



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Marcos Paulo Cardoso Marques

Correlação entre *status* do microbioma vaginal e lesões precursoras do colo uterino e canal anal de mulheres HIV+ em uso de TARV com e sem o uso de inibidores da protease

Rio de Janeiro

2020

Marcos Paulo Cardoso Marques

Correlação entre *status* do microbioma vaginal e lesões precursoras do colo uterino e canal anal de mulheres HIV+ em uso de TARV com e sem o uso de inibidores da protease

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Leila Cristina Soares Brollo

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

M357 Marques, Marcos Paulo Cardoso.

Correlação entre status do microbioma vaginal e lesões precursoras do colo uterino e canal anal de mulheres HIV+ em uso de TARV com e sem o uso de inibidores da protease / Marcos Paulo Cardoso Marques. – 2020.

78 f.

Orientadora: Leila Cristina Soares Brollo

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Colo uterino – Teses. 2. Papillomaviridae. 3. HIV (Vírus) – Teses. 4. Infecções por HIV. 5. Terapia Antirretroviral de Alta Atividade. 6. Vaginose Bacteriana. I. Brollo, Leila Cristina Soares. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.98

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Marcos Paulo Cardoso Marques

Correlação entre *status* do microbioma vaginal e lesões precursoras do colo uterino e canal anal de mulheres HIV+ em uso de TARV com e sem o uso de inibidores da protease

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 07 de agosto de 2020.

Orientadora: Prof.^a Dra. Leila Cristina Soares Brollo
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof. Dr. Evandro Mendes Klumb
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Jacyara Brito Macedo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Carlos Augusto Pais Cabral
Universidade José do Rosário Vellano

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo amor, carinho e o estímulo ao estudo.

A Simone, pelo incentivo e apoio nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra. Leila Cristina Soares Brollo, minha orientadora, por sua confiança inabalável, incansável dedicação ao estudo, enorme sabedoria e infinita paciência, com certeza sem ela não teria chegado até aqui.

À Prof.^a Dra. Debora Fontenelle dos Santos, pelo apoio durante a pesquisa, na captação das pacientes e permissão para a coleta das amostras durante suas consultas.

À Prof.^a Dra. Jacyara Brito Macedo, pelos ensinamentos e por ter facultado as dependências do laboratório de biologia molecular do departamento de bioquímica do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes (IBRAG) – UERJ, para realização da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Jorge Luis Alves Brollo, amigo e grande incentivador.

À bióloga Ms. Amanda Chaves Pinho pelo seu inestimável trabalho no laboratório de biologia molecular do departamento de bioquímica do IBRAG - UERJ, por toda colaboração e dedicação durante a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Pinho de Oliveira pela excelente acolhida no serviço de ginecologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE).

À Prof.^a Dra. Luciana Maria Borges da Matta Souza, pela atenção e disponibilidade em aceitar a árdua tarefa da revisão.

Aos Prof. Dr. Evandro Mendes Klumb, Prof. Dr. Carlos Augusto Pais Cabral e Prof.^a Dra. Jacyara Brito Macedo pela gentileza de atenderem ao convite para participarem da Banca de Defesa desta Dissertação de Mestrado.

À Prof.^a Dra. Renata Aranha e ao Prof. Dr. Márcio Antônio Babinski pela delicadeza de aceitarem o convite para a suplência da Banca Examinadora.

Às secretárias da ginecologia do HUPE, srta. Maria Isabel de Souza Lima e sra. Tereza Cristina Ramos Granja, pelo carinho, prontidão e torcida pelo sucesso do trabalho.

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.

Cora Coralina

RESUMO

MARQUES, Marcos Paulo Cardoso. **Correlação entre status do microbioma vaginal e lesões precursoras do colo uterino e canal anal de mulheres HIV+ em uso de TARV com e sem o uso de inibidores da protease.** 2020. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A imunossupressão relacionada ao vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) é conhecida por ter um impacto desfavorável na história natural do Papillomavirus Humano (HPV), sendo associada ao aumento da aquisição e à persistência da infecção HPV induzida. A terapia antirretroviral (TARV) altamente ativa permitiu aumentar a qualidade e aumentar a expectativa de vida das pessoas vivendo com HIV. Os inibidores da protease (IP) podem causar efeitos adversos na mucosa com impacto no crescimento e na integridade dos tecidos, porém tendem a atingir baixas concentrações em fluidos biológicos. O objetivo desse trabalho foi de estabelecer possíveis diferenças na constituição do microbioma vaginal e a ocorrência de lesões precursoras cervical e anal em mulheres HIV+ em TARV com e sem inibidores da protease. Oitenta e oito mulheres com infecção pelo vírus HIV foram divididas em dois grupos: TARV com IP e sem IP. Todas as participantes foram submetidas à anamnese com coleta de dados clínicos e sociodemográficos. O DNA total, usado como modelo nos ensaios baseados em reação da polimerase em cadeia (PCR) para a detecção de HPV-DNA, foi extraído de amostras cervicais e anais. Amostras ectocervicais, endocervicais e anais foram coletadas para colpocitologia e citologia anal. Não houve diferenças entre os grupos com e sem IP em relação às lesões relacionadas ao HPV. Apesar da maior prevalência de vaginose bacteriana (VB) no grupo IP (33,96% vs 17,14%), a diferença não foi significativa ao considerar todas as mulheres ($p = 0,066$). Quando mulheres com carga viral detectável e contagem de células T CD4 + <200 foram excluídas em ambos os grupos, a VB foi mais prevalente no grupo IP ($p = 0,049$). Não foram encontradas associações entre VB e idade, uso de preservativo, HPV cervical, tempo com o regime TARV atual, relação anal receptiva desprotegida e lesões relacionadas ao HPV cervical. As taxas de positividade para o HPV cervical e anal foram de 35,21% e 78,8%, respectivamente. A presença de lesões relacionadas ao HPV na colpocitologia foi associada à positividade anal do HPV ($p = 0,027$). A proporção entre infecção cervical por HPV e lesões cervicais relacionadas ao HPV foi de 2,5. A proporção entre infecção pelo HPV anal e lesões relacionadas ao HPV anal foi de 4,3. Trinta por cento tinham DNA concomitante de HPV no colo do útero e no ânus. Não houve diferenças na frequência de lesões HPV-relacionadas de colo uterino e ânus, bem como na ocorrência de infecções pelo HPV cervical e anal entre mulheres HIV+ com e sem IP. Após exclusão de mulheres com carga viral detectável e contagem de células T CD4 + <200, houve aumento na ocorrência de vaginose bacteriana em mulheres HIV+ em TARV com IP.

Palavras-chave: Papillomavirus humano. Síndrome da imunodeficiência adquirida. Infecções por HIV. Terapia antirretroviral. Vaginose bacteriana.

