CE envolvidos pela vesícula fagocítica é denominado corpo de inclusão, que por sua vez é constituído por microcolônias bacterianas intracelulares. O CE passa por um processo de redução das ligações entre as proteínas da membrana e a ativação de adenosina trifosfatase, que por fim, degrada o ATP da célula hospedeira. Esse processo requer ganho de energia para sua reorganização estrutural em uma forma replicativa, o corpo reticular (CR) (MAHONY; COOMBES e CHERNESKY, 2003). Portanto, nesta transformação, o CE dá origem a uma forma metabolicamente ativa, o CR. O CR é constituído em uma estrutura menos densa de diâmetro (800 nm a 100 nm), resultando assim a síntese de RNA, DNA e outras proteínas (MAHONY; COOMBES e CHERNESKY, 2003). Essas partículas reticuladas utilizam os substratos do hospedeiro para se dividir. Embora os CR sejam definidos como elementos osmoticamente instáveis e incapazes de infectar células vizinhas, sofrem divisão por fissão binária produzindo assim uma grande inclusão citoplasmática (STAMM; JONES e BATTEIGER, 2005; WARFORD; CHERNESKY e PETERSON, 1999). Esta inclusão

contém de 100 a 1000 novos de CE e aproximadamente 40 a 48 horas a partir da infecção celular, o macrófago é rompido, liberando os corpos elementares infectando células vizinhas (BRUNHAM e REY-LADINO, 2005; MOULDER, 1991; SCHACHTER e STAMM, 1999).

Os sinais que controlam a transformação morfológica do CR para CE ainda são pouco conhecidos. Sabe-se, porém, que esta transformação requer em parte a oxidação de proteínas da membrana externa de clamídia, que por sua vez são ricas em cisteína e importante na formação de ligações dissulfeto. Sobre esta transformação, os CE possuem semelhança a esporos. Portanto, os CE são reconhecidos como elementos rígidos, osmoticamente estáveis e adaptados para a sobrevivência extracelular (MAHONY; COOMBES e CHERNESKY, 2003; STAMM; JONES e BATTEIGER, 2005). Stenner-Liewen et al. (2002) descreveram formas diferentes de liberação dos CE: por processo de exocitose, extrusão da inclusão citoplasmática ou por lise celular. Um dos mecanismos utilizados pela bactéria para se liberar e infectar novas células de hospedeiros é através da proteína clamidial CADD (*Chlamydia* protein associating with death domains). Esse processo conduz a célula parasitada a apoptose e a associação com os receptores da família TNF (fator de necrose tumoral) do hospedeiro.

Segundo os autores Mahony; Coombes e Chernesky (2003); Morrison (2003), com o padrão de expressão gênica alterado, as clamídias assumem a forma de corpo persistente (CP), que contribui para sua sobrevivência intracelular, servindo assim reservatório para as reinfecções. A forma de CP parece haver com a exaustão de nutrientes, concentração sub-ótima de antibióticos e a presença de interferon gama (IFN- γ).

A habilidade da clamídia de poder se transformar da forma não infecciosa para a forma infecciosa em células hospedeiras torna-se difícil a sua própria eliminação. Pouco se conhece sobre os mecanismos específicos membranares da clamídia, como o mecanismo de endocitose, multiplicação do parasito na célula hospedeira, transformação da forma inativa do CE para a forma ativa do CR e a expressão antigênica na vigência do ciclo celular (CEVENINI; DONATI e SAMBRI, 2002; PAAVONEN e EGGERT-KRUSE, 1999). No entanto, de acordo com Cevenini; Donati e Sambri (2002); Paavonen e Eggert-Kruse (1999) e Stephens et al. (1998), atualmente existem novas informações referente à biologia celular da clamídia. Após o seqüenciamento do genoma da clamídia, foram reveladas características relacionadas à sua própria biologia. Várias proteínas associadas à patogenicidade foram caracterizadas

e a filogenia dos genes da clamídia está relacionada a um processo bastante complexo evolutivo de adaptação intracelular obrigatório. Desde então, é possível adentrar com maiores detalhes, tanto *in vivo* e *in vitro*, o *link* entre a infecção clamidial e as doenças específicas relacionadas à infecção. Essa informação molecular nos direcionou para um melhor entendimento do que abrange os patógenos intracelulares obrigatórios.

Embora, Beatty; Morrison e Byrne (1994) relataram que a infecção clamidial tem o seu início pelo o contato do CE com a superfície apical do epitélio da célula alvo, Cevenini; Donati e Sambri (2002) descreveram que ainda não foram identificadas as estruturas de adesão ou receptores correspondentes às células eucarióticas. No entanto, pensa-se que a adesão da clamídia às células hospedeiras possa acontecer possivelmente através de interações moleculares e diferentes mecanismos. De acordo com Paavonen e Eggert-Kruse (1999), já propuseram mecanismos de fagocitose e presença de receptores mediadores para endocitose e pinocitose.

Ainda mais, a rigidez de membrana é conferida por ligações de dissulfeto entre as MOMP e por sua vez são ricas em resíduos de cisteína, existindo em maior quantidade nos CE do que nos CR (MOULDER, 1991). A *C. trachomatis* possui uma característica interessante ao se referir a não inclusão de cisteína, pois, a falta deste elemento pode atrasar a diferenciação dos CR em CE nas inclusões intracitoplasmáticas, sendo esse processo normalizado pela sua reintrodução. Os dois tipos de estruturas celulares descritos no ciclo celular de clamídia possuem uma grande quantidade de MOMP (MOULDER, 1991). A MOMP fica localizada na superfície da membrana celular e está associada ao lipopolissacarídeo (LPS) e por sua vez, os epítomos estão localizados na própria MOMP (CEVENINI; DONATI e SAMBRI, 2002) (Figura 3).

Rodríguez-Marañón et al. (2002), relataram em seu texto de revisão sobre a composição da MOMP, além de existir 4 domínios variáveis (VD) na sua estrutura, há 5 domínios constantes (CD) intercaladas entre os VD (Figura 4).

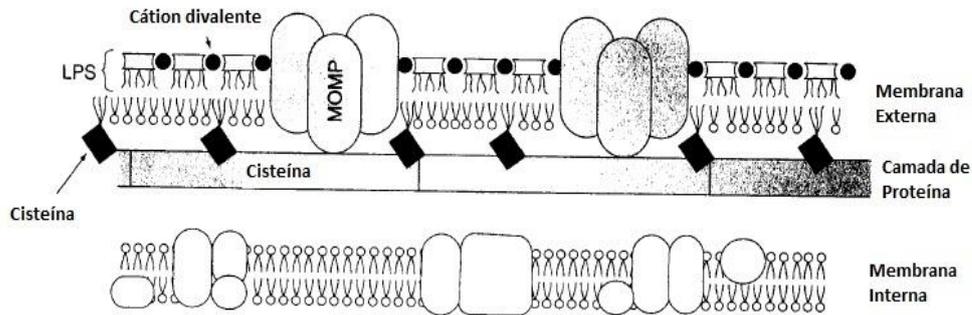


Figura 3 – Principal proteína da membrana externa (MOMP) da *Chlamydia trachomatis*.

FONTE: HATCH, 1996.



Figura 4 – Representação esquemática do gene *ompA* de *Chlamydia trachomatis*.

FONTE: Modificada – SPAARGAREN et al., 1995.

As MOMP, que têm sido utilizadas para classificar os diferentes genótipos da *C. trachomatis*, servem como estruturas de adesão (SU e CALDWELL, 1991). Embora os diferentes genótipos de *C. trachomatis* apresentem diferentes tropismos de tecidos, todos infectam as células epiteliais (ROAN; STARNBACH, 2008). As células mais suscetíveis são as colunares endocervicais ou metaplásicas escamosas e parabaisais do trato genital inferior (SILVA e LONGATTO, 2000). Murray et al. (2004), descreveram que os receptores para corpo elementar são restritos principalmente às células epiteliais não-ciliadas, colunares, cúbicas ou de transição, que são encontradas nas membranas mucosas da uretra, endocérnix, endométrio, trompas uterinas, ovários, reto e conjuntivas.

A *C. trachomatis* possui uma característica interessante ao se referir ao seu ciclo vital. Depende de proteínas específicas e da capacidade da célula hospedeira em gerar

energia e outros intermediários metabólicos, portanto, depende do estado nutricional da célula hospedeira para sua multiplicação (MOULDER, 1984). Conforme o que já foi descrito, as clamídias não são capazes de produzir seu próprio ATP, composto essencial para o metabolismo e respiração (CEVENINI; DONATI e SAMBRI, 2002). Essas bactérias realizam o processo de transcrição com RNA polimerase própria, mas para isso, é necessária a utilização dos nucleosídeos trifosfatos da célula hospedeira, assim como a de alguns aminoácidos que elas não são capazes de produzir. O RNAm é produzido a partir do DNA cromossômico usando a RNA polimerase do corpo elementar. Tanto o RNAt quanto o RNA ribossomal também estão presentes no corpo elementar (ALLAN e PEARCE, 1983; MOULDER, 1984; SILVA e LONGATTO, 2000; STEPHENS et al., 1998).

Uma outra característica interessante e com base nas suas características biológicas, o glicogênio é retido durante o desenvolvimento da inclusão citoplasmática. Possivelmente, o glicogênio providencia uma energia extra no processo de inclusão citoplasmática da *C. trachomatis* (PAAVONEN e EGGERT-KRUSE, 1999).

2.3 - Manifestações clínicas e seqüelas no trato reprodutivo da mulher causadas pela *Chlamydia trachomatis*

Biologicamente, mulheres são mais suscetíveis para maioria das infecções transmitidas pelo ato sexual do que os homens. Esta explicação deve-se a anatomia da vagina e superfície da mucosa exposta para uma grande quantidade de patógenos durante o ato sexual, passando-se a oferecer uma menor proteção efetiva contra os agentes infecciosos (WHO, 2005). A maioria das mulheres com infecções de transmissão sexual tendem apresentar-se assintomáticas e, portanto, não buscam tratamento. O não diagnóstico e não tratamento de infecções transmitidas pela relação sexual são as causas da cronicidade da infecção e numerosas complicações sofridas pelas mulheres (WHO, 2010; WYRICK, 2002).

De acordo com Bébéar e Barbeyrac (2009); CDC (2006); Rhoton-Vlasak (2000); United States Preventive Services Task Force (2002), a *C. trachomatis* pode acometer vários locais do organismo, causando, assim, manifestações clínicas bem diferentes.

Dentre estes acometimentos, em mulheres, destacamos: uretrites, cervicites, endometrites, salpingite, salpingo-ooforites, câncer cervical e peri-hepatite (Síndrome de *Fitz-Hugh-Curtis*).

O epitélio endocervical é o tecido que é mais freqüentemente infectado, e a maioria dos casos é assintomática. Quando sintomática, pode apresentar dor no hipogastro, febre, náuseas, disúria e endocervicite friável com a presença de muco purulento. A infecção primária acomete o epitélio cilíndrico endocervical, considerado reservatório de infecção (ADETUNDE et al., 2009; BARNES e SCHACHTER, 1997; BÉBÉAR e BARBEYRAC, 2009; De PALO, 1996; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

Além de causar uretrites, cervicites, endometrites e doença inflamatória pélvica nas mulheres, a infecção pode evoluir com complicações (Figura 5). As mais freqüentes são a infertilidade (formação de fibrose das trompas de Falópio), a gestação ectópica e, menos freqüentemente, a chamada síndrome de *Fitz-Hugh-Curtis* (peri-hepatite). Estudos realizados entre essas pacientes com quadros de infertilidade por lesões tubárias e gravidez ectópica demonstraram positividade três vezes maior para os anticorpos contra *C. trachomatis* do que na população normal (BÉBÉAR e BARBEYRAC, 2009; CDC, 2006; MOL et al., 1997).

Acredita-se que a doença inflamatória pélvica é resultado da distribuição de microrganismos no canalículo do endocérvice para o endométrio, mucosa da tuba uterina, ovários e o peritônio (BARACAT e LIMA, 2005; WHO, 2005). A DIP é uma síndrome clínica que compreende um espectro de desordens inflamatórias do trato genital superior (acima do orifício interno do colo uterino), incluindo qualquer combinação de endometrite, salpingite, ooforite, abscesso tubovariano e pelviperitonite. A patogênese das seqüelas em longo tempo da infecção por clamídia ainda é pouco entendida, mas sabe-se que entre 10% a 40% das mulheres com cervicites por clamídia e não tratadas clinicamente desenvolvem sintomas de DIP (ADETUNDE et al., 2009; CDC, 1991; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; TOTH et al., 2000). Seqüelas de DIP como obstrução tubária e aderências pélvicas podem acarretar em infertilidade, gravidez ectópica e dor pélvica crônica. A gravidade dessas seqüelas está relacionada com a duração da doença (BARACAT e LIMA, 2005; HAMDAD et al., 2004; WHO, 2005).

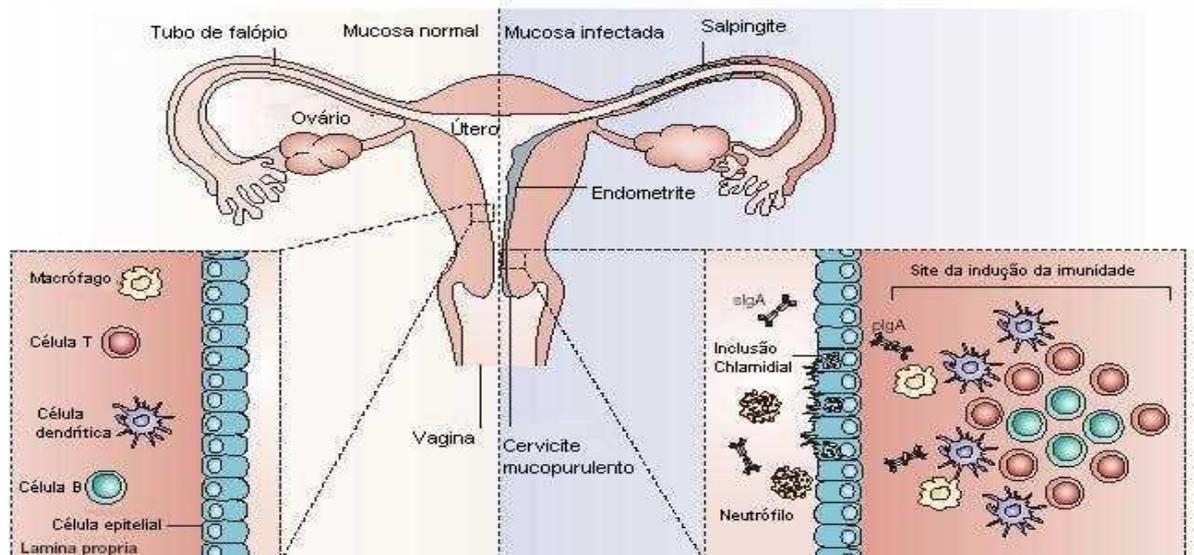


Figura 5 – Infecção do trato genital feminino pela *Chlamydia trachomatis*.

FONTE: BRUNHAM e REY-LADINO. 2005.

O gonococo e a clamídia são considerados como os patógenos primários, pois representam a primeira onda de invasão microbiológica das tubas uterina. As lesões provocadas por essas bactérias diminuem o potencial de defesa tubário, permitindo a invasão de outros agentes, considerados como os patógenos secundários. A clamídia provoca lesões com tendência a cronicidade, evocando-se mecanismos imunológicos para sua própria manutenção. Por esta razão, é possível a presença de infecções assintomáticas por esta bactéria (DESSUS-BABUS et al., 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

2.4 - Infecção em gestantes e no recém-nascido

A infecção por clamídia pode resultar em mau prognóstico da gravidez. Estudos apontam que a relação direta das infecções neonatais por *C. trachomatis* se deve a exposição com as mães infectadas durante o parto vaginal (ADENTUNDE et al., 2009; PAAVONEN e EGGERT-KRUSE, 1999). Em gestantes, alguns estudos demonstram que a infecção por clamídia pode resultar em endometrite pós-parto, prematuridade de parto, ruptura prematura de membranas amnióticas e aborto

espontâneo. (ADENTUNDE et al., 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; RHOTON-VLASAK, 2000; UNITED STATES PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE, 2002). A endometrite pós-parto ocorre em 30% das mulheres com infecção antenatal por clamídia. Infecções perinatais causando a conjuntivite/oftalmia neonatal, cegueira, pneumonia neonatal, baixo peso ao nascer são as seqüelas observadas oriunda de clamídia (BÉBÉAR e BARBEYRAC, 2009; GERBASE et al., 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Portanto, segundo os autores, a infecção por *C. trachomatis* é reconhecida como a causa mais comum de conjuntivite em neonatos e é considerada uma das causas mais comuns de pneumonia na primeira infância (BÉBÉAR e BARBEYRAC, 2009; GERBASE et al., 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Bébéar e Barbeyrac (2009) descreveram que a transmissão das infecções ao recém-nascido (RN) ocorre por exposição a secreções vaginais infectadas e por sua vez a taxa de transmissão via secreção vaginal é alta (50%-70%). Aproximadamente 30 a 50% dos RN de mães infectadas por clamídia terá conjuntivite de inclusão 5 a 10 dias após o nascimento. Cinquenta por cento (50%) dos neonatos com conjuntivite terá infecção nasofaríngea e o não tratamento da infecção adquirido ao nascimento poderá persistir por meses ou até anos. A presença de infecção por clamídia em nasofaringe é bastante freqüente, porém, assintomática e aproximadamente 30% das crianças com infecção em orofaringe poderão desenvolver pneumonia (BÉBÉAR e BARBEYRAC, 2009; BÉBÉAR e GROMBS, 2010; GOH e FORSTER, 1993; HAMMERSCHLAG, 1989).

Foram reportados casos de infecções por *C. trachomatis* em RN por partos cesarianos associado com ruptura prematura de membranas. Entretanto, Gencay et al. (2000) relataram casos de infecção intra-uterina em mães infectadas sem história de ruptura de membrana. As infecções por clamídia na vagina e faringe de neonatos também foram observadas (CHERNESKY, 2005). Infecções assintomáticas da vagina e do reto podem ocorrer em 15% das crianças nascidas de gestantes infectadas (GOH e FORSTER, 1993; HAMMERSCHLAG, 1989).

2.5 - Infertilidade

Definições de infertilidade geralmente são referidas às mulheres, devido à inabilidade da mulher de poder conceber mesmo quando a conseqüência provém do sexo masculino. Segundo Borges et al. (2005), a infertilidade conjugal é a incapacidade

de concepção após um ano de vida sexual ativa e regular, sem uso de qualquer método contraceptivo. As definições de infertilidade usadas pelo Borges et al. (2005), são as seguintes: Infertilidade Primária: A mulher que não conseguiu conceber após 1 ano de exposição a gravidez e não houver gestação anterior e Infertilidade Secundária: A mulher teve uma concepção anteriormente, mas não consegue conceber mais posteriormente.

Nas mulheres, as complicações mais temíveis de uma infecção por clamídia são a salpingite e a DIP, conseqüentemente afetando a vida reprodutiva feminina, ocasionando por sua vez, infertilidade definitiva (CDC, 2006; PAAVONEN e EGGERT-KRUSE, 1999; WIESENFELD, 2002).

A endocervicite por clamídia é considerada uma infecção silenciosa, de alta prevalência e com uma série de repercussões clínicas para as mulheres. Quando não tratada a tempo, essa infecção ascende às trompas, causando a DIP e aderências. A DIP pode causar seqüelas permanentes nas trompas e útero e essas seqüelas incluem a dor pélvica crônica, infertilidade e gravidez ectópica (CDC, 2006; GONÇALVES, et al., 2009). Segundo Haggerty et al. (2003) e Rogstad (2008), a endometrite freqüentemente acompanha a salpingite e por sua vez poderá produzir sangramento uterino irregular. Em um estudo de revisão, Bébéar e Barbeyrac (2009) relataram que a salpingite poderá formar uma lesão tissular ou fibrose nas tubas uterinas e conseqüentemente culminar em complicações na vida reprodutiva. Dois terços de todos os casos de infertilidade por fator tubário e um terço dos casos de gravidez ectópica tem sua origem relacionada à infecção por clamídia (PAAVONEN e EGGERT-KRUSE, 1999; PEIPERT, 2003).

Entre as mulheres que apresentam salpingite, aproximadamente 70% a 90% delas apresentam a endometrite, entretanto, 8% a 33% de mulheres que não apresentam salpingite têm endometrite. O fator tubário, ou seja, a formação das aderências das fímbrias está diretamente relacionada com o insucesso de gravidez (CDC, 2006).

De acordo com alguns estudos a infecção crônica em mulheres está associada com o sorotipo K de *C. trachomatis* e por sua vez, é a causa de infertilidade (ANTTILA et al., 2001) (Tabela 2) e quanto a sua prevalência, é a maior entre mulheres com menos de 25 anos (CDC, 2006). A freqüente assintomatologia da infecção por clamídia demonstra a importância do rastreamento e tratamento precoce (CDC, 2006; WHO, 2001). É recomendado também o rastreio anual para todas as mulheres sexualmente ativas com até 25 anos e para mulheres após os 25 anos, quando há fatores de risco identificáveis, é recomendado rastreamento anual (CDC, 2006).

Tabela 1 - Registro de diferentes genótipos associadas às repercussões clínicas.

Sorotipos	Repercussões clínicas
D a K	Infecções do trato urogenital (uretrite, epidimite, cervicite, salpingite), DIP, gravidez ectópica
K	Infertilidade
G, I e D	Carcinoma de células escamosas do colo uterino

FONTE: HSU et al., 2006.

2.6 - Câncer cervical

Para Anttila et al. (2001); Muñoz et al. (2006) e Paavonen e Eggert-Kruse (1999), *C. trachomatis* parece ser um importante co-fator de HPV para carcinoma cervical.

Estudos epidemiológicos e moleculares apontam que a infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) desempenha importante papel no surgimento da neoplasia. Necessariamente, a infecção pelo HPV por si só não é suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical, portanto, exige-se com isso a coexistência de outros fatores. Vários estudos demonstraram associações com a infecção por *C. trachomatis* e neoplasia intraepitelial cervical ou carcinoma do colo (ANTTILA et al., 2001; GONÇALVES et al., 2009; HERRERO et al., 2005; Ho et al., 1995; LEVI et al., 2004; RHOTON-VLASAK, 2000; SAMOFF et al., 2005). Além de *C. trachomatis*, associações de *N. gonorrhoeae*, Herpes genital (HSV-2) e HPV são consideradas também como prováveis co-fatores para o desenvolvimento de lesões cancerosas. A infecção por clamídia, a nível celular, poderá aumentar a susceptibilidade de HPV ao nível de epitélio basal, devido à alteração das características de células epiteliais que são formadas (SAMOFF et al., 2005).

Em um estudo de revisão, Oliveira et al. (2008) relataram a forma persistente da infecção por *C. trachomatis* e por sua vez, tem como papel facilitador na carcinogênese cervical, por meio das proteínas de choque térmico 60 (CHSP60). Durante a infecção persistente, essas proteínas sintetizadas pela *C. trachomatis* têm ação anti-apoptótica e facilitadora de atuação das oncoproteínas em células simultaneamente infectadas por HPV de alto risco (HPV tipo 16 e 18).

Antilla et al. (2001) estudaram e analisaram a associação entre a exposição a diferentes sorotipos de *C. trachomatis* e desenvolvimento de carcinoma de células escamosas dosando anticorpos IgG. O estudo foi desenvolvido por pesquisadores que realizaram testes com 181 amostras de pacientes da Finlândia, Noruega e Suécia com carcinoma cervical invasivo através de métodos de sorologia. Concluíram que pacientes positivas para *C. trachomatis* com sorotipo G mostrou-se fortemente associada com desenvolvimento de carcinoma de células escamosas do colo uterino (Tabela 1). Portanto, o sorotipo G é o que está mais fortemente associado ao desenvolvimento de carcinoma de células escamosas e que o aumento de exposições aos diferentes sorotipos aumenta o risco mostrando que há uma relação entre infecção por *C. trachomatis* e carcinoma de células escamosas. Analisaram também outros sorotipos de clamídia e verificaram que os sorotipos I e D estavam associados à lesão maligna (Tabela 1). Além do mais, evidenciaram-se a associação do sorotipo G com infecções sintomáticas e infecções do trato superior (ANTTILA et al., 2001). Todavia, a associação entre *C. trachomatis* e lesões intra-epiteliais cervicais persiste por ser esclarecida (OLIVEIRA et al., 2008).

2.7 - Métodos de Tipagens em amostras clínicas de *Chlamydia trachomatis*

Em 1957, o isolamento inicial de *C. trachomatis* tem sido importante para a caracterização de isolados clínicos para estudos epidemiológicos (SUCHLAND e STAMM, 1991). No início de 1960, o primeiro método desenvolvido de sorotipagem para *C. trachomatis* foi o teste de prevenção à toxicidade. Embora este ensaio sorospecífico fosse considerado oneroso e demorado, foi o que direcionou para a primeira classificação sorológica de cepas de *C. trachomatis* (SUCHLAND e STAMM, 1991; WANG et al., 1985) .

No início da década de 80, Wang et al. (1985) desenvolveram um painel de anticorpos monoclonais (MAbs) utilizado no ensaio de micro imunofluorescência indireta. Em relação ao primeiro método mencionado acima, este ensaio foi consideravelmente mais específico e menos laborioso, pois, não requer a imunização de ratos para tipagem em cada isolado clínico.

Atualmente, existem vários métodos de tipagem desenvolvidos para um melhor entendimento da epidemiologia e patogênese de doenças acometidas por clamídia (DEAN et al., 2009). Um dos métodos de tipagem consiste na utilização de anticorpos

monoclonais e policlonais contra a principal proteína de membrana externa. Este método identifica a diferenciação de microorganismo em sorotipos e soroclasses: classe B: (sorotipos B, Ba, D, Da, E, L₂, L_a), classe C: (A, C, H, I, I_a, J, J_a, K, L₁, L₃), e classe intermediária: (F, G) (DEAN et al., 2009). Vários estudos ressaltaram que o método de sorotipagem da MOMP é considerado por muitos laborioso e desvantajoso, pois, requer uso de cultura de células e de painel de análise de anticorpos monoclonais (KLINT et al., 2007).

Desde então, comparando-se com os métodos de sorotipagem, os métodos de genotipagem são considerados mais sensíveis e específicos para a identificação do genótipo de *C. trachomatis* com base na semelhança de aminoácidos e são comumente usados (BANDEA et al., 2001; HSU et al., 2006; MOLANO et al., 2004; YUAN, et al., 1989). Vários estudos demonstraram a viabilidade de isolados clínicos de sorotipos de *C. trachomatis* através da técnica de RFLP ou de seqüenciamento do gene *omp1* (*ompA*) (IKEHATA; NUMAZAKI e CHIBA, 2000; LYSÉN et al., 2004; NGANDIJO et al., 2004; SINGH et al., 2003). O gene da MOMP, a *omp1* (*ompA*), demonstra ter um melhor resultado de análise ao ser utilizada a técnica de genotipagem e na diferenciação entre as cepas identificadas. No *omp1* (*ompA*), há uma extensa variação na seqüência das regiões de segmentos (VS1-4), denominadas de epítomos imunogênicos, importante para estudo epidemiológico populacional e conseqüentemente para produção de vacinas (GAO et al., 2007; PETERSON et al., 1999; STOTHARD; BOGUSLAWSKI e JONES, 1998). Portanto, Brunelle e Sensabaugh (2006) relataram em um estudo de revisão que o *omp1* (*ompA*) é considerado um gene altamente polimórfico em bactéria.

