



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2009/2010

Mariana Cordeiro Gonçalves Abreu
Infecções ginecológicas e factor tubar da infertilidade

Abril, 2010

FMUP



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Mariana Cordeiro Gonçalves Abreu
Infecções ginecológicas e factor tubar da infertilidade

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Ginecologia e Obstetrícia

Trabalho efectuado sobre a orientação de:

Prof. Doutor João Luís Silva Carvalho

Trabalho efectuado segundo as normas da revista:

Acta Obstetrica e Ginecologica Portuguesa

Abril, 2010

FIMUP

Eu, Mariana Cordeiro Gonçalves Abreu, abaixo assinado, nº mecanográfico 040801168, aluno do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter actuado com absoluta integridade na elaboração deste projecto de opção.

Neste sentido, confirmo que NÃO incorri em plágio (acto pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 13/04/2010

Assinatura:

Mariana Cordeiro Gonçalves Abreu

Nome: Mariana Cordeiro Gonçalves Abreu

Endereço electrónico: marianacgabreu@gmail.com

Título da Monografia:

Infecções ginecológicas e factor tubar da infertilidade

Nome completo do Orientador: Prof. Doutor João Luís Silva Carvalho

Nome completo do Co-Orientador: não tive

Ano de conclusão: 2010

Designação da área do projecto de opção: Ginecologia e Obstetrícia

É autorizada a reprodução integral desta ~~Dissertação/Monografia/Relatório de Estágio~~ (*cortar o que não interessar*) apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 13/04/2010

Assinatura:

Mariana Cordeiro Gonçalves Abreu

Título:

Infecções ginecológicas e factor tubar da infertilidade

Title:

Gynecological infections and tubal factor infertility

Autor:

Mariana Cordeiro Gonçalves Abreu

Aluna de 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Medicina da
Universidade do Porto

Local:

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Alameda Professor Hernâni Monteiro

4200 - 319 Porto

PORTUGAL

Resumo

As infecções do aparelho genital feminino são muito prevalentes, especialmente nas mulheres jovens sexualmente activas.

A doença inflamatória pélvica (DIP) é frequentemente assintomática e subdiagnosticada.

As trompas uterinas são um órgão importante na reprodução humana. Os processos infecciosos que nelas ocorrem provocam alterações que podem comprometer a função tubar. A lesão das trompas é uma causa frequente de infertilidade, sendo responsável por cerca de 25% dos casos de infertilidade feminina nos países desenvolvidos. Este mecanismo é denominado factor tubar da infertilidade (FTI).

Os principais agentes infecciosos que podem prejudicar a fertilidade feminina são a *Chlamydia trachomatis*, a *Neisseria gonorrhoeae*, o *Mycobacterium tuberculosis* e de forma menos clara, o *Mycoplasma genitalium* e alguns agentes da vaginose bacteriana.

As lesões tubares ocorrem mesmo quando a salpingite é subclínica. O diagnóstico e tratamento precoces são essenciais. Os agentes envolvidos devem ser identificados, de forma a instituir antibioterapia dirigida. O objectivo deve ser sempre erradicar a infecção aguda, prevenir a colonização crónica e o aparecimento de mais estirpes resistentes aos antimicrobianos.

Os programas de rastreio deveriam ser implementados pois permitem identificar as portadoras assintomáticas.

O FTI tem ganho especial atenção, sendo apontado como uma das piores sequelas das infecções genitais femininas. Nesta revisão, é abordado o papel das trompas uterinas na reprodução humana e o impacto que as infecções genitais têm nas suas integridades anatómicas, morfológicas e funcional. São focados os principais agentes infecciosos que constituem risco para a fertilidade feminina e a importância da actuação precoce e intensiva.

Palavras chave: infecções ginecológicas, salpingite, factor tubar da infertilidade

Abstract

Genital tract infections are very prevalent, particularly between young sexually active women. Pelvic inflammatory disease (PID) is often subclinical and subdiagnosed.

Uterine tubes are an important organ in human reproduction. In salpingitis, the infection may produce tubal changes and impair their function. Female infertility may be due tubal damage and this is known as tubal factor infertility (TFI). This factor is responsible for approximately 25% of female infertility cases in developed countries.

The main infectious agents of tubal injury are *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycobacterium tuberculosis* and, in an uncertain way, *Mycoplasma genitalium* and some agents implicated in bacterial vaginosis.

Tubal damage may occur even if salpingitis are asymptomatic. Diagnose and treatment in an early stage of disease is essential. The etiology must be identified to assure an effective treatment. The goal must be always eradicate acute infection, prevent chronic disease and even avoid antimicrobial resistances. Screening programs should be implemented to allow the detection of asymptomatic carriers of these microorganisms.

Tubal factor infertility has rightfully gained attention as one of the greatest sequelae deriving from genital tract infections. This paper reviews the role of uterine tubes in human reproduction and the impact of genital infections in their anatomical, morphological and functional integrities. The main microorganisms that carry risk for female fertility and the importance of a prompt and intensive evaluation are in focus.

Key words: gynecological infections, salpingitis, tubal factor infertility

Índice

Declaração de integridade	i
Declaração de reprodução	ii
Título, autor e local de elaboração do trabalho	iii
Resumo.....	iv
Abstract	v
Índice.....	vi
Abreviaturas	vii
1. Introdução	1
2. Mecanismos fisiológicos das trompas uterinas e a sua importância na reprodução humana	2
3. Epidemiologia das infecções ginecológicas que constituem risco para a fertilidade feminina.	3
4. Doença inflamatória pélvica.....	5
5. Principais agentes etiológicos	7
a) <i>Chlamydia trachomatis</i>	7
b) <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	8
c) Micoplasmas genitais	10
d) Vaginose bacteriana	11
e) Tuberculose genital	11
6. Manifestações da DIP a nível das trompas uterinas	12
7. Importância do diagnóstico e tratamento precoces	13
8. Prognóstico.....	15
9. Conclusão.....	16
Agradecimentos.....	17
Bibliografia	17

Abreviaturas:

CDC: Centro de Controlo e Prevenção de Doenças

DIP: doença inflamatória pélvica

DIU: dispositivo intra-uterino

FTI: factor tubar da infertilidade

HSP: proteínas de choque de calor

IL: interleucina

OMS: Organização Mundial de Saúde

TNF: factor de necrose tumoral

1. Introdução

As infecções genitais femininas são um importante problema de saúde pública devido à sua elevada incidência e às possíveis sequelas a longo prazo. As infecções não complicadas do tracto genital inferior, quando não tratadas, podem desencadear doença inflamatória pélvica (DIP) ¹. Esta doença manifesta-se com endometrite, salpingite, parametrite, peritonite pélvica ou abscessos tubo-ováricos ². A DIP é frequentemente subdiagnosticada ou confundida com outras patologias pélvicas, como a endometriose ou determinadas perturbações intestinais ³.