ABSTRACT

MARQUES, Marcos Paulo Cardoso. **Correlation between vaginal microbiome status and precursor lesions of the cervix and anal canal of HIV + women using ART with and without the use of protease inhibitors.** 2020. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Immunodeficiency related to the human immunodeficiency virus (HIV) is known for its adverse impact in the natural history of human papillomavirus (HPV); it is associated with the rise in acquisition and persistence of induced HPV infection. The highly active antiretroviral therapy (HAART) allowed both quality and life expectancy of people living with HIV to increase. Protease inhibitors (PI) can cause adverse effects on mucosa, impacting on growth and tissue integrity, but tend to reach low concentrations in biological fluids. The objective of this research was to establish possible differences in the composition of the vaginal microbiome and the frequency of cervical and anal precursor lesions in HIV+ women on HAART, with and without PI. Eighty-eight women with HIV infection were divided into two groups: HAART with or without PI. All participants were submitted to anamnesis and clinical and sociodemographic data were collected. The total DNA, used as a model on the trials/tests based on the polymerase chain reaction for detecting of HPV DNA, was extracted from cervical and anal samples. Ectocervical, endocervical, and anal samples were collected for colpocytology and anal cytology. There was no difference between the groups with and without PI in relation to injuries related to HPV. Though there's a predominance of bacterial vaginosis (VB) in group PI (33.96% vs 17.14%), the difference was not so substantial when all the women were considering ($p = 0.066$). When women with a detectable viral charge and cell count T CD4 + <200 were excluded from both groups, the VB was more prevalent in group PI ($p = 0,049$). No associations were found between VB and age, use of preservatives, cervical HPV, time with the current HAART regimen, unprotected receptive anal intercourse, and cervical HPV-related injuries. The positivity rates for cervical and anal HPV were 35.21% and 78.8%, respectively. The presence of HPV-related lesions in colpocytology was associated with the anal positivity of HPV ($p = 0.027$). The proportion between HPV-related cervical infection and HPV-related cervical lesions was 2.5. The ratio between anal HPV infection and anal HPV-related injuries was 4.3. Thirty percent had concomitant HPV DNA in the cervix and anus. There were no differences in the frequency of cervical and anus-related HPV lesions, as well as in the occurrence of cervical and anal HPV infections among HIV+ women with and without PI. After excluding women with detectable viral load and CD4+ <200 T-cell counts, the occurrence of bacterial vaginosis in HIV+ women with PI increased.

Keywords: Human papillomavirus. HIV infections. Antiretroviral therapy. Bacterial vaginosis. Acquired immunodeficiency syndrome.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AGC	<i>Atypical Glandular Cells</i>
ASC-H	<i>Atypical Squamous Cells Cannot Exclude High-grade Intraepithelial Lesion</i>
ASC-US	<i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i>
CCR5	C-C chemokine receptor type five
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DBQ	Departamento de Bioquímica
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPV	<i>Human Papillomavirus</i>
HSIL	<i>High-grade Cervical Squamous Intraepithelial Lesion</i>
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes
IC	Intervalo de Confiança
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IP	Inibidores de Protease
LBM	Laboratório de Biologia Molecular
LCR	<i>Long Control Region</i>
LSIL	<i>Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NIA	Neoplasia Intraepitelial Anal
NLIM	Negativo para Lesões Intraepiteliais ou Malignidade
OR	<i>Odds Ratio</i>
ORF	<i>Open Reading Frames</i>
ORI	Origem de Replicação
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>

TARV	Terapia Antiretroviral Altamente Ativa
UERJ	Universidade Estadual do Rio de Janeiro
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i>
VB	<i>Vaginose Bacteriana</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1. REVISÃO DA LITERATURA	13
1.1 Epidemiologia da infecção pelo HIV no Brasil	13
1.2 Tipos de HIV	14
1.3 Estrutura e replicação	15
1.4 Terapia antirretroviral para HIV	15
1.5 HIV e resposta imune	17
1.6 Lesões precursoras de câncer de colo uterino e do canal anal e imunidade	18
1.7 Papel do <i>Human Papillomavirus</i> no câncer de colo uterino	18
1.8 Classificação das lesões precursoras do colo uterino	21
1.9 Neoplasia epitelial anal e HPV	22
1.10 Microbioma vaginal	25
1.11 Inibidores da protease e HPV	26
1.12 Inibidores da protease e epitélio	26
1.13 Justificativa	27
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. METODOLOGIA	29
3.1 Desenho de estudo	29
3.2 Pacientes e local de estudo	29
3.3 Aspectos éticos	29
3.4 Coleta de dados	29
3.5 Coleta de amostras cervicais e anais	30
3.6 Análise estatística	32
3.7 Resultados	33
4. DISCUSSÃO	37
CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44
APÊNDICE A – Tabela 1: Características sociodemográficas e clínicas	55

APÊNDICE B – Tabela 2: Características sociodemográficas e clínicas estratificadas por diagnóstico de HPV anal e associações	56
APÊNDICE C – Tabela 3: Vaginose bacteriana e variáveis clínicas:	57
ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética.....	58
ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido	59
ANEXO C – Comprovação de submissão do 1 ^o artigo científico	60
ANEXO D – Aceite do 1 ^o artigo científico.....	61
ANEXO E – Formato final do 1 ^o artigo científico publicado.....	62
ANEXO F – Comprovação de submissão do 2 ^o artigo científico submetido	68
ANEXO F – Formato final do 2 ^o artigo científico submetido.....	69

INTRODUÇÃO

A imunossupressão relacionada ao vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) é conhecida por ter um impacto desfavorável na história natural do *Human Papillomavirus* (HPV), sendo associada ao aumento da aquisição e à persistência da infecção HPV induzida. A terapia antirretroviral altamente ativa (TARV) altamente ativa permitiu aumentar a qualidade e aumentar a expectativa de vida das pessoas vivendo com HIV. Os inibidores da protease (IP) podem causar efeitos adversos na mucosa com impacto no crescimento e na integridade dos tecidos, porém tendem a atingir baixas concentrações em fluidos biológicos.

O objetivo geral deste trabalho é analisar as alterações do microbioma vaginal, verificar se há diferença na ocorrência de infecção pelo HPV e lesões precursoras de câncer de colo uterino e de ânus entre mulheres HIV+ em TARV com e sem inibidores da protease. Os objetivos específicos são: a) analisar o microbioma vaginal, bem como a frequência de vaginose bacteriana (VB), entre mulheres HIV+ em TARV com e sem inibidores da protease e b) analisar possíveis diferenças na ocorrência de infecções pelo HPV e lesões precursoras de câncer cervical e anal, entre mulheres HIV+ em TARV com e sem inibidores da protease.

O estudo foi realizado com pacientes do sexo feminino, com idades entre 18 e 65 anos, com infecção pelo HIV em TARV, no HUPE, de outubro de 2017 a janeiro de 2019. Participantes com histerectomia prévia ou que eram virgens no momento da inscrição no estudo foram excluídas.

Este estudo inicia-se com um capítulo de revisão da literatura sobre o vírus o HIV, a terapia antirretroviral a resposta imune ao HIV, as lesões precursoras de câncer cervical e de canal anal, o papel do HPV nas neoplasias epiteliais cervical e anal, microbioma vaginal e os inibidores da protease e epitélio. No segundo capítulo, encontram-se os objetivos do trabalho. O terceiro capítulo refere-se a metodologia, com descrição do tipo de estudo, das bases que originaram a população do estudo, da condução da análise estatística e os resultados encontrados. Os capítulos quatro e cinco trazem, respectivamente, a discussão e as conclusões do estudo. Ao final é apresentado um artigo já publicado e outro artigo submetido, como produtos do estudo realizado.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Epidemiologia da infecção pelo HIV no Brasil

A epidemia do vírus da imunodeficiência humana/síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês *human immunodeficiency virus* - HIV e *acquired immune deficiency syndrome* - AIDS) sofreu mudanças dramáticas desde que os primeiros casos foram descritos em 1981. Inicialmente percebida como uma doença entre gays ou haitianos nos países ocidentais, a transmissão do HIV foi relatada em praticamente todas as partes do mundo. Os níveis de prevalência na década de 1990 atingiram mais de 30% entre adultos em muitas cidades da África Subsaariana, configurando-se como uma das maiores preocupações em saúde pública em todo o mundo (Holmes *et al.*, 2019). Na era da TARV, houve notáveis reduções na mortalidade relacionada à AIDS (Pettit *et al.*, 2018).