2.8 - Genotipagem de *Chlamydia trachomatis*

Embora Persson (2002), em um artigo de revisão, descreveu que é proveitoso somente em alguns casos o estudo de sorologia de infecção por clamídia e estudos relacionados à epidemiologia, Jurstrand et al. (2001) comentaram que a informação obtida referente à caracterização de genótipos de *C. trachomatis* não somente identifica os genótipos e seus variantes circulantes na comunidade estudada, mas também nos oferece um melhor entendimento da epidemiologia à infecção por *C. trachomatis*.

A *C. trachomatis*, reconhecida como a bactéria encontrada especificamente em humanos, divide-se em 19 genótipos. Esta informação se baseia na imunoreatividade

específica à epítomos da MOMP (BÉBÉAR e BARBEYRAC, 2009; CEVENINI; DONATI e SAMBRI, 2002; JURSTRAND et al., 2001).

Baseando-se às diferenças de antigenicidade, além dos 19 diferentes genótipos, existem numerosos variantes que já foram caracterizados. Os genótipos A, B, Ba e C infectam a conjuntiva e estão associados ao tracoma endêmico, o maior causador de cegueira na África, Ásia, no Oriente Médio e América do Sul ; os genótipos D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J e K são predominantemente isolados do trato urogenital e estão associados com as doenças sexualmente transmissíveis, às conjuntivites de inclusão ou pneumonia neonatal em crianças nascidas de mães infectadas. Associados também às DST, referidos como doença sistêmica, os genótipos L1, L2, L2a e L3, são encontrados nos nódulos linfáticos e são associados ao linfogranuloma venéreo (BÉBÉAR e BARBEYRAC, 2009; CEVENINI; DONATI e SAMBRI, 2002; MANAVI, 2006).

Como se pode observar, de acordo com várias literaturas, a prevalência destes genótipos é bem heterogênea. Mas mesmo assim, diversos autores relatam que os genótipos mais prevalentes são D, E e F.

Os genótipos de *C. trachomatis* mais prevalentes, segundo diversos autores consultados, encontram-se da seguinte maneira: No Brasil, a identificação dos genótipos D, E, F e K foi encontrada em uma população feminina. Os genótipos D (33,3%) e E (33,3%) foram encontrados com maior frequência de amostras endocervicais (LIMA et al., 2007). Na Korea, em um estudo realizado por Lee et al. (2006), de 40 amostras positivas para clamídia, encontraram 6 diferentes genótipos. A ordem de prevalência dos genótipos encontrados nas infecções genitais segue da seguinte maneira: sorotipo E (45%), F (20%), G (15%), D e H (5%) e J (2,5%) e genótipos heterogêneos misturados (7,5%). Mesmo encontrando variedades de genótipos, o genótipo E foi o mais prevalente.

Em outro estudo realizado em Camarões, na África Central, Ngandjio et al. (2003) amplificaram e seqüenciaram com sucesso 25 cepas do gene *omp1* (*ompA*) de amostras do trato urogenital. Embora tenham obtido um pequeno número de cepas, encontraram uma variedade heterogênea de genótipos. O genótipo mais comum encontrado foi E (44%), em seguida foi F (20%) e D/Da (20%). Os genótipos J (12%) e G (4%) também foram encontrados. A predominância do genótipo E encontrado nesse estudo e outros sugere que esse genótipo possui vantagem biológica em relação aos outros genótipos. Foi sugerido pelos autores Jurstrand et al. (2001) e Ngandjio et al. (2003), com base nas suas características biológicas, essa vantagem está associada às

seqüências nucleotídicas correspondente ao gene *ompA* e as suas seqüências de aminoácidos.

Em Nova Delhi, Singh et al. (2003) encontraram um percentual de 48% do genótipo D do gene *omp1 (ompA)* de *C. trachomatis*. Em seguida, os genótipos E (34%), F (12%) e I (6%) também foram encontrados oriundos de amostras urogenitais.

Já na China, Gao et al. (2007) estudaram e identificaram sorotipos de *C. trachomatis* coletado do trato genital de mulheres de alto risco. O genótipo mais prevalente do *omp1 (ompA)*, correspondente ao sorotipo E foi (27,9%), seguindo os sorotipos F (23%), G (12,4%) e D (11,1%). Os sorotipos I (6,6%), H (2,7%) e inclusive B/Ba (1,3%) foram os menos prevalentes. De acordo com estes autores as distribuições genotípicas são semelhantes aos que foram reportadas de outros países.

2.9 - Imunobiologia

2.9.1 - Imunopatogênese da *Chlamydia trachomatis*

Embora, a infecção por clamídia possa ser facilmente tratada, diversos estudos têm mostrado que *C. trachomatis* pode persistir latente ou de forma assintomática no hospedeiro, dificultando assim, o tratamento na fase inicial (ROAN e STARNBACH, 2008). Portanto, o desafio de controlar as doenças associadas à clamídia é identificar e tratar os indivíduos infectados antes de ocorrer danos irreversíveis. Uma abordagem mais eficaz no controle de infecções é o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a clamídia (ROAN e STARNBACH, 2008).

O esclarecimento da imunobiologia da infecção por *C. trachomatis* é essencial para o desenvolvimento de uma vacina. A vacina precisa induzir a resposta imunológica que está associada à infecção ou a imunopatologia (BRUNHAM e REY-LADINO, 2005). Os microrganismos possuem componentes antigênicos capazes de provocar uma resposta imune. Ao desenvolver uma vacina, é importante saber identificar e empregar o antígeno correto para provocar uma resposta imunológica específica e protetora contra o patógeno correspondente (BRUNHAM e REY-LADINO, 2005; MARQUES e MENEZES, 2005).

Embora Darville e Hiltke (2010), comentarem em uma revisão sobre as conseqüências de infecção por clamídia estarem bem estabelecidas, o mecanismo da imunidade e danos teciduais acometidos por clamídia ainda não se encontra totalmente

esclarecido. Mas sabe-se que infecções prévias não são capazes de conferir uma resistência ou proteção eficaz às reinfecções, portanto, a clamídia possui habilidade de escapar dos mecanismos imunológicos do hospedeiro (BRUNHAM, 1999; LOOMIS e STARNBACH, 2002). Millman et al. (2004) e Paavonen e Lehtinen (1996) relataram que o sistema imunológico afetado pela *C. trachomatis* poderá contribuir para sua própria sobrevivência no hospedeiro infectado e com isso induzir infecções persistentes.

Segundo Bébéar e Barbeyrac (2009); Dessus-Babus et al. (2002); Jones (1995); Murray et al. (2004), a infecção por *C. trachomatis* confere baixa proteção contra a reinfecção e, por sua vez, é considerada de curta duração. A reinfecção induz uma intensa resposta inflamatória com conseqüentemente formação de lesão tissular. Para Gijssen et al. (2001), a re-infecção ou a reativação de uma infecção primária latente têm sido consideradas como indutoras de uma resposta imune mais exuberante. Com isso, essa resposta inflamatória pode induzir a formação de fibrose que leva a infertilidade e disfunção sexual em pacientes com infecções genitais. Já foi sugerido por alguns pesquisadores, que a infecção do trato genital feminino confere, no mínimo, uma imunidade parcial contra a manifestação da reinfecção (BÉBÉAR e BARBEYRAC, 2009; JONES, 1995; MURRAY et al., 2004).

Darville e Hiltke (2010) reforçam em uma revisão sobre as infecções crônicas por *C. trachomatis*, a natureza dessas infecções que é considerada comum e que são liberados de forma contínua os mediadores que promovem a importação de células de resposta inflamatória. Danos nos tecidos epiteliais no hospedeiro, formação de cicatrização, fibroses e novamente a formação de cicatrização tecidual correlacionam a aumento da severidade da infecção. Portanto, de acordo com esses autores, o processo de reinfecção por *C. trachomatis* é frequente.

Conforme já escrito, o sistema imune para combater a *C. trachomatis* requer uma variedade de tipos de células, cada uma efetuando uma variedade de efeitos funcionais. Um trabalho demonstrou que tanto os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ possuem o papel de proteção através da secreção de Interferon- γ (IFN- γ) (LOOMIS e STARNBACH, 2002). Portanto, segundo Bobo et al. (1997); Debattista et al. (2003); Loomis e Starnbach (2002); Ramsey et al. (2001); Shemer e Sarov (1985), na história natural da infecção clamidial, há uma forte ligação do desenvolvimento do ciclo intracelular da clamídia com a resposta imune, como a presença de IFN- γ . Provavelmente, as atividades mediadas pelo IFN- γ inibem o crescimento da clamídia em pessoas infectadas. No entanto, experimentos em humanos e em animais

demonstraram que essas atividades frequentemente resultam em *clearance* incompleta de *C. trachomatis*, portanto, a resposta inflamatória por secretar IFN- γ poderá resultar em resposta patológica. De acordo com Paavonen (2004), o dano tecidual é resultado do reconhecimento imune de antígenos específicos expressos pelo organismo. Porém, a infecção crônica do trato genital superior poderá ser também resultado de falhas ou enfraquecimento da ação das células T *helper*-1 (Th-1) e/ou resposta hiperestimulada das células Th-1. Beatty; Morrison e Byrne (1994); Paavonen e Lehtinen (1996) relataram que a indução da resposta celular pela Th-1 ou Th-2 poderá ser um fator determinante na patogênese clamidial. A Th-1 induz a ação do IFN- γ e altas concentrações do IFN- γ já foram detectadas em secreções endocervicais de pacientes com cervicites e no soro de pacientes com DIP por clamídia. Embora Darville e Hiltke (2010), em um estudo de revisão, explicarem que é essencial a participação e a resposta da célula T na defesa do hospedeiro durante o processo de patogênese por *C. trachomatis*, o grau de resposta imune da célula T no processo de infecção primária aumenta progressivamente com as subseqüentes infecções, promovendo assim, danos nos tecidos e a formação de cicatrização.

Segundo Alberts et al. (2004); Paavonen (2004), a regulação da produção de citocinas secretadas pelas células Th efectoras, é essencial para o sucesso na resposta imune quando relacionados à infecção por patógenos intracelulares. Deficiências na produção ou na atividade das citocinas podem estar associadas com processo inflamatório no hospedeiro, apresentando assim, falhas no sistema imunológico. De acordo com Rasmussen et al. (1997), o crescimento intracelular é requerido e a resposta do processo inflamatório pelas citocinas é mantida durante o ciclo de desenvolvimento clamidial.

Por isso, pode-se concluir que tanto a resposta humoral e a resposta imune mediada por células são importantes na proteção à infecção por clamídia. A vacina contra a clamídia deverá induzir anticorpos na superfície da mucosa para bloquear a entrada do CE pelo o epitélio (De la MAZA e PETERSON, 2002).

Em diversos trabalhos já foi descrito que os anticorpos são capazes de neutralizar a clamídia, inibir sua adesão à superfície celular e impedir a mudança de CE para CR no fagossomo. As células apresentadoras de antígenos (APC), presentes no local da infecção, podem apresentar fragmentos de peptídeos da clamídia ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II aos linfócitos T CD4⁺ (LOOMIS e STARNBACH, 2002). A ativação das células T CD4⁺ pode tanto inibir a replicação da

C. trachomatis como estimular a função de proteção celular através do processo imunológico e inflamatório (LOOMIS e STARNBACH, 2002). A função principal das células T CD4⁺ é de promover a ativação das células B, células CD8⁺ e outras células do processo inflamatório. Porém, Cotter et al. (1995); Ramsey; Soderberg e Rank (1988) descreveram em seus estudos que a deficiência de células B diante da infecção clamidial em ratos, demonstrou que o anticorpo não é requerido para a resolução da infecção do trato genital ou para resistência a reinfecção do trato genital. Portanto, esse fato não indica que o anticorpo não seja um componente importante para a proteção do animal imunocompetente, mas serve como parâmetro de que o anticorpo, por si só, não é suficientemente capaz de prevenir a infecção. Ainda mais, Morrison e Morrison (2001), relataram que a imunidade à reinfecção no trato genital por clamídia não depende exclusivamente dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺.

O IFN- γ possui atividades que parece limitar o processo infeccioso por clamídia. Segundo Gupta et al. (1994); Murray et al. (1989) o IFN- γ inibe a replicação de *C. trachomatis* através de 3 mecanismos. Primeiramente, o IFN- γ induz a expressão de indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), que é uma enzima hospedeira que degrada o estoque intracelular do triptofano. Como a clamídia não possui habilidade de produzir triptofano, a indução do crescimento de IDO pelo o IFN- γ limita o crescimento intracelular clamidial. O IFN- γ também regula a expressão de óxido nítrico sintetase (iNOS), que catalisa a produção de vários intermediários reativos de nitrogênio, como por exemplo o óxido nítrico (NO) (LIEW e COX, 1991; LIEW, 1994). E, finalmente, o IFN- γ não regula o receptor que expressa a transferrina na superfície das células infectadas, resultando em uma deficiência intracelular de ferro que também é considerado como um fator de limitação à replicação da *C. trachomatis* (BYRD e HORWITZ, 1993).

Por isso, Pal et al. (2001) e Peterson et al. (1988) esclarecem que o mecanismo envolvido na destruição da clamídia ainda não está bem definido. Sabe-se que os anticorpos poderão prevenir o desenvolvimento da infecção ou interferir o ciclo de crescimento da clamídia na célula eucariota.

2.9.2 - Desenvolvimento de vacina anti-clamídial e a identificação de proteínas imunodominantes reconhecidas por células T humanas

O desenvolvimento de vacinas contra *C. trachomatis* ainda é um desafio. A falta de adjuvantes (veículo estimulador inespecífico de resposta imune) como alvo para produção de vacinas, o conhecimento limitado em saber quais os antígenos de *C. trachomatis* induzem uma resposta imune de proteção e ferramentas para a manipulação genética de *Chlamydia* spp., introduzem a complexidade no processo de desenvolvimento de vacinas (IGIETSEME; BLACK e CALDWELL, 2002). Segundo Millman et al. (2004) a variação genética do *ompA*, o gene que codifica a MOMP, a diversidade e evolução dos epítomos da MOMP entre a população encontrada com DST é pouco conhecido. A MOMP tem sido o foco principal de estudo por possuir variantes sorológicos (sorotipos /genótipos); estimula as células T para a produção de anticorpos e adere e invade as células hospedeiras com tropismo celular (LEE et al., 2006). Portanto, de acordo com alguns estudos, a MOMP tem sido o foco de estudos epidemiológicos de *C. trachomatis* e a candidata principal para a produção de vacina. O *ompA* codifica e exibe uma extensa seqüência de variações ou segmentos de DNA onde pode ser localizada quatro regiões de domínios variáveis (VDI a VDIV) em diferentes genótipos. Análises de seqüências revelaram três regiões que possui uma superfície exposta com presença de peptídeos antigênicos (epítomos imunogênicos) importantes para produção de vacina (GAO et al., 2007; HSU et al., 2006; LEE et al., 2006). Ao seqüenciar os quatro segmentos variáveis, foi identificado diferenças nas seqüências no mesmo genótipo de *C. trachomatis*. De acordo com alguns estudos, a análise molecular epidemiológica é considerada importante na identificação de grupos de alto risco (HSU et al., 2006; LEE et al., 2006).

O esclarecimento da imunobiologia de *Chlamydia muridarum* em modelos de ratos infectados por clamídia, está facilitando imensamente a retomada do esforço para desenhar a vacina contra a infecção causada pela *C. trachomatis*. Atualmente, a seleção de antígenos que estimulam as células CD4⁺ Th1 é o centro de um desenho estratégico para a produção de vacinas recombinantes (BRUNHAM e REY-LADINO, 2005). Até o presente momento, poucas proteínas imunodominantes específicas para *C. trachomatis* foram identificadas (STAG et al., 1993). Segundo Stambach et al. (2003), a identificação e utilização de proteínas na proteção imune contra a infecção pela *C. trachomatis* é considerada importante e nos últimos 7 anos houve progresso

considerável com relação a caracterização de 8 proteínas alvos para o reconhecimento da célula T. Stambach et al. (2003) relataram em um estudo com ratos que a formação de proteção parcial contra a infecção pela *C. trachomatis* através da inclusão de membrana associada a proteína CrpA (cysteine-rich protein A) com epítomos de células T CD8⁺ são específicos para *C. trachomatis*. Semelhantemente, foi demonstrado em um outro estudo, uma inclusão de membrana associada à proteína de *C. trachomatis*, a Cap1 (class I accessible protein 1) com epítomos de células T, apresenta alta homologia entre os sorotipos de *C. trachomatis* (FLING et al., 2001). Dentre os candidatos antigênicos que contém epítomos de células T conhecidos, são eles:

- A MOMP (Proteína de Membrana Externa ou Mayor Outer Membrane Protein) constitui aproximadamente 60% do total da massa da membrana externa da proteína e contém vários epítomos de células CD4⁺ e CD8⁺. A MOMP é considerada o alvo principal da resposta T celular para *C. trachomatis*, soro específica, a mais estudada e a mais forte candidata para a elaboração de vacinas (BRUNHAM e REY-LADINO, 2005; CAMPBELL et al., 1990; CHRISTIANSEN; OSTERGAARD e BIRKELUND, 1994; KIM e DeMARS, 2001; MILLMAN et al., 2004; STAG et al., 1993; SU e CALDWELL, 1991).
- A OMP2 (Outer-membrane protein 2), é considerada também um antígeno imunodominante com epítomos de células CD4⁺ e CD8⁺. A OMP2 é considerada alvo para a resposta T celular do sistema imune para as infecções causadas pela *C. trachomatis* e *C. pneumoniae* (FREIDANK et al., 1993; NEWHALL; BATTEIGER e JONES, 1982; WAGER et al., 1990).
- A CHSP60, proteína de choque térmico 60 (chlamydial heat shock protein 60), principal componente clamidial, está associada com seqüelas de longa duração nas tubas uterinas. A presença da CHSP60 na membrana externa do corpo elementar ocorre durante o processo de modificação intracelular do corpo reticular para corpo elementar. Indivíduos com predisposição genética apresentando resposta imune deficiente poderão desencadear um ciclo persistente de infecção associada com uma contínua estimulação antigênica na inflamação crônica, podendo resultar em cicatrização nas tubas uterinas (KINNUNEN; PAAVONEN e SURCEL, 2001).

- PmpD, proteína de membrana polimórfica D (polymorphic membrane protein D) é considerada potencialmente antigênica e contém epítomos de células T (BRUNHAM e REY-LADINO, 2005). A função e o desenvolvimento das Pmps nas clamídias permanecem desconhecidos. De fato é desconhecida, se a variação evidenciada na seqüência do genoma é utilizada pela bactéria durante o ciclo de desenvolvimento para interagir com a célula hospedeira ou entre as cepas (GRIMWOOD; OLINGER e STEPHENS, 2001).

Segundo Clifton et al. (2004); Dongre et al. (2001), componentes de *C. trachomatis* do Sistema de Secreção Tipo III (Components of the *C. trachomatis* Type III Secretion System) fazem parte do principal mecanismo de virulência do organismo. As proteínas secretadas por este sistema entram no citosol, se replicam dentro da APC e são apresentadas para moléculas de MHC classe I (Moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade), estimulando uma resposta citotóxica ou células T CD8⁺.

A criação de vacinas para estimular a imunidade protetora contra *C. trachomatis* e outros patógenos bacterianos intracelulares requerem uma incorporação de vários antígenos (Tabela 2). As misturas de antígenos deverão estimular o sistema imune, incluindo as células de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e produção de anticorpos (LOOMIS e STARNBACH, 2002). Aproximadamente 8% a 57% das amostras clínicas de doenças sexualmente transmissíveis são misturas de diferentes infecções (ALZHANOV et al., 2007; BAILEY et al., 1994; DEAN et al., 1992; DEAN et al. 1995; SPAARGAREN et al., 2005). Brunham e Rey-Ladino (2005); Loomis e Starnbach (2002) relataram que a produção de células T CD4⁺ e possivelmente as CD8⁺ que produzem a IFN- γ , bem como as células B em ratos infectados por *C. muridarum*, são requeridas para acabar e prevenir as infecções e as reinfecções, respectivamente. Entretanto, as respostas imunes associadas com infecções persistentes por *C. trachomatis* parecem induzir a formação de patologias, resultado de uma inflamação crônica e formação de lesão tissular. Assim, a pesquisa entre a imunidade preventiva e imunidade associada à patogênese por *C. trachomatis* no hospedeiro, mostra ser de grande impacto para futura criação de vacinas.

Segundo Brunham e Rey-Ladino (2005); Millman et al. (2004), a pesquisa para desenvolvimento de vacinas contra as infecções por *C. trachomatis* continua sendo uma tarefa complexa. Todavia, houve progresso nos últimos anos à identificação de vários antígenos de *C. trachomatis* como candidatos potenciais vacinais. Entrican; Buxton e Longbottom (2001) descreveram que a produção de vacinas está voltada à pesquisa

genética ou de DNA com a finalidade de induzir a imunidade protetora em vários modelos de animais. Embora, Brunham e Rey-Ladino (2005) terem relatado sucesso em regimes de imunização em ratos envolvendo a aplicação de DNA e proteínas, a aplicação em humanos continua sendo obscura.

As multisubunidades de proteínas vacinais parecem ser mais eficazes em relação às vacinas baseados num único antígeno. Futuramente, os candidatos às vacinas anti-clamidiais seriam compostas de vários antígenos (BRUNHAM e REY-LADINO, 2005).

Tabela 2 – Proteínas de *Chlamydia trachomatis* reconhecidas por células T humanas e por ratos.

Proteína	Peso Molecular em Kda	Local encontrada	Células que reconhecem as proteínas	Fonte de células T
CrpA	15	Inclusão de membrana	Células T CD8 ⁺ (pool)	Células T-em ratos infectadas por <i>C. Trachomatis</i>
Cap1	30	Inclusão de membrana	Células T CD8 ⁺ (pool)	Células T-em ratos infectadas por <i>C. trachomatis</i>
MOMP	40	Membrana	Clones-Céls T CD8 ⁺ (pool) Clones-Céls T CD8 ⁺ (pool)	CMSP-pacientes com tracoma CMSP-pacientes infectadas por <i>C. trachomatis</i>
OMP2	60	Membrana	Clone-Célula T CD8 ⁺ Clone-Célula T CD4 ⁺ Céls T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	CMSP- <i>C. trachomatis</i> -exposição em humanos Líquido sinovial de pacientes com artrite reativa Esplenócitos de ratos imunizados com OMP2
HSP60	60	Citoplasma	Céls T CD4 ⁺ Céls T CD8 ⁺ (pool)	CMSP de pacientes com artrite reativa CMSP de pacientes com tracoma
YopD homóloga	ND	Membrana	Clone-Céls T CD4 ⁺	Líquido sinovial de pacientes com artrite reativa
Enolase	46	ND	Clone-Céls T CD4 ⁺	Líquido sinovial de pacientes com artrite reativa
PmpD	160	Membrana	Clone-Céls T CD4 ⁺	Líquido sinovial de pacientes com artrite reativa

CrpA - cysteine-rich protein A; Cap1- class I accessible protein; MOMP – major outer membrane protein; OPM2 – outer membrane protein; HSP60 – heat-shock protein 60; YopD homologue- homóloga de *Yersinia pseudotuberculosis* YopD; PmpD – polymorphic membrane protein; CMSP – Células Mononucleares de Sangue Periférica; ND

FONTE: BRUNHAM e REY-LADINO, 2005.

Embora tenha sido descrito que os genomas de várias cepas de *C. trachomatis* foram seqüenciados, há ainda pouca informação com relação à estrutura do gene desta bactéria (ALBRECHT et al., 2010). Portanto, as características genéticas de *C. trachomatis* ainda estão incompletas.

Dentre estes estudos, Gomes et al. (2004); Nunes et al. (2007) e Stephens et al. (1998), comentam que embora, ainda exista uma falta de entendimento à associação genética ou diferenças protéicas, como também ao tropismo celular e propriedades patogênicas entre vários genótipos de *C. trachomatis*, as análises feitas do genoma completo de *C. trachomatis* revelam características interessantes relacionada à complexidade biológica da família Chlamydiaceae. Vários avanços correspondentes à genética de *C. trachomatis* tem sido feitos desde a publicação de 1998 referente à seqüência do genoma da cepa e genótipo D/UW-3/Cx (cepa óculo-genital) e a viabilidade do genoma parcial do genótipo L2 do linfogranuloma (CEVENINI; DONATI e SAMBRI, 2002).

Segundo Stephens et al. (1998); Thomas et al. (1997), já foram identificados os genomas de duas espécies de clamídia. Em 2010, Albrecht et al.; Cevenini; Donati e Sambri (2002); Stephens et al. (1998) e Thomas et al. (1997), descreveram o genoma do genótipo D de *C. trachomatis* no qual possui um conteúdo com 58,7% de adenina-timina, organizado num único cromossomo circular, com tamanho aproximado de 1.042,519 pares de bases (pb) com aproximadamente 894 genes codificadores, das quais setenta são exclusivas de *C. trachomatis* e um plasmídio de 7,5 Kb (7493 pb). Ainda mais, Everett; Hornung e Andersen (1999b) descreveram que o plasmídio exibe 60% a 80% de região conservada entre as espécies. Os referidos autores Birkelund e Stephens (1992) relataram que o DNA dos diferentes genótipos da espécie *C. trachomatis* possui uma homologia de mais de 96%, porém, a homologia genômica é reduzida entre a espécie *C. trachomatis* com outras espécies da mesma família.

Thomson et al. (2008) descreveram que os genomas de clamídia exibem uma capacidade elevada de codificação. Segundo Baehr et al. (1988) existe um elevado grau de homologia dos genes que codificam as MOMP nos diferentes genótipos. As regiões que apresentam a homologia dos genes são constantes, espaçadas por quatro domínios variáveis (VDI a VDIV) apresentando aproximadamente de 40 a 93 pb. As diferenças nas seqüências codificantes VDI a VDIV entre os genótipos conferem a variação antigênica (CEVENINI; DONATI e SAMBRI, 2002). Tais segmentos variáveis contêm determinantes antigênicos específicos para sub-espécies e sorogrupos. Ainda mais, a

variabilidade da sequência da MOMP provavelmente deve a seleção do hospedeiro (meio) e da capacidade de adaptação bacteriana (STOTHARD; BOGUSLAWSKI; JONES, 1998). Portanto, Yuan et al. 1989; Millman; Tavaré e Dean (2001) afirmam que o mapeamento dos epítomos demonstrou que os domínios (VD) contêm determinantes antigênicos que permitam a formação de anticorpos específicos de cada genótipo.

Em um estudo de revisão de literatura, Biros et al. (2007); Cevenini ; Donati e Sambri (2002); Paavonen e Eggert-Kruse (1999); Seth-Smith et al. (2009) descreveram que o gênero *Chlamydia* compreende um grupo de bactérias, que além de possuir um cromossoma, possui um plasmídio críptico (pCT) de aproximadamente 7 a 10 cópias altamente conservado, com menos de 1% de variação na sequência de nucleotídeos. Ainda mais, todos pCT de *C. trachomatis* codificam oito ORF - *open reading frames*, que são regiões codificadoras de genes com aproximadamente mais de 100 aminoácidos intercaladas por pequenas regiões não-codificadoras. As sequências já se encontram completas e disponíveis para os quatro sorotipos (L1, L2, L2a e L3) e por sua vez são altamente conservadas entre diferentes isolados.

Em 1997 Farencena et al. descreveram a ausência de pCT na tentativa de diagnosticar *C. trachomatis* pelo plasmídio. De acordo com os autores, essa informação nos descreve um isolado menos virulento, pertencente ao genótipo de tracoma e que cresce bem *in vitro*. Somente um plasmídio de uma cepa pertencente ao linfogranuloma venereum foi completamente descrito e caracterizado. Por existir um elemento extra cromossomal e, portanto considerado essencial para sua sobrevivência, sugere-se que a clamídia possui uma vantagem no seu ciclo de vida ou até no processo da resposta imune no hospedeiro (FARENCENA et al., 1997).