Sendo multifactorial, a infertilidade feminina pode também ser motivada por alterações anatómicas dos órgãos genitais, quer sejam congénitas ou adquiridas ⁴. A lesão das trompas uterinas é uma das causas de infertilidade, sendo este mecanismo denominado factor tubar da infertilidade (FTI) ². Este factor é responsável por 10 a 25% dos casos de infertilidade feminina nos países desenvolvidos e por mais de 80% dos casos nos países em desenvolvimento ^{5,6,7}.

As lesões tubares podem ser originadas por infecções, trauma cirúrgico, endometriose ou reacção a corpos estranhos. Actualmente, o FTI surge mais frequentemente em consequência de infecções ^{2,8,9}. As salpingites primárias ocorrem devido a microorganismos que ascendem do tracto genital inferior e correspondem a 85% dos casos de salpingite ¹⁰. É frequente permanecerem assintomáticas. Actualmente admite-se que as salpingites subclínicas são mais frequentes do que as sintomáticas ⁹.

As salpingites mais frequentemente relacionadas com o FTI são desencadeadas pela *Chlamydia trachomatis* e pela *Neisseria gonorrhoeae* ². Contudo, há outros agentes etiológicos potencialmente lesivos para as trompas uterinas. A microflora fisiológica do tracto genital feminino é constituída por vários agentes, incluindo microorganismos que ainda não foram identificados e cujo potencial lesivo se desconhece ¹¹. A tuberculose genital é uma doença com grande impacto na fertilidade feminina ¹⁰.

O FTI tem ganho especial atenção pois é apontado como uma das piores sequelas das infecções ginecológicas. Com este trabalho, pretende-se fazer uma revisão bibliográfica de trabalhos publicados nos últimos 10 anos relacionados com o tema. É abordado o papel das trompas uterinas na reprodução humana e o impacto que as infecções ginecológicas têm na sua função. São focados os principais agentes etiológicos que constituem risco para a fertilidade feminina e a importância da actuação precoce.

2. Mecanismos fisiológicos das trompas uterinas e a sua importância na reprodução humana

As trompas uterinas, ou de Falópio, têm um importante papel no transporte e suporte nutricional dos gâmetas humanos ¹⁰.

São um órgão essencialmente muscular com o lúmen delineado por epitélio, constituído por células colunares ciliadas e células secretoras não ciliadas. De acordo com o ciclo menstrual, ocorrem transformações nas trompas. Os cílios das células ciliadas sofrem renovação mensal, com os estrogénios a promover a sua proliferação e a progesterona a descamação ^{1, 2}. O músculo liso das trompas uterinas denomina-se mioosalpinge e tem acção contráctil, promovida pela actividade pacemaker das células intersticiais de Cajal ⁸.

Na altura da ovulação, as células secretoras estão particularmente activas e libertam o seu conteúdo no lúmen tubar. Isto faz com que estas células diminuam de altura e as células ciliadas se tornem proeminentes. Os cílios adquirem uma maior liberdade de movimentos ¹².

Após a ovulação, o oócito é captado pelo óstio tubar, com a intervenção das fimbrias existentes na extremidade ovárica da trompa ¹⁰. Os movimentos ciliares e as secreções presentes no lúmen tubar conferem lubrificação e protecção ao oócito enquanto este prossegue na trompa ⁸. Os espermatozóides alojam-se no epitélio tubar, onde continuam a sofrer capacitação, o que prolonga o período fértil de um ciclo menstrual ¹³.

A acção contráctil da mioosalpinge, o movimento dos cílios e as secreções epiteliais promovem a força propulsora necessária à progressão do oócito e o meio adequado para que os gâmetas se encontrem e a fecundação ocorra. O zigoto inicia na trompa as suas divisões mitóticas e é deslocado em direcção ao útero ¹⁰. Nesta altura, verifica-se aumento do tónus muscular do istmo tubar e surge um muco espesso que leva à obstrução da extremidade uterina da trompa. O zigoto permanece retido nesse local por cerca de 72 horas. Este atraso parece ser importante para que o zigoto seja exposto a factores de crescimento e nutrientes presentes no fluído tubar ¹². O embrião é transferido para o útero apenas quando o desenvolvimento endometrial é óptimo para a sua implantação ^{8,12}.

A integridade de uma das trompas uterinas é condição necessária para que ocorra uma gravidez espontânea. As trompas constituem um canal colector para os oócitos libertados pelo ovário, um meio de armazenamento de espermatozóides, tornam possível o encontro dos gâmetas humanos e o transporte do novo embrião até ao útero. A lesão tubar perturba este processo harmonioso, em que o simples encontro de duas células marca o início de uma nova vida humana.

3. Epidemiologia das infecções ginecológicas que constituem risco para a fertilidade feminina

Anualmente, a DIP ocorre em 1 a 2% de todas as mulheres jovens sexualmente activas ^{2, 3}. Na europa, são diagnosticados por ano um milhão de novos casos de salpingite ¹⁴. Aproximadamente 85% das infecções tubares são espontâneas, sendo as restantes desencadeadas por procedimentos que fragilizam a barreira de muco cervical. A DIP afecta principalmente jovens sexualmente activas e mulheres em idade reprodutiva. A sua prevalência é maior no grupo de jovens dos 15 aos 29 anos de idade, de nível socioeconómico baixo e residentes em grandes centros urbanos ^{8,15}.