A mortalidade global pelo HIV atingiu o pico em 2006, com 1,95 milhão de mortes e, desde então, diminuiu para 950 mil de mortes em 2017 (Frank *et al.*, 2019). No Brasil, em 2018, foram diagnosticados 43.941 novos casos de HIV e 37.161 casos de AIDS, com uma taxa de detecção de 17,8/100.000 habitantes, totalizando, no período de 1980 a junho de 2019, 966.058 casos de AIDS detectados no país (Ministério da Saúde, 2019).

Apesar de uma prevalência geral baixa no Brasil, essa prevalência é substancialmente maior em populações-chave com maior risco. De acordo com os critérios do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS), a epidemia brasileira está concentrada (Guimarães *et al.*, 2015). No Brasil houve um aumento de 2% na taxa de detecção da doença, com tendência no aumento da infecção em regiões mais carentes como o Norte-Nordeste e entre os mais jovens e os idosos. Neste cenário, fenômenos como a feminização, pauperização e interiorização da epidemia têm ganhado cada vez mais atenção, apontando para a importância dos aspectos socioeconômicos, regionais e culturais, de gênero, cor da pele, bem como a falta de recursos estruturais e humanos em saúde como elementos de vulnerabilidade ao HIV/AIDS (Furtado *et al.*, 2016).

Nas duas primeiras décadas da epidemia de AIDS no Brasil (1980-1997), as pessoas que ingeriram drogas contribuíram com 17,3% dos casos de AIDS, mas desde 1998 a prevalência de infecção por HIV nesta população vem diminuindo. Observou-se um declínio mais acentuado nos últimos anos e hoje corresponde a 2,1% dos novos casos de AIDS. Esta tendência

parece resultar de uma combinação de diferentes fatores, como mudanças comportamentais e implementação de medidas preventivas (Guimarães *et al.*, 2015).

A transmissão entre homens e mulheres através da mucosa responde pela maioria das recentes infecções por HIV-1. Numerosos fatores podem aumentar o risco de aquisição de HIV-1 em mulheres, incluindo estágio de infecção pelo HIV-1 e carga viral do parceiro, co-infecções com infecções sexualmente transmissíveis, ectopia cervical e idade. Flutuações hormonais e mudanças nas barreiras mucosas do trato reprodutivo feminino são fatores de risco significativos para a aquisição do HIV-1 (Carias *et al.*, 2016).

A razão de sexos no Brasil apresenta diferenças regionais importantes, apesar de, em todas elas, haver um predomínio de casos em homens. Nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, a razão de sexos, em 2018, foi de 26 e 27 casos em homens para cada dez casos em mulheres, respectivamente. Essa razão cai nas regiões Norte, Nordeste e Sul. A região Sul tem a maior proporção de mulheres no total de casos de AIDS: 18 homens para cada dez mulheres (Ministério da Saúde, 2019).

1.2 Tipos de HIV

A pandemia mundial de AIDS é uma combinação de múltiplas epidemias de HIV, cada uma ocorrendo em regiões e populações geográficas específicas. (Librelotto *et al.*, 2015)

Os vírus da imunodeficiência humana, HIV, pertencem à família Retroviridae, gênero Lentivirus. Estão agrupados em dois tipos: HIV-1, o principal agente mundial e HIV-2, restrito a algumas regiões da África Ocidental e Central (Fanales-Belasio *et al.*, 2010).

O vírus HIV tipo 1 é responsável pela maioria dos casos de AIDS e tem 9 subtipos (classificados com as letras A-D, F-H, J e K) com uma distribuição complexa em todo o mundo. Além disso, vírus recombinantes podem aparecer em regiões onde diferentes subtipos são prevalentes. Os subtipos A1, B, C e a forma recombinante CRF02_AG são as formas de HIV-1 mais prevalentes e estão associados a mais de 75% dos casos de AIDS em todo o mundo. A maioria das pessoas está infectada com o subtipo B. Os subtipos C, F1 e os recombinantes BC e BF geralmente são observados em baixas frequências na maioria das cidades e estados brasileiros (Librelotto *et al.*, 2015).

1.3 Estrutura e replicação

O genoma do HIV consiste em duas moléculas de *ribonucleic acid* (RNA) de fita simples idênticas que estão envolvidas no núcleo da partícula do vírus. A estrutura da partícula do HIV é semelhante para o HIV-1 e o HIV-2. Embora com estruturas semelhantes, têm diferentes habilidades patogênicas no hospedeiro. (Azevedo-Pereira *et al.*, 2015; Fanales-Belasio *et al.*, 2010)

As proteínas virais são codificadas por nove genes, sendo três poliproteínas (*env*, *gag* e *pol*), quatro acessórias (*nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*) e duas regulatórias (*tat*, *rev*). O gene *pol* codifica uma poliproteína de 160 kilodaltons que após clivagem proteolítica origina as enzimas virais transcriptase reversa, protease e integrase. A transcriptase reversa representa uma enzima fundamental para o ciclo replicativo do HIV-1, uma vez que é responsável pela síntese de *deoxyribonucleic acid* (DNA) a partir do RNA viral (Nkeze, 2015). Em razão da ausência de capacidade de reparo, a transcriptase reversa não é capaz de corrigir erros que ocorrem durante a transcrição reversa, o que conseqüentemente leva a uma alta taxa de mutações (Cuevas *et al.*, 2015). A protease viral está envolvida no processamento que gera várias proteínas e enzimas virais, sendo necessária para o ciclo replicativo do vírus. A integrase é essencial para incorporação do DNA viral ao DNA da célula do hospedeiro (Wang *et al.*, 2019).

Uma vez no citoplasma, o genoma viral RNA sofre transcrição reversa para uma fita dupla de DNA pró-viral, pela transcriptase reversa viral. O DNA pró-viral é, então, associado com proteínas virais e celulares em um grande complexo nucleoproteico de pré-integração que é transportado para o núcleo celular através do poro nuclear. (Engelman, 2019)

A replicação não tratada do HIV causa progressiva perda de células T CD4+ e uma ampla variedade de anormalidades imunológicas, levando a um risco aumentado de complicações infecciosas e oncológicas (Deeks *et al.*, 2015).

1.4 Terapia antirretroviral para HIV

A AIDS, inicialmente considerada uma doença aguda e fatal, atualmente possui perfil de doença crônica. Essa modificação se deve à TARV, que permitiu aumentar a qualidade do tratamento das pessoas portadoras do vírus HIV, melhorando a qualidade e aumentando a

expectativa de vida (Medeiros *et al.*, 2017). Estudos populacionais mostram melhora na sobrevida dos pacientes com essa doença, havendo, aos 25 anos, uma expectativa mediana de vida de 32,5 anos desde o momento em que começam o tratamento (Rossi *et al.*, 2012).