Embora haja pouca informação referente à disseminação da cepa mutante (KLINT et al., 2007), Seth-Smith et al. (2009) relataram uma descoberta de uma nova variante plasmidial. A descoberta foi em 2006 na Suécia e a variante apresenta uma deleção de 377 pb na primeira sequência de codificação do plasmídio, resultando em uma falha na detecção. O resultado negativo de diagnóstico nem sempre demonstra uma diminuição de pessoas infectadas. Segundo Herrmann et al. (2008), a descoberta das variantes nas cepas de *C. trachomatis* pertence ao genótipo E.

Uma análise comparativa das sequências plasmidial revelou a região mais conservada. Segundo os autores Seth-Smith et al., a segunda região de codificação do plasmídio é altamente conservada. O plasmídio é considerado o alvo importantíssimo para os testes de diagnóstico, pois possui resistência contra danos oriunda da nuclease e

como já foi descrito anteriormente, possui até 10 cópias por genoma (SETH-SMITH et al., 2009). Cada plasmídeo possui uma única ou exclusiva seqüência, de acordo com o seu genótipo, porém as diferenças entre alguns são mínimas. Além disto, as modificações apresentadas na nova variante plasmidial e que são consideradas significativas, estão sendo disseminadas. Análises filogenéticas de plasmídeo clamidial indicam que sua linhagem evolucionária são de plasmídios de outras espécies de clamídia (THOMAS et al., 1997).

Ainda mais, já foi comprovado que o plasmídeo não é considerado essencial para o ciclo de vida da bactéria, uma vez que isolados clínicos de *C. trachomatis* sem a presença do plasmídeo já foram descritos (FARENCENA et al., 1997; STOTHARD; BOGUSLAWSKI e JONES, 1998; THOMAS et al., 1997).

2.11 - Gene *ompA* de *Chlamydia trachomatis*

A Proteína de Membrana Externa (MOMP) é uma das principais componentes estrutural de *C. trachomatis* e é responsável pela a integridade estrutural do corpo elementar de infecção extracelular e na conversão do desenvolvimento do corpo reticular intracelular (LYSÉN et al., 2004). A MOMP, reconhecido como o antígeno imunodominante codificado pelo o gene *ompA*, exibe uma extensa área de variação nucleotídica sendo por sua vez, conferido por quatro domínios variáveis (VDI a VDIV) (JURSTRAND et al., 2001). Esses domínios contêm peptídeos antigênicos expostos na superfície da membrana da bactéria (LYSÉN et al., 2004). Conforme a descrição do Yang et al. (2010), as seqüências nucleotídicas nos domínios VDI e VDII são suficientemente diferentes em todos os genótipos. Yang et al. (2010), em uma curta comunicação, sugerem que as mutações ocorrem frequentemente entre os genótipos. Essas mutações podem indicar diferenças imunogênicas entre as MOMP de genótipos de *C. trachomatis*.

Descrito como um gene de única cópia, o gene *ompA*, é um dos genes mais polimórficos conhecidos entre as bactérias. Variações acima de 25% tem sido detectada na seqüência do *ompA*, conferindo assim uma seqüência nucleotídica de polimorfismo. Sendo assim, a MOMP é considerada como alvo principal de resposta imune em humano (BRUNELLE e SENSABAUGH, 2006).

De acordo com Brunelle e Sensabaugh (2006), estudos apontam discordância entre as cepas e a análise filogenética do *ompA*. Dentre estes acometimentos apontados acima, ainda não há explicações com relação às características biológicas de *C. trachomatis*. Uma possível explicação se deve à recombinação do gene *ompA* entre as cepas pertencente a *C. trachomatis*. Há evidências de recombinação gênica com outros genes pertencentes ao genoma de *C. trachomatis* que conseqüentemente poderá produzir outras combinações de perfil fenotípico (BRUNELLE e SENSABAUGH, 2006). Portanto, a relação filogenética e o gênero ou tipos de *C. trachomatis* é pouco compreendida. Segundo Kaltenboeck; Kousoulas e Storz (1993), menos de 10% apresentam similaridade de DNA cromossomal entre as espécies de clamídia. Enquanto que, aproximadamente 68% do gene *ompA* é idêntico entre *C. psittaci* e *C. trachomatis* e entre *C. pneumoniae* e *C. trachomatis*, 71% do *ompA* é idêntico entre *C. psittaci* e *C. pneumoniae*.

Ainda mais, Geisler; Morrison e Bachmann (2010), relataram que as cepas de *C. trachomatis* podem ser diferenciadas pela a composição da OmpA. Sendo assim, aproximadamente 20 tipos e variantes da OmpA já foram identificadas. Portanto, acredita-se que o tropismo e a habilidade de *C. trachomatis* de estabelecer a infecção ou de persistir em tecido do hospedeiro está diretamente ligada à composição da OmpA e às características imunogenéticas do hospedeiro.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Identificar os genótipos de *C. trachomatis* a partir de amostras positivas para DNA plasmidial em mulheres com diagnóstico de infertilidade e em gestantes atendidas em Manaus – Amazonas.

3.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar as características das mulheres inférteis e gestantes estudadas;
- Desenhar iniciadores que amplifiquem o gene *ompA*;
- Comparar os iniciadores desenhados neste estudo com os iniciadores descritos na literatura;
- Amplificar o gene *ompA* das amostras positivas para *C. trachomatis*;
- Sequenciar a região amplificada do gene *ompA*, codificador da membrana de proteína externa (MOMP) de *C. trachomatis*;
- Determinar a frequência dos genótipos encontrados nos dois grupos estudados;
- Analisar a variabilidade genética nas sequências do gene *ompA*;
- Analisar filogeneticamente as sequências do domínio variável II do gene *ompA* identificadas neste estudo e comparar com as demais sequências depositadas no *GenBank*.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Considerações éticas

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEP/UFAM) no dia 13 de agosto de 2012, conforme a resolução do CAAE nº 0194.0.115.000-08 (ANEXO A) e desenvolvido no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

4.2 - População em estudo

Fizeram parte deste estudo uma população de 96 pacientes inférteis atendidas na Clínica de Reprodução Humana (Clininfert) e 53 gestantes que procuraram o ambulatório de pré-natal do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes situado na zona norte na cidade de Manaus, capital do estado do Amazonas (AM). O estudo com a população de mulheres inférteis, situado na zona centro-sul na cidade de Manaus, capital do estado do Amazonas (AM) ocorreu no período de 04 de abril de 2008 a 21 de dezembro de 2011.

Este trabalho de pesquisa é um estudo molecular de genotipagem de *C. trachomatis* em que os dados obtidos são mostrados de forma descritiva.

Amostras de 96 mulheres inférteis foram coletadas por uma médica especialista na clínica particular, Clininfert, a partir do diagnóstico clínico, de imagens e laboratorial. Enquanto as amostras de 53 mulheres gestantes foram coletadas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Dona Francisca Mendes, advindas de dissertação de mestrado de Alfaia (2005). As amostras de gestantes foram mantidas no biorepositório do Centro de Apoio Multidisciplinar – CAM/UFAM e autorizadas para utilização neste trabalho.

4.3 - Critérios de Inclusão (INFERTILIDADE)

Os critérios utilizados para as pacientes que buscaram tratamento de infertilidade teve seguimento nesta ordem: ter o diagnóstico de infertilidade confirmado pela médica especialista; ter residência no estado do Amazonas há pelo menos um ano; mulheres em

idade reprodutiva que não conseguiram conceber por um período mínimo de um ano de tentativa.

4.4 - Critérios de Exclusão (INFERTILIDADE)

Os critérios de exclusão das participantes de infertilidade seguem na seguinte ordem: a desistência da paciente em participar da pesquisa; mulheres com menos de um ano de tentativa para concepção; mulheres que apresentaram sangramento vaginal; mulheres que tiveram relação sexual nas últimas 72 horas; mulheres em uso de cremes vaginais e de antibióticos.

4.5 - Critérios de Inclusão (MULHERES GESTANTES)

Os critérios de inclusão para mulheres gestantes são: estar grávida no terceiro trimestre (29 a 41 semanas e seis dias de idade gestacional); frequentar o ambulatório de pré-natal de baixo risco no Hospital Universitário Dona Francisca Mendes; residir em Manaus pelo menos 1 ano.

4.6 - Critérios de Exclusão (MULHERES GESTANTES)

Foram excluídas as participantes gestantes: mulheres com duração gestacional menor do que 28 semanas e 6 dias; uso de antibiótico devido à outra infecção diagnosticada ou com história de uso nos últimos 30 dias; gestantes que tiveram relação sexual nas últimas 72 horas; gestantes em uso de cremes vaginais; gestantes com sangramento vaginal; gestantes com diagnóstico de placenta prévia e com diagnóstico ou suspeita clínica de ruptura prematura de membranas.

4.7 - Obtenção e processamento de amostras biológicas

O processamento de todas as amostras (Figura 6) foi realizado pela pesquisadora responsável pelo projeto no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) – Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Com auxílio de escovas endocervicais (cyto-brush) foram coletadas amostras endocervicais. Essas amostras foram imediatamente acondicionadas em 400 µL de solução tampão (TE) (Tris HCl 10 mM e EDTA 1 mM) e mantidas no gelo até o momento do transporte para o laboratório onde foram congeladas a -20°C até o momento da extração do DNA (GRIFFAIS e THIBON,1989). Abaixo segue o fluxograma das atividades laboratoriais realizadas.

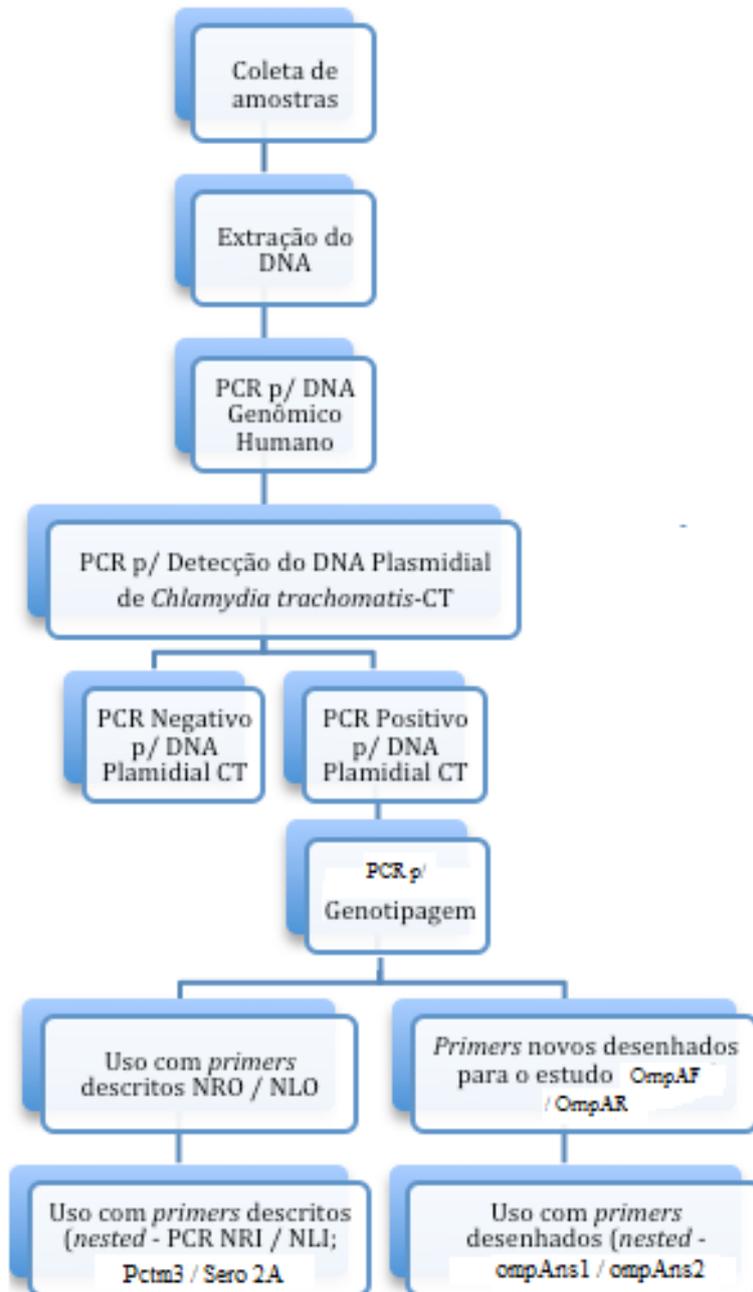


Figura 6 - Fluxograma da obtenção e processamento de amostras biológicas.

4.8 - Extração do DNA das amostras

Antes de iniciar a amplificação do DNA bacteriano da *C. trachomatis*, as amostras foram submetidas a um processo de extração do DNA. As amostras foram descongeladas de forma gradual e deixadas à temperatura ambiente. Em seguida, preparou-se a solução de tampão proteolítico TPK¹. Aos 400 µL da amostra adicionou-se 400 µL da solução de TPK¹ e em seguida foi levada ao banho-maria à 56°C por 1 hora e fervura por 10 minutos.

As amostras assim preparadas foram mantidas à -20°C até a sua utilização (BAUER e MANOS, 1998). Todas as amostras foram submetidas à extração de DNA pelo método Fenol: Clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH e MANIATIS, 1989) (ANEXO B).

4.9 - Amplificação Controle do DNA Humano (PCR)

Para certificar-se que o processo de extração foi eficiente e como forma de controle da presença do DNA cromossomal humano amplificável, foi realizada uma reação de PCR utilizando iniciadores ISO05G, que amplificam uma região microsatélite (GATA)13 do gene da golgina localizado no cromossomo 15 humano desenvolvidos por Pontes; Ângelo e Astolfi Filho (2003).

4.10 - Sistema de PCR para Controle do DNA Humano

O sistema de PCR continha o volume final de 20,0 µL, composto por seguintes componentes: 2,2 µL H₂O Ultra-purificada; 2,5 µL do Tampão da enzima 10X; 2,5 µL de dNTP 2,5 mM; 2,5 µL de MgCl₂ 20 mM; 5,0 µL de iniciadores (Primers) ISO05G 5 pmol; 0,3 µL da enzima *Taq* DNA polimerase 5U/µL e 5,0 µL da amostra de DNA.

¹ 900 µL de TE (Tris HCl 50 mM + EDTA 1 mM) pH 8,0
100 µL de Tween 20%
20 µL proteinase K 10 mg/mL).

A reação de PCR foi realizada em termociclador Applied Biosystems – Veriti 96 *well Thermal Cycler* programada da seguinte maneira:

- Pré-desnaturação por 2 minutos a 95°C;
 - Desnaturação por 1 minuto a 95°C;
 - Anelamento por 1 minuto a 55°C;
 - Extensão por 1 minuto a 72°C;
 - Extensão final por 5 minutos a 72°C.
- } 40 ciclos de amplificação

O termociclador foi programado, para ao final dos ciclos conservar as amostras que foram amplificadas a 4°C até que fossem retiradas e congeladas.

Após a amplificação com iniciadores ISO05G os amplicons foram visualizados em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídeo 1µg/mL.

4.11 - Amplificação do DNA Plasmidial da *Chlamydia trachomatis* (PCR)

Para a pesquisa da *C. trachomatis* utilizou-se a técnica de PCR. O par de iniciadores, KL1 (Forward primer) e KL2 (Reverse primer), que amplificam um fragmento de 241 pb, foi utilizado para a amplificação da seqüência alvo do DNA plasmidial (MAHONY et al., 1993; SCHACHTER, 1997) (Tabela 5). Um teste confirmatório das amostras de PCR positivas do DNA plasmidial de *C. trachomatis* foi realizado utilizando os iniciadores: CTP1 (Forward primer) e CTP2 (Reverse primer), que amplificam um fragmento de 201 pb) (Tabela 3).

Tabela 3 – Seqüência dos iniciadores KL1 e KL2 / CTP1 e CTP2.

Oligonucleotídeos	Seqüência do Iniciador 5' → 3'	Tamanho do amplicon
KL1	TCCGGAGCGAGTTACGAAGA	241 pb
KL2	AATCAATGCCCGGATTGGT	
CTP1	TAGTAACTGCCACTTCATCA	201pb
CTP2	TTCCCCTTGTAATTCGTTGC	

FONTE: MAHONY et al., 1993; SCHACHTER, 1997.

4.12 - Sistema de PCR para detectar DNA plasmidial da *Chlamydia trachomatis*

O sistema de reação foi composto de 5,0 µL de DNA; 5,0 µL do Tampão 10X; 2,0 µL de MgSO₄ 50 mM; 1,0 µL de dNTP 10,0 mM; 5,0 µL do iniciador KL1 5 pmol; 5,0 µL do iniciador KL2 5 pmol; 0,2 µL de *Platinum*[®] Taq DNA polymerase High Fidelity da Invitrogen Life Technologies 5U/µL e 26,8 µL de água ultra-purificada totalizando o volume de 50 µL. O sistema de reação para confirmar a amplificação do DNA plasmidial foi o mesmo, com uma única diferença de substituir os iniciadores KL1 5 pmol e KL2 5 pmol por CTP1 10 pmol e CTP2 10 pmol.

O controle negativo consistiu em água ultra-purificada e o controle positivo consistiu em amostra positiva sequenciada para DNA de *C. trachomatis*, extraído de amostra isolado do trato genital feminino, cedida do acervo de amostras armazenado no Laboratório de Diagnóstico Molecular do CAM da UFAM.

A amplificação do DNA plasmidial de *C. trachomatis* utilizando os iniciadores KL1 e KL2 foi processada em termociclador Applied Biosystems – *Veriti 96 well Thermal Cycler* programada para realizar o seguinte termociclagem:

- Pré-desnaturação a 94°C por 30 segundos;
 - Desnaturação a 94°C por 30 segundos;
 - Anelamento a 64°C por 30 segundos;
 - Síntese a 68°C por 2 minutos.
- } 40 ciclos de amplificação

Na síntese final, deixou-se mais uma temperatura de síntese a 68°C por 5 minutos. Ao término dos ciclos, o termociclador foi programado para conservar as amostras numa temperatura de 4°C.

A termociclagem utilizada para os iniciadores CTP1 10 pmol e CTP2 10 pmol foi:

- Pré-desnaturação a 95°C por 4 minutos;
 - Desnaturação a 95°C por 1 minuto;
 - Anelamento a 58°C por 1 minuto;
 - Síntese a 68°C por 1:30 minutos;
 - Síntese final 68°C por 4 minutos.
- } 40 ciclos de amplificação

4.13 - Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos de PCR para pesquisa de *C. trachomatis* com iniciadores desenhados

Para a visualização dos produtos amplificados pela técnica de PCR para a pesquisa de DNA de *C. trachomatis*, recorreu-se à técnica de eletroforese em gel de agarose 2,0% em solução Tampão 1X. Para a eletroforese, misturou-se 10µL de cada produto de PCR com 5 µL de uma solução de azul de bromofenol (TEB 5X). As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram banda correspondente a 241 pb (KL1/KL2) e 201 pb (CTP1/CTP2), comparando ao marcador de peso molecular na posição correspondente.

4.14 - Genotipagem através da seqüência do *ompA* em amostras isoladas de *C. trachomatis*

4.14.1 - Iniciadores usados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a amplificação do *ompA*

Com a finalidade de genotipar as amostras positivas de *C. trachomatis*, foi realizada a amplificação do gene *ompA* por PCR utilizando-se os iniciadores NLO e NRO seguida de *nested*-PCR com os pares de iniciadores Pctm3 e Sero2A e NLI e NRI (Tabela 6), respectivamente. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (1,0 µg/mL), evidenciando-se uma banda correspondente a 1.130 pb e 1.014 pb, respectivamente.

A Tabela 4 mostra as seqüências dos iniciadores utilizados na genotipagem de *C. trachomatis* (GOMES et al., 2004; HSU et al., 2006; NGANDIJIO et al., 2004).

Tabela 4 – Iniciadores usados na PCR do *ompA*.

Gene <i>ompA</i>	Iniciador	Seqüência do iniciador (5' → 3')	Localização do gene *	Tamanho (pb)
Primeira Reação	NLO	ATGAAAAAACTCTTGAAATCG	1 a 21 ^a	1.130
	NRO	CTCAACTGTAAGTGCATTT	1108 a 1128 ^a	1.130
Nested-PCR	Pctm3	TCCTTGCAAGCTCTGCCTGTGGGGAATCCT	55 a 84 ^a	1.014
	Sero2A	TTTCTAGATTTTCATTTTGIT	1068 a 1049 ^a	1.014
Nested-PCR	NLI	GTATTTGCCGCTTTGAGTTCTGCTTC	31 a 51 ^a	1.014
	NRI	CCGCAAGATTTTCTAGATTTTC	1073 a 1053 ^a	1.014

* Baseada na seqüência do sorotipo D (*GenBank* no. AE001273).

FONTE: GOMES et al., 2004; HSU et al., 2006; NGANDIJO et al., 2004.

4.15 - Sistema de PCR para a amplificação do *ompA*

No sistema de PCR para a amplificação do gene *ompA* da *C. trachomatis*, foi utilizada uma enzima de alta fidelidade a *Platinum*[®] Taq DNA polymerase High Fidelity da Invitrogen Life Technologies. Em cada reação utilizou-se como controle negativo um branco de reação, ou seja, no lugar do DNA utilizou-se água ultra-purificada. Para o controle positivo, utilizou-se uma amostra comprovadamente positiva e já sequenciada pelo Laboratório de Diagnóstico Molecular da UFAM. Em seguida, realizou-se a *nested*-PCR com os iniciadores NRI/NLI e Sero2A/Pctm3.

O sistema de reação de PCR na primeira reação e na *nested*-PCR foi composto de 5,0 µL e 2,5 µL de DNA, respectivamente; Tampão 10X; MgSO₄ 50 mM; dNTP 10 mM; para cada iniciador 10 pmol (NLO/NRO; Pctm3; Sero2A e NRI/NLI); *Platinum*[®] Taq DNA polymerase High Fidelity da Invitrogen Life Technologies 1.5U/µL e água ultra-purificada totalizando o volume de 25 µL.

A PCR foi processada em termociclador Applied Biosystems – Veriti 96 well Thermal Cycler programada para realizar o seguinte termociclagem:

- Pré-desnaturação a 95°C por 6 minutos;
 - Denaturação a 95°C por 1 minuto;
 - Anelamento a 45°C por 3 minutos;
 - Síntese a 68°C por 2 minutos;
- } 40 ciclos de amplificação

Na síntese final, deixou-se mais uma temperatura de síntese a 68°C por 5 minutos e ao término dos ciclos programou-se o termociclador a 4°C para a conservação das amostras até a retirada das mesmas.

4.16 - Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos de PCR para análise do gene *ompA* do DNA de *C. trachomatis*

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 0,8% em solução Tampão 1X, corado com brometo de etídeo (1µg/µL) e revelados por luz ultravioleta. Para a eletroforese, misturou-se 5 µL de cada produto de PCR com 3 µL de uma solução de azul de bromofenol (TEB 5X) e 2 µL de água ultra-purificada. Um dos poços do gel foi usado para aplicação do marcador molecular de 1 Kb Ladder (INVITROGEN, *Life Technologies*), que possui fragmentos de DNA de 500 pb a 12 Kb. O tamanho dos produtos amplificados são aproximadamente de 1.130 pb (NLO/NRO) e 1.014 pb (Pctm3/Sero2A e NLI/NRI), respectivamente (Tabela 4) (GOMES et al., 2004; HSU et al., 2006; NGANDIJO et al., 2004).

4.17 - Desenho dos iniciadores que amplificam o gene *ompA* de *C. trachomatis*

As sequências nucleotídicas dos novos iniciadores utilizados para a amplificação do gene *ompA* foram definidas a partir das sequências gênicas de genótipos de *C. trachomatis*, depositadas no banco de dados do NCBI (National Center of Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nih.nlm.gov>). As sequências selecionadas no *GenBank* estão representadas conforme número de acesso: X52080.1; X16007.1; X62921.1; X62918.1; X52557.1; AF063199.2; AF063202.2; AF063204.2; EU105066.1; AF063208.1; AY950630.1.

As sequências gênicas foram alinhadas no programa Bioedit, com auxílio da ferramenta ClustalW, onde pode ser gerada a sequência consenso que serviu de molde para a escolha das sequências dos novos iniciadores. A escolha das melhores sequências de iniciadores limitou-se a regiões conservadas entre os genótipos analisados e assim desenhamos os iniciadores. Essas regiões puderam ser identificadas com auxílio do programa MEGA 4.0. As sequências de oligonucleotídeos foram analisadas e editadas com o auxílio das ferramentas Perl Primer, ClustalW e Primer 3.

Na Tabela 5 estão descritas as sequências dos iniciadores desenhados utilizados na reação de genotipagem:

Tabela 5 - Iniciadores desenhados usados na PCR do *ompA*.

Gene	Iniciador	Sequência do iniciador (5'→3')	Localização do gene	Tamanho (pb)
<i>ompA</i>				
Primeira Reação	OmpAF	GGAGATCCTTGCGATCCTTGC	532 a 552	1.002
	OmpAR	CATCGATCAAGCGAGTCTCAAC	1555 a 1534	1.002
Nested-PCR	ompAns1	CGACCGTGTTTTGRAAACWGATG	608 a 631	677
	ompAns2	GACCATTAACTCCAATGTARGG	1286 a 1263	677

*baseada nas sequências de genótipos de *C. trachomatis* no GenBank.

4.18 - Teste dos iniciadores desenhados

A fim de testar a validade dos iniciadores foi feita a otimização do PCR com gradiente para determinar temperatura ótima de anelamento dos iniciadores. Após avaliação da temperatura ótima de anelamento foi estabelecido o sistema de PCR para a amplificação do *ompA* com os novos iniciadores.

4.19 - Sistema de PCR para a amplificação do *ompA* com os iniciadores desenhados

O sistema de reação de PCR usando novos iniciadores foi o mesmo do sistema anterior: 5,0 µL de DNA na primeira reação e 2,5 µL de DNA na *nested*-PCR; Tampão

10X; MgSO₄ 50 mM; dNTP 10 mM; para cada iniciador 10 pmol (OmpAF/OmpAR; OmpAns1/OmpAns2); *Platinum*[®] Taq DNA polymerase High Fidelity da Invitrogen Life Technologies 1.5U/μL e água ultra-purificada totalizando o volume de 25 μL.

O termociclagem da PCR seguiu o mesmo das reações anteriores, com uma única modificação na temperatura de anelamento dos iniciadores da primeira PCR com os iniciadores OmpAF/OmpAR (TA = 68°C) e da *nested*-PCR com os iniciadores OmpAns1/OmpAns2 (TA = 62°C).

As PCR foram processadas também em termociclador Applied Biosystems – *Veriti 96 well Thermal Cycler* e programada para realizar o seguinte termociclagem:

Programa de termociclagem para a primeira reação:

- Pré-desnaturação a 95°C por 6 minutos;
 - Desnaturação a 95°C por 1 minuto;
 - Anelamento a 68°C por 3 minutos;
 - Síntese a 68°C por 2 minutos;
 - Síntese Final a 68°C por 5 minutos
- } 40 ciclos de amplificação

Programa de termociclagem para a segunda reação (*nested*-PCR):

- Pré-desnaturação a 95°C por 6 minutos;
 - Desnaturação a 95°C por 1 minuto;
 - Anelamento a 62°C por 3 minutos;
 - Síntese a 68°C por 2 minutos;
 - Síntese Final a 68°C por 5 minutos
- } 40 ciclos de amplificação

O termociclador foi programado, para ao final dos ciclos conservar as amostras que foram amplificadas a 4°C até que sejam retiradas e congeladas.