A infecção por *C. trachomatis* é a doença bacteriana sexualmente transmissível mais prevalente a nível mundial ¹⁶. A Organização Mundial de Saúde (OMS), refere uma incidência global de 90 milhões de infecções genitais anuais por este agente, das quais 50 milhões ocorrem no sexo

feminino ^{5,14,16}. Nos países desenvolvidos, a prevalência de infecção genital por *C. trachomatis* na população em geral é de 3%. A prevalência é maior nos países em desenvolvimento, especialmente nas mulheres em idade reprodutiva. Nesses países, cerca de 51% das mulheres grávidas e 61% das mulheres inférteis estão ou foram infectadas por este agente ¹⁷. O número de infecções por *C. trachomatis* continua a aumentar. Apenas os países em que foram implementados programas de rastreio têm conseguido uma diminuição gradual da sua incidência ⁶.

A incidência das infecções por *N. gonorrhoeae* tem diminuído nas últimas décadas. Este decréscimo verifica-se quer nos países ocidentais quer em África ⁴. Em 2006 a gonorreia foi a segunda doença sexualmente transmissível mais notificada nos EUA, a seguir à infecção por *C. trachomatis* ^{10,18}.

Noutras regiões do globo, as infecções por gonococos são bastante mais frequentes. De acordo com a OMS, a nível mundial ocorrem cerca de 62 milhões de casos de gonorreia todos os anos. Aproximadamente metade desses casos (27 milhões) surgem no sul e sudeste da Ásia. Dezassete milhões são detectados anualmente na África subsariana ¹⁹.

O *Mycoplasma genitalium* foi identificado em 14 a 16% dos casos de DIP. Este agente foi detectado em mais de 20% das adolescentes que recorreram aos serviços de saúde. Em mulheres sexualmente activas de alto risco, é tão prevalente quanto a *C. trachomatis* ²⁰.

A tuberculose genital feminina está quase extinta no mundo ocidental. Contudo continua a ser uma realidade devastadora nos países em desenvolvimento, especialmente na Índia, onde é endémica ⁴. A sua prevalência continua a aumentar nos países em desenvolvimento. Actualmente a prevalência mundial é de 8 a 10 milhões de casos. Nos países desenvolvidos, a prevalência na população infértil é inferior a 1% ²¹. Das mulheres indianas com história de tuberculose genital, 58% são inférteis ⁹. Apesar de ser uma patologia rara entre nós, deve ser considerada, particularmente em imigrantes oriundos da Ásia, Médio Oriente e América latina. Nos países em desenvolvimento é a principal causa de infertilidade feminina, geralmente desencadeada pelo FTI ^{10,22}.

4. Doença inflamatória pélvica

A DIP é uma das piores consequências das doenças sexualmente transmissíveis. Cerca de 99% dos casos de DIP aguda resultam da progressão de microorganismos a partir da vagina ou do cólo uterino. Alguns autores utilizam como sinónimo o termo salpingite, uma vez que a infecção das trompas uterinas é o componente mais comum e característico da DIP²³.

A etiologia da DIP é sobretudo polimicrobiana. Nesta doença co-existem bactérias aeróbicas e anaeróbicas com graus de patogenicidade variados. A *N. gonorrhoeae* foi isolada em 45% dos casos de DIP e a *C. trachomatis* em 10% das infecções. Encontrou-se co-existência destes dois agentes em 12% das pacientes^{3,15}. Outros estudos referem que 30 a 50% das mulheres com gonorreia estão co-infectadas pela *C. trachomatis*²⁴. Estes 2 microorganismos iniciam frequentemente a infecção pélvica. A sua permanência desequilibra as condições do meio e geralmente segue-se o crescimento desproporcionado da flora vaginal fisiológica. Em aproximadamente 50% dos casos de DIP, são encontrados no fluído tubar habitantes fisiológicos da vagina, evidenciando a progressão de microorganismos endógenos para um órgão que é normalmente estéril^{10,23}.

A DIP é sobretudo uma doença das jovens e mulheres sexualmente activas. A maior prevalência verificada deve-se à maior exposição aos agentes patogénicos mas também aos altos níveis de estrogénios nessas faixas etárias. Os estrogénios provocam ectopia cervical com exposição do epitélio colunar do colo uterino. Isso potencia a fixação cervical de microorganismos, o que aumenta o risco de infecções cervicais e a progressão destas para o tracto genital superior^{15, 25}. Os métodos contraceptivos usados interferem com o risco de desenvolver DIP. Os métodos de barreira reduzem o risco de infecções genitais. As mulheres que usam anticoncepcionais orais parecem ter um risco aumentado de cervicite. Contudo, quando ocorre DIP, esta é geralmente menos agressiva. Os componentes progestativos tornam o muco cervical mais espesso e normalmente há diminuição do cataménio. Estes factores diminuem a progressão de agentes para o tracto genital superior²³. A associação entre o uso de dispositivo intra-uterino (DIU) e o risco de salpingite é controversa. Por

implicar a permanência de um corpo estranho no útero e canal cervical, pensa-se que as utilizadoras estão mais vulneráveis à progressão ascendente de infecções. Estudos recentes demonstraram que há um risco aumentado de DIP apenas nas 3 primeiras semanas após a colocação de DIU^{23,26}.

A DIP parece ter uma repercussão mais dramática nas trompas uterinas do que em qualquer outra parte do tracto genital⁴. O processo de infecção, inflamação e reparação tecidual sediado nas trompas, leva a lesões por vezes irreversíveis²⁷. Admite-se que a presença de qualquer microorganismo nas trompas uterinas que suscite uma resposta inflamatória, quer seja aguda ou crónica, perturba a homeostasia tubar²⁸. Contudo, o risco de FTI relaciona-se com a etiologia da salpingite.