Os esquemas terapêuticos empregados na prática clínica atual para o tratamento contra o HIV têm comprovada eficiência na redução das taxas de morbimortalidade da AIDS (Broder, 2010). A notável redução da taxa de óbitos no mundo está relacionada à supressão da replicação viral, no aumento das células de defesa CD4+ e na substancial proteção do sistema imunológico dos pacientes, propiciados pela terapia antirretroviral de elevada potência. A terapia que envolve tipicamente a combinação de três ou mais antirretrovirais de pelo menos duas subclasses diferentes é hoje parte do senso comum de que os pacientes têm direito aos benefícios do tratamento, dada a gama de opções de medicamentos disponíveis no mercado (Becerra, Bildstein & Gach, 2016).

O Brasil ganhou destaque entre os países que possuem uma política ativa de combate à AIDS, sendo considerado um caso de sucesso internacional, com o Programa Nacional DST/AIDS, que prevê, entre outras atividades, a distribuição universal de TARV, conforme os ditames da Lei no 9.313, de 1996 (República Federativa do Brasil, 1996).

Os antirretrovirais são divididos em seis classes: inibidores de protease (IP), os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos/nucleotídeos, os inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos, os inibidores da fusão, os inibidores da integrase e os antagonistas do co-receptor *C-C chemokine receptor type five* (CCR5 - receptor de quimiocina tipo 5) (Pau & George, 2014).

Os IP, como Fosamprenavir, Atazanavir, Darunavir, Indinavir, Lopinavir, Nelfinavir, Ritonavir e Saquinavir, atuam na enzima protease, bloqueando sua ação e impedindo a produção de novas cópias de células infectadas com HIV (Pau & George, 2014).

No ciclo de vida do HIV, a protease é um elemento essencial para a maturação e replicação viral. Os IP são capazes de interagir e ocupar de forma competitiva o sítio ativo da enzima, impedindo sua atuação. O sítio ativo da protease pode ser ocupado tanto pelo seu substrato natural, as poliproteínas virais a serem clivadas, quanto pelas moléculas produzidas artificialmente, os IP. O excesso do fármaco no interior da célula, em relação à quantidade do substrato natural, possibilita a inibição da replicação do vírus (LV, Chu & Wang, 2015).

Os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos/nucleotídeos atuam na enzima transcriptase reversa, incorporando-se à cadeia de DNA que o vírus cria e tornam essa cadeia defeituosa, impedindo que o vírus se reproduza. Os principais representantes desta classe

são zidovudina, abacavir, didanosina, estavudina, lamivudina e tenofovir (Pau & George, 2014).

Os inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos bloqueiam diretamente a ação da enzima e a multiplicação do vírus. Os principais representantes desta classe são Efavirenz, Nevirapina e Etravirina (Pau & George, 2014).

Os inibidores de fusão, como a Enfuvirtida, impedem a entrada do vírus na célula e, impedindo que ele se reproduza (Pau & George, 2014).

Os inibidores da Integrase, como o Raltegravir, bloqueiam a atividade da enzima integrase, responsável pela inserção do DNA do HIV ao DNA humano. Assim, inibe a replicação do vírus e sua capacidade de infectar novas células (Pau & George, 2014).

O antagonista de CCR5, Maraviroc, se liga seletivamente ao receptor CCR5 humano na membrana celular, bloqueando assim a interação do HIV gp120 e o receptor CCR5 para o HIV trópico CCR5 (Pau & George, 2014).

As principais razões para troca de TARV são simplificação do esquema antirretroviral, ocorrência de efeitos adversos, eliminação interações indesejadas, adequação de esquema à gestação e minimização de custos (Brites, 2016).

1.5 HIV e resposta imune

De acordo com a taxa de progressão, a infecção pelo HIV pode ser dividida em três tipos principais: rápida, quando a AIDS se desenvolve dentro de três anos após a infecção; intermediária, em que a AIDS se desenvolve lentamente entre 3 e 10 anos após a soroconversão; e não progressão a longo prazo, quando as pessoas infectadas pelo HIV com ausência de declínio de células T CD4+ e T CD8+ e controle da replicação do vírus na ausência de tratamento. Esse último grupo compreende menos de 5% dos casos (Kumar, 2013).

A infecção primária pelo HIV é caracterizada por uma doença sintomática transitória (em 40-90% dos casos) associada a altos níveis de replicação do vírus. Na grande maioria (> 80%) de indivíduos infectados, o vírus transmitido resulta da infecção de uma única variante de vírus (Perreau, Levi & Pantaleo, 2013).

Os sintomas não são típicos de uma síndrome viral aguda e podem incluir febre, fadiga, erupção cutânea, dor de cabeça, linfadenopatia, faringite, mialgia, artralgia, meningite asséptica, dor retroorbital, perda de peso, depressão, distúrbios gastrointestinais, suores

noturnos, úlcera genital e úlcera oral. A fase sintomática geralmente dura 2-4 semanas em indivíduos com progressão "normal" na doença, enquanto os sintomas graves e prolongados estão associados à progressão rápida da doença. Uma vez que a infecção crônica pelo HIV é estabelecida, o curso da doença e progressão do HIV pode ser influenciado substancialmente pelos fatores hospedeiro (genético e imunológico) e virológico (Perreau, Levi & Pantaleo, 2013).

1.6 Lesões precursoras de câncer de colo uterino e do canal anal e imunidade

A imunodeficiência relacionada ao HIV é conhecida por ter um impacto desfavorável na história natural do HPV, sendo associada ao aumento da aquisição e à persistência da infecção por HPV, bem como ao aumento do risco de lesões intraepiteliais de alto e baixo grau e carcinoma invasivo, além de maior taxa de coinfeção com múltiplos tipos de HPV de alto risco em comparação com indivíduos HIV-negativos (Clemente, 2017).

No entanto, o HIV pode afetar alguns tipos de HPV de alto risco mais desfavoravelmente do que outros. Em particular, foi relatado que o HPV 16 é menos afetado por mudanças nos níveis de imunodeficiência do que outros tipos e pode estar sub-representado em relação a outros tipos de HPV em mulheres infectadas com HIV em comparação às não infectadas com diagnósticos citológicos e / ou histológicos similares (Clifford, 2017).

A reversão da imunossupressão relacionada ao HIV devido a TARV pode não levar a uma diminuição da incidência de câncer anal ou câncer cervical, pois o desenvolvimento destes parece não estar claramente vinculado ao desenvolvimento da AIDS, ao contrário de outras neoplasias malignas associadas ao HIV, como o sarcoma de Kaposi e o linfoma não Hodgkin (Palefsky, 2005).

No sistema de classificação para o HIV do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical, desde 1993, foi definido como condição de estágio B e o câncer cervical invasivo tornou-se uma condição definidora de AIDS entre as mulheres (CDC, 2014).

1.7 Papel do *Human Papillomavirus* no câncer de colo uterino

O HPV tem sua maior prevalência nas populações jovens sexualmente ativas. Dados relatam que cerca de até 70% das pessoas sexualmente ativas nos Estados Unidos entrarão em contato com o vírus durante a sua vida. O HPV é considerado a mais importante causa de câncer cervical, sendo detectado em 95-100% dos casos de câncer de células escamosas cervicais. Conseqüentemente, a menor idade de início da vida sexual e o maior número de parceiros sexuais aumentam o risco de contaminação. São espécie-específicos e tem tropismo pelo epitélio escamoso da pele e das mucosas, podendo induzir a formação de tumores ou papilomas em diversas regiões, dentre elas, incluem-se: colo uterino, vagina, vulva, orofaringe e ânus (Bosch *et al.* 2003; Koutsky, Galloway & Holmes, 1988).