4.20 - Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos de PCR para análise do gene *ompA* do DNA de *C. trachomatis* com iniciadores desenhados

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 0,8%, corados com brometo de etídeo (1µg/µL) e revelados por luz ultravioleta. Para a eletroforese, misturou-se 5 µL de cada produto de PCR com 3 µL de uma solução de azul de bromofenol (TEB 5X) e 2 µL de água ultra-purificada. Um dos poços do gel foi usado para aplicação do marcador molecular de 1 Kb Ladder (INVITROGEN, Life Technologies), que possui fragmentos de DNA de 500 pb a 12 Kb. O tamanho esperado dos produtos amplificados é de aproximadamente 1.002 pb (OmpAF/OmpAR) e 677 pb (OmpAns1/OmpAns2), respectivamente.

4.21 - Purificação dos produtos amplificados

Na obtenção do tamanho de fragmento desejado, os produtos amplificados por PCR foram submetidos à purificação ao utilizar as enzimas Exonuclease (Exo) e Fosfatase Alcalina (Sap).

O sistema de purificação foi composto de 10,0 µL do produto da PCR; 6 µL do produto de PCR; 0,34 µL da enzima *Exo* (3,3 U) e 0,66 µL da enzima *Sap* (0,66 U). Em seguida incubou-se durante 30 minutos a 37°C; 15 minutos a 80°C e 1 minuto a 10°C (temperaturas ideais para a ação enzimática) no termociclador Applied Biosystems – *Veriti 96 well Thermal Cycler*.

4.22 - Reação de Sequenciamento dos produtos amplificados

As amostras foram seqüenciadas no seqüenciador automático ABI 3130 XL da Applied BioSystems na UFAM. Posteriormente, as seqüências foram alinhadas pelo o programa CLUSTAL W - BIOEDIT (THOMPSON; HIGGINS e GIBSON, 1994) com as seqüências nucleotídicas disponíveis no Banco de Dados Mundial – *GenBank* para que haja a confirmação de cada seqüência para o gene *ompA*.

As amostras purificadas, foram seqüenciadas nos segmentos variáveis do *ompA* utilizando-se os iniciadores NLO ou NRO; Pctm3 ou Sero2A; NLI ou NRI; OmpAF ou OmpAR; OmpAns1 ou OmpAns2. Os produtos purificados provenientes das reações acima foram submetidas ao seqüenciador automático ABI 3130 XL da Applied BioSystems contendo os seguintes reagentes para um volume final de 10 μ L: 0,3 μ L de *Big Dye*; 2,5 μ L de Tampão; 2 μ L iniciador (10 pmol/ μ L); 3,2 μ L de Água Milli-Q autoclavada e 2 μ L do produto amplificado por PCR (~ 50 ng de 1 a 2 Kb do produto). Após a montagem da reação de seqüenciamento levou-se ao termociclador para realizar a seguinte termociclagem:

- Pré-desnaturação a 96°C por 1 minuto;
 - Desnaturação a 96°C por 10 segundos;
 - Anelamento a 50°C por 15 segundos;
 - Síntese a 60°C por 75 segundos;
 - Desnaturação a 96°C por 10 segundos;
 - Anelamento a 50°C por 15 segundos;
 - Síntese a 60°C por 90 segundos;
 - Desnaturação a 96°C por 10 segundos;
 - Anelamento a 50°C por 15 segundos;
 - Síntese a 60°C por 120 segundos;
 - Manutenção/*Hold* a 10°C por tempo indefinido.
- } 15 ciclos
- } 5 ciclos
- } 5 ciclos

4.23 - Precipitação dos produtos da reação de seqüenciamento

Ao término da reação, foram adicionados aos produtos da reação 2,5 μ L de EDTA 125 mM e 27,5 μ L de etanol a 100% em cada poço de uma placa contendo 96 poços com volume final de reação de 10 μ L. Em seguida, a placa foi selada e deixada em temperatura ambiente durante 15 minutos e centrifugou-se durante 30 minutos a 2000 rpm em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre papel absorvente. Aplicou-se um pulso na centrífuga com a placa invertida em papel absorvente e adicionou-se 30 μ L de etanol a 70% em cada amostra e a placa foi selada, novamente. Após a centrifugação durante 15 minutos a 4000 rpm em centrífuga refrigerada, o

sobrenadante foi descartado e a placa foi invertida sobre papel absorvente e foi centrifugada novamente durante 1 minuto a 140 rpm. A placa foi acondicionada em termociclador a 37°C durante 15 minutos para que o produto do seqüenciamento precipitado secasse.

4.24 - Preparo das amostras para análise no ABI

Ao término da precipitação, os produtos foram ressuspensos utilizando-se Formamida *Hi-Di* da *Applied Biosystems* P/N 4311320. Portanto, adicionou-se 10 µL de Formamida *Hi-Di* em cada amostra. Logo após, a placa foi selada e vortexada e aplicou-se um pulso na centrífuga. Em seguida, as amostras foram desnaturadas em termociclador durante 2 minutos a 94°C e logo após, a placa foi imediatamente colocada no gelo durante 2 minutos. Aplicou-se um pulso na centrífuga para remoção de bolhas de ar e removeu-se o adesivo na placa. Após este procedimento, a placa com a bandeja e tampa adaptadora foram colocadas no “autosampler tray” (suporte onde a placa com as amostras ficam).

Após a reação de seqüenciamento, as seqüências foram conferidas e alinhadas pela ferramenta CLUSTAL W disponível no programa de computador BIOEDIT Version 7.0.0 (HALL, 1999). As seqüências nucleotídicas de clamídia foram submetidas ao programa PHRED/PHRAP, através do site: < www.bioinformatica.ufam.edu.br > disponíveis na Universidade Federal do Amazonas (UFAM) para análise e verificação da viabilidade das seqüências.

Para confirmar cada genótipo das seqüências nucleotídicas válidas de clamídia, foram comparadas as amostras seqüenciadas disponíveis no Banco de Dados Mundial de Nucleotídeos – *GenBank*, utilizando-se o programa BLAST/BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997), através do site: < www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST >. Os valores de *e-value* com grandeza exponencial igual ou menor que e^{-11} foram aceitos. Não foram aceitos ou analisados os resultados com valores de *e-value* iguais ou maiores que e^{-10} .

4.25 - Análises de tipos de mutações e dos domínios variáveis do gene *ompA* de *C. trachomatis*

A análise das seqüências dos domínios variáveis (VD) do gene *ompA* de *C. trachomatis* foi obtida através das seqüências da MOMP disponíveis no Banco de Dados

Mundial de Nucleotídeos no *GenBank*, utilizando-se o programa BLAST/BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997), através do site: <www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Todas as amostras que tiveram seus genótipos confirmados foram alinhadas e comparadas pela ferramenta CLUSTAL W disponível no programa BIOEDIT Version 7.0.0 (HALL, 1999) com as seqüências dos VD de seu protótipo, conforme o número de acesso (L03754.1) depositado no *GenBank*.

Os tipos de mutações nucleotídicas de amostras que foram genotipadas, assim como o número de ocorrências e suas localizações foram alinhados e comparados entre as seqüências dos sítios variáveis dos VD no programa Mega 5.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), versão 5.0 (Kumar et al., 2008). A análise de mutações foi baseada nos números de acesso dos VD depositados no *GenBank*.

4.26 - Análise filogenética

Para análise filogenética foi realizado o alinhamento entre as sequências do VD II do gene *ompA* de *C. trachomatis* depositadas no *GenBank* conforme número de acesso L03761.1.

O modelo evolutivo adotado para as análises filogenéticas foi inferido utilizando-se o modelo evolutivo escolhido para o alinhamento pelo programa jModelTest versão 0.1.1 que aplica métodos estatísticos de verossimilhança para selecionar o modelo evolutivo que mais se adequa à amostra (POSADA, 2008). Uma vez alinhadas as sequências nucleotídicas obtidas no CLUSTAL W, no BIOEDIT (Thompson; Higgins e Gibson, 1994), o programa jModelTest foi utilizado para determinar o melhor modelo evolutivo que explica a divergência genética entre as amostras estudadas. As árvores filogenéticas foram obtidas através do método de máxima verossimilhança através do programa Mega 5.0 versão 5.0 (Kumar et al., 2008) tendo assim os valores de *bootstrap* calculados para 1000 reamostragens. Ainda mais, agrupamentos com *bootstrap* inferiores a 50% são considerados valores insignificantes, portanto, foram excluídos da árvore.

4.27 - Metodologia Estatística

Os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas, onde se calculou as frequências absolutas simples e relativas para os dados categóricos e média e desvio-

padrão (DP) para os dados quantitativos. Na comparação dos dados categóricos foi aplicado o teste do qui-quadrado de *Pearson*, sendo que na impossibilidade de aplicar o teste de *Pearson* foi utilizado o teste exato de *Fisher* (VIEIRA, 2004).

O software utilizado na análise foi o programa Epi-Info versão 7, que é desenvolvido e distribuído gratuitamente pelo CDC (www.cdc.org/epiinfo), e o nível de significância fixado para aplicação dos testes foi de 5%.

5 - RESULTADOS

Um total de 149 mulheres foram testadas por PCR para *C. trachomatis*, sendo 96 mulheres inférteis atendidas na clínica particular de Reprodução Humana (Clininfert) e 53 mulheres gestantes atendidas no ambulatório de pré-natal do Hospital Dona Francisca Mendes na cidade de Manaus – AM. No grupo de mulheres inférteis observou-se uma positividade de 24,0% para o DNA plasmidial de *C. trachomatis*, enquanto no grupo de mulheres gestantes observou-se 39,6%.

5.1 - Características da população do estudo

Nesta seção, a partir do levantamento de dados obtidos da avaliação, foi possível traçar o perfil geral populacional de 2 grupos diferentes de mulheres estudadas. A Tabela 6 mostra as características das 96 mulheres com problemas de infertilidade e 53 mulheres gestantes estudadas quanto a idade e estado civil. A idade média das pacientes de infertilidade foi de 32,3 anos ($\pm 4,7$ DP) e das gestantes foi de 24,9 anos ($\pm 4,9$ DP).

Quando feito levantamento sobre seu estado civil, 84,9% das gestantes e 92,7% das mulheres com infertilidade declararam união estável com seus parceiros (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição segundo a frequência da faixa de idade e estado civil das gestantes e mulheres em tratamento para infertilidade em duas Unidades de Saúde da cidade de Manaus – AM, 2012.

Variáveis	Grupos				Total
	Gestantes (n = 53)		Infertilidade (n = 96)		
	f _i	%	f _i	%	
Idade					
18 a 24	28	52,8	4	4,2	32
25 a 29	16	30,2	24	25,0	40
30 a 34	6	11,3	33	34,4	39
35 a 39	3	5,7	30	31,3	33
40 a 44	-	-	5	5,2	5
Média ± DP	24,9 ± 4,9		32,3 ± 4,7		
Estado Civil					
Solteira	8	15,1	7	7,3	15
União estável	45	84,9	89	92,7	134

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio-padrão.

Na Tabela 7, observou-se entre as 53 gestantes estudadas, 2 pacientes deixaram de responder em relação ao tratamento para engravidar, deixando o total de 51 pacientes. Observa-se ainda que para o grupo de gestantes, 51 (100,0%) não havia passado por qualquer tipo de tratamento para engravidar. Já no grupo de infertilidade, 93,8% das mulheres estavam em tratamento para infertilidade pela primeira vez. Ainda observando Tabela 7 verificou-se que das 96 pacientes do grupo de infertilidade, 24 (25,0%) e 53 mulheres gestantes 16 (30,2%) relataram história de aborto.

Tabela 7 - Distribuição segundo a frequência dos dados de aborto e tratamento para engravidar por parte das gestantes e mulheres em tratamento para infertilidade atendidas em duas Unidades de Saúde da cidade de Manaus – AM, 2012.

Variáveis	Grupos				Total
	Gestantes		Infertilidade		
	f_i	%	f_i	%	
Tratamento para engravidar					
Sim	-	-	6	6,3	6
Não	51	100,0	90	93,8	141
Total	51	10,00	96	100,0	
Aborto					
Sim	16	30,2	24	25,0	40
Não	37	69,8	72	75,0	109
Total	53	100,0	96	100,0	149

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio-padrão.

A distribuição em relação ao tipo de infertilidade das pacientes neste estudo está mostrada na Figura 7. Das 96 mulheres, 64,6% relataram histórico de infertilidade primária e 35,4% com infertilidade secundária.

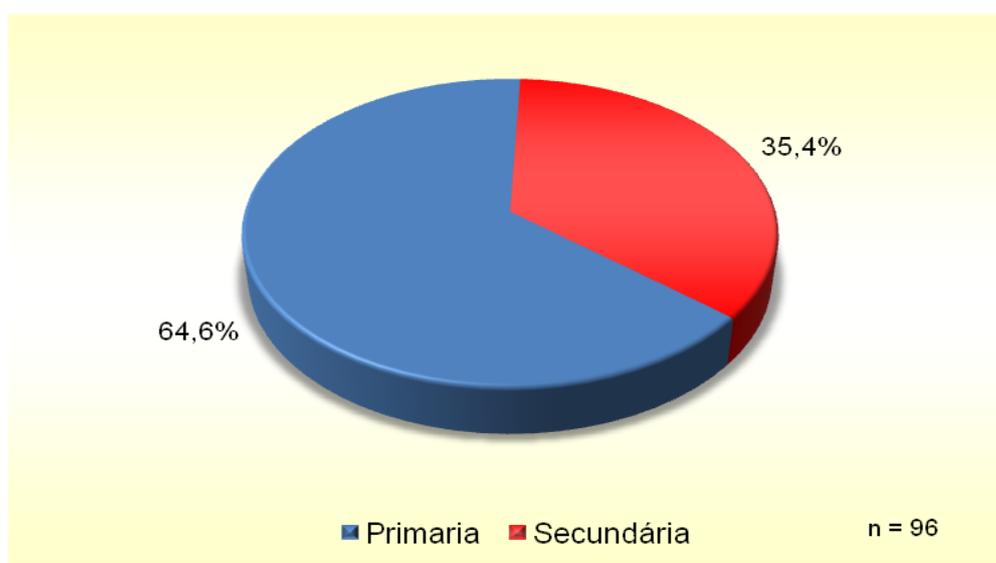


Figura 7 - Distribuição segundo a frequência do tipo de infertilidade em mulheres atendidas em uma unidade de saúde da cidade de Manaus – AM, 2012.

Conforme mostra a Figura 8, das 96 pacientes inférteis que participaram do estudo, 5,2% das mulheres apresentaram episódio de gravidez ectópica.



Figura 8 - Distribuição segundo a frequência das mulheres atendidas em uma unidade de saúde para tratamento de infertilidade que tiveram gravidez ectópica, Manaus – AM, 2012.

Percebe-se, ainda, na Tabela 8, 42,7% de mulheres com infertilidade apresentavam cervicite no exame especular enquanto que no grupo das gestantes 43,4% apresentaram sinais de cervicite.

Tabela 8- Distribuição segundo a frequência do resultado do exame especular em relação ao grupo de gestantes e mulheres em tratamento para infertilidade atendidas em duas unidades de saúde da cidade de Manaus – AM, 2012.

Cervicite (Exame especular)	Grupos				Total
	Gestantes		Infertilidade		
	f_i	%	f_i	%	
Sim	23	43,4	41	42,7	64
Não	30	56,6	55	57,3	85
Total	53	35,6	96	64,4	149

f_i = frequência absoluta simples.

A Figura 9 mostra a distribuição das mulheres com problemas de infertilidade apresentando algum comprometimento tubário. Das 96 mulheres que participaram do estudo e que fizeram o exame, 42,7% apresentaram fator tubário no exame de HSG.

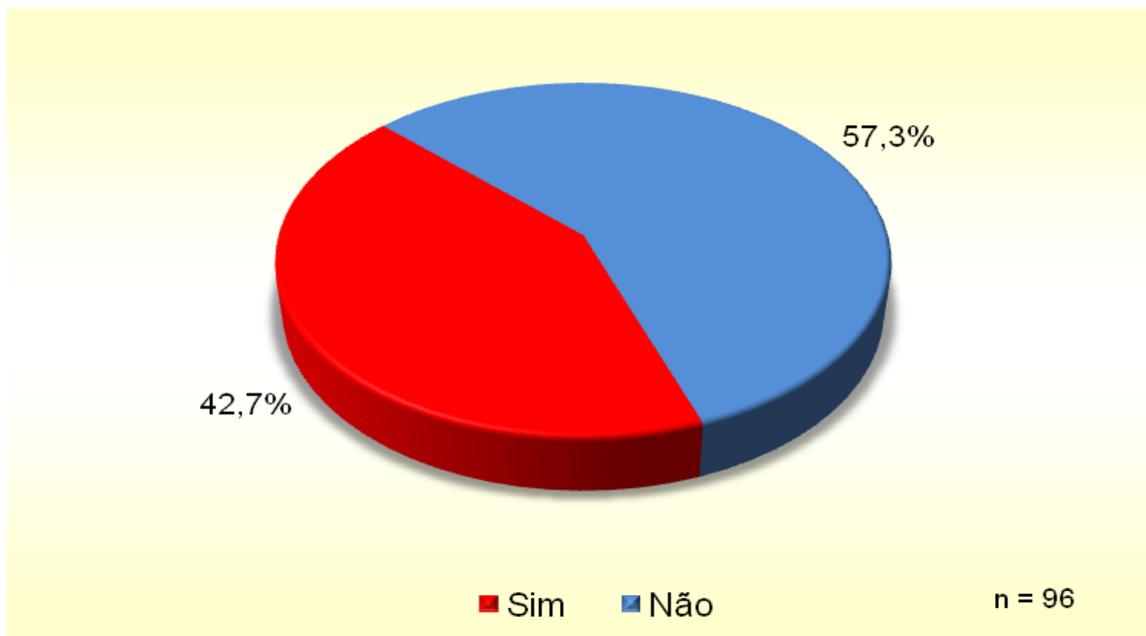


Figura 9 - Distribuição segundo a frequência das mulheres cujo o exame HSG detectou fator tubário, atendidas em uma unidade de saúde para tratamento de infertilidade, Manaus – AM, 2012.

5.2 - Resultados Moleculares

5.2.1 - Amplificação do DNA plasmidial da *Chlamydia trachomatis*

Todas as amostras positivas para o controle do DNA genômico humano (Figura 10) foram testadas à amplificação do DNA plasmidial de *C. trachomatis*. Foram consideradas positivas para *C. trachomatis* as amostras que após amplificação por PCR do DNA plasmidial, utilizando os iniciadores KL1/KL2 e CTP1/CTP2 observou-se uma banda com 241 pb e 201 pb, respectivamente (Figura 11).

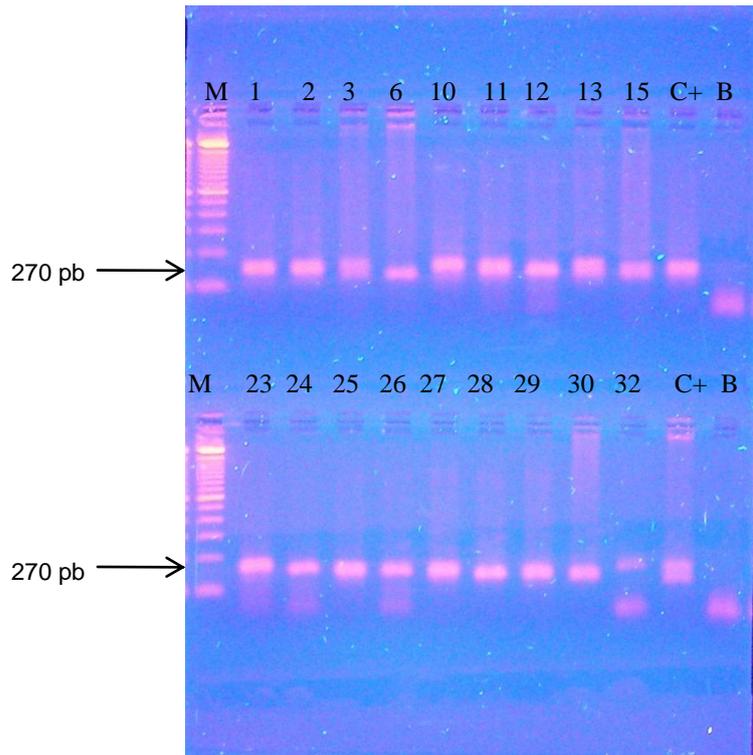


Figura 10 - Perfil eletroforético em gel de Agarose 2,5% corado com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) evidenciando uma banda de 270 pb correspondente a amplificação de uma região microsatélite $(\text{GATA})_{13}$ do cromossoma 15 humano utilizando-se iniciadores ISO05G 5 pmol (PONTES; ÂNGELO e ASTOLFI FILHO, 2003); M: Marcador de peso molecular 100 pb da *INVITROGEN Life Technologies*; Amostras: 1, 2, 3, 6, 10, 11, 12, 13, 15, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32; C⁺: Controle Positivo; B: Branco.

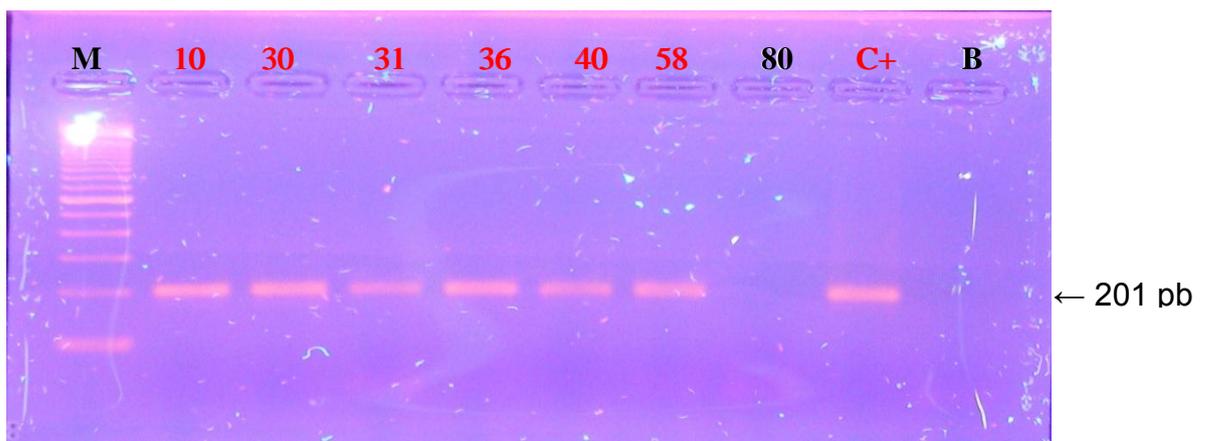


Figura 11 - Perfil eletroforético em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) dos produtos amplificados por PCR para detecção de *Chlamydia trachomatis* utilizando-se os iniciadores CTP1 e CTP2 que amplificam um fragmento de 201 pb correspondente ao DNA plasmidial da bactéria. A enzima utilizada foi a Platinum® Taq DNA Polimerase High Fidelity; M: Marcador de peso molecular 100 pb da *INVITROGEN Life Technologies*; Amostras de gestante: 10, 30, 31, 36, 40, 58, 80; C⁺: Controle Positivo; B: Branco.

Dentre as 149 mulheres que participaram do estudo, 22 (22,9%) mulheres inférteis e 20 (37,7%) gestantes eram positivas para DNA plasmidial de *C. trachomatis* quando testada com os iniciadores KL1/KL2 e CTP1/CTP2. Não foi observada significância estatística no resultado da PCR para *C. trachomatis* em relação aos dois grupos de mulheres estudadas ($p = 0,045$) (Tabela 9).

Tabela 9- Distribuição segundo a frequência do resultado do PCR para *Chlamydia trachomatis* em relação ao grupo de gestantes e mulheres em tratamento para infertilidade atendidas em duas unidades de saúde da cidade de Manaus – AM, 2012.

PCR para <i>Chlamydia trachomatis</i>	Grupos				Total
	Gestantes		Infertilidade		
	f_i	%	f_i	%	
Positivo	20	37,7	22	22,9	42
Negativo	33	62,3	74	77,1	107
Total	53	35,6	96	64,4	149

$p = 0,045$ (Teste do qui-quadrado de *Pearson*); f_i = frequência absoluta simples.

5.3 - Genotipagem do gene *ompA*

Das 42 amostras positivas para *C. trachomatis*, somente 14 amostras (33,3%) apresentaram amplificação positiva para genotipagem. Das 14 amostras genotipadas, 8 correspondem a amostras de gestantes e 6 correspondentes a amostras de infertilidade com os iniciadores desenhados. Portanto, 40% (8/20) das amostras de gestantes e apenas 27,3% (6/22) das amostras de infertilidade foram genotipadas.

Como já foi mencionado na metodologia deste trabalho, dois tipos de iniciadores foram utilizados: um descrito na literatura NLO/NRO, seguidos de *nested*-PCR com Pctm3/Sero2A e NLI/NRI e os desenhados nesta pesquisa: OmpAF/OmpAR, seguidos de *nested*-PCR ompAns1/ompAns2.

5.4 - Análise de diferentes iniciadores (*primers*) utilizados na PCR de genotipagem

A Tabela 10 mostra as PCR realizadas com diferentes iniciadores (NLO/NRO; NLI/NRI; Pctm3/Sero2A; OmpAF/OmpAR; ompAns1/ompAns2) com amostras positivas de mulheres inférteis e de gestantes. Dentre as 22 amostras positivas de mulheres inférteis testadas com os iniciadores inicialmente propostos, 10 (13,6%) apresentaram amplificação para o gene *ompA* e com os iniciadores desenhados, 14 (27,6%) teve a amplificação do *ompA* pelo *nested*-PCR.

Já dentre as 20 amostras positivas para o DNA plasmidial de *C. trachomatis* do grupo de gestantes, 7 (35,0%) amostras apresentaram amplificação positiva para genotipagem com os iniciadores inicialmente propostos Sero2A e Pctm3, enquanto que com os novos iniciadores (ompAns1 e ompAns2) 8 amostras (40,0%) tiveram o gene *ompA* amplificado pelo *nested*-PCR. Esta análise na frequência não apresentou diferenças estatisticamente significativas. Todos os valores encontrados para p-valor estavam acima de 0,05 (Tabela 10).

Tabela 10 - Distribuição segundo a frequência do resultado do PCR da genotipagem em relação ao grupo de gestantes e mulheres com diagnóstico de infertilidade atendidas em duas unidades de saúde da cidade de Manaus – AM, 2012.

PCR da genotipagem	Grupos				Total	p*
	Gestantes n=20		Infertilidade n=22			
	f _i	%	f _i	%		
Iniciadores inicialmente propostos						
NLO/NRO	2	10,0	3	13,6	5	0,182
Sero2A / Pctm3	7	35,0	3	13,6	10	0,192
NLI/NRI	5	25,0	1	4,5	6	0,054
Iniciadores desenhados						
OmpAF/OmpAR	2	10,0	4	18,2	6	0,231
ompAns1/ompAns2	8	40,0	6	27,6	14	0,467

f_i = frequência absoluta simples; * Teste exato de *Fisher*.

Não foi constatada associação estatística ao nível de 5% de significância.

Portanto, o total de amostras positivas para o DNA plasmidial de *C. trachomatis* dos dois grupos foram testadas com todos os iniciadores usados nesse estudo para a amplificação do gene *ompA*, ou seja, tanto os descritos por Gomes et al. (2004); Hsu et al. (2006); Ngandijio et al. (2004) quanto os desenhados neste estudo.