Dificuldades de diagnóstico

A DIP aguda apresenta uma clínica muito diversificada, com sinais e sintomas não específicos que variam entre manifestações ténues a quadros urgentes. O diagnóstico diferencial de DIP aguda inclui perturbações gastrointestinais, torção ou rotura de massa anexial, endometriose, apendicite aguda e gravidez ectópica. O sintoma mais frequente é a dor abdominal baixa, que além de inespecífica, pode ser moderada ou mesmo inexistente³. Na maioria dos casos, a DIP ocorre com uma clínica pouco exuberante. Frequentemente as mulheres ignoram os sintomas desencadeados por esta doença, que também tendem a ser desvalorizados pelo médico assistente. Contudo, o diagnóstico continua a ser essencialmente clínico e presuntivo. Os testes de pesquisa dos agentes etiológicos nem sempre permitem conhecer o resultado em tempo útil. Outros meios de diagnóstico são invasivos, caros ou pouco acessíveis²⁹. Em mais de 70% dos casos de DIP o agente etiológico não chega a ser identificado^{20,30}.

5. Principais agentes etiológicos

De seguida vão ser abordados os principais agentes etiológicos que constituem risco para a fertilidade feminina.

a) *Chlamydia trachomatis*:

A *C. trachomatis* é uma bactéria intracelular obrigatória, com crescimento lento. Há 18 serótipos distintos, contudo 60 a 70% das infecções urogenitais são desencadeadas pelos serótipos D, E e F³¹. Esta bactéria pode existir em duas formas: o corpo elementar e o corpo reticulado. O corpo elementar, apesar de metabolicamente inactivo é a forma infecciosa, capaz de penetrar em células não infectadas. O corpo reticulado replica-se por divisão binária dentro das células do hospedeiro, onde origina novos corpos elementares que são libertados por citólise. A capacidade de permanecer em formas latentes aumenta a dificuldade da erradicação deste agente¹⁶.

Quando a infecção se localiza no tracto genital inferior manifesta-se com cervicite mucopurulenta. Muitas vezes surge associada com uretrite ou síndrome uretral aguda¹⁶. Contudo, a infecção é designada “epidemia silenciosa” pois é assintomática em cerca de 70 a 75% das mulheres, fazendo com que seja subdiagnosticada e evolua muitas vezes sem tratamento⁸.

Há uma grande variabilidade individual no curso desta infecção. A taxa de cura espontânea da infecção genital baixa é de 30% durante as primeiras semanas ou meses, de 50% em um ano e chega a 94% em 4 anos. Contudo, nesses casos não se exclui a possibilidade da infecção ter ascendido para o tracto genital superior e persistir a esse nível⁵. Aproximadamente 20% a 40% das mulheres com cervicite por este agente desenvolvem DIP^{9, 16, 28}.

A taxa de recorrência é alta, ocorrendo em 30 a 50% dos casos⁶. A recorrência pode ser desencadeada pela reactivação das formas latentes³². Mulheres com uma infecção prévia por *C. trachomatis* devem ser consideradas em risco de reactivação da infecção quando submetidas a

determinados estímulos, como a instrumentação uterina. Nesses casos, deve-se realizar com antecedência antibioterapia profilática ³³.

Fisiopatologia

A *C. trachomatis* provoca dano nas células tubares epiteliais quando o seu ciclo de replicação termina e os corpos elementares são libertados por citólise das células do hospedeiro. Contudo, este mecanismo não parece ser importante nas infecções persistentes já que nessas a taxa de replicação é baixa ⁵.

Quando há exposição crónica ou repetida a este agente, há formação de anticorpos contra as proteínas de choque de calor (HSP) de 10 kDa e 57 kDa da *C. trachomatis*. Estas HSP têm uma grande homologia com as HSP de 60kDa humanas (HSP60). Devido ao mimetismo molecular pode ocorrer uma reacção auto-imune. Os anticorpos contra as HSP da *C. trachomatis* atacam e lesionam as células do hospedeiro ¹⁶. Estes anticorpos estão geralmente associados com infecção crónica complicada, em que há lesão tubar subjacente ^{34, 35}. As mulheres com anticorpos anti-HSP60 positivos e infectadas com *C. trachomatis*, têm uma maior incidência de lesão tubar. A cHSP10 também está relacionada com lesões tubares que seguem a infecção por este agente ^{4,9}.

A infecção por *C. trachomatis* lesa as células epiteliais ciliadas e estende-se para a mucosa da trompa uterina ^{12,14}. Um estudo *in vitro* demonstrou que as células intersticiais de Cajal das trompas uterinas de rato, também são danificadas na infecção por este agente. A perda da sua actividade pacemaker agrava a estase no lúmen tubar, podendo haver acumulação de secreções e oócitos ⁸. Os efeitos a longo prazo traduzem-se por cicatrização, fibrose e consequente obstrução, podendo desencadear infertilidade de origem tubar ^{7,8}.

b) *Neisseria gonorrhoeae*:

A *N. gonorrhoeae* é o agente etiológico da gonorreia. Este agente tem predilecção pelo epitélio colunar ou pseudoestratificado e por essa razão a infecção ocorre frequentemente no tracto

urogenital ²⁴. Na mulher é comum haver colonização do endocólio uterino, que se manifesta com cervicite mucopurulenta. Contudo, a gonorreia é muitas vezes assintomática e a infecção pode alcançar o tracto genital superior ⁴.

Fisiopatologia:

Quando a *N. gonorrhoeae* coloniza as trompas uterinas, adere selectivamente às células epiteliais não ciliadas. Contudo, as lesões por si desencadeadas são direccionadas às células ciliadas ³⁶. A exposição do epitélio ao gonococos resulta na diminuição e progressiva cessação da actividade ciliar. Este efeito ocorre antes de qualquer alteração estrutural detectável por electromicroscopia ¹². O gonococos pode transpôr o epitélio tubar e a inflamação por vezes torna-se transmural. Admite-se que a *N. gonorrhoea* é frequentemente o agente inaugural da salpingite, mas que a sua presença é limitada no tempo devido às condições de anóxia que se desenvolvem nos tecidos locais. Contudo, ocorre recolonização por outros microorganismos que dão continuidade ao processo infeccioso. O gonococos por vezes dissemina-se para o fundo de saco uterino, onde pode persistir ³⁶.