O HPV é um vírus da família Papilomaviridae, não envelopado, com genoma de DNA de fita dupla circular, constituído de aproximadamente 8000 pares de bases (Doorslaer *et al.*, 2018). Aproximadamente 200 tipos de HPV foram caracterizados. A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou 13 Tipos de HPV como carcinógenos do grupo 1: HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59 e -66), que são comumente referidos como “HPVs de alto risco” (Bouvard, Baan & Straif, *et al.*, 2009 Muñoz *et al.*, 2003). Esses vírus são classificados em grupos de alto risco e de baixo risco de acordo com a propensão para a progressão maligna das lesões que causam. A infecção persistente de tipos de alto risco, tem sido conhecida por predispor ao desenvolvimento de cânceres de colo uterino, orofaringe e região anogenital (Munger *et al.*, 2004; Völter *et al.*, 1996; Lorincz *et al.*, 1992).

O genoma do HPV está dividido em três regiões: expressão precoce (E, do inglês Early), composta pelos genes designados de E1, E2, E4, E5, E6, E7 e E8; expressão tardia (L, do inglês Late), composta por dois genes tardios, L1 e L2 e a região de longo controle (LCR, do inglês Long Control Region) ou URR (*Upstream Regulatory Region*). A região E codifica proteínas necessárias na replicação do DNA viral e na transformação celular, e a região L codifica as proteínas do capsídeo. Uma característica comum entre os papilomavírus é a de que todas as regiões do DNA que codificam as proteínas virais estão localizadas no filamento positivo do genoma e onde estão inseridas 10 ORFs (*Open Reading Frames*). A LCR é a única região que não contém ORF e varia de tamanho nos papilomavírus. Nela está inserida a origem de replicação (ORI). Na região E, destacam-se as proteínas virais: E1, E2, E6 e E7. A proteína E1 tem relação com a replicação viral, E2 com a transcrição e replicação. Por outro lado, E6 e E7 codificam proteínas que são responsáveis pela transformação da célula hospedeira (Santos *et al.*, 2007; Harden & Munger, 2017).

A proteína viral tardia L1 é a principal proteína do capsídeo, correspondendo a 80% do conteúdo protéico viral, enquanto L2 é a menor proteína do capsídeo, e tem como função ligar-se ao DNA e facilitar o transporte da proteína L1 para o núcleo da célula (Santos *et al.*, 2007).

Na maioria das pessoas, a infecção por HPV é assintomática e em mais de 90% dos casos, o HPV pode ser eliminado dentro de 1 a 2 anos. As lesões que não são eliminadas pelo sistema imunológico podem persistir por várias décadas e os genomas virais parciais podem integrar-se ao genoma da célula hospedeira (Lee *et al.*, 2002). Apesar de todos os HPV causarem alterações proliferativas, a natureza mais ativa das proteínas E6 e E7 nos vírus de alto risco torna-as capazes de, eventualmente, gerarem tumores malignos. E6 e E7 desempenham, então, um papel central na progressão e manutenção dos tumores e, por isso, são também designadas por oncoproteínas (Villa, 1997; Fehrmann, Klump & Laminis, 2003).

A oncoproteína E6 forma um complexo com a proteína supressora de tumor (p53) e acelera sua degradação, inativando sua ação no controle negativo do ciclo celular e na reparação do DNA. A proteína E7 interfere com a proteína do retinoblastoma (pRb), um produto do gene supressor de tumor, e às proteínas p107 e p130, semelhantes à Rb, das quais regulam negativamente a proliferação celular (Degenhardt & Silverstein, 2001). E6 e E7 inibem assim, várias vias naturais de "supressão de tumores". A oncoproteína E6 tem a habilidade de degradar e neutralizar a p53, inativando sua ação no controle negativo do ciclo celular e na reparação do DNA. A oncoproteína E7 promove a proliferação celular competindo com o fator de transcrição de E2F para ligação à proteína supressora de tumor de retinoblastoma (pRB), liberando E2F e, assim, possibilitando síntese de DNA, facilitando a entrada da célula na fase S. A oncoproteína E7 interfere com a proteína do retinoblastoma (pRb), um produto do gene supressor de tumor, e às proteínas p107 e p130, semelhantes à pRb, que regulam negativamente a proliferação celular (Münger *et al.*, 2004; Harden *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2002; Stubenrauch *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2006; Tashiro & Brenner, 2017; Hou, Wu & Chiang, 2002).

Como consequência, essas proteínas virais induzem a proliferação de células de carcinoma com DNA modificado. A inativação de funções normais de proteínas supressoras de tumor pRb e p53 é um passo importante na carcinogênese cervical (Lee *et al.*, 2002).

A integração do DNA do HPV é observada principalmente em lesões cervicais malignas. Há grande especificidade no local de clivagem do DNA do vírus, sendo que esta separação não ocorre de forma aleatória, pois a maioria ocorre nas regiões E1 e E2 do vírus. O resultado dessa quebra é uma perda de função desses dois genes, acompanhada de uma desregulação dos genes E6 e E7, resultando em transformação da célula hospedeira (Stewart *et al.*, 2014).

A consequência da interrupção do DNA viral é a expressão constitutiva de E6 e E7 seguida por vantagem de crescimento seletivo em comparação com células com apenas vírus episossomal DNA. As proteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco interagem e suprimem a função das proteínas TP53 e pRB, respectivamente, ambos reguladores principais do ciclo celular, estendendo assim a vida útil das células infectadas, favorecendo o acúmulo de defeitos mitóticos, instabilidade genômica e, finalmente o desenvolvimento de neoplasia. O modo de ação de pRb e p53 na regulação do ciclo celular sugere que a inativação ou modulação da atividade destas duas proteínas podem resultar na proliferação celular das células basais, alterando a sua diferenciação, permitindo então a expansão de um pool e células epiteliais para a replicação de partículas virais (Lee *et al.*, 2002).

A rápida multiplicação celular conduz à acumulação de mutações genéticas que podem dotar as células de novas características, como a capacidade de invadirem tecidos adjacentes e a capacidade de se disseminarem pelo organismo através da corrente sanguínea, originando metástases (Villa, 1997; Hubert & Laimins, 2002).

Dentre os tipos oncogênicos, o HPV16 e HPV18 são os mais comumente relacionados com a infecção persistente e, conseqüentemente, a neoplasia maligna de colo uterino. Nesse sentido, o início precoce da atividade sexual, aumentando a exposição ao risco de infecção por HPV, além da imunossupressão, a multiparidade, o tabagismo e o uso prolongado de contraceptivos orais combinados são também fatores associados ao desenvolvimento do câncer cervical (Levi *et al.*, 2002).

Em 2017, o câncer de colo uterino no Brasil foi a quarta causa de óbitos por neoplasia em mulheres, com 6385 óbitos, sendo o terceiro tumor mais frequente na população feminina. A estimativa do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) para o biênio 2020-2022 é de 16.710 novos casos e um risco estimado de 12,6 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2020).