As Figuras 12 e 13 mostram géis da PCR para genotipagem de *C. trachomatis* utilizando os novos iniciadores. Os iniciadores desenhados para amplificação do gene *ompA* foram os únicos a amplificar (677 pb) o gene da amostra 76 (amostra de gestante) após *nested*-PCR (*ompAns1/ompAns2*). Adicionalmente, as amostras 5, 22B e 26 (amostras de infertilidade) apresentaram a amplificação do gene *ompA* na *nested*-PCR apenas com os iniciadores desenhados neste estudo *ompAns1* e *ompAns2*.

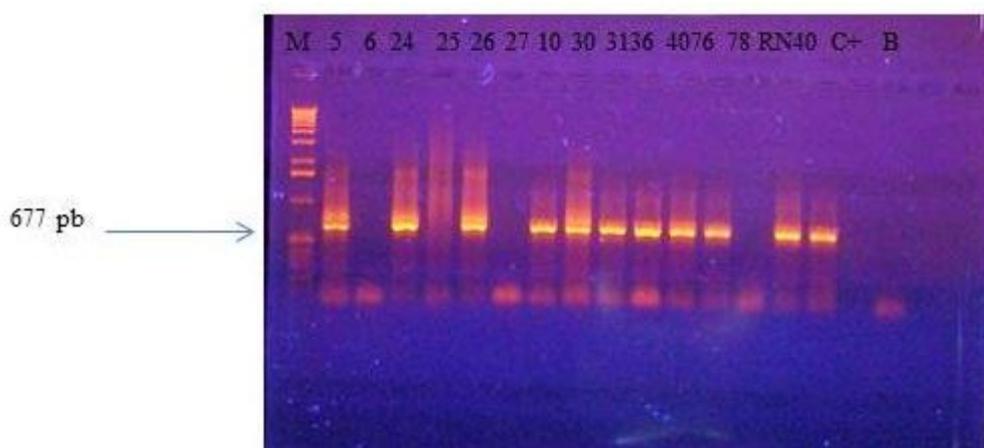


Figura 12 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (1 μ g/ μ L) dos produtos amplificados de *C. trachomatis* por *nested*-PCR genotipagem utilizando-se os iniciadores *ompAns1* e *ompAns2* que amplificam um fragmento de 677 pb do gene *ompA* da bactéria; M: Marcador de peso molecular 1 Kb (1000 pb) da INVITROGEN *Life Technologies*; Amostras positivas em mulheres inférteis, gestantes e RN: 5, 6, 24, 25, 26, 27, 10, 30, 31, 36, 40, 76, 78, C+: Controle Positivo; B: Branco.



Figura 13 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (1 μ g/ μ L) dos produtos amplificados de *C. trachomatis* por *nested*-PCR genotipagem utilizando-se os iniciadores ompAns1 e ompAns2 que amplificam um fragmento de 677 pb do gene *ompA* da bactéria; M: Marcador de peso molecular 1 Kb (1000 pb) da INVITROGEN *Life Technologies*; Amostras positivas em mulheres inférteis: 8, 1, 11, 15, 22B, 25, 27, 32, 77, 80, 81, 87, 90, 96, C+: Controle Positivo; B: Branco; 6, 7, 8.

5.5 - Confirmação e análise de sequenciamento dos produtos amplificados

Das 14 amostras amplificadas com os novos iniciadores, apenas 10 amostras foram genotipadas com êxito com os iniciadores inicialmente propostos NLO/NRO e Pctm3 e Sero2A e NLI e NRI, sendo 7 amostras de gestantes e 3 de mulheres inférteis. Das 4 amostras não amplificadas, uma era de gestante (amostra 76) e 3 eram de infertilidade (amostras 05, 22B e 26). Os genótipos correspondentes podem ser observados na Tabela 11.

Após a análise de sequenciamento dos produtos de PCR com os iniciadores propostos, realizou-se sequenciamento dos produtos de PCR obtidos com os novos iniciadores. Todas as 14 amostras amplificadas por *nested*-PCR (ompAns1/ompAns2), (8 amostras de gestantes e 6 de infertilidade) apresentaram amplificação positiva e foram sequenciadas para obter os genótipos correspondentes, os quais podem ser observados na Tabela 12.

Todas as seqüências dos genótipos identificados foram comparadas com protótipos de cada genótipo depositado no *GenBank* com seu número de acesso. Os valores de *e-value* e identificação máxima do *BLAST* foram considerados. Avaliou-se o grau de similaridade entre as seqüências das amostras depositadas no *GenBank* e cada seqüência já existente no banco de dados. Quanto menor o *e-value* maior a semelhança entre suas seqüências.

A análise de sequenciamento com os novos iniciadores confirmou o resultado obtido anteriormente com os iniciadores inicialmente propostos, que foi, genótipo D nas amostras 10, 30, 36 e 58. Entre a análise das amostras 31 e 40 os novos iniciadores confirmaram a identificação do genótipo E e na amostra 22A e 86 o genótipo F. A identificação do genótipo K nas amostras 20 e 24 de infertilidade confirmou o resultado anterior (Tabela 11 e Tabela 12).

Adicionalmente, analisaram-se e identificaram-se o genótipo E na amostra 05 e genótipo K nas amostras 22B e 26 de mulheres inférteis e genótipo I em amostra 76 de gestante apenas com os novos iniciadores (Tabela 11 e Tabela 12).

Tabela 11 – Tipos de *C. trachomatis* identificados por *BLAST* no *Genbank* (Manaus – AM, 2012).

Iniciadores utilizados: NLO/NRO seguido do Pctm3/Sero2A e do NLI/NRI.

Amostra	Identificação da amostra	Número de acesso no <i>GenBank</i>	Genótipo identificado	<i>e-value</i>	Max ident
10	Gestante	HM230054.1	D	0.0	98%
		FJ943519	Da	0.0	98%
30	Gestante	CP002054.1	D	0.0	99%
31	Gestante	CP001890.1	E	0.0	99%
36	Gestante	HM230054.1	D	3e-45	100%
40	Gestante	CP001890	E	0.0	99%
58	Gestante	HM230054	D	0.0	100%
		FJ943521.1	Da	0.0	100%
86	Gestante	HM230057.1	F	9e-93	98%
20	Infértil	DQ155300	K	0.0	99%
22A	Infértil	JF437563	F	0.0	99%
24	Infértil	FJ428246.1	K	0.0	99%

Tabela 12 – Tipos de *C. trachomatis* identificados por *BLAST* no *Genbank* (Manaus – AM, 2012).

Iniciadores utilizados: OmpAF/OmpAR seguido do ompAns1/ompAns2.

Amostra	Identificação da amostra	Número de acesso no <i>GenBank</i>	Genótipo identificado	<i>e-value</i>	Max ident
10	Gestante	AM179412.1	D	0.0	94%
30	Gestante	AY950628.1	D	0.0	100%
31	Gestante	DQ890028.1	E	0.0	96%
36	Gestante	FJ261943.1	D6	0.0	100%
40	Gestante	JN192145.1	E	2e-170	96%
58	Gestante	AM179412.1	D	0.0	90%
76	Gestante	AY950625.1	I	1e91	94%
86	Gestante	FJ261947.1	F	3e-64	90%
05	Infértil	DQ890028.1	E	0.0	91%
20	Infértil	AF414965.1	K	1e-17	95%
22A	Infértil	FJ943529.1	F	2e-133	85%
22B	Infértil	DQ357070	K	0.0	86%
24	Infértil	FJ428246.1	K	2e-73	82%
26	Infértil	DQ357070.1	K	3e-143	93%

De acordo com a análise feita no *GenBank*, a Tabela 13 mostra a distribuição dos genótipos identificados de *C. trachomatis* em mulheres gestantes e inférteis. Observa-se que para os dois grupos de mulheres estudados foram identificados uma maior frequência (50%) de genótipo D em gestantes e 66,7% de genótipo K em mulheres inférteis. Ainda observando a Tabela 13, identificou-se 25% de genótipo E em gestantes e 16,7% em mulheres com infertilidade. Já para o genótipo F, 12,5% e 16,7% foram identificados em gestantes e mulheres inférteis, enquanto que o genótipo I foi

identificado apenas no grupo de gestantes (12,5%). Os genótipos D e I não foram observados no grupo de mulheres inférteis. O genótipo K não foi observado em gestantes.

Tabela 13 - Distribuição segundo a frequência do genótipo identificado em relação ao grupo de gestantes e mulheres em tratamento para infertilidade atendidas em duas unidades de saúde da cidade de Manaus – AM, 2012.

Genótipo identificado	Grupos				Total
	Gestantes		Infertilidade		
	f _i	%	f _i	%	
D	4	50,0	-	-	4
E	2	25,0	1	16,7	3
F	1	12,5	1	16,7	2
I	1	12,5	-	-	1
K	-	-	4	66,7	4
Total	8	57,1	6	42,9	14

f_i = frequência absoluta simples.

5.6 - Análises de tipos de mutações e dos domínios variáveis do gene *ompA* de *C. trachomatis*

As sequências das amostras que tiveram os genótipos identificados foram analisadas e comparadas com as seqüências dos domínios variáveis (VD) de seu protótipo, conforme o número de acesso depositado no *GenBank* (Tabela 14). Observa-se que essas seqüências são muito variáveis, resultando em 35 pontos de mutações. Quanto ao tipo de mutação, foram identificadas do tipo transversão: troca de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa (A/G ↔ C/T) e transição: troca de uma purina por outra purina (G↔A); ou uma pirimidina por outra pirimidina (C↔T). Entre os genótipos das seqüências de amostras analisadas, observou-se que o genótipo K apresentou maior número de mutações, e ainda mais do tipo transição (C↔T). Seguindo a análise, o genótipo I foi que apresentou número de mutações do tipo transversão (GT; TG) e de transição (CT; AG). Já para os genótipos D e E, observou-se apenas uma mutação do tipo transição (AG) e 4 do tipo transversão (AT; TA; TG; CG), sendo que a mutação para CG foi identificada apenas para o genótipo D (Gráfico 1) (Tabela 14).

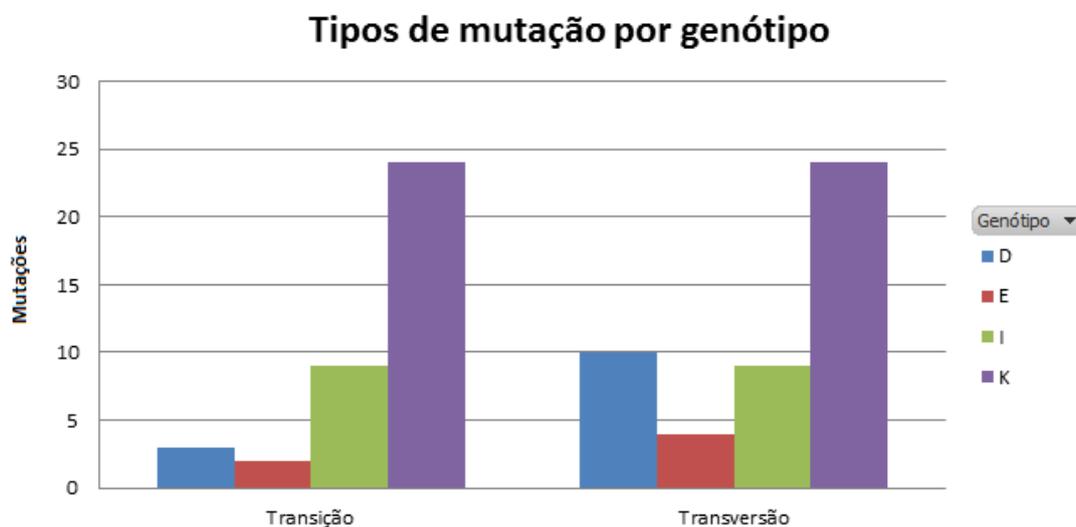


Gráfico 1 – Distribuição dos tipos de mutação por genótipo de acordo com as amostras de infertilidade e gestante na cidade de Manaus – AM, 2012.

O Gráfico 2 mostra o total de mutações por amostra analisada pelo VD. Observa-se que o maior número de mutações ocorreu nas amostras 20 e 24, que corresponde às amostras de infertilidade e amostra 76 de gestante. Conforme a análise realizada, as amostras 20 e 24 são as que apresentaram genótipos K (Gráfico 1) (Tabela 14) e a 76 o genótipo I. Quanto às demais amostras, não foi possível à identificação do VD, provavelmente devido à insuficiência de dados moleculares para análise. A amostra 05 (Infertilidade) foi considerada o protótipo para esta análise por apresentar a sequência dos nucleotídeos mais conservada entre as demais amostras com variáveis analisadas (aproximadamente 63 pb). O tamanho das sequências dos VD varia de 42 pb a 93 pb. De acordo com a análise feita no *GenBank* com número de acesso L03754.1, o tamanho da sequência dos nucleotídeos do VD II é de 63 pb.

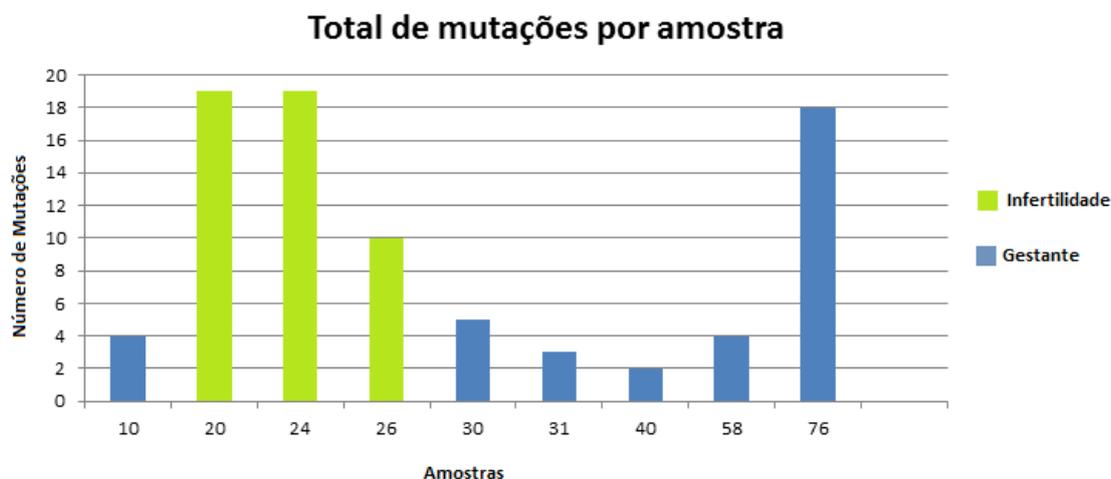


Gráfico 2 – Distribuição do total de mutações por amostra de infertilidade e gestante na cidade de Manaus – AM, 2012.

Quanto à análise para o total de mutações por grupo estudado, observe-se que apenas o grupo de infertilidade houve maior número de mutações (Gráfico 3).

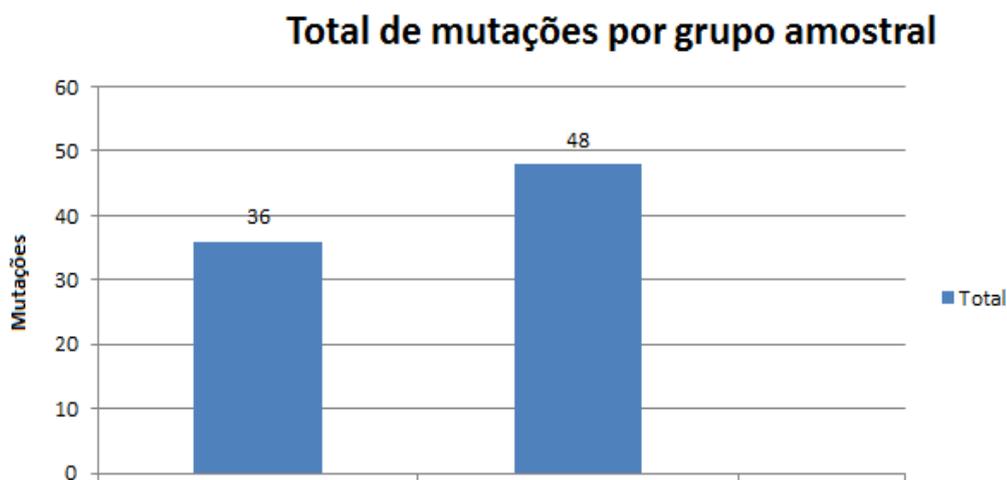


Gráfico 3 – Distribuição do total de mutações por grupo estudado na cidade de Manaus – AM, 2012.

Entre as amostras analisadas representadas na Tabela 14, apenas a amostra 26 (infertilidade) apresentou somente o domínio variável III com tamanho da sequência de 42 pb, conforme análise feita no *GenBank* com número de acesso L03753.1, ao passo que a amostra 76 (gestante), apresentou três domínios diferentes (VDI, II e IV). O tamanho das sequências de VDI e VDIV da amostra 76 é de 66 pb e para o VDII é de 63 pb, conforme número de acesso no *GenBank* L03754.1 para VDI e VDIV e L03751.1

para VDII. Nas demais amostras, todas apresentaram o domínio variável II. Adicionalmente, não foi possível identificar o(s) domínio(s) variante(s) das demais amostras.

Tabela 14 – Número de acesso no *GenBank* dos domínios variáveis do gene *ompA* de *C. trachomatis*.

Amostra	Identificação da amostra	Número de acesso no <i>GenBank</i>	Genótipo identificado	Modificação nucleotídica	Posição
10	Gestante	LO3754.1	D	T→G; A→G; T→G; A→T	31; 34; 36; 57
30	Gestante	LO3754.1	D	T→G; A→G; T→G; C→G; A→T	31; 34; 36; 44; 57
31	Gestante	LO3754.1	E	T→A; T→G; A→G	31; 36; 45
40	Gestante	LO3754.1	E	T→G; A→G	36; 45
58	Gestante	LO3754.1	D	T→G; A→G; T→G; A→T	31; 34; 36; 57
76	Gestante	LO3761.1	I	C→T; G→T; G→A; T→A; C→T; A→C; T→G; T→G; C→G; A→G; A→T; T→C; A→G; G→T; A→G; G→C; C→T; A→G	23; 24; 25; 26; 27; 29; 31; 36; 38; 42; 45; 48; 49; 51; 52; 53; 54; 57
20 ^a	Infértil	LO3761.1	K	A→T; C→T; G→T; G→A; T→A; C→T; A→C; T→A; T→C; C→T; A→T; A→T; T→C; A→G; T→C; G→T; A→G; G→C; C→T	22; 23; 24; 25; 26; 27; 29; 31; 37; 38; 42; 45; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54
24	Infértil	LO3761.1	K	A→T; C→T; G→T; G→A; T→A; C→T; A→C; T→G; T→C; C→T; A→T; A→T; T→C; T→C; G→T; A→G; G→C; C→T; A→G	22; 23; 24; 25; 26; 27; 29; 31; 37; 38; 42; 45; 48; 50; 51; 52; 53; 54; 57
26	Infértil	LO3753.1	K	G→C; T→C; A→C; C→T; A→T; A→G; G→T; G→C; T→C; T→C	40; 41; 42; 44; 45; 46; 51; 53; 54; 56

Modificações nucleotídicas das seqüências dos domínios variáveis identificadas e representadas por cores diferentes em diferentes posições do gene *ompA* de *C. trachomatis*.

5.7 - Análise Filogenética

Após análise dos resultados do BLAST as sequências do VD II do gene *ompA* foram selecionadas a partir dos dados de cada amostra e alinhadas com auxílio da ferramenta ClustalW, considerando-se os “gaps” do alinhamento como dados perdidos, não como indels (inserções ou deleções). A escolha do referido domínio deve-se ao fato deste apresentar maior qualidade e riqueza de dados dentre os resultados do sequenciamento de cada amostra.

A partir do alinhamento das sequências construiu-se uma árvore filogenética (Figura 14) utilizando-se o modelo evolutivo de Três Parâmetros, ou K81, descrito por Kimura (1981). Observa-se que valores do *bootstrap* são mostrados nos ramos da árvore. Os valores que se encontravam abaixo de 50 foram considerados insignificantes, portanto, foram excluídos. A partir da análise filogenética verificou-se a segregação da árvore em quatro agrupamentos distintos, que correspondem aos quatro genótipos adotados no estudo (D, E, I e K), formando entre si um grupo monofilético enraizado pela sequência do Domínio Variável III (VDIII) do genótipo K.

Observou-se ainda que as amostras identificadas como genótipo D formam um grupo monofilético com aquelas identificadas como genótipo E, e as amostras identificadas como genótipo K formam um grupo monofilético com aquelas identificadas como genótipo I. Além disso, observou-se que o ancestral do genótipo K divergiu daquele do genótipo I antes da segregação entre os ancestrais dos genótipos D e E. Os dados utilizados na análise não foram suficientes para fornecer uma topologia clara dentro dos grupos de cada genótipo separadamente.

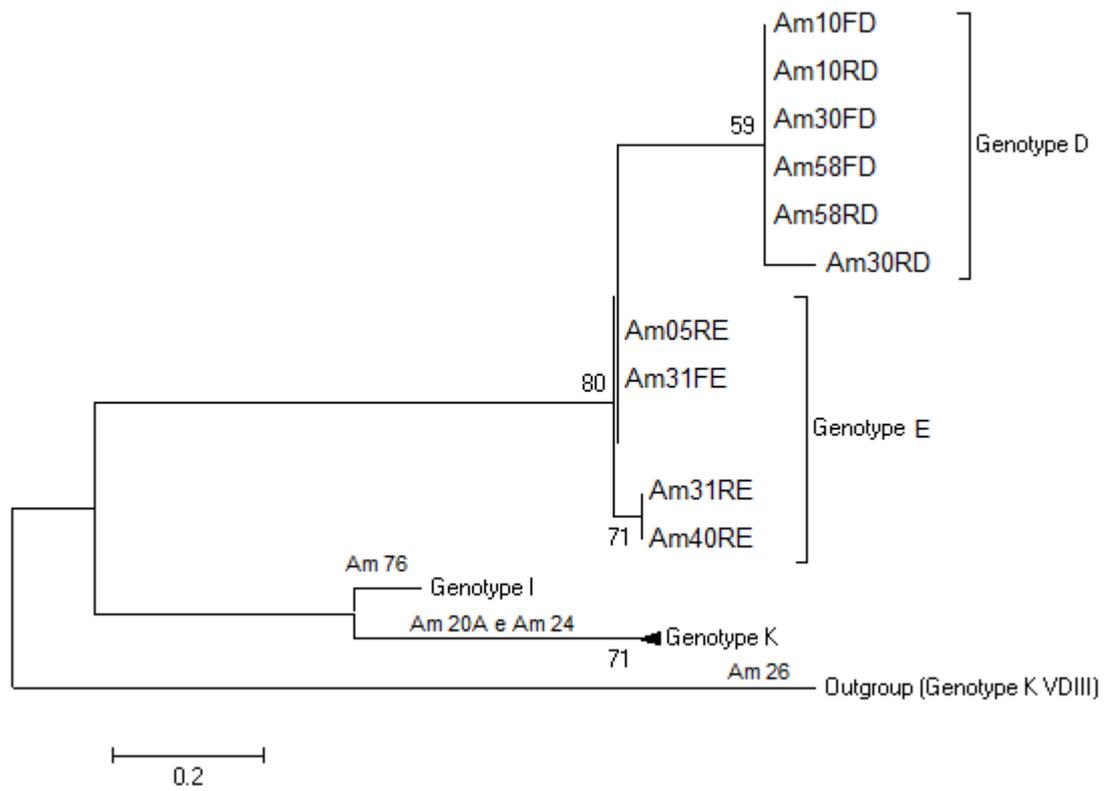


Figura 14 – Árvore filogenética de análises de domínio variável II do gene *ompA* de *C. trachomatis* analisadas a partir das sequências obtidas no *GenBank* de amostras de mulheres gestantes e inférteis (Manaus – AM, 2012).

6 - DISCUSSÃO

6.1 - Análises de variáveis das características das populações estudadas

Embora, o foco principal deste estudo seja a análise das seqüências do gene *ompA* de *C. trachomatis*, consideramos o estudo das variáveis características das populações com o intuito de conhecer a população do estudo.

Analisando as variáveis das características das duas populações estudadas em relação à frequência da faixa de idade, verificou-se que a faixa etária de mulheres com diagnóstico de infertilidade foi ≥ 30 anos (34,4%), cuja idade média com DP foi $32,3 \pm 4,7$ e positividade para *C. trachomatis* de 22,9%. Por outro lado, a idade de maior frequência entre as gestantes estudadas foi de 18 – 24 anos (52,8%) com uma média de idade $24,9 \pm 4,9$ e positividade para *C. trachomatis* de 37,7%. Embora a maioria dos estudos preconiza que a alta prevalência da infecção por clamídia encontra-se em jovens com faixa etária < 25 anos (CDC, 2012), Land e Evers (2002) descreveram que a maioria das pacientes que apresentam problemas de infertilidade possui idade > 25 anos. Neste estudo, é possível que entre as mulheres inférteis não haja associação entre a infecção e idade, uma vez que a maioria foi em busca de tratamento para infertilidade com idade entre 30 a 39 anos.

Dados analisados quanto ao estado civil, 92,7% das mulheres pertencentes do grupo de infertilidade e 84,9% das gestantes declararam ter união estável. Esses dados mostram a predominância da união estável. Nos dois grupos, segundo dados do IBGE (2010), nos últimos 10 anos, o número de uniões consensuais, ou seja, aquela união que não há cerimônia no civil nem no religioso aumentou no Brasil. A região que apresenta maior proporção de pessoas vivendo em união consensual fica na região Norte. Neste estudo, embora a maioria das mulheres tenha declarado união estável, observou-se taxa de frequência de positividade de *C. trachomatis* (22,9%) em mulheres inférteis e (37,7%) em gestantes. No estudo realizado por De Lima Freitas et al. (2011), a alta prevalência encontrada de *C. trachomatis* (52,8%) provavelmente está relacionada com número de parceiros sexuais (48,2%) que já tiveram contato. De acordo com CDC (2012), mulheres são frequentemente reinfectadas por seus parceiros que não receberam

tratamento. Portanto, Gaydos et al. (1991) revelaram que o parceiro sexual masculino é um importante reservatório para as infecções que ocorrem no sexo feminino.

No presente estudo, apenas o grupo de mulheres inférteis foi em busca de tratamento. No que se refere ao presente estudo, dados nos mostram a associação de aumento de idade (30 a 39 anos) de mulheres inférteis que buscaram tratamento para a infertilidade (93,8%). Esses dados estão de acordo com Borges et al. (2005), a relação idade e infertilidade são bastante conhecidas. Segundo a *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) (2000), a idade da mulher é um fator que está bem estabelecido que pode levar à infertilidade.

De acordo com esta pesquisa realizada em 96 mulheres inférteis, das 64,6% dos casos de mulheres que apresentavam infertilidade primária e das 35,4% participantes com infertilidade secundária, 22 apresentaram positividade para *C. trachomatis*. No estudo de De Lima Freitas et al. (2011), encontraram uma taxa de 54,4% de mulheres que apresentavam infertilidade primária e 44,6% infertilidade secundária com resultado positivo para clamídia. De acordo com os critérios do *CDC* (2012), mesmo que os sintomas da clamídia sejam geralmente leves ou ausentes, complicações sérias causadas pela bactéria podem causar danos irreversíveis com presença de possíveis lesões tubárias, tendo como consequência a infertilidade. Um estudo realizado na Holanda por Hartog (2004) descreve que a presença mínima de lesões tubárias ou endometrite assintomática compromete a fertilidade, mesmo que seus achados laporoscópicos se mostrem normais.