Como resposta à infecção pelo gonococos, as células epiteliais tubares expressam várias citocinas pró-inflamatórias e respectivos receptores, tais como a interleucina (IL) 1 α , IL-1 β e o factor de necrose tumoral (TNF) α ⁴. A produção destas citocinas tem o intuito de proteger as células do hospedeiro, limitando a sua penetração pelo gonococos. No entanto, verificou-se que as citocinas desencadeiam lesões epiteliais ³⁷. O TNF- α induz apoptose em cerca de 30% das células epiteliais tubares. Este é um mecanismo de defesa, que previne a colonização das células do hospedeiro pelo gonococos. Contudo, as células epiteliais infectadas adquirem um mecanismo que as impede de sofrer apoptose, o que leva à persistência da infecção. Compreender o mecanismo anti-apoptótico induzido pelo gonococos permitiria desvendar um pouco mais da sua patogénese e iria possibilitar a criação de novas estratégias para prevenção e tratamento da infecção ¹.

c) **Micoplasmas genitais**

Foram identificadas seis espécies diferentes de micoplasmas no tracto genital feminino. Muitos destes, tais como o *Mycoplasma hominis* e o *Ureaplasma urealyticum*, pertencem à flora vaginal fisiológica. O *M. genitalium* tem maior potencial patogénico e parece ser um factor de risco independente para o desenvolvimento de DIP^{11, 38}. A sua presença foi demonstrada em casos de cervicite, endometrite aguda e salpingite, nos quais a pesquisa de gonococos e *C. trachomatis* tinha sido negativa^{11, 20, 39}. A infecção por este agente é frequentemente assintomática³⁰.

O *M. genitalium* ascende a partir do endométrio para as trompas uterinas, podendo invadir os paramétrios^{9, 38}. Outra forma de progressão da infecção, prende-se com a sua capacidade de aderir aos espermatozóides, usando-os como veículo para alcançar o tracto genital feminino superior²⁰.

Fisiopatologia:

O papel do *M. genitalium* na infertilidade feminina continua sob investigação. Este agente é isolado do fluído tubar de algumas mulheres com salpingite. Um estudo *in vitro* demonstrou que o *M. genitalium* provoca lesões no epitélio tubar. Os cílios das células ciliadas ficam edemaciados e a sua actividade é prejudicada, podendo haver perda desses componentes celulares. Admite-se que apesar das lesões serem pouco exuberantes quando comparadas com as provocadas pela *C. trachomatis* ou pela *N. gonorrhoeae*, a sua persistência pode levar a complicações irreversíveis nas trompas uterinas, com fibrose e desenvolvimento de aderências².

Os anticorpos contra o *M. genitalium* são mais frequentemente encontrados em mulheres com FTI do que naquelas em que a infertilidade tem outra etiologia^{20, 39}. Estudos recentes sugerem que o *M. genitalium* está envolvido na patogénese de DIP potencialmente desencadeadora de infertilidade, por comprometimento da função das trompas uterinas³⁸.

O *M. hominis* e o *U. urealyticum* apresentam uma associação menos clara face à infertilidade feminina ⁴⁰. Continua por esclarecer se estes agentes conseguem desencadear DIP ou se actuam como meros co-factores de outros microorganismos ⁴.

d) Vaginose bacteriana:

A vaginose bacteriana é caracterizada pelo crescimento desproporcionado de microorganismos que pertencem à flora vaginal fisiológica. Os microorganismos geralmente envolvidos são o *Mycoplasma hominis*, o *Ureoplasma urealyticum*, a *Gardnerella vaginalis* e as espécies de anaeróbicos *Mobiluncus*, *Bacteroides* (exclui-se o *Bacteroides fragilis*), *Peptostreptococcus* e *Peptococcus* ^{4,23}.

A vaginose bacteriana por si só tem poucas complicações graves. Contudo pode ocorrer disseminação dos agentes envolvidos para o tracto genital superior ⁴. A vaginose bacteriana associa-se a um aumento de risco de 2 vezes para desenvolvimento de DIP ³. A progressão ascendente da infecção é mais frequente quando co-existem outros agentes patogénicos. Na ausência de sinais e sintomas, 15% das mulheres com vaginose bacteriana têm DIP subclínica ⁴¹.

Fisiopatologia:

Alguns dos agentes causais desta doença, tais como o *M. hominis*, o *Bacteroides ureolyticus* e a *Mobiluncus* spp, provocam lesão directa no epitélio das trompas uterinas e podem estar na origem de infertilidade tubar. Foi demonstrado que a infecção por *M. hominis* diminui a actividade ciliar. Um estudo *in vitro* revelou que determinados *Mobiluncus* produzem citotoxinas que danificam as células ciliadas do epitélio tubar de bovinos. O *B. ureolyticus* liberta endotoxinas que provocam danos na mucosa e nas células ciliadas das trompas uterinas ¹².

e) Tuberculose genital

Os agentes etiológicos desta infecção pélvica são o *Mycobacterium tuberculosis* e o *M. bovis* ²³.

Fisiopatologia

Geralmente o local da primoinfecção é o pulmão. Por disseminação hematogénica a micobactéria pode alcançar os órgãos genitais. As trompas uterinas são o principal órgão a ser atingido na tuberculose pélvica, e o mais lesado. A resposta inflamatória desencadeia a formação de granulomas com necrose caseosa nas trompas uterinas, que podem conduzir à sua obstrução²³. Frequentemente ocorre hidrossalpinge e abscesso tubo-ovárico²².

6. Manifestações da DIP a nível das trompas uterinas

As salpingites primárias geralmente são bilaterais, desde que na ausência de um corpo estranho. O processo infeccioso crónico, que frequentemente se segue, também atinge as duas trompas. Contudo a severidade e a extensão da lesão pode variar consideravelmente entre os dois lados. Na fase aguda, normalmente ocorre inflamação da mucosa tubar, com edema das paredes das trompas que envolve também a serosa. Esta reacção inflamatória pode resultar na formação de aderências dentro do lúmen da trompa e entre a serosa e os órgãos adjacentes. Por vezes surge um exsudado purulento que preenche o lúmen tubar e que pode extravasar para a cavidade peritoneal. Nesta fase, o processo infeccioso sediado na trompa uterina denomina-se piossalpinge²⁴. O exsudado é extremamente irritante e tem na sua constituição múltiplos agentes patogénicos, podendo desencadear um processo infeccioso nas estruturas por si atingidas. Isto leva à distorção da anatomia local, que compromete ainda mais a estrutura e função tubar⁴².