1.8 Classificação das lesões precursoras do colo uterino

A terminologia citológica atual (sistema Bethesda) é resultado de um trabalho de painel de especialistas convocado em 1988. Esta nomenclatura sugere que a doença intraepitelial cervical não é um processo contínuo, mas sim um sistema de duas doenças descontínuas, de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL – *low-grade squamous intraepithelial lesion*)

e lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL - *high-grade cervical squamous intraepithelial lesion*). A Nomenclatura de Bethesda foi submetida a revisões em 1991, 2001 e 2014 (Verma *et al.*, 2014; Brasil, 2016).

O termo células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US – *atypical squamous cells of undetermined significance*) foi definido como achados citológicos caracterizados pela presença de alterações celulares insuficientes para o diagnóstico de lesão intraepitelial, mas alterações mais significativas do que as encontradas em processos inflamatórios. Esta categoria foi então reclassificada em células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) e células escamosas atípicas de significado indeterminado não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H - *Atypical Squamous Cells cannot exclude High-grade Intraepithelial Lesion*). Também foi incorporado o termo células glandulares atípicas de significado indeterminado (AGC - *Atypical Glandular Cells*) (Brasil, 2016).

Existem questionamentos quanto à eficácia do exame citopatológico em mulheres infectadas pelo HIV em razão da maior prevalência de citologias com atipias de significado indeterminado e maior frequência de infecções associadas. Para minimizar os resultados falso-negativos, alguns autores preconizam a complementação colposcópica (Brasil, 2016; Guido *et al.*, 2003).

1.9 Neoplasia epitelial anal e HPV

A relação entre o HPV e o câncer anal foi sugerida em 1971, na observação da presença de carcinoma in situ adjacente a uma verruga anal, em estudo de alterações displásicas do canal anal feito Oriel e Whimster (Oriel & Whimster, 1971). Em 1986, Fenger e Nielsen, descreveram a presença de displasia e carcinoma in situ adjacentes à maioria dos carcinomas anais, demonstrando que as lesões anais compartilham um padrão de HPV oncogênico visto nas lesões cervicais (Fenger & Nielsen, 1986; Darragh *et al.*, 2012).

Atualmente, é consenso que o principal fator de risco associado ao câncer anal é o HPV (Darragh *et al.*, 2012; Sehnal *et al.*, 2014). Embora o HPV 16 seja o principal tipo relacionado ao câncer anal, outros tipos como 18, 31, 33 e 45 também podem estar envolvidos na gênese da neoplasia anal (Frisch *et al.*, 1997; Shah, 1997; Salati & Kadi, 2012).

A citologia anal vem sendo adotada como um procedimento padrão em indivíduos com risco de câncer anal para detectar lesões precursoras, já que a incidência de câncer anal vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas (Donà *et al.*, 2012). Na Alemanha, diretrizes sobre estratégias de triagem, algoritmos de diagnóstico e gerenciamento de doenças foram publicados em 2015 (Esser & Kreuter & Oette *et al.*, 2015). No entanto, ainda existe algum debate sobre o uso de diferentes estratégias de triagem (Dietrich *et al.*, 2015).

O epitélio do canal anal se estende da borda anal até a linha pectínea e tem revestimento pluriestratificado do tipo escamoso. A linha pectínea é facilmente identificável, representando o epitélio de transição que fica entre o revestimento escamoso do canal anal distal e a mucosa do reto. Na região entre o canal anal e o reto, o epitélio é constituído predominantemente por células de transição, que apresentam características semelhantes às do revestimento urogenital e da mucosa glandular do reto (Santos, 2007).

A incidência do câncer anal vem aumentando no mundo inteiro (Salati & Kadi, 2012), é raro em pessoas com menos de 35 anos, sendo encontrado principalmente em idosos, com idade média de início nos 60 anos (*American Cancer Society*, 2020). O risco de ser diagnosticado com câncer anal durante a vida é de cerca de 1 em 500, esse risco é um pouco maior em mulheres do que em homens, e é também maior em pessoas com certos fatores de risco para câncer anal. Segundo estimativas do *National Cancer Institute* (NCI), o câncer anal corresponderá a 0,5% de todos os novos casos de câncer nos Estados Unidos da América (EUA) em 2020 (NCI, 2020).

A neoplasia anal também mostra uma incidência crescente em pessoas vivendo com HIV e AIDS, onde é muito mais frequente em comparação com a população soronegativa (Oette *et al.*, 2017). Cerca de 1,5% dos pacientes com HIV terão câncer anal aos 75 anos, em comparação com 0,05% em indivíduos HIV negativo (Silverberg *et al.*, 2015). A neoplasia intraepitelial anal (NIA), lesão precursora do câncer anal, pode ser detectada em grande e crescente número de pacientes infectados pelo HIV (Simard *et al.*, 2013). Nesses indivíduos, a progressão para NIA de alto grau e câncer ocorre mais rapidamente do que em pessoas soronegativas (Kreuter *et al.*, 2010; Berry *et al.*, 2014; Palefsky *et al.*, 1998). Além disso, pacientes HIV positivo são até duas décadas mais jovens na época do diagnóstico de câncer anal do que pacientes HIV negativo (Kreuter *et al.*, 2010; Abbasakoor & Boulos, 2005).

O câncer anal mostra uma taxa de incidência substancialmente mais alta em pacientes HIV positivos em comparação com a população em geral (34,6–100 vs. 0,3-1 casos por 100.000 pessoas-ano) (Silverberg *et al.*, 2015; Richel *et al.*, 2015; Abramowitz *et al.*, 2007). Dependendo do subgrupo de infectados com HIV, a NIA de alto grau foi descrita em 13–52%

dos homens que fazem sexo com homens , 15% dos pacientes heterossexuais, 11% das mulheres e 23–27% dos pacientes membros de grupos não selecionados (Simard *et al.*, 2013; Kreuter *et al.*, 2010; Weis *et al.*, 2011) .

Mulheres HIV positivas têm até 28 vezes aumento do risco de câncer anal em comparação com mulheres soronegativas (Frisch *et al.*, 2000, Dal Maso *et al.*, 2003). A prevalência relatada de NIA se aproxima de 27% no subgrupo de mulheres com relação anal (Weis *et al.*, 2011). No entanto, o sítio do contato sexual não é um pré-requisito para a infecção pelo HPV, pois é possível a autoinoculação do vírus do colo do útero ao ânus (Edgren *et al.*, 2007). Assim, para alguns autores, justifica-se a triagem geral na presença de infecção pelo HIV em mulheres (Weis *et al.*, 2011). Altas taxas de infecção anal por HPV e câncer anal também foram documentadas para indivíduos infectados pelo HIV que não relataram relações sexuais (Piketty *et al.*, 2003). Os fatores de risco para o câncer anal descritos na literatura são infecção pelo HIV, infecção por HPV, detecção de HPV de alto risco, baixa contagem de células CD4, tabagismo, relação anal receptiva, múltiplos parceiros, líquen escleroso, imunossupressão, lúpus eritematoso sistêmico e citologia anal anormal (Kreuter *et al.*, 2010; Richel *et al.*, 2015; Abramowitz *et al.*, 2007; Weis *et al.*, 2011; Swedish *et al.*, 2011; Forman *et al.*, 2012; Daling *et al.*, 2004).

Nos EUA, estima-se a ocorrência de 8590 novos casos de câncer anal em 2020, com 1350 mortes como desfecho, sendo 580 em mulheres (NCI, 2020). No Brasil, a última estimativa do INCA, editada em 2018, revela que no ano de 2015 ocorreram 406 mortes, sendo 258 delas em mulheres (INCA, 2020).