Com relação ao aborto, 24 (25,0%) das mulheres inférteis e 16 (30,2%) das gestantes relataram ter passado pelo processo de aborto. O resultado deste trabalho com relação ao aborto e infecção por clamídia foi que 22,9% das mulheres inférteis e 37,7% das mulheres gestantes relataram aborto. A participação da clamídia está associada como um dos agentes responsáveis pela infecção causando o aborto. Embora alguns estudos demonstrem a relação do aborto e infecção clamidial, não podemos afirmar que este fato estaria relacionado apenas com a infecção por *C. trachomatis*, pois entre as mulheres gestantes, 20 (37,7%) apresentaram positividade para clamídia.

Neste estudo observou-se que a distribuição de gravidez ectópica nas mulheres com diagnóstico de infertilidade foi mínima (5,2%) no universo estudado de 96 mulheres. Do total de 96 pacientes analisadas neste estudo 5 relataram episódio de

gravidez ectópica. Segundo Bouyer et al. (2003); Marchbanks e Aneger (1988), existem vários fatores que se associam ao aumento de risco para gravidez ectópica durante a vida reprodutiva. De acordo com Fernandes et al. (2004), o conseqüente dano parcial ou completo das trompas de Falópio permite que essas mulheres, no futuro, vivenciem como seqüela gravidez ectópica. Beslagic; Jasminka e Mahmutovic (2004) relataram que a DIP é uma doença de etiologia polimicrobiana e a participação da clamídia está associada como um dos agentes responsáveis pela infecção causando a gravidez ectópica.

Neste estudo, 42,7% das pacientes de infertilidade e 43,4% das gestantes apresentaram dados clínicos de cervicite, cuja positividade para *C. trachomatis* em mulheres inférteis e em gestantes foi de 22,9% e 37,7%, respectivamente. Estes dados apresentam uma importante informação para a saúde reprodutiva da mulher, pois, em diversas situações podem evoluir para seqüelas como DIP ou infecções na gravidez, podendo levar a parto prematuros e infecções neo-natais. Vários estudos demonstraram que a etiologia das cervicites pode estar relacionada tanto com *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; WHO, 2005).

Ao passo que 22 pacientes (22,9%) neste estudo apresentaram diagnóstico positivo para *C. trachomatis*, das 96 mulheres arroladas em uma clínica de infertilidade, 42,7% apresentaram achados anormais nos resultados do exame de HSG. A HSG é um exame que permite avaliar a permeabilidade tubária e a cavidade uterina na investigação de causa de infertilidade primária ou secundária. Este exame auxilia na investigação e confirmação do diagnóstico do trato genital feminino superior, como por exemplo, localizar aderências tubárias, e principalmente obstruções tubárias geralmente associadas à doença inflamatória pélvica causada pela *C. trachomatis* ou de etiologia polimicrobiana. Segundo Almeida et al. (2000), a HSG é o método mais utilizado atualmente para o diagnóstico de fator tuboperitoneal por ser mais prático. Entretanto, um teste específico para confirmar o diagnóstico para *C. trachomatis* é mandatório, porém, segundo Marques e Menezes (2005), não se deve deixar de valorizar os exames inespecíficos que nos podem conduzir a um diagnóstico de suspeição.

6.2 - Análise de amplificação do gene *ompA* de *C. trachomatis* pelo método de PCR

Apesar de a metodologia de estudo já estar toda estabelecida, observou-se resultados negativos do gene *ompA* de amostras positivas à PCR tendo como alvo o DNA plasmidial de *C. trachomatis*. Assim, surgiu a possibilidade dos resultados serem falso-negativos por não estarem amplificando o *ompA* de todas as amostras positivas pelo o plasmídeo. Diante do exposto, neste trabalho realizamos o desenho de novos iniciadores e a otimização da reação em cadeia da polimerase. A acuidade da PCR depende da escolha da seqüência do DNA, pois, segundo Brunelle e Sensabaugh (2012) há uma elevada variabilidade nucleotídica no gene *ompA* entre as cepas de *C. trachomatis*. Além dos comentários descritos anteriormente a respeito à amplificação do gene *ompA*, no presente estudo, obtivemos um resultado de 77,2% (32/42) de não amplificação do gene *ompA* com os iniciadores descritos na literatura. Assim, como foram relatados em outros estudos, Quint et al. (2010) descreveram de 50 amostras positivas, 14 (28%) foram negativos para o gene *ompA* através de *nested*-PCR e portanto, não foram sequenciadas. Ainda mais, os iniciadores usualmente usados nas reações de genotipagem amplificam tamanho de fragmento grande (1.1 kb) do gene *ompA*. Amostras com baixa qualidade de DNA frequentemente são negativas, portanto, não sendo possível a tipagem dessas amostras (MOLANO et al., 2004). Assim, como a literatura relata, o resultado obtido nesse trabalho gerou um fato curioso, pois, nem todas as amostras positivas pelo o plasmídeo houve a amplificação do gene *ompA*, deixando dúvidas no resultado final.

Em nosso estudo, observamos ao todo que de 149 participantes estudadas, 28,2% (42/149) foram positivas quando realizada PCR tendo como alvo o DNA plasmidial. Assim, esperava-se que todas as amostras positivas para o DNA plasmidial de *C. trachomatis* fossem também positivas para o gene *ompA*. Entretanto, somente 13,6% e 4,5% das amostras foram positivas com os iniciadores de amplificação do gene *ompA* com iniciadores inicialmente propostos (Sero2A/Pctm3 e NLI/NRI) em amostras de infertilidade e para as amostras de gestantes, 35,0% e 25,0% foram positivas com os iniciadores Sero2A/Pctm3 e NLI/NRI, respectivamente. Justificando o ocorrido para a não amplificação do gene *ompA* em todas as amostras positivas, a literatura relata uma elevada variabilidade genética neste gene entre as cepas estudadas e que a acuidade da

PCR estaria diretamente relacionada à escolha das sequências nucleotídicas (ou iniciadores) utilizados na reação da PCR (BRUNELLE e SENSABAUGH, 2012).

Diante de resultados neste estudo, foi realizado o desenho de novos iniciadores para região do gene *ompA*. Na tentativa de melhorar o desempenho da PCR para genotipagem foram alinhadas várias sequências nucleotídicas depositadas no *GenBank* e observou-se a região de menor variabilidade genética para realizar o desenho dos novos iniciadores. Após realização de novas PCR, desta vez, utilizando os novos iniciadores desenhados, que também possui como alvo o gene *ompA*, observou-se que 27,6% e 40,0% de positividade foram para amostras de infertilidade e de gestantes. O desenho de novos iniciadores para *nested-PCR* foi essencial, pois o tamanho de fragmento possui 677 pb, ou seja, menor que 1.1 Kb. Molano et al. (2004) descreveram que as sequências de menor tamanho são considerados mais adequados no processo de amplificação. Apesar destes resultados não terem apresentado significância estatística eles foram melhores que o anterior. Portanto, podemos dizer que são mais adequados para serem utilizados nas amostras na PCR de genotipagem.

Quanto às demais amostras positivas para DNA plasmidial de *C. trachomatis* e a não amplificação do gene *ompA*, alguns estudos correlacionam esse fato por outros fatores. Segundo Quint et al. (2010), a não amplificação do gene *ompA* em amostras positivas para *C. trachomatis* poderá ser devido a baixa quantidade de DNA na amostra. A positividade de DNA plasmidial de *C. trachomatis* está relacionado com o aumento da sensibilidade do método de identificação, quando dirigida ao plasmídio críptico da bactéria presente em 7 a 10 cópias por célula, ao comparar com o uso de alvos cromossômicos de cópia única, como o gene *ompA* (MAHONY et al., 1993). Portanto, dados da literatura mostram que o motivo para o resultado falso negativo do *ompA* em amostras positivas por plasmídeo podem ser devido a presença de uma única cópia desse gene (JURSTRAND et al., 2001). Ainda mais, todos isolados de plasmídios de *C. trachomatis* que parasitam a espécie humana são altamente conservados com <1% de variação nucleotídica (BIROS, et al., 2007).

6.3 - Identificação de genótipos do gene *ompA* de *C. trachomatis*

As amostras de mulheres inférteis e de gestantes foram genotipadas pela comparação com sequências de amostras protótipos depositadas no *GenBank*,

atribuindo dessa forma, aos genótipos específicos do gene *ompA* de *C. trachomatis*. Identificamos assim genótipos D, E, F, I e K. Como descrito por outros autores, a prevalência de genótipos de *C. trachomatis* têm sido identificado em diversos lugares do mundo, como os genótipos D (5 – 48%), genótipos variantes de D e E (22 - 44%) e F (8 - 20%), sendo esses predominantemente encontrado em infecções urogenital. Já para os genótipos G (4 - 7%), Ga, H (<5%), I (6%), genótipos variantes de I e J (5 -13%), e K (5 - 10%), são considerados como os tipos menos comuns encontrados (De HARO-CRUZ et al., 2011). Na América Latina e no Caribe, são raros dados de prevalência de genótipos de *C. trachomatis* em amostras endocervical e uretrais. Já em amostras de mulheres brasileiras, Lima et al. (2007) descreveram os genótipos que foram identificados associados com infecções endocervical: D (33, 3%), E (33,3%), F (16,7%) e K (16,7%). Gallo et al. (2010) revelaram um estudo realizado recentemente na Argentina com relação aos genótipos mais prevalentes encontrados de amostras endocervicais. A maioria dos genótipos obtidos foi, E (46,9%), D (21%) e F (16,1%).

Nossos dados estão de acordo com Lima et al. (2007) e Bandea et al. (2010) onde os genótipos D (50%) e E (25,0%) foram predominantes no grupo de mulheres gestantes. Ao passo que para os demais genótipos, foram encontrados o F e I em igual proporção (12,5%). Além de serem os mais prevalentes, os genótipos D, E e F são também responsáveis para a maioria das infecções no trato genital causadas por *C. trachomatis* (De HARO-CRUZ et al., 2011). Na descrição de Anttila et al. (2001), o genótipo F está frequentemente associado com dor de baixo ventre.

A predominância do genótipo D encontrado nesse trabalho sugere vantagem biológica na nossa região. Assim, a diversidade genética do gene *ompA* é necessária para permitir seu sucesso ecológico no hospedeiro (BRUNHAM et al., 1994). Lampe; Suchland e Stamm (1993) sugerem que é provável que a recombinação de variabilidade genética ser um mecanismo de diversificação do *ompA*. Esta sugestão está baseada não apenas em outros estudos, como por exemplo, descrito por Brunham et al. (1994), mas também no estudo atual. Ainda mais, neste estudo, não foi identificado o genótipo K no grupo de mulheres grávidas.

Entre as mulheres inférteis, o genótipo predominante correspondeu ao sentido inverso ao que foi descrito por Lima et al. (2007) e Gallo et al. (2004), sendo que no estudo descrito por Gallo et al. não foi identificado o genótipo K no grupo de amostras

estudado. No presente estudo, o genótipo predominante foi K (66,7%), e E e F (16,7%). Segundo dados sugeridos por Antilla et al. (2001), Koskela et al. (2000), Marrazo e Stamm (1998) e Morre et al. (2000), a identificação do genótipo K em mulheres inférteis associada a infecção crônica tem sido reconhecido como causa de infertilidade. Portanto, no presente estudo, a taxa encontrada de genótipo K somente no grupo de mulheres inférteis está de acordo aos estudos de Antilla et al. (2001), Koskela et al. (2000), Marrazo e Stamm (1998) e Morre et al. (2000).

6.4 - Análise das sequências dos Domínios Variáveis e de tipos de mutações do gene *ompA* de *C. trachomatis*

Ao analisar as amostras sequenciadas de *C. trachomatis* a maioria revelou uma elevada variabilidade genética. Das 14 seqüências obtidas, analisaram-se os VD de apenas 9 amostras. Uma possível explicação para a não identificação dos VD das demais amostras deve-se aos dados moleculares insuficientes para a análise (no hits found) ou devido ao número de pares de bases insuficiente para análise. Os tamanhos de fragmentos dos VD de amostras analisadas e comparadas com as depositadas no banco de dados *Genbank* são pequenos (42 pb a 93 pb). Quanto à amostra 05 de infertilidade, cuja identificação do VD foi do tipo II (VDII), foi a que apresentou sítio mais conservado. Portanto, esta amostra foi considerada o protótipo para as análises das demais amostras.

Em apenas duas amostras com os VD identificados, observaram-se 2 a 3 mutações. As demais apresentaram até 19 variações nucleotídicas. A elevada variabilidade da MOMP foi descrita por vários autores e por sua vez, as mutações ocorrem frequentemente entre os genótipos (YANG et al., 2010).

Segundo Everett; Bush e Anderson (1999) e Yuan et al. (1989), os genótipos e os segmentos variáveis dos domínios podem ser diferenciados pela seqüência do gene *ompA*. Quanto à análise feita neste estudo, a região do VDII foi que mais apresentou variações nucleotídicas.

Duas amostras de infertilidade com a identificação de genótipo K e 1 amostra de gestante com genótipo I foram as que apresentaram maior número de mutações do tipo transição e transversão. Nas duas amostras de infertilidade, verificamos 19 pontos de

mutações, das quais 6 foram de transversão e na amostra de gestante observamos 18 pontos de mutações, das quais 7 foram de transversão. A mutação conhecida por transversão é classificada como menos comum, pois, há troca de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa. Devem-se considerar as dificuldades no progresso no desenvolvimento de novas terapias anti-clamidia devido à falta de conhecimento do sistema genético clamidia (KARI et al., 2011). Segundo Kari et al. (2011), a identificação e conhecimento de mutações de genes essenciais com potencial de patogenicidade deverá ser aplicado na manipulação genética para desenvolvimento de terapias efetivas microbiana e de vacinas.

As amostras de infertilidade e de gestante descritas acima apresentaram mutações na região de variabilidade VDII e nas regiões VDI, VDII e VDIV, respectivamente. Segundo Cevenini; Donati e Sambri (2002), as diferenças nas sequências de VDI a VDIV entre os genótipos conferem a variação genética. Ou seja, isso pode explicar a importância da presença de peptídeos antigênicos nos VD para desenvolvimento de vacinas (GAO et al., 2007; HSU et al., 2006 e LEE et al., 2006).

Embora Bandea et al. (2001) e De Haro-Cruz et al. (2011) descreveram que os genótipos K e I são menos comuns, a frequência de genótipo K e I encontrada neste estudo foi considerada elevada (66,7%) e (12,5%), respectivamente. Segundo De Haro-Cruz et al. (2011), mutações observadas nos VDI, VDII e VDIV nesses genótipos podem modificar as sequências dos aminoácidos. Segundo os mesmos autores, tal fato pode indicar o potencial de evasão de *C. trachomatis* a resposta imune do hospedeiro.

6.5 - Análise filogenética dos Domínios Variáveis de *C. trachomatis*

Quanto à análise filogenética do presente trabalho, verificamos que essas amostras compartilham do mesmo ancestral, demonstrando uma origem comum. Lima et al. (2007) descrevem no seu estudo, a identificação de uma grande quantidade de substituições nucleotídicas que foram observadas no gene *ompA*, e que este fato sugere a seleção genotípica ou a própria seleção no hospedeiro e adaptação bacteriana. Ou seja, esta análise de seqüências pertencentes a esses genótipos pode permitir possivelmente, a verificação de alterações características que podem ter conferido a bactéria uma

vantagem evolutiva, imunológica, permitindo assim, sua disseminação na região estudada.

Diante deste estudo, e de acordo com o que foi discutido e sugerido por Lampe; Suchland e Stamm (1993), as variações encontradas nas sequências surgem dos pontos de mutação ou possivelmente pela recombinação dos VD na MOMP.

Das amostras analisadas neste estudo, verificamos que as frequências genotípicas mais frequentes foram para os genótipos D (50%) e E (25%) em gestantes e para o genótipo K (66,7%) em mulheres inférteis, respectivamente. Todos esses achados genotípicos apresentaram os pontos de mutação na região de variabilidade VDII, exceto para uma amostra de infertilidade (VDIII).

Embora neste estudo foi caracterizado o genótipo F, não foi possível identificar os domínios variáveis. É possível que se trata de fornecimento de informação insuficiente para a identificação dos VD no resultado de sequenciamento.

A análise de variabilidade do gene *ompA* de *C. trachomatis* no presente estudo providenciou resultados interessantes que poderá ser aplicado para estudos epidemiológico, caracterizando, portanto, a circulação dos tipos de *C. trachomatis* na nossa região e aplicar para futuros estudos como alvo de drogas. Apesar de existir alguns estudos que já descreveram a caracterização dos genótipos no Brasil, é de nosso conhecimento que este é o primeiro estudo que tenha caracterizado os genótipos e análise dos domínios variáveis do gene *ompA* de *C. trachomatis* em mulheres inférteis e gestantes em Manaus - AM.

7 - CONCLUSÕES

1. Os novos iniciadores desenhados OmpAF/OmpAR e ompAns1/ompAns2 mostraram melhores resultados do que os iniciadores inicialmente propostos para serem utilizados na PCR de genotipagem para *C. trachomatis*.
2. Neste estudo foram identificados os genótipos D, E, F, I e K nos grupos de mulheres estudados.
3. Os genótipos D (50%) e E (25%) foram os mais frequentes entre o grupo de gestantes.
4. O genótipo K (66,7%) foi o mais frequente entre as mulheres inférteis.
5. Não foi identificado, neste estudo, o genótipo K no grupo de mulheres grávidas. Este resultado fundamenta a relação do genótipo/sorotipo K em mulheres com infecções crônicas e com infertilidade.
6. As amostras de infertilidade com a identificação de genótipo K e a amostra de gestante com genótipo I foram as que apresentaram maior número de mutações do tipo transição e transversão.
7. A região VDII foi que mais apresentou variações nas seqüências analisadas.
8. A freqüência de genótipo K e D encontrada neste estudo são consideradas elevadas (66,7%) e (50,0%).
9. Sugere-se que as variações encontradas nas sequências dos genótipos identificados surgem dos pontos de mutação ou possivelmente pela recombinação dos VD na MOMP.
10. Neste estudo, observou-se que os genótipos D, E, I e K compartilham do mesmo ancestral.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADETUNDE, I.A.; KODUAH, M.; AMPORFUL, J.K.; DWUMMOH-SARPONG, A.; NYARKO, P.K.; ENNIN, C.C.; APPIAH, S.I.; OLADEJO, N. Epidemiology of Chlamydia Bacteria Infections – A Review. **Journal of American Science**, v. 5, n. 4, p. 55-64, **2009**.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, MARTIN; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia molecular da célula*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, **2004**.

ALBRECHT, M.; SHARMA, C.M.; REINHARDT, R.; VOGEL, J.; RUDEL, T. Deep sequencing-based discovery of the *Chlamydia trachomatis* transcriptome. *Nucl. Acids Res.*, v.38, n. 3, p. 868-877, 2010.

ALENCAR, A.A.F.; FERREIRA, L.C.L.; LOUREIRO, J.A.S. Detecção de *Chlamydia trachomatis* por imunofluorescência direta em esfregaços endocervicais. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**, v. 103, n.6, p.199–203, **1993**.

ALFAIA, A.P.B.B. Infecção por *Chlamydia trachomatis* em gestantes: Prevalência e Importância Pré-natal. **2005. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical)** – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus – AM.

ALLAN, I.; PEARCE, J .H. Aminoacid requirements of strains *Chlamydia trachomatis* and *C. psittaci* growing in McCoy cells: Relationship with clinical syndrome and host origin. **J. Gen. Microbiol.**, v. 129, p. 2001-2007, **1983**.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, **1997**.

ALZHANOV, D.T.; SUCHLAND, R.J.; BAKKE, A.C.; STAMM, W.E.; ROCKEY, D.D. Clonal isolation of Chlamydia-infected cells using flow cytometry. **J Microbiol Methods.**, v. 68, p. 201-8, **2007**.

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. **Optimal evaluation of the infertile female**. A committee opinion. <http://www.asrm.org>. 2000.

ANTTILA, T.; SAIKKU, P.; KOSKELA, P.; BLOIGU, A.; DILNER, J.; IKÄHEIMO, I.; JELLUM, E.; LEHTINEN, M.; LENNER, P.; HAKULINEN, T.; NÄRVÄNEN, A.; PUKKALA, E.; THORESEN, S.; YOUNGMAN, L.; PAAVONEN, J. Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. **JAMA**, v. 285, p. 47-51, **2001**.

ARAÚJO, RSC. Estudo da infecção genital por *Chlamydia trachomatis* em adolescentes e jovens do sexo feminino no distrito sanitário leste do município de Goiânia: prevalência e fatores de risco. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 24, n.7, p.492-492, **2002**.

- BAEHR, W.; ZHANG, Y.X.; JOSEPH, T.; SU, H.; NANO, F.E.; EVERETT, K.D.; CALDWELL, H.D. Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 85, n.11, p. 4000-4004, 1988.
- BARACAT, E.C. e LIMA, G.R. Guia de medicina ambulatorial e hospitalar de ginecologia. A São Paulo: Manole, **2005**.
- BARNES, R.; SCHACHTER, J. Infecções causadas por *Chlamydia trachomatis*. In: MORSE, S.A.; MORELAND, A.A.; HOLMES, K.K. Atlas de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, capítulo 4, p. 65-86, **1997**.
- BAUER, H.M.; MANOS, M. M. PCR Detection of Genital Human Papillomavirus. In: Applications – **Viral Pathogens**, p. 407-413, **1998**.
- BEATTY, W.L.; MORRISON, R.P.; BYRNE, G.I. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. **Microbiol. Rev.**, v. 58, p. 686-699, **1994**.
- BÉBÉAR, C.; BARBEYRAC, B. Genital Chlamydia trachomatis infections. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 15, n. 1, **2009**.
- BÉBÉAR, C.; GROMB, S. Chlamydia trachomatis infection in children: Do not forget perinatal acquisition: A case report of a 7-year old girl, *Chlamydia trachomatis* infected, presumed sexually assaulted. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 17, p. 96-98, **2010**.
- BENI, B.T.; MOTAMEDI, H.; ARDAKANI, M.R. Genotyping of the prevalent *Chlamydia trachomatis* strains in cervical infections in women in Ahvaz, Iran. **4** v. 59, p. 1023-1028, **2010**.
- BESLAGIC, E.; JASMINKA, G.; MAHMUTOVIC, S. Detection of *Chlamydia trachomatis* in cervical smear samples with determined HPV. **Med. Arth.**, v. 3, n. 58, p. 143-4, **2004**.
- BIRKELUND, S.; STEPHENS, R.S. Construction of physical and genetic maps of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 by pulsed-field gel electrophoresis. **J Bacteriol.** V. 174, n. 9, p. 2742-2747, **1992**.
- BIRO, F. Adolescents and sexually transmitted diseases. Maternal and Child Health Technical Information Bulletin. **Washington, DC; National Center for Education in Maternal and Child Health in Cooperation with the Maternal and Child Health Bureau Health Resources and Services Administration, Public Health Service, US Department of Health and Human Services, 1992**.
- BIROS, E.; BODNÁR, J.; BIROS, I.; BIROSOVA, E.; MOJZIS, J.; HRIVNÁK, M.; KLIMČÁKOVÁ, L.; FINDLAY, I.; MIROSSAY, A.; MIROSSAY, L. Nucleic Acid Amplification Technique for Detection of *Chlamydia trachomatis* Infection from Clinical Urogenital Swabs. **Folia Microbiol.**, v. 52, n. 4, p. 437-442, **2007**.

BORGES, L.S.; SILVA, J.C.R.; SILVA, AC.J.S.R.; AGUIAR, F.M.; NETO, O.B.P.; REIS, F.J.C.; NOQUEIRA, A.A. Avaliação da concordância diagnóstica entre métodos não invasivos e endoscopia na investigação de infertilidade. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, v. 27, n. 7, p. 401-406, **2005**.

BOUYER, J. COSTE, J. SHOJAEI, T. POULY, J.L. FERNANDEZ, H. GERBAUD, L. et al. Risk factors for ectopic pregnancy: a comprehensive analysis based on a large case-control, population-based study in France. **Am J Epidemiol.**, v.157, p. 185-94. **2003**.

BRUNELLE, B.W.; SENSABAUGH, G.F. The *ompA* Gene in *Chlamydia trachomatis* Differs in Phylogeny and Rate of Evolution from Other Regions of the Genome. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 578-585, **2006**.

BRUNELLE, B.W.; SENSABAUGH, G.F. Nucleotide and phylogenetic analyses of the *Chlamydia trachomatis ompA* gene indicates it is a hotspot for mutation. **BMC Research notes**, v. 5, n. 53, **2012**.

BRUNHAM, R.; YANG, C.; MACLEAN, I.; KIMANI, J.; MAITHA, G.; PLUMMER, F. *Chlamydia trachomatis* from Individuals in a Sexually Transmitted Disease Core Group Exhibit Frequent Sequence Variation in the Major Outer Membrane Protein (*omp1*) Gene. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 458-463, **1994**.

BRUNHAM, R.C. Human immunity to chlamydiae. In: *Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity*. DC: ASM Press, p. 211-238, **1999**.

BRUNHAM, R.C.; REY-LADINO, J. Immunology of *Chlamydia* Infection: Implications for a *Chlamydia trachomatis* Vaccine. **Nature Reviews/Immunology**, v.5, p.149-161, **2005**.

BYRD, T.F.; HORWITZ, M.A. Regulation of transferring receptor expression and ferritin content in human mononuclear phagocytes. Coordinate upregulation by iron transferrin and downregulation by interferon gamma. **J Clin Invest**, v. 91, p. 969-976, **1993**.

CAMPBELL, L.A.; KUO, C.-C, WANG, S.-P; GRAYSTON, J.T. Serological response to *Chlamydia pneumoniae* infection. **J. Clin. Microbiol.** V. 28, p. 1261-1264, **1990**. In: MYGIND, P.; CHRISTIANSEN, G.; PERSSON, K.; BIRKELUND, S. Analyses of the Humoral Response to *Chlamydia trachomatis* Outer Membrane Protein 2. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 3, p. **1998**.

CANADA COMMUNICABLE DISEASE REPORT (CCDR). 2002 Canadian Sexually Transmitted Infections Surveillance Report (Supplement). Public Health Agency of Canada, Ottawa, Ont. Ref Type: Serial (Book, Monograph). June [31S2], p. 1-49, 2005.

CARVALHO, N.S.; ANGELI, R.; KRAJDEN, M. Prevalência dos agentes de cervicite: Análise da Literatura. **DST – J bras Doenças Sex Transm.**, v. 16, n. 4, p. 56-60, 2004.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Screening Tests to Detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections. RR-15, **Centers For Disease Control and Prevention (CDC)**, Atlanta, GA. Ref Type: Report, **2002**.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Trends in Reportable Sexually Transmitted Diseases in the United States, 2003 – **National Data on Chlamydia, Gonorrhea and Syphilis, 2003.** Disponível em: <<http://www.cdc.gov/std/stats/trends2003.htm>> Acesso em: 28 Mar. 2004.

CDC WONDER. Policy Guidelines for Prevention and Management of Pelvic Inflammatory Disease (PID). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National Center for Prevention Services. v.40, **1991.**

CENSO IBGE 2010. Dados da Sociedade Brasileira. Disponível em: <http://ricardoapesceadv.blogspot.com.br/2012/04/censo-ibge-dados-da-sociedade.html#!/2012/04/censo-ibge-dados-da-sociedade.html> Acesso em: 27 junho 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Trends in Reportable Sexually Transmitted Diseases in the United States, 2005. National Surveillance Data for Chlamydia, Gonorrhea, and Syphilis, December, **2006.**

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Sexually Transmitted Diseases Surveillance, 2008. Chlamydia-United States. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/std/stats08/chlamydia.htm#a6>> Acesso em: 21 Sept. 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Chlamydia* – CDC Fact Sheet, **2012.** Disponível em: : <http://www.cdc.gov/std/chlamydia/stdfact-chlamydia.htm> Acesso em: 17 Jun.2012.