Os abscessos tubo-ováricos são uma manifestação tardia da DIP. Estes são de etiologia polimicrobiana, nem a *C.trachomatis* nem a *N. gonorrhoeae* conseguem produzi-los isoladamente. Os agentes anaeróbicos predominam nas fases avançadas do processo infeccioso. Na presença de um abscesso tubo-ovárico, é frequente haver obliteração completa da trompa uterina¹⁵.

7. Importância do diagnóstico e tratamento precoces

A salpingite subclínica é mais comum que a sintomática e frequentemente apresenta um carácter crónico⁹. Admite-se que a DIP subclínica tem o mesmo risco de lesões tubares que uma DIP com clínica exuberante. A maioria das mulheres com lesões cicatriciais nas trompas uterinas não refere história de DIP aguda no passado⁴¹.

Apenas 14% das mulheres infectadas com *C. trachomatis* ou *N. gonorrhoeae* apresentam sintomas valorizáveis⁵. As mulheres com DIP não tratadas durante as primeiras 72h após o início dos sintomas, têm uma probabilidade 3 vezes superior de desenvolver infertilidade de origem tubar²³. Recomenda-se um baixo limiar para suspeição desta doença¹⁰.

A DIP provocada pela *C. trachomatis* é a principal causa de infertilidade feminina prevenível¹⁶. A elevada taxa de recorrência da infecção e a sua morbidade reprodutiva, evidenciam a importância de detectar e tratar todas as mulheres portadoras deste agente⁹. Apenas o tratamento precoce consegue um bom controlo da infecção. A antibioterapia numa infecção crónica parece ser menos eficaz na prevenção de sequelas¹⁶.

O benefício dos programas de rastreio da *C. trachomatis* foi comprovado em zonas onde a sua implementação se traduziu com diminuição da prevalência deste agente e dos casos de DIP⁴³. O custo-benefício do rastreio é positivo, mesmo em populações com baixa prevalência da infecção¹⁶. Nas mulheres infectadas, recomenda-se a repetição dos testes de identificação deste agente 3 meses após o término da antibioterapia⁴⁴.

As cervicites desencadeadas pela *N. gonorrhoeae* evoluem para DIP em 10 a 25% das mulheres não submetidas a tratamento^{1, 37}. O gonococos apresenta uma notável capacidade de alterar o seu genótipo, o que lhe permite adaptar-se facilmente a meios inóspitos. Um reflexo disso é a contínua aquisição de resistência a antimicrobianos, incluindo as sulfonamidas, penicilinas, tetraciclina e fluroquinolonas^{18, 45, 46}. Actualmente, as cefalosporinas de terceira geração são recomendadas como

primeira linha de tratamento. Contudo, já foram detectadas estirpes resistentes a esta classe de antimicrobianos de toma oral na Ásia, com possível importação para a Europa. Com o intuito de evitar a emergência de mais estirpes resistentes, o Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC) recomenda que todos os casos de gonorreia sejam confirmados através de cultura e que se realizem sempre testes de susceptibilidade a antimicrobianos ¹⁰.

O *M. genitalium* é resistente a antimicrobianos recomendados pelo CDC para tratamento da DIP, tais como a cefoxitina e a doxiciclina ³⁰. É importante identificar este agente etiológico, para que possa ser instituída antibioterapia dirigida. A resistência ao tratamento pode levar a inflamação e infecção crónica do tracto genital superior, aumentando a probabilidade de sequelas graves nas trompas uterinas ^{3,20}.

Na tuberculose genital, o diagnóstico precoce é essencial para evitar a progressão da doença. Quando o diagnóstico é estabelecido, geralmente a probabilidade de uma futura gravidez já é baixa, ainda que seja instituída a terapêutica adequada ²². Esta doença é muitas vezes assintomática e nas formas paucibacilares, a detecção da micobactéria torna-se difícil, sendo uma doença subdiagnosticada ²¹. Nas áreas endémicas, devem ser instituídos programas de rastreio para todas as mulheres jovens em risco.

As infecções por estes agentes, preenchem os pré-requisitos para serem integradas em programas de rastreio uma vez que são muito prevalentes, geralmente assintomáticas e estão associadas a morbilidade reprodutiva. Só os programas de rastreio permitem fazer o diagnóstico de um número significativo de doentes assintomáticas ⁴⁷.

O CDC defende que o rastreio de colonização genital baixa por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* diminui a incidência de doenças sexualmente transmissíveis desencadeadas por estes agentes. Recomenda o rastreio da infecção por *C. trachomatis* em todas as mulheres sexualmente activas

com menos de 25 anos. As mulheres em risco de infecção por *N. gonorrhoeae* devem ser submetidas a rastreio para o gonococos²⁹.

Os parceiros sexuais das pacientes com infecção por *C. trachomatis* ou por gonococos devem ser tratados. O objectivo é diminuir quer o risco de reinfeção da mulher quer a prevalência destas infecções nas redes sociais⁴⁶.

8. Prognóstico

A OMS alerta que as infecções não tratadas por *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* podem desencadear DIP em mais de 40% das mulheres. Um em cada 4 casos poderá resultar em infertilidade feminina⁴⁸. Mesmo após antibioterapia adequada, a presença de lesões tubares com cicatrização e fibrose ocorre em 33 a 45% dos casos de DIP³.

O risco de FTI após salpingite está relacionado com o agente etiológico. A PID por *C. trachomatis* evolui mais vezes com infertilidade de origem tubar do que quando a infecção é por gonococos⁹.

A incidência de FTI aumenta com a repetição dos episódios de DIP. Surge em aproximadamente 10% das mulheres após a primeira DIP, em 20% das mulheres com 2 episódios e em mais de 40% após 3 episódios da doença²³. A DIP aguda recorrente ocorre em cerca de 25% dos casos e nas adolescentes alcança taxas de 30 a 50%^{6,23}.