Entende-se a importância do papel da coinfeção do HPV/HIV na patogênese das lesões intraepiteliais anogenitais. A imunossupressão já mencionada, aumenta o risco de câncer relacionado com o HPV nesses pacientes. Mulheres HIV+ apresentaram 5 a 7 vezes mais chance de desenvolver câncer anal e cervical em comparação a população geral (Palefsky, 2006). Stier *et al.*, em revisão sistemática publicada em 2015, demonstraram a importância crescente do HPV e câncer anal entre mulheres. Os resultados do estudo mostram que a infecção pelo HPV e displasia anal são comuns em mulheres, especialmente naquelas que vivem com HIV ou têm uma história de patologia do trato genital inferior relacionada ao HPV. Além disso, a incidência de câncer anal continua a crescer em todas as mulheres e especialmente aquelas que vivem com HIV, apesar do amplo uso da TARV (Stier *et al.*, 2015)..

Vários estudos mostraram que a TARV tem feito pouco para reduzir o risco aumentado de infecção por HPV em homens e mulheres, porém os mecanismos subjacentes ao benefício

limitado da TARV em relação à contínua alta prevalência e incidência de infecção por HPV ainda são mal compreendidos (Daling *et al.*, 2004).

1.10 Microbioma vaginal

A barreira imune de uma mucosa vaginal saudável é composta de propriedades físico-químicas que impedem a disseminação de agentes patogênicos. Os péptidos antimicrobianos e as citocinas também desempenham um papel de barreira imunológica após o reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos. A resposta das células epiteliais hospedeiras a bactérias patogênicas ou comensais é principalmente mediada através de receptores de reconhecimento de padrões, incluindo receptores tipo *Toll Like Receptors* (Doerflinger, Throopn & Herbst-Kralovetz, 2014).

O trato genital feminino é um habitat importante para o microbioma humano. A investigação da flora vaginal "normal" geralmente revela espécies de *Lactobacillus* como o gênero de predominância na vagina, o que ajuda a promover um meio vaginal saudável. Existem mais de 120 espécies identificadas de *Lactobacillus* e mais de 20 espécies foram detectadas na vagina. No entanto, tipicamente, uma ou duas espécies de *Lactobacillus* são predominantes (Gao, Weng, Gao & Chen, 2013). Além disso, os *Lactobacillus* demonstraram exercer efeitos citotóxicos nas células tumorais cervicais *in vitro*, independentemente do pH e do ácido láctico (Brotman *et al.*, 2014).

A susceptibilidade biológica à aquisição de HPV e a competência imune para a depuração de uma infecção por HPV podem ser afetadas por infecção bacteriana vaginal capaz de interromper o equilíbrio do microbioma vaginal. A VB, caracterizada pela perda de espécies de *Lactobacillus* e por um crescimento excessivo simultâneo de bactérias anaeróbicas, tem sido associada à síndrome da descarga vaginal, desfechos desfavoráveis de gravidez, doença inflamatória pélvica, infecções pós-operatórias da ferida e endometrite após abortos eletivos. Além disso, predispõe as mulheres a infecção pelo HPV (Gao, Weng, Gao & Chen, 2013). Guo *et al.* observaram menor depuração do HPV em mulheres com VB e Dols *et al.* observaram mudança na composição do microbioma em relação aos *Lactobacillus* na infecção por HPV (Guo *et al.*, 2012).

Os mecanismos pelos quais o microbioma vaginal pode influenciar a detecção de HPV não são conhecidos. Os *Lactobacillus sp.* demonstraram produzir vários fatores microbicidas,

incluindo o ácido láctico. O ácido láctico é mais eficaz do que a acidez isolada no controle do crescimento excessivo de bactérias e na prevenção de infecções sexualmente transmissíveis (Brotman *et al.*, 2014). Clarke *et al.*, em um grande estudo de coorte, relataram maior detecção de HPV, lesões intraepiteliais de baixo grau e infecção por *Chlamydia trachomatis* em mulheres com pH elevado (Clarke *et al.*, 2012).

1.11 Inibidores da protease e HPV

Alguns trabalhos são consistentes em demonstrar que o lopinavir inibe a degradação da p53 pelo HPV e mata seletivamente as células do câncer cervical (Tommasino *et al.*, 2000). Hampson *et al.*, observaram que os inibidores da protease como lopinavir e indinavir podem induzir toxicidade seletiva de células do carcinoma do colo transformadas pelo HPV e podem ser uma alternativa de tratamento tópico de lesões pré-malignas relacionadas ao HPV (Hampson *et al.*, 2011).

Os antirretrovirais indinavir e lopinavir também inibem a capacidade do oncogene E6 do HPV16 de degradar a p53 e matar seletivamente células de carcinoma cervical em vitro. A exposição a esses medicamentos provoca alterações metabólicas dessas células de carcinoma (Kim *et al.*, 2014).

1.12 Inibidores da protease e epitélio

A manutenção da integridade epitelial intestinal é crítica para a função gastrointestinal normal. A desregulação da tight junction e a indução de apoptose ou necrose em células epiteliais intestinais são responsáveis pelo dano epitelial (Wu *et al.*, 2010).

Os inibidores da protease demonstraram, mesmo em baixas concentrações, causar efeitos adversos no epitélio da mucosa oral. Um epitélio comprometido permite acesso a microorganismos e materiais tóxicos aos tecidos. O impacto adverso de lopinavir/ritonavir no crescimento e na integridade dos tecidos parece mais severo quando comparado ao amprenavir (Israr *et al.*, 2011).

Além disso, Danaher, 2010, demonstrou que os inibidores da protease podem afetar a resposta inflamatória inata no epitélio da mucosa oral (Danaher, 2010).

1.13 Justificativa

Os antirretrovirais da classe dos inibidores da protease exercem efeitos antagônicos em relação aos fatores de risco de câncer de colo uterino. Ao mesmo tempo em que se observa, in vitro, que inibem a capacidade do oncogene E6 do HPV de degradação da p53, esses antirretrovirais demonstraram ter ação adversa na manutenção da integridade dos tecidos e na resposta inflamatória inata, favorecendo à aquisição de novas infecções e a reativação da infecção pelo HPV latente, por perda da imunidade específica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é analisar as alterações do microbioma vaginal, verificar se há diferença na ocorrência de infecção pelo HPV e lesões precursoras de câncer de colo uterino e de ânus entre mulheres HIV+ em TARV com e sem inibidores da protease

2.2 Objetivos específicos

Analisar o microbioma vaginal, bem como a frequência de VB, entre mulheres HIV+ em TARV com e sem IP.

Analisar possíveis diferenças na ocorrência de infecções pelo HPV e lesões precursoras de câncer cervical e anal, entre mulheres HIV+ em TARV com e sem IP.

3. METODOLOGIA

3.1 Desenho de estudo

Foi realizado estudo transversal-observacional. O cálculo do tamanho da amostra baseou-se na suposição preliminar de que a ocorrência de VB, HPV anal e HPV cervical entre mulheres com TARV sem IP seria de aproximadamente 20% e 50% entre aquelas em TARV com IP. O tamanho da amostra foi estimado usando o cálculo sugerido por Dupont *et al.*. Com erro de 5% e um poder de 80% em detectar uma diferença de prevalência de 30%, o programa sugeriu 72 casos (Dupont *et al.*, 1998).