CEVENINI, R.; DONATI, M.; SAMBRI, V. *Chlamydia trachomatis* – the pneumo. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology, v. 16, n. 6, p. 761-773, 2002.

CHAVEZ, J.M.; MIGUEL, R.D.V.; CHERPES, T. L. *Chlamydia trachomatis* Infection Control Programs: Lessons Learned and Implications for Vaccine Development. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, Article ID 754060, 5p., doi: 10.1155/2011/754060, **2011.**

CHERNESKY, M.A. The laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. **Can J Infect Dis Med Microbiol**, v. 16, n. 1, p. 39-44, **2005.**

CHRISTIANSEN, G.; OSTERGAARD, L.; BIRKELUND, S. Analysis of the Chlamydia pneumonia surface. P. 173-176, **1994.** In: ORFILA, J. et al. (ed.). Chlamydial infections: proceedings of the Eight International Symposium on Human Chlamydial Infections. Esculapio, Bologna, Italy. In: MYGIND, P.; CHRISTIANSEN, G.; PERSSON, K.; BIRKELUND, S. Analyses of the Humoral Response to *Chlamydia trachomatis* Outer Membrane Protein 2. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5; n. 3, p. **1998.**

CLIFTON, D.R.; FIELDS, K.A.; GRIESHABER, S.S.; DOOLEY, C.A.; FISCHER, E.R.; MEAD, D.J.; CARABEO, R.A.; HACKSTADT, T. A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 101, p. 10166-10171, **2004.** In: BRUNHAM, R.C.; REY-LADINO, J. Immunology of *Chlamydia* Infection: Implications for a *Chlamydia trachomatis* Vaccine. **Nature Reviews/Immunology**, v.5, p.149-161, **2005.**

COORDENAÇÃO NACIONAL DE DST/AIDS. **Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis DST**. 3.ed. 1999.

COTTER, T.W.; MENG, Q.; SHEN, Z.; ZHANG, Y.; SU, H.; CALDWELL, H. Protective Efficacy of Major Outer Membrane Protein-Specific Immunoglobulin A (IgA) and IgG monoclonal antibodies in a murine model of *Chlamydia trachomatis* genital tract infection. **Infect. Immun.**, v.63, n.12, p. 4704-4714, **1995**.

DARVILLE, T.; HILTKE, T.J. Pathogenesis of Genital Tract Disease Due to *Chlamydia trachomatis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. S2, p. S114-S125, **2010**.

DAVIS, C.H.; RAULSTON, J.E.; WYRICK, P.B. Protein disulfide isomerase a component of the estrogen receptor complex, is associated with *Chlamydia trachomatis* serovar E attached to human endometrial epithelial cells. **Infect Immun**, v. 70, p. 3413-3418, **2002**.

De HARO-CRUZ, M.J.; DELEÓN-RODRIGUEZ, I.; ESCOBEDO-GUERRA, M.R.; LÓPEZ-HURTADO, M.; ARTEAGA-TRONCOSO, G.; ORTIZ-IBARRA, F.J. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from endocervical specimens of infertile Mexican women. **Enferm Infecc Microbiol Clin.**, v. 29, n. 2, p. 102-108, **2011**.

De ALMEIDA, I.; SOUZA, C.; REGINATTO, F.; CUNHA FILHO, J.S.; FACIN, A.; FREITAS, F.; LAVIC, Y.; PASSOS, E.P. Histerossonossalpingografia e Histerossalpingografia no Diagnóstico de Permeabilidade Tubária em Pacientes Inférteis. **Rev Ass Med Brasil**, v. 46, n. 4, p. 342-345, **2000**.

De la MAZA, L.M.; PETERSON, E.M. Vaccines for *Chlamydia trachomatis* infections. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 3, n. 7, p. 980-986, **2002**.

De LIMA FREITAS, N.S.; BORBOREMA-SANTOS, C.M.; BARROSO SERRÃO DAS NEVES, D.; COSTA DE OLIVEIRA, C.M.; DUTRA FERREIRA, J.R.; ASTOLFI-FILHO, S. High Prevalence Detection of *Chlamydia trachomatis* by Polymerase Chain Reaction in Endocervical Samples of Infertile Women Attending University Hospital in Manaus – Amazonas, Brazil. **Gynecol Obstet Invest**, v. 72, n.4, p. 220-226, **2011**.

De PALO, G. Colposcopia e patologia do trato genital inferior. 2. Ed. Rio de Janeiro: MEDSI, **1996**.

DEAN, D.; SHACHTER, J.; DAWSON, C.R.; STEPHENS, R.S. Comparison of the major outer membrane protein variant sequence regions of B/Ba isolates: a molecular epidemiologic approach to *Chlamydia trachomatis* infections. **J Infect Dis.**, v. 166, p. 383-92, **1992**.

DEAN, D.; BRUNO, W.J.; WAN, R.; GOMES, J.P.; DEVIGNOT, S.; MEHARI, T.; VRIES de, H.J.C.; MORRÉ, S.A.; MYERS, G.; READ, T.D.; SPRATT, B.G. Predicting Phenotype and Emerging Strains among *Chlamydia trachomatis* Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1385-1394, **2009**.

DONGRE, A.R.; KOVATS, S.; deROOS, P.; McCORMACK, A.L.; NAKAGAWA, T.; PAHARKOVA-VATCHKOVA, V.; ENG, J.; CALDWELL, H.; YATES, J.R.; RUDESKY, A.Y. In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 1485-1494, **2001**. In: BRUNHAM, R.C.; REY-LADINO, J. Immunology of *Chlamydia* Infection: Implications for a *Chlamydia trachomatis* Vaccine. **Nature Reviews/Immunology**, v.5, p.149-161, **2005**.

ELEUTÉRIO, R.M.N.; ELEUTÉRIO JÚNIOR, J.; GIRALDO, P.C.; MUNIZ, A.M.V. Cervicite por *Chlamydia trachomatis* em Mulheres Sexualmente Ativas Atendidas em um Serviço Privado de Ginecologia na Cidade de Fortaleza. **RBAC**, v.39, n.4, p.287-290, **2007**.

ENG, T.R.; BUTLER, W.T. The hidden epidemic: confronting sexually transmitted diseases. Washington, D.C.: **National Academy Press**, p. 28-68, **1997**.

ENTRICAN, G.; BUXTON, D.; LONGBOTTOM, D. Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology. **J R Soc Med.**, v. 94, p. 273-277, **2001**. In: LONGBOTTOM, D. Chlamydial vaccine development. **Journal of Medical Microbiology**, JMM Editorial, **2003**.

EPI-INFO, Versão 7 para *neumon*, produzido e distribuído gratuitamente pelo Centro de Controle de Doenças – CDC, Califórnia, janeiro de 2012.

EVERETT, K.D.; BUSH, R.M.; ANDERSON, A.A. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. Nov. and Simkaniaceae fam. Nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. **Int J Sys Bacteriol.**, v. 49, n. 2, p. 415-40, **1999**.

FARENCEA, A.; COMANDUCCI, M.; DONATI, M.; RATTI, G.; CEVENINI, R. Characterization of A New Isolate of *Chlamydia trachomatis* Which Lacks the Common Plasmid and Has Properties of Biovar trachoma. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 07, p. 2965-2969, **1997**.

FERNANDES, A.M.S.; RIBEIRO, L.P.; MORAES, F.H.; MEIRA, P.C.; SOLLERO, C.A.; YAMADA, E.M. Prevalência de Gestação Ectópica de Tratamento cirúrgico em Hospital Público de 1995-2000. **Rev Assoc Med Bras**, v. 4, n. 50, p. 413-6, **2004**.

FLING, S.P.; SUTHERLAND, R.A.; STEELE, L.N.; HESS, B.; D'ORAZIO, S.E.F.; MAISONNEUVE, J.F.; LAMPE, M.F.; PROBST, P.; STARNBACH, M.N. CD8⁺ T cells recognize an inclusion membrane-associated protein from the vacuolar pathogen *Chlamydia trachomatis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 1160-1165, **2001**.

FREIDANK, H.M.; CLAD, A.; HERR, A.S.; WIEDMANN-AL-AHMAD, H.M.; JUNG, B. Identification of *Chlamydia pneumoniae*-specific protein antigens in immunoblots. **Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis.**, v. 12, p. 947-951, **1993**. In: MYGIND, P.H.; CHRISTIANSEN, G.; PERSSON, K.; BIRKELUND, S. Analysis of the Humoral Immune Response to *Chlamydia* Outer Membrane Protein 2. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. V. 5; n. 3, p. 313-318, **1998**.

FRIAS, M.C.A.A.; PEREIRA, C.F.A.; PINHEIRO, V.M.S.; PINHEIRO, M.S.; ROCHA, C.F. Frequência de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* na endocérvice de mulheres no menacme. **DST – J Bras Doenças Sex Transm**, v. 13. N. 3, p. 5-22, **2001**.

GALLO, V.L.; ENTROCASSI, C.; COROMINA, A.L.; RODRIGUEZ, F.M. Distribution study of *Chlamydia trachomatis* genotypes in symptomatic patients in Buenos Aires, Argentina: association between genotype E and neonatal conjunctivitis. **BMC Res Notes**, v. 3, p. 34-9, **2010**.

GAO, X.; CHEN, X-S.; YIN, Y-P.; ZHONG, M-Y.; SHI, M-Q.; WEI, W-H.; CHEN, Q.; PEELING, R.W.; MABEY, D. Distribution Study of *Chlamydia trachomatis* Serovars among High-Risk Women in China Performed Using PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1185-1189, **2007**.

GAYDOS, C.A; HOWELL, M.R.; PARE, B.; CLARK, K.L.; ELLIS, D.A. *Chlamydia trachomatis* infections in female military recruits. **N Engl J Med.**, v. 339, p. 739-744, **1991**.

GEISLER, W.M.; SUCHLAND, R.J.; WHITTINGTON, W.L.; STAMM, W.E. The relationship of serovars to clinical manifestation of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. **Sex Transm Dis**, v. 30, p. 160-165, **2003**.

GEISLER, W.M.; MORRISON, S.G.; BACHMANN, L.H. Concordance of Rectal and Cervical *Chlamydia trachomatis* OmpA Genotypes Infecting Women in Birmingham, Alabama. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 37, n. 1, p. 32-33, **2010**.

GIJSEN, A. P., LAND, J. A., GOOSSENS, V. J., LEFFERS, P., BRUGGEMAN, C. A.; EVERS, J. L. *Chlamydia pneumoniae* and screening for tubal factor subfertility. **Human Reproduction**, v.16, n.3, p. 487-491, **2001**.

GENCAY, M.; KOSKINIEMI, M.; AMALA, P.; FELLMAN, V.; NARVANEM, A.; WAHLSTROM, T.; VAHERI, A.; PUOLAKKAINEN, M. *Chlamydia trachomatis* seropositivity is associated both with stillbirth and preterm delivery. **APMIS**, v. 108, n. 9, p. 584-588, **2000**.

GENOMA COMPLETO DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*. Disponível em: <http://www.wishart.biology.ualberta.ca/BacMap> Acesso em: 25 dez. **2007**.

GERBASE, A.; STEIN, C.; LEVISON, J.; HTUN, Y. Global burden of Sexually Transmitted Diseases (excluding HIV in the 2000). **Sexually Transmitted Diseases**, **2010**.

GOH, B. T.; FORSTER, G. E. Sexually Transmitted diseases in Children: chlamydial oculo-genital infection. **Genitourin Med.**, v. 69, p. 213-221, **1993**.

GOMES, J.P.; BRUNO, W.J.; BORREGO, M.J.; DEAN, D. Recombination in the genome of *Chlamydia trachomatis* involving the polymorphic membrane protein C gene relative to *ompA* and evidence for horizontal gene transfer. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 4295-4306, **2004**.

GONÇALVES, A.K.S.; SILVA, M.J.P.M.A.; ANDRADE, C.F.; PONTES, A.C.; DANTAS, G.L.; EULETÉRIO, J.J.; GIRALDO, P.C. Rastreamento Universal para Cervicite clamidiana: uma revisão sistemática. **Femina**, v. 37, n. 10, Out. **2009**.

GREGORY, W.W.; GARDNER, M.; BYRNE, G. Arrays of hemispheric surface projections on *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* observed by scanning electron microscopy. **Infect. Immun.**, v. 138, p. 241-244, **1979**.

GRIFFAIS R.; THIBON, M. Detection of *Chlamydia trachomatis* by Polimerase Chain Reaction. **Res Microbiol.** v. 140, p. 139-141, **1989**.

GUASCHINO, S.; SETA, F. Update on *Chlamydia trachomatis*. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 900, p. 293-300, **2000**.

HAGGERTY, C.L.; NESS, R.B.; AMORTEGUI, A.; HENDRIX, S.L.; HILLIER, S.L.; HOLLEY, R.L.; PEIPERT, J.; RANDALL, H.; SONDHEIMER, S.J.J.; SOPER, D.E.; SWEET, R.L.; TRUCCO, G. Endometritis does not predict reproductive morbidity after pelvic inflammatory disease. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 188, n. 1, p. 141-148, **2003**.

HALL, S.G. *Chlamydia trachomatis* update on laboratory diagnosis. Check sample. **Am. Soc. Clin. Pathol.** v. 40, n. 4, p. 49-61, **1997**.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41, 95-9, **1999**.

HAMMERSCHLAG, M. R. Chlamydial Infections. **The Journal of Pediatrics**, v. 114, n. 5, p. 727-734, **1989**.

HARTOG, J. *Chlamydia pneumoniae* role in tubal pathology studied. **Human Reproduction**. v. 19, p. 1380-4, **2004**.

HATCH, T.P. Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in Chlamydiae? **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 1, p. 1-5, **1996**.

HERRERO, R.; CASTLE, P.E.; SCHIFFMAN, M.; BRATTI, M.C.; HILDESHEIM, A.; MORALES, J.; ALFARO, M.; SHERMAN, M.E.; WACHOLDER, S.; CHEN, S.; RODRIGUEZ, A.C.; BURK, R.D. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, p. 1796-1807, **2005**.

HERRMANN, B.; TORNER, A.; LOW, N.; KLINT, M.; NILSSON, A.; VELICKO, I.; SODERBLUM, T. BLAXHULT, A. Emergence and spread of *Chlamydia trachomatis* variant, Sweden. **Emerg Infect Dis**. v. 14, p. 1462-1465, **2008**.

HO, G.Y.E, BURK, R.D.; KLEIN, S.; KADISH, A.S.; CHANG, C.J.; PRABHUDAS, P. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, p. 1365-1371, **1995**.

HSU, M-C.; TSAI, TSAI, P-Y.; CHEN, K-T.; LI, L-H.; CHIANG, C-C.; TSAI, J-J.; LI, L-H.; CHIANG, C-C.; TSAI, J-J.; KE, L-Y.; CHEN, H-Y.; LI, S-Y. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from clinical specimens in Taiwan. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 301-308, **2006**.

IGIETSEME, J.U.; BLACK, C.M.; CALDWELL, H.D. Chlamydia vaccines: strategies and status. **BioDrugs**, v. 16, p. 19-35, **2002**. In: BRUNHAM, R.C.; REY-LADINO, J. Immunology of Chlamydia Infection: Implications for a *Chlamydia trachomatis* Vaccine. **Nature Reviews/Immunology**, v. 5, p. 149-161, **2005**.

IKEHATA, M.; NUMAZAKI, K.; CHIBA, S. Analysis of *Chlamydia trachomatis* serovars in endocervical specimens derived from pregnant Japanese Women. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 27, p. 35-41, **2000**.

ISHAK, M.O.G.; ISHAK, R. O impacto da infecção por *Chlamydia* em populações indígenas da Amazônia brasileira. **Cad Saúde Pública**, v. 17, n. 2, p. 385-396, **2001**.

JALIL, E.M.; PINTO, V.M.; BENZAKEN, A.S.; RIBEIRO, D.; OLIVEIRA, E.C.; GARCIA, E.G.; MOHERDAUI, F.; BARBOSA, M.J. Prevalência da infecção por clamídia e gonococo em gestantes de seis cidades brasileiras. **Rev. Bras Ginecol Obstet**, v. 30, n. 12, p. 614-9, **2008**.

JONES, R.B. Chlamydial diseases. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious disease**. 4th ed. New York, Curcill Livingstone, **1995**. In: SANTOS, C.; TEIXEIRA, F.; VICENTE, A.; SPARTACO, A.F. Detection of *Chlamydia trachomatis* in Endocervical Smears of Sexually Active Women in Manaus-AM, by PCR. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.7, n.2, p. 91-95, **2003**.

JURSTRAND, M.; FALK, L.; FREDLUND, H.; LINDBERG, M.; OLCÉN, P.; ANDERSSON, S.; PERSSON, K.; ALBERT, J.; BÄCKMAN, A. Characterization of *Chlamydia trachomatis omp1* Genotypes among Sexually Transmitted Disease Patients in Sweden. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 3915-3919, **2001**.

KALTENBOECK, B.; KOUSOULAS, K.G.; STORZ, J. Structures of allelic Diversity and Relationships among the Major Outer Membrane Protein (ompA) Genes of the Four Chlamydial Species. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 2, p. 487-502, **1993**.

KARI, L.; GOHEEN, M.M.; RANDALL, L.B.; TAYLOR, L.D.; CARLSON, J.H.; WHITMIRE, W.M.; VIROK, D.; RAJARAM, K.; ENDRESZ, V.; MCCLARTY, G.; NELSON, D.E.; CALDWELL, H.D. Generation of targeted *Chlamydia trachomatis* null mutants. **PNAS**, v. 108, n.17, p. 7189-7193, **2011**.

KIM, S.K.; DeMARS, R. Epítoto clusters in the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 13, p. 429-436, **2001**. In: BRUNHAM, R.C.; REY-LADINO, J. Immunology of Chlamydia Infection: Implications for a *Chlamydia trachomatis* Vaccine. **Nature Reviews/Immunology**, v. 5, p. 149-161, **2005**.

KIMURA, M. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 78, p. 454-458, **1981**.

KINNUNEN, A.; PAAVONEN, J.; SURCEL, H.M. Heat shock protein 60 specific T-cell response in chlamydial infections. **Scand. J. Immunol.**, v. 54, **2001**.

KLEBA, B.J.; BANTA, E.; LINDQUIST, E.A.; STEPHENS, R.S. Recruitment of mammalian cell fibronectin to the surface of *Chlamydia trachomatis*. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 3935-3938, **2002**.

KLINT, M.; FUXELIUS, H-H.; SKARIN, H.; RUTERMAR, K.C.; ANDERSSON, S.G.E.; PERSSON, K.; HERRMANN, B. High-Resolution Genotyping of *Chlamydia trachomatis* Strains by Multilocus Sequence Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1410-1414, **2007**.

KULKARNI, S.; RADER, J.S.; ZHANG, F.; LIAPIS, H.; KOKI, A.T.; MASFERRER, J.L.; SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A.J. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. **Clinical Cancer Research**, v.7, n. 2, p. 429-434, **2001**.

KUMAR, S.; NEI, M.; DUDLEY, J.; TAMURA, K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in bioinformatics**, v. 9, n. 4, p. 299-306, **2008**.

LAMPE, M.F.; SUCHLAND, R.J.; STAMM, W.E. Nucleotide sequence of the variable domains within the major outer membrane protein gene from serovariants of *Chlamydia trachomatis*. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 213-219, **1993**.

LAND, J.A.; EVERS, J.L.H. Chlamydia infection and subfertility. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 16, n. 6, p. 901-912, **2002**.

LEE, G.; PARK, J.; KIM, B.; KIM, S-A.; YOO, C-K.; SEONG, W.K. *OmpA* genotyping of *Chlamydia trachomatis* from Korean female sex workers. **Journal of Infection**, v. 52, p. 451-454, **2006**.

LEVI, J.E., FERNANDES, S.; TATENO, A.F., MOTTA, E.; LIMA, L.P.; ELUF-NETO, J.; PANNUTI, C.S. Presence of multiple human papillomavirus type in cervical samples from HIV-infected women. **Gynecologic & Oncology**, v. 92, p. 225-231, **2004**.

LIEW, F.Y.; COX, F.E. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. **Immunol Today**, v. 12, p. A17-A21, **1991**.

LIEW, F.Y. Regulation of nitric oxide synthesis in infectious and autoimmune diseases. **Immun Lett**, v. 43, p. 95-98, **1994**.

LIMA, H.E.; OLIVEIRA, M.B.; VALENTE, B.G.; AFONSO, D.A.F.; DAROCHA, W.D.; SOUZA, M.C.; ALVIM, T.C.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; NORONHA, F.S.M. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from endocervical specimens in Brazil. **Sex Transm Dis.**, v. 34, n. 9, p. 709-717, **2007**.

Longbottom, D.; Coulter, L.J. Animal chlamydioses and zoonotic implications. **J Comp Pathol**, v. 128, p. 217-244, **2003**.

LOOMIS, W.P.; STARNBACH, M.N. T cell responses to *Chlamydia trachomatis*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 87-91, **2002**.

LYSÉN, M.; OSTERLUND, A.; RUBIN, C.J.; PERSSON, T.; PERSSON, I.; HERRMANN, B. Characterization of ompA genotypes by sequence analysis of DNA from all detected cases of *Chlamydia trachomatis* infections during 1 year of contact tracing in a Swedish county. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 1641-1647, **2004**.

MANAVI, K. A review on infection with *Chlamydia trachomatis*. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 20, p. 941-951, **2006**.

MAHONY, J.B.; LUINSTR, K.E.; SELLORS, J.W.; CHERNESKY, M.A. Comparison of Plasmid and Chromosome-Based Polymerase Chain Reaction Assays for detecting *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 1753-1758, **1993**.

MAHONY, J.B.; COOMBES, B.K.; CHERNESKY, M.A. *Chlamydia* and *Chlamydophila*. In **Manual of Clinical Microbiology**, Washington D.C. : ASM Press., p. 991-1004, **2003**.

MARCHBANKS, P.A.; ANEGER, J.F. Risk factors for ectopic pregnancy: a population based study. **JAMA**, n. 259. p. 1823-7, **1988**.

MARRAZZO, J.M.; STAMM, W.E. New approaches to the diagnosis, treatment, and prevention of chlamydial infection. **Curr Clin Top Infect Dis**. v. 18, p. 37-59, **1998**.

MARQUES, C.A.S.; MENEZES, M.L.B. Infecção Genital por *Chlamydia trachomatis* e Esterilidade. **DST – J bras Doenças Sex Transm.**, v. 17, n. 1, p. 66-70, **2005**.

MARQUES, C.A.S.; MENEZES, M.L.B.; COELHO, I.M.G.; MARQUES, C.R.C.; CELESTINO, L.C.; MELO, M.C.; LIMA, P.R. Infecção genital por *Chlamydia trachomatis* em casais atendidos em ambulatório de esterilidade conjugal. **DST – J bras Doenças Sex Transm.**, v. 19, n. 1, p. 5-10, **2007**.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Plano Estratégico. **Programa Nacional de DST e AIDS**, Brasília, **2005**.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Controle Doenças Sexualmente Transmissíveis DST. 4 ed. Brasília: Série Manuais, **2006**.

MIRANDA, A.E; GADELHA, A.M.J.; PASSOS, M.R.L. Impacto da Infecção pela *Chlamydia trachomatis* na Saúde Reprodutiva. **DST – J Bras Doenças Sex Transm.**, v. 15, n. 1, p. 53-58, **2003**.

MMWR – MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT. **Screening Tests to Detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections – 2002**. Centers for Diseases Control and Prevention, v. 51, n.15, Outubro 18 de **2002**.

MMWR – MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT. **Chlamydia Screening Among Sexually Active Young Female Enrollees of Health Plans – United States, 1999-2001**. Centers for Diseases Control and Prevention, v.53, n. 42, p.983-985, Outubro de **2004**.

MMWR – MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT. **Chlamydia Screening Among Sexually Active Young Female Enrollees of Health Plans – United States, 2000-2007**. Centers for Diseases Control and Prevention, v. 58, n. 14, p. 362-365, Abril 17 de **2009**.

MMWR – MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT. **CDC Grand Rounds: Chlamydia Prevention: Challenges and Strategies for Reducing Disease Burden and Sequelae**. Centers for Diseases Control and Prevention, v.60, n. 12, p. 370-373, Abril 1 de **2011**.

MOL, B.W.; DIJKMAN, B.; WERTHEIM, P.; LIJMER, J.; van der VEEN, F; BOSSUYT, P.M. The accuracy of serum chlamydial antibodies in the diagnosis of tubal pathology: a meta-analysis. **Fertil. Steril.** v. 67, n. 6, p. 1031-1037, 1997.

MOLANO, M.; MEIJER, C.J.L.M.; MORRE, S.A.; POL, R.; BRULE, A.J.C. Combination of PCR Targeting the VD2 of omp1 and Reverse Line Blot Analysis for typing of Urogenital *Chlamydia trachomatis* Serovars in Cervical Scrape Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 2935-2939, **2004**.

MOLANO, M.; MEIJER, C.J.L.M.; WEIDERPASS, E.; ARSLAN, A.; POSSO, H.; FRANCESCHI, S.; RONDEROS, M.; MUÑOZ, N.; van den BRULE, A.J.C. The natural course of *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic Colombian women: a 5-year follow-up study. **J Infect Dis**, v. 191, p. 907-916, **2005**.

MORRE, S.A.; ROZENDAAL, L.; van VALKENGOED, I.G.M.; BOEKE, A.J.P.; van VOORST VADER, P.C.; SCHIRM, J.; de BLOK, S.; van den HOEK, J.A.; van DOORNUM, G.J.; MEIJER, C.J.; van den BRULE, A.J. Urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in men and women with a symptomatic or asymptomatic infection: an association with clinical manifestations? **J Clin Microbiol.**, v. 38, p. 2292-2296, **2000**.

MORRISSON, S.G.; MORRISSON, R.P. Resolution of secondary *Chlamydia trachomatis* genital tract infection in immune mice with depletion of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. **Infect Immun.**, v. 69, p. 2643-2649, **2001**.

MORRISSON, R.P. New insights into a persistent problem – chlamydial infections. **J Clin Invest**, v. 111, n. 11, p. 1647-1649, **2003**.

MOULDER, J. W. Looking at chlamydiae without looking at their hosts. **Am. Soc. Microbiol News**, v.50, p. 353-362, **1984**.

MOULDER, J. W. Interaction of chlamydiae and host cells *in vitro*. **Microbiol Rev.**, v.55, p. 143-90, **1991**.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAQUÉ, X.; de GONZÁLEZ, A.B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human câncer. **Vaccine**, v. 24, supplement 3, p. S1-S10, **2006**.

MURRAY, H.W.; SZURO-SUDOL, A.; WELLNER, D.; OCA, M.J.; GRANGER, A.M.; LIBBY, D.M.; ROTHERMEL, C.D.; RUBIN, B.Y. Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages. **Infect Immun**, v. 57, p. 845-849, **1989**.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, **2004**. 776 p.

NEWHALL, W.J.; BATTEIGER, J.B.; JONES, R.B. Analysis of the human serological response to proteins of *Chlamydia trachomatis*. **Infect. Immun.**, v. 38, p. 1181-1189, **1982**.

NGANDJIO, A.; CLERC, M.; FONKOUA, M.C.; THONNON, J.; LUNEL, F.; BEBEAR, C.; BIANCHI, A. & BARBEYRAC, B. Restriction endonuclease patterns of the *omp1* gene of reference *Chlamydia trachomatis* strains and characterization of isolates from Camerononian students. **J. Med Microbiol.**, v. 53, p. 47-50, **2004**.

NUNES, A.; GOMES, J.P.; MEAD, S.; FLORINDO, C.; CORREIA, H.; BORREGO, M.J.; DEAN, D. Comparative Expression Profiling of the *Chlamydia trachomatis* pmp Gene Family for Clinical and Reference Strains. **PLoS ONE**, v. 2, n. 9, e878, doi: 10.1371, **2007**.