O FTI está relacionado com a gravidade da lesão tubar observada em laparoscopia. Ocorre apenas em 3% das pacientes com lesão tubar leve e em 29% quando a lesão é grave. A ausência de aderências peritubais durante o episódio agudo parece ser o achado laparoscópico com maior valor preditivo de fertilidade²⁷. Se houver dano tubar extenso, a probabilidade de uma gravidez espontânea é menor²³.

A infecção por *C. trachomatis* por vezes persiste após antibioterapia ⁹. Em 3% dos casos ocorre infertilidade ¹⁶. O processo imunológico pode perpetuar-se apesar da erradicação do agente ²⁸.

A *N. gonorrhoeae* pode causar dano permanente nas trompas uterinas, com subsequente infertilidade ²⁴. Apesar de incomum, por vezes ocorre disseminação hematogénica da infecção, que pode cursar com febre, artrite, dermatite, endocardite e/ou meningite ³⁶.

O *M. genitalium* é resistente a muitos antibióticos usados no tratamento da DIP, pelo que frequentemente a infecção persiste e evolui para salpingite crónica ². As mulheres com colonização genital pelo *M. genitalium* apresentam uma taxa de infertilidade cerca de 2,5 vezes superior, quando comparadas com mulheres sem infecção prévia por este agente ⁴⁹.

Na tuberculose genital, após o estabelecimento da doença as taxas de concepção são baixas, variando entre 10 a 20% a nível global ²².

Actualmente as opções de tratamento disponíveis, tais como a microcirurgia tubar e as técnicas de reprodução medicamente assistida, são diversas e bastante eficazes. São oferecidas opções reprodutivas com resultados satisfatórios quando a infertilidade se estabelece como resultado de um ou vários episódios de DIP ¹⁰.

9. Conclusão

As infecções ginecológicas potencialmente desencadeadoras de infertilidade são frequentemente assintomáticas e permanecem muitas vezes sem diagnóstico.

O objectivo deve ser sempre diagnosticá-las precocemente e tratá-las de forma intensiva. Na maioria dos casos de suspeição de DIP, a etiologia não é confirmada. Isto reflecte-se na aplicação de antibioterapia não específica para os agentes etiológicos, que conduzem ao aumento das estirpes

resistentes aos antimicrobianos, a elevadas taxas de persistência e à recorrência da infecção. Conhecer o ou os agentes etiológicos e aplicar um tratamento direccionado, permitiria um controlo mais eficaz da infecção, com o objectivo último de melhorar o prognóstico a longo termo.

A prevalência das infecções ginecológicas permanece alta a nível mundial, o que reflecte a ineficácia dos programas de controlo em curso. A instituição de programas de rastreio dos principais agentes etiológicos, teria um efeito a longo prazo benéfico. Além de permitir o diagnóstico e tratamento precoces destas infecções, diminuindo as suas sequelas, iria permitir quebrar o ciclo de transmissão silenciosa dos agentes. Também devem ser concentrados esforços na prevenção primária das infecções ginecológicas, de forma a diminuir a exposição e a aquisição de agentes patogénicos. As consequências patofisiológicas e psicológicas das infecções ginecológicas podem ser devastantes, especialmente porque a maioria das mulheres atingidas são jovens.

Agradecimentos

A autora agradece ao Prof. Doutor Silva Carvalho, pela orientação, compreensão e ajuda para ultrapassar as dificuldades com que se confrontou na realização deste trabalho.

Bibliografia

1. Morales P, Reyes P, Vargas M. Infection of Human Fallopian Tube Epithelial Cells with *Neisseria gonorrhoeae* Protects Cells from Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Apoptosis. *Infect Immun* 2006; 74 (6): 3643–50.
2. Baczynska A, Funch P, Fedder J. Morphology of human Fallopian tubes after infection with *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* - in vitro organ culture study. *Hum Reprod* 2007; 22 (4): 968-979.

3. Haggerty CL, Ness RB. Diagnosis and treatment of pelvic inflammatory disease. *Womens Health (Lond Engl)* 2008; 4 (4): 383-397.
4. Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, et al. Genital tract infections and infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 140 (1): 3-11.
5. Hartog JE, Morr  SA, Land JA. Chlamydia trachomatis - associated tubal factor subfertility: immunogenetic aspects and serological screening. *Hum Reprod Update* 2006; 12 (6): 719-730.
6. Land JA, Evers JLH. Chlamydia infection and subfertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002; 16 (6): 901-912.
7. Veenemans LM, Linden PJ. The value of Chlamydia trachomatis antibody testing in predicting tubal factor infertility. *Hum Reprod* 2002; 17: 695-698.
8. Dixon RE, Hwang SJ, Hennig GW. Chlamydia infection causes loss of pacemaker cells and inhibits oocyte transport in the mouse oviduct . *Biol Reprod* 2009; 80: 665-673.
9. Mardh, PA. Tubal factor infertility, with special regard to chlamydial salpingitis. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17: 49-52.
10. Rhoton-Vlasak, AMD. Infections and Infertility. *Prim Care Update Ob Gyns* 2000; 7 (5): 200-206.
11. Taylor SN. Mycoplasma genitalium. *Curr Infect Dis Rep.* 2005; 7 (6): 453-7.
12. Lyons RA, Saridogan E, Djahanbakhch O. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Human Reprod Update* 2006; 12 (4): 363-372.
13. ESHRE, Capri Workshop Group. Diagnosis and management of the infertile couple: missing information. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 295-307.

14. Wilkowska-Trojnieł M, Zdrodowska-Stefanow B, Ostaszewska-Puchalska I. Chlamydia trachomatis urogenital infection in women with infertility. *Adv Med Sci* 2009; 54.
15. Lareau SM, Beigi RH. Pelvic Inflammatory Disease and tubo-ovarian abscess. *Infect Dis Clin N Am* 2008; 22: 693-708.
16. Paavonen J, Eggert-Kruse W. Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction. *Hum Reprod Update* 1999; 5 (5): 433- 447.
17. Dadamessi I, François Eb, Betsou F. Combined detection of Chlamydia trachomatis-specific antibodies against the 10 and 60-kDa heat shock proteins as a diagnostic tool for tubal factor infertility: results from a case-control study in Cameroon. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 45: 31-35.
18. Whiley DM, Tapsall JW, Sloots TP. Nucleic Acid Amplification Testing for Neisseria gonorrhoeae: An Ongoing Challenge. *J Mol Diagn* 2006; 8 (1): 3-15.
19. Barry PM, Klausner JD. The use of cephalosporins for gonorrhea: The impending problem of resistance. *Expert Opin Pharmacother* 2009; 10 (4): 555-577.
20. Haggerty, CL. Evidence for a role of Mycoplasma genitalium in pelvic inflammatory disease. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21 (1): 65-9.
21. Singh N, Sumana G, Mittal S. Genital tuberculosis: a leading cause for infertility in women seeking assisted conception in North India. *Arch Gynecol Obstet* 2008;278: 325-327.
22. Tripathy SN, Tripathy SN. Infertility and pregnancy outcome in female genital tuberculosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 76: 159-163.
23. Katz VL, Lentz GM, Lobo RA, Gershenson DM. *Comprehensive Gynecology*. 5th ed. Mosby Elsevier; 2007. p. 607-629.

24. Bieber EJ, Sanfilippo JS, Horowitz IR. *Clinical Gynecology*. Churchill Livingstone Elsevier; 2006. p. 259-292.
25. Haggerty CL, Ness RB. Epidemiology, pathogenesis and treatment of pelvic inflammatory disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006; 4 (2): 235-47.
26. Grimes, DA. Intrauterine device and upper-genital-tract infection. *Lancet* 2000; 356: 1013-1019.
27. Pavletic AJ, Wölner-Hanssen P, Paavonen J, Hawes SE, Eschenbach. Infertility following pelvic inflammatory disease. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999; 7: 145-152.
28. Imudia AN, Detti L, Puscheck EE. The prevalence of ureaplasma urealyticum, mycoplasma hominis, chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae infections, and the rubella status of patients undergoing an initial infertility evaluation. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25: 43-46.
29. Crossman SH. The Challenge of Pelvic Inflammatory Disease. *Am Fam Physician* 2006; 73: 859-64.
30. Haggerty CL, Totten PA, Astete SG. Failure of cefoxitin and doxycycline to eradicate endometrial Mycoplasma genitalium and the consequence for clinical cure of pelvic inflammatory disease. *Sex Transm Infect* 2008; 84: 338–342.
31. Paavonen J, Lehtinen M. Chlamydial pelvic inflammatory disease. *Hum Reprod Update* 1996; 2 (6): 519–529.
32. Witkin SS, Linhares IM. Chlamydia trachomatis in subfertile women undergoing uterine instrumentation. An alternative to direct microbial testing or prophylactic antibiotic treatment. *Hum Reprod* 2002; 17 (8): 1938-1941.

33. Land JA, Gijzen AP, Evers JLH. Chlamydia trachomatis in subfertile women undergoing uterine instrumentation. Screen or treat? Hum Reprod 2002; 17 (3): 525-527.
34. Hartog JE, Land JA, Stassen FRM. Serological markers of persistent C. trachomatis infections in women with tubal factor subfertility. Hum Reprod 2005; 20: 986-990.
35. Dutta R, Jha R, Salhan S. Chlamydia trachomatis - Specific Heat Shock Proteins 60 Antibodies can Serve as Prognostic Marker in Secondary Infertile Women. Infection 2008; 36: 374-378.
36. Edwards JL, Apicella MA. The Molecular Mechanisms Used by Neisseria gonorrhoeae To Initiate Infection Differ between Men and Women. Clin Microbiol Rev 2004; 17 (4): 965–981.
37. Maisey K, Nardocci G, Imarai M. Expression of Proinflammatory Cytokines and Receptors by Human Fallopian Tubes in Organ Culture following Challenge with Neisseria gonorrhoeae. Infect Immun 2003; 71: 527-32.
38. Clausen HF, Fedder J, Drasbek M. Serological investigation of Mycoplasma Genitalium in infertile women. Hum Reprod 2001; 16 (9): 1866-1874.
39. Svenstrup HF, Fedder J, Kristoffersen SE. Mycoplasma genitalium, Chlamydia trachomatis, and tubal factor infertility—a prospective study. Fertil Steril 2008; 90 (3): 513-20.
40. Fenkci V, Yilmazer M, Aktepe OC. Have Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infections any significant effect on female fertility? Infect Med 2002; 10: 220-223.
41. Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, et al. Lower Genital Tract Infection and Endometritis:Insight Into Subclinical Pelvic Inflammatory Disease. Obstet Gynecol 2002; 100 (3): 456-63.
42. Green TH. Gynecology Essentials of Clinical Practice. 3th ed. Little Brown: 1977.

43. Geisler WM. Management of Uncomplicated Chlamydia trachomatis Infections in Adolescents and Adults: Evidence Reviewed for the 2006 Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 77-83.
44. Peterman TA, Tian LH, Metcalf CA. High Incidence of New Sexually Transmitted Infections in the Year following a Sexually Transmitted Infection: A Case for Rescreening. *Ann Intern Med* 2006; 145 (8): 564-572.
45. Workowski KA, Berman SM, Douglas JM. Emerging Antimicrobial Resistance in Neisseria gonorrhoeae: Urgent Need to Strengthen Prevention Strategies. *Ann Intern Med* 2008; 148: 606-613.
46. Vranken MV. Prevention and Treatment of Sexually Transmitted Diseases: An Update. *Am Fam Physician* 2007; 76: 1827-32.
47. Macmillan S, Templeton A. Screening for Chlamydia trachomatis in subfertile women. *Hum Reprod* 1999; 14 (12): 3009-3012.
48. World Health Organization. Prevention and control of sexually transmitted infections: draft global strategy; Fifty-ninth World Health Assembly Annex A59/11 Geneva: 2006.
49. Stephen EH, Chandra A. Declining estimates of infertility in the United States: 1982-2002. *Fertil Steril* 2006; 86: 516-523.