OLIVEIRA, M.L.; DE AMORIM, M.M.R.; DE SOUZA, A.S.R.; DE ALBUQUERQUE, L.C.B.; DA COSTA, A.A.R. Infecção por *Chlamydia* em pacientes com lesões intra-epiteliais cervicais. **Rev Assoc Med Bras**, v. 54, n. 6, p. 506-12, **2008**.

PAAVONEN, J. Sexually transmitted chlamydial infections and subfertility. **International Congress Series**, v. 1266, p. 277-286, **2004**.

PAAVONEN, J.; EGGERT-KRUSE, W. *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 5, n. 5, p. 433-447, **1999**.

PAAVONEN, J.; LEHTINEN, M. *Chlamydia* pelvic inflammatory disease. **Human Reproduction Update**, p. 519-529, **1996**.

PAL, S.; THEODOR, I.; PETERSON, E.M.; De la MAZA, L.M. Immunization with the *Chlamydia trachomatis* Mouse Pneumonitis Major Outer Membrane Protein Can Elicit a Protective Immune Response against a Genital Challenge. **Infection and Immunity**, p. 6240-6247, **2001**.

PASSOS, M.R.L.; VARELLA, R.Q. e MIRANDA, A.E. *Chlamydia trachomatis*: A epidemia silenciosa. **Separata**. Rio de Janeiro, Phoenix Produções Editoriais, **2003**.

PASSOS, M.R.L.; VARELLA, R.Q. e MIRANDA, A.E. Em foco – *Chlamydia trachomatis*: A Epidemia Silenciosa. São Paulo: Ed. Phoenix, **2005**.

PEELING, R.; KING, L. Sexually transmitted disease: impact of molecular laboratory diagnostic methods on disease control and prevention. **Can J Infect Dis.**, v. 10, p. 309-387, **1999**.

PEIPERT, J.F. Clinical practice. Genital chlamydial infections. **N Engl J Med**, v. 349, p. 2424-2430, **2003**.

PERSING, D. H. In vitro Nucleic Acids amplification techniques. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WRITE, T. J. **Diagnostic molecular microbiology**, Washington Mayo Foundation Rochester, **1993**.

PERSSON, K. The role of serology, antibiotic susceptibility testing and serovar determination in genital chlamydial infections. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, v. 16, p. 801-814, **2002**.

PETERSON, E.M. ; ZHONG, G.M. ; CARLSON, E. ; De la MAZA, L.M. Protective role of magnesium in the neutralization by antibodies of *Chlamydia trachomatis* infectivity. **Infect Immun.**, v. 56, p. 885-891, **1988**.

PETERSON, E.M. ; YOU, J.Z ; MOTIN, V. ; de LAZA, L.M. Intranasal immunization with *Chlamydia trachomatis*, serovar E, protects from a subsequent vaginal challenge with the homologous serovar. **Vaccine**, v. 17, p. 2901-2907, **1999**.

PN-DST/AIDS. DST em números 2003. In: **Ministério da Saúde**. Disponível em: http://www.aids.gov.br/final/inferior_nova.asp >. Acesso em: 22 jan. **2007**.

PONTES, I.M.; ÂNGELO, P. C. S.; ASTOLFI FILHO, S. Desenvolvimento de Novos Marcadores Microssatélites para Análise Genética em Humanos. A Amazônia na Era Genômica e Pós-Genômica. **Livro de Resumos do 4º Encontro de Genética do Amazonas**, p. 79, **2003**.

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Mol. Biol. Evol.**, v. 25, n. 7, p. 1253-1256, **2008**.

QUINT, K.D.; BOM, R.J.M; BRUISTEN, S.M.; van DOORN, L.J.; MELCHERS, W.J.; de VRIES, H.J.C.; MORRE, S.A.; QUINT, W.G.V. Comparison of the *Chlamydia trachomatis*-DT genotyping assay and *OmpA* sequencing among different clinical samples from men and women. **Mol Cell Probes**, v. 24, p. 266-70, **2010**.

RAMSEY, K.H.; SODERBERG, S.F.; RANK, R.G. Resolution of Chlamydial genital infection in B-cell-deficient mice and immunity to reinfection. **Infect. Immun.**, v. 56. p. 1320-1325, **1988**.

RAMSEY, K.H.; MIRANPURI, G.S.; SIGAR, I.M.; QUELLETTE, S.; BYRNE, G.I. *Chlamydia trachomatis* persistence in the female mouse genital tract: inducible nitric oxide synthase and infection outcome. **Infect Immune.**, v. 69, p. 5131-5137, **2001**.

RASMUSSEN, S.J; ECKMANN, L.; QUAYLE, A.J; SHEN, L.; ZHANG, Y.X.; ANDERSON, D.J.; FIERER, J.; STEPHENS, R.S.; KAGNOFF, M.F. 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**, v. 99, n. 1, p. 77-87, **1997**.

RHOTON-VLASAK, A. Infections and Infertility. **Elsevier Science**, v. 7, n. 5, p. 200-206, **2000**.

ROAN, N.; STARNBACH, M. Mediada controle imunológico da infecção por *Chlamydia*. **Microbiologia Celular**, v. 10, 2008.

RODRÍGUEZ-MARAÑÓN, M.J.; BUSH, R.M.; PETERSON, E.M.; SCHIRMER, T.; de la MAZA, L.M. Prediction of the membrane-spanning β -strands of the major outer membrane protein of *Chlamydia*. **Protein Science**, v.11, n. 7, p. 1854-1861, 2002.

ROGSTAD, K. Complications in the female and their management. In: Moss, T, ed. International handbook of *Chlamydia*, 3rd edn. Haslemere, UK: Alden Press, p. 111-121, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory Manual. New York, 2^a Edição. Cold Spring Harbor Lab. USA, Apendix E: E.3, 1989.

SAMOFF, E.; KOUMANS, E.H.; MARKOWITZ, L. E.; STERNBERG, M.; SAWYER, D.S.; PAPP, J.R.; BLACK, C.M.; UNGER, E.R. Association of *Chlamydia trachomatis* with Persistence of High-Risk Types of Human Papillomavirus in a Cohort of Female Adolescents. **Am J Epidemiol.**, v. 162, n. 7, p. 668-675, 2005.

SANTOS, C.; TEIXEIRA, F.; VICENTE, A.; ASTOLFI-FILHO, S. Detection of *Chlamydia trachomatis* in Endocervical Smears of Sexually Active Women in Manaus-AM, by PCR. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.2, n.7, p. 91-95, 2003.

SARDINHA, J. C. G. et al. **Plano Interinstitucional das DST e AIDS no Estado do Amazonas. 1999.**

SCHACHTER, J. DFA, EIA, PCR, LCR and other technologies: What tests should be used for diagnosis of *Chlamydia* infections? **Immunological Investigations**, v. 26, p. 157-61, 1997. In: SANTOS, C.; TEIXEIRA, F.; VICENTE, A.; SPARTACO, A.F. Detection of *Chlamydia trachomatis* in Endocervical Smears of Sexually Active Women in Manaus-AM, by PCR. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.7, n.2, p. 91-95, 2003.

SCHACHTER, J.; STAMM, W.E. *Chlamydia*. In: Manual of clinical microbiology. 7.ed. Washington, D.C.: ASM Press, p.795-806, 1999.

SEADI, C.F.; ORAVEC, R.; POSER B.V.; CANTARELLI, V.V.; ROSSETTI, M.L. Diagnóstico laboratorial da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 38, n.2, p.125-133, 2002.

SETH-SMITH, H.M.B.; HARRIS, S.R.; PERSSON, K.; MARSH, P.; BARRON, A.; BIGNELL, A.; BJARTLING, C.; CLARK, L.; CUTCLIFFE, L.T.; LAMB DEN, P.R.; LENNARD, N.; LOCKEY, S.J.; QUAIL, M.A.; SALIM, O.; SKILTON, R.J.; WANG, Y.; HOLLAND, M.J.; PARKHILL, J.; THOMSON, N.R.; CLARKE, I.N. Co-evolution of genomes and plasmids within *Chlamydia trachomatis* and the emergence in Sweden of a new variant strain. **BMC Genomics**, v. 10, p. 2009.

SHEMER, Y.; SAROV, I. Inhibition of growth of *Chlamydia trachomatis* by human gamma interferon. **Infect Immun.**, v. 48, p. 592-596, 1985. In: LOOMIS, W.P.; STARNBACH, M.N. T cell responses to *Chlamydia trachomatis*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 87-91, 2002.

- SILVA FILHO, A.M.; LONGATTO, FILHO, A. Colo Uterino & Vagina. Processos Inflamatórios. Aspectos Histológicos, Citológicos e Colposcópicos. Rio de Janeiro: **Revinter**, 2000. 209 p.
- SINGH, V.; SALHAN, S.; DAS, B.C.; MITTAL, A. Predominance of *Chlamydia trachomatis* Serovars Associated with Urogenital Infections in Females in New Delhi, India. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 2700-2702, 2003.
- SPAARGAREN, J.; FENNEMA, H.S.; MORRE, S.A.; de VRIES, H.J.; COUTINHO R.A. New lymphogranuloma venereum *Chlamydia trachomatis* variants, Amsterdam. **Emerg Infect Dis**. v. 11, p. 1090-2, 2005.
- STAG, A.J.; ELSLEY, W.A.J.; PICKETT, M.A.; WARD, M.E.; KNIGHT, S.C. Primary human T-cell responses to the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. **Immunology**, v. 79, p. 1-9, 1993.
- STAMBACH, M.N.; LOOMIS, W.P.; OVENDALE, P.; REGAN, D.; HESS, B.; ALDERSON, M.R.; FLING, S.P.; An inclusion membrane protein from *Chlamydia trachomatis* enters the MHC class I pathway and stimulates a CD8⁺ T cell response. **J. Immunol**. v. 171, n. 9, p. 4742-4749, 2003. In: BRUNHAM, R.C; REY-LADINO, J. Immunology of Chlamydia Infection: Implications for a *Chlamydia trachomatis* Vaccine. **Nature Reviews/Immunology**, v.5, p. 149-161, 2005.
- STAMM, W.E.; JONES, R.B.; BATTEGEIGER, B.E.; *Chlamydia trachomatis* (Trachoma, perinatal Infections, Lymphogranuloma Venereum and Others Genital Infections), 2005. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. Principles and Practice of Infectious Diseases. **Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone**, v.2, 6 ed., 2005, p. 2239-2255.
- STENNER-LIEWEN, F.; LIEWEN, H.; ZAPATA, J.M.; PAWLOWSKI, K.; GODZIK, A.; REED, J.C. CADD, a Chlamydia Protein That Interacts with Death Receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 9633-9636, 2002.
- STEPHENS, R.S.; KALMAN, S.; LAMMEL, C.; FAN, J.; MARATHE, R.; ARAVIND, L.; MITCHELL, W.; OLINGER, L.; TATUSOV, R.L.; ZHAO, Q.; KOONIN, E.V.; DAVIS, R.W. Genome Sequence of an Obligate Intracellular Pathogen of Humans: *Chlamydia trachomatis*. **Science**, v. 282, p. 754-759, 1998.
- SU, H.; CALDWELL, H.D. *In vitro* neutralization of *Chlamydia trachomatis* by monovalent Fab antibody specific to the major outer membrane protein. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 2843-2845, 1991.
- SUCHLAND, R.J.; STAMM, W.E. Simplified microtiter cell culture method for rapid immunotyping of *Chlamydia trachomatis*. **J. Clin Microbiol.**, v. 29, p. 1333-1338, 1991.
- TEMPLETON, A. Chlamydia screening. Adolescent Sexual Health. **Royal College of Obstetricians and Gynaecologists**. 12 December, 2002.

THOMAS, N.S.; LUSCHER, M.; STOREY, C.C.; CLARKE, I.N. Plasmid diversity in Chlamydia. **Microbiology**, Jun; 143 (Pt6). P. 1847-1854, **1997**.

THOMSON, N.R.; HOLDEN, M.T.; CARDER, C.; LENNARD, N.; LOCKEY, S.J.; MARSH, P.; SKIPP, P.; O'CONNOR, C.D.; GOODHEAD, I.; NORBERTZCAK, H.; HARRIS, B.; ORMOND, D.; RANCE, R.; QUAIL, M.A.; PARKHILL, J.; STEPHENS, R.S.; CLARKE, I.N. *Chlamydia trachomatis*: genome sequence analysis of lymphogranuloma venereum isolates. **Genome Res.**, v. 18, p. 161-171, **2008**.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Ac. Res.**, v. 22, p. 4673-4680, **1994**.

TOTH, M. PATTON, D.L.; CAMPBELL, L.A.; CARRETA, E.I.; MOURADIAN, J.; TOTH, A.; SHEVCHUK, M. BAERGEN, R.; LEDGER, W. Detection of chlamydial antigenic material in ovarian, prostatic, ectopic pregnancy and semen samples of culture-negative subjects. **Am J Reprod Immunol.**, v. 43, n. 4, p.218-222, **2000**.

UNITED STATES PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE. Screening for Chlamydial Infection: Recommendations and Rationale: U.S. Preventive Services Task Force. **The Internet Journal of Infectious Diseases**. v. 2, n. 2, **2002**.

UNITED STATES PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE. Screening for chlamydial infection: recommendations and rationale. **Am J Prev Med.**, v. 20, n. 3, p. 90-4, **2001**.

VIEIRA, Sonia – Bioestatística, Tópicos Avançados – Rio de Janeiro. 2.ed. – RJ: Elsevier, 2004.

WAGER, E. A.; SCHACHTER, J.; BAVOIL, P.; STEPHENS, R.S. Differential human serologic response to two 60.000 molecular weight *Chlamydia trachomatis* antigens. **J. Infect. Dis.**, v. 162, p. 922-927, **1990**. In: MYGIND, P.H.; CHRISTIANSEN, G.; PERSSON, K.; BIRKELUND, S. Analysis of the Humoral Immune Response to *Chlamydia* Outer Membrane Protein 2. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 5; n. 3, p. 313-318, **1998**.

WANG, S.P.; KUO, C.C.; BARNES, R.C.; STEPHENS, R.S. & GRAYSTON, J.T. Immunotyping of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibodies. **J. Infect Dis.**, v. 152, p. 791-800, **1985**.

WANG, Y.; BERG, E.A.; FENG, X.; SHEN, L.; SMITH, T.; COSTELLO, C.E.; ZHANG, Y.X. Identification of surface-exposed components of MOMP of *Chlamydia trachomatis* serovar F. **Protein Science**, v. 15, p. 122-134, **2006**.

WARFORD, A.; CHERNESKY, M.; PETERSON, E.M. Laboratory Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. In: **Gleaves CA, ed. Cumitech 19A. Washington, DC:ASM Press**, p. 1-18, **1999**.

WEINSTOCK, H.; BERMAN, S.; CATES, W Jr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. **Perspect Sex Reprod Health**, v.36, p.6-10, **2004**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. STI/HIV Status and trends of STI, HIV and AIDS at the end of the Millennium. Western Pacific Region, **1999**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections: Overview and Estimates. **World Health Organization**. Geneva: World Health Organization, p. 11-4, **2001**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Sexually Transmitted and Other reproductive tract infectious. **A guide to essential practice**, **2005**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Sexually Transmitted Diseases. **World Health Organization**. Geneve, **2010**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Iniciativa para Pesquisa de Vacinas (IVPR). Doenças Sexualmente Transmissíveis. *Chlamydia trachomatis*. **World Health Organization**, **2012**.

WYRICK, P.B. *C. trachomatis*: infection strategies of the ultimate intracellular pathogen. **ASM News** **68**. p. 70-76, **2002**.

YANG, B.; ZHENG, H.P.; FENG, Z.Q.; XUE, Y.H.; WU, X.Z.; HUANG, J.M.; XUE, X.J.; JIANG, H.N. The Prevalence and Distribution of *Chlamydia trachomatis* Genotypes among Sexually Transmitted Disease Clinic Patients in Guangzhou, China, 2005-2008. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 63, p. 342-345, **2010**.

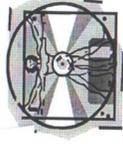
YUAN, Y.; ZHANG, Y.X.; WATKINS, N.G. & CALDWELL, H.D. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars. **Infect Immun.**, v, 57, p. 1040-1049, **1989**.

ANEXOS



PODER EXECUTIVO
MINISTÉRIO DE EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

ANEXO A



PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou a **emenda** ao Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 0194.0.115.000-08, intitulado “**Análise da variabilidade dos genes das proteínas de membrana polimórfica (pmp) de *Chlamydia trachomatis* isoladas do trato genital de mulheres inférteis na cidade de Manaus/Amazonas**”, o qual passa a ter o seguinte título: “**Análise das sequencias do gene *ompA* de *Chlamydia trachomatis* isoladas do trato genital de mulheres inférteis e gestantes em Manaus/Amazonas**”, tendo como Pesquisadora Responsável Norma Suely de Lima Freitas.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 13 de Agosto de 2012.

Prof. MSc. Pedro Rodolfo Fernandes da Silva
Coordenador CEP/UFAM

ANEXO B

Extração de DNA pelo Método Fenol: Clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Adicionou-se 400 µL de Fenol Hidratado a 400 µL da amostra, que foi previamente digerida com proteinase K (BAUER & MANOS, 1998) e homogenizou-se suavemente por 10 minutos seguido de 10 minutos de centrifugação a 12.000 rpm. Logo em seguida coletou-se o sobrenadante e adicionou-se 400 µL de Fenol:Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1). Homogenizou-se essa mistura por 10 minutos e a seguir centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante e adicionou-se 400 µL de Clorofórmio Hidratado 1:1 e agitou-se por 10 minutos seguidos de centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. Coletou-se novamente o sobrenadante e adicionou-se 1/10 (10%) do volume do sobrenadante NaCl 5M e 1000 µL de Etanol Absoluto gelado, deixando-se precipitando à 0°C por 12 horas.

No dia seguinte, dando continuidade ao procedimento de extração de DNA, pegou-se o material precipitado, centrifugou-se a 10.000 rpm por 30 minutos e descartou-se o sobrenadante cuidadosamente. Logo após, lavou-se o sedimento de DNA (*Pellet*) com 500 µL de Etanol a 70% gelado, centrifugou-se à 8.000 rpm por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante cuidadosamente para não perder o sedimento. Em seguida, deixamos secar o sedimento por aproximadamente 40 minutos no fluxo laminar e fez-se a ressuspensão do sedimento de DNA com 50 µL de água Milli-Q.

APENDICES

Jogos dramáticos elevam riscos

Um estudo publicado no 'New England Journal of Medicine' acompanhou milhares de fãs alemães durante a Copa do Mundo de 2006 e descobriu que as emergências cardíacas aumentavam nos dias em que a equipe alemã jogava, em especial depois de jogos dramáticos.



MOSTRA DEPRESSÃO EM TRATAMENTO

Pesquisa realizada no Brasil aponta que o tratamento da infertilidade pode causar sintomas psicológicos a mulheres, como a depressão, ansiedade, raiva, frustração e também isolamento familiar e social.

APONTOU QUE MAIORIA ATINGIDA PELA BACTÉRIA CHLAMYDIA TRACHOMATIS SE TORNOU ESTÉRIL

DST 'silenciosa' é causa de infertilidade em mulheres

Vanessa Brito
Da Redação
Manaus, Amazonas

Mulheres de diferentes faixas etárias correm o risco de contrair uma Doença Sexualmente Transmissível (DST) grave que causa infertilidade, mesmo sem saber que estão doentes, pela falta de uso de preservativos nas relações sexuais.

A bactéria Chlamydia trachomatis é a principal causa da doença inflamatória contraída e atinge mais mulheres que homens. As informações foram comprovadas através de uma pesquisa de mestrado feita na Universidade Federal do Amazonas (Ufam).

A pesquisa estudou 106 mulheres atendidas na clínica de infertilidade do Hospital Universitário Francisca Mendes, zona norte de Manaus, que já apresentavam histórico de infertilidade.

O estudo do mestrado em Biotecnologia, da pesquisadora Norma Suely de Lima, comprovou que 56 (52,8%), das 106 pacientes consultadas, apresentavam a doença já em estágio avançado.

Todas as pacientes que possuem diagnóstico da bactéria não sentiam nenhum sintoma de infecção. No estágio avançado da inflamação, a bactéria, genericamente conhecida como clamídia, pode causar doenças como câncer de colo de útero, obstrução das trompas, infecções pélvicas crônicas e até gravidez ectópica, que acontece fora do útero.

De acordo com a pesquisadora, a DST causada pela bactéria clamídia é 'silenciosa'. A pesquisadora também concluiu que a média de idade das pacientes que apresentaram resultados positivos é de 32 anos. "Cerca de



Pesquisa estudou 106 mulheres atendidas na clínica de infertilidade do Hospital Universitário Francisca Mendes / Foto: Evandro Sallas 09/10/08

"Cerca de 75% das mulheres que têm problemas de infertilidade por essa bactéria não sabem que sofrem da doença".

Da pesquisadora Norma Suely de Lima, mestra em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas.

75% das mulheres que têm problemas de infertilidade por essa bactéria não sabem que sofrem da doença e quando descobrem o problema a inflamação já está em estágio avançado", afirmou.

O estudo é um dos poucos registros sobre incidência de Doenças Sexualmente Transmissíveis em mulheres inférteis no Brasil e principalmente na

Região Amazônica. Segundo a pesquisadora, a doença é pouco conhecida pela população amazônica e os tratamentos ainda são ineficazes.

As pacientes que participaram da pesquisa tinham renda familiar de dois a quatro salários mínimos e a maioria delas reside na zona leste de Manaus. "Essas pessoas com baixa renda têm menos conhecimento e acesso às informações, o que piora a situação".

Da pesquisadora Norma Suely de Lima, mestra em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas.

Região Amazônica. Segundo a pesquisadora, a doença é pouco conhecida pela população amazônica e os tratamentos ainda são ineficazes.

As pacientes que participaram da pesquisa tinham renda familiar de dois a quatro salários mínimos e a maioria delas reside na zona leste de Manaus. "Essas pessoas com baixa renda têm menos conhecimento e

"Essas pessoas com baixa renda têm menos conhecimento e acesso às informações, o que piora a situação".

Da pesquisadora Norma Suely de Lima, mestra em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas.

Ginkgo Biloba eleva risco de convulsão em pessoas com epilepsia

O Ginkgo Biloba, um dos fitoterápicos mais vendidos no mundo, aumenta o risco de convulsões em pessoas com epilepsia e reduz a eficácia de medicamentos anticonvulsivos. Há algumas pesquisas isoladas apontam nesse sentido. Agora, uma revisão de dez estudos realizada na Universidade de Bonn (Alemanha) soma evidências sobre esses riscos do produto.

Os autores do estudo afirmam que, pelas evidências atuais, deveria haver maior restrição à venda de medicamentos à base de Ginkgo Biloba.

O fitoterápico costuma ser indicado para vários problemas, como Alzheimer, perda de memória e perda auditiva. "Mas não temos evidências que comprovem a sua ação", diz Elza Márcia Yacubian, professora de Neurologia da Unifesp.

Quanto aos riscos relacionados à epilepsia, Yacubian diz que testes mostram que o ginkgo biloba induz o fígado a produzir uma enzima que é a mesma que faz a metabolização de dois dos medicamentos antiepilépticos mais usados. "Além disso, a mesma do Ginkgo Biloba tem uma neurotoxina que aumenta a atividade cerebral, desencadeando crises epilépticas e que pode levar a convulsão mesmo pessoas que não têm o distúrbio", diz Yacubian.

Segundo a farmacêutica Ivana Suffredini, do laboratório de extratos da Universidade Paulista (Unip), os estudos com extratos vegetais são recentes e ainda faltam informações sobre os efeitos.

Fale com o editor
redacao@diarioam.com.br

Vol. 72, No. 4, 2011

Article (Fulltext) Article (PDF, 168 KB)

Original Article

High Prevalence Detection of *Chlamydia trachomatis* by Polymerase Chain Reaction in Endocervical Samples of Infertile Women Attending University Hospital in Manaus-Amazonas, Brazil

Norma Suely de Lima Freitas^a, Cristina Maria Borborema-Santos^a, Dária Barroso Serrão das Neves^{a,b}, Cintia Mara Costa de Oliveira^a, Júnia Raquel Dutra Ferreira^a, Spartaco Astoff-Filho^a

^aFederal University of Amazonas – UFAM, Molecular Diagnostic Laboratory, Biotechnology Division, and

^bDona Francisca Mendes University Hospital, Manaus/AM, Brazil

Address of Corresponding Author

Gynecol Obstet Invest 2011;72:220-226 (DOI: 10.1159/000324798)

Key Words

- Chlamydia trachomatis
- Infertile women
- Polymerase chain reaction
- Brazil

Abstract

Background: We established for the first time the prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection among infertile women in Manaus Amazonas Brazil using the polymerase chain reaction (PCR) technique. **Methods:** 106 women were studied at a public university hospital fertility clinic for infertility problems correlated with chlamydia infection. Social-economic and clinical information was obtained before medical examination to obtain samples for the amplification of *C. trachomatis* DNA plasmid. **Results:** The prevalence of chlamydial infection among infertile women was 52.8, and 51.8% of the positive participants were older than 30 years of age ($p = 0.8697$). Of the 56 women positive for *C. trachomatis*, 31 (55.4%) had never given birth, while 9 (16%) had a pregnancy resulting in fetal death. Our findings also revealed that these patients had a low socio-economic status and high unemployment ($p = 0.0274$), and a significant association of 5% ($p < 0.05$) of chlamydial infection with family income. **Conclusions:** Due to the high prevalence of *C. trachomatis*, concerns about effects on reproductive health and fertility are undertaken. Therefore, we believe it is extremely necessary to implement large-scale PCR-based screening as part of routine clinical detection programs concerning preventive effects of chlamydial infection among this population.

Copyright © 2011 S. Karger, AG, Basel

Author Contacts

Dr. Cristina Maria Borborema dos Santos
Laboratório de Diagnóstico Molecular, Centro de Apoio Multidisciplinar
Biotechnology Division, Universidade Federal do Amazonas, Avenida General
Rodrigo Jordão Ramos, 3000, Bloco G, Campus Universitário, Bairro Coroado I
Manaus, AM 69077-000 (Brazil), Tel. +55 92 3647 4018, E-Mail
crisantas@ufam.edu.br

Article Information

Received: December 31, 2009

Accepted after revision: February 2, 2011

Published online: November 17, 2011

Number of Print Pages: 7

Number of Figures: 0, Number of Tables: 3, Number of References: 33

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

Recommend this



Related articles

Assessment of Chlamydia trachomatis Prevalence by Cell Culture and Transcription-Mediated Amplification in Symptomatic Women

Prevalence of Chlamydia trachomatis Infection in the Turkish Female Population

Detection of Chronic Endometritis by Diagnostic Hysteroscopy in Asymptomatic Infertile Patients

Decreased Susceptibility to Azithromycin and Doxycycline in Clinical Isolates of Chlamydia trachomatis Obtained from Recurrently Infected Female Patients in India

Chlamydia trachomatis Infection: Is It Relevant in Irritable Bowel Syndrome?

Adequate Levofloxacin Treatment Schedules for Uterine Cervicitis Caused by Chlamydia trachomatis

Increased Frequency of Bacterial Vaginosis and Chlamydia trachomatis in Pregnant Women with Human Papillomavirus Infection

Current Impact Factor: 1.276

This journal is part of the 5th subject package of the Karger Journal Archive Collection. Information on packages (PDF) Free sample issues



For non-native English speakers and international authors who would like assistance with their writing before submission, we suggest American Journal Experts for their scientific editing service.