3.2 Pacientes e local de estudo

Pacientes do sexo feminino, com idades entre 18 e 65 anos, com infecção pelo HIV em terapia antirretroviral em tratamento a nível ambulatorial no HUPE foram convidadas a participar de outubro de 2017 a janeiro de 2019. Participantes com histerectomia prévia ou que eram virgens no momento da inscrição no estudo foram excluídas.

No total, 88 mulheres participaram deste estudo e foram divididas em dois grupos: mulheres em TARV com IP e mulheres em TARV sem IP.

3.3 Aspectos éticos

Todas as participantes assinaram termo de consentimento informado. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética via Plataforma Brasil (número CAAE 58111916.3.0000.5259).

3.4 Coleta de dados

Cada paciente foi submetida à anamnese com coleta de dados sociodemográficos e identificação de possíveis fatores de risco para prevalência de vaginose bacteriana e aquisição de HPV.

3.5 Coleta de amostras cervicais e anais

Durante o exame ginecológico, as amostras foram coletadas da ectocérvice e endocérvice usando espátula de madeira de Ayres e *cytobrush*, respectivamente. As lâminas foram preparadas usando métodos citológicos padrão, fixadas e armazenadas em álcool a 96%, coradas pelo método de Papanicolaou e analisadas ao microscópio óptico. As amostras citológicas anais foram coletadas através de movimentos suaves de rotação com uma escova citológica a uma profundidade de aproximadamente 4 cm da borda anal, evitando o contato com qualquer lesão externa. As lâminas foram preparadas pelo método convencional, fixadas e armazenadas em álcool a 96%, coradas pelo método de Papanicolaou e analisadas ao microscópio óptico. O resultado foi classificado de acordo com o Sistema Bethesda de 2014, conforme determinado pelo Sistema Único de Saúde (SUS). O microbioma vaginal predominante foi avaliado e o diagnóstico de VB foi caracterizado predominantemente por bacilos Supracitoplasmáticos (sugestivo de *Gardnerella / Mobiluncus*) e ausência de lactobacilos. A presença de lesões HPV-relacionadas também foi avaliada.

Foram consideradas como possíveis lesões HPV-relacionadas: resultados não indicativos de alterações benignas, ASC-US, AGC, ASC-H, LSIL, HSIL e carcinoma invasivo. O ASC-US foi considerado uma lesão relacionada ao HPV. Isso é discutível porque o ASC-US pode ser negativo para o HPV em aproximadamente 50% dos casos. Entretanto, numericamente, mais lesões de alto grau foram precedidas pelo ASCUS do que pelo ASC-H (Sherman *et al.*, 2001).

O material para a pesquisa do HPV foi obtido da zona de junção escamo-colunar cervical com o emprego de uma haste coberta com algodão hidrófilo que foi introduzida 2 cm no colo uterino e submetida à rotação de 180° em sentido horário e a seguir 180° em sentido anti-horário; o mesmo procedimento foi realizado para coleta da amostra anal. A ponta da haste foi em seguida, imersa em solução tampão TE 1X (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM - pH 7,4) e,

imediatamente, encaminhada ao laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Bioquímica, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (DBQ – IBRAG).

Os tubos contendo as células foram mantidos a -20°C até a extração do DNA genômico pelo método de digestão enzimática com proteinase K, conforme descrito por Mahony e colaboradores (Mahony *et al.*, 1993). Os tubos foram descongelados a temperatura ambiente, tiveram suas hastes removidas e reservadas para a centrifugação dos tubos a 10.000 rpm por 10 minutos, seguido de descarte dos sobrenadantes e suspensão do pellet de células cervicais em 515 μL de tampão TE 1X contendo 5 μL de proteinase K (10 mg/mL) e 10 μL de Tween-20 (10%). Após homogeneização e retorno das respectivas hastes, os tubos permaneceram sob agitação constante de 600 rpm por 3 horas a 37°C . A desnaturação de proteínas ocorreu a 100°C por 10 minutos e a solução de DNA foi mantida a -20°C até sua utilização nos ensaios de detecção de DNA do HPV.

A pesquisa do HPV foi feita pela amplificação do DNA viral pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), utilizando dois pares de oligonucleotídeos: MY09/MY11 (Manos *et al.* 1989) e GP05+/06+ (da Roda Husman *et al.* 1995), desenhados para uma região conservada da ORF L1 do HPV, gerando amplicons de aproximadamente 450 (MY-PCR) e 150 pares de bases (pb) (GP+-PCR), respectivamente, conforme descrito anteriormente por Klumb e colaboradores (Klumb *et al.*, 2010).

A MY-PCR ocorreu em uma mistura reacional de 25 μL contendo tampão de PCR 1X, 100mM de dNTPs, 2 mM de MgCl_2 , 0,2 μM de cada primer; 0,3 U de DNA polimerase (Biotools ou Class Five) e 5 μL de amostra de DNA, utilizando os termocicladores modelos MJ96+Biocycler (Peltier Thermal Cycler, California, United States) e Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). O programa utilizado consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min, 40 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 95°C , 1 minuto de pareamento a 55°C e 1 minuto de extensão a 72°C , seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

A GP+-PCR foi realizada em uma mistura reacional com 25 μL de volume final incluindo tampão de PCR 1X, 100 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl_2 ; 0,4 μM de cada primer; 0,6 U de DNA polimerase (Biotools ou Class Five) e 5 μL de amostra de DNA, utilizando os mesmos modelos de termocicladores anteriores. O programa empregado consistiu em uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos incluindo desnaturação a 95°C por 30 segundos, pareamento a 44°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos, seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para excluir os casos de falso negativos, ainda foi realizada a nested PCR, onde 1 μ L do produto da reação de MY-PCR é utilizado substituindo o DNA para a reação de amplificação de GP+-PCR.

Como controle interno para verificação da qualidade do DNA extraído e da ausência de inibidores da reação, todas as amostras de DNA foram testadas com o par de primers PC03/04 (de Roda Husman *et al.* 1995), que amplifica um fragmento de 110 pb do gene da β -globina humana (β -PCR). Esta reação ocorreu em um volume final de 25 μ L contendo tampão de PCR 1X, 40 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,12 mM de cada primer; 0,2 U de DNA polimerase (Biotools ou Class Five) e 2,5 μ L de amostra de DNA utilizando o termociclador e o programa empregados na MY-PCR.

Para cada conjunto de amostras analisadas, foi preparado um controle negativo, utilizando-se todos os reagentes e substituindo-se a amostra de DNA por água, para avaliar a presença de DNA amplificável em quaisquer dos reagentes empregados, e um controle positivo, utilizando-se uma amostra de DNA sabidamente HPV positiva. Os produtos de PCR e padrões de peso molecular foram analisados eletroforéticamente em gel de poliacrilamida 6%, corados com brometo de etídeo (0,5 mg/ml) e fotografados sob luz ultravioleta.

3.6 Análise estatística

Para variáveis qualitativas, foi utilizado o teste Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher para observar possíveis associações existentes, sendo este segundo teste um substituto para quando o valor esperado é inferior a 5, o que é uma premissa do teste Qui-quadrado. Quando utilizado o teste de Fisher, foi sinalizado com o uso de asterisco. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando um nível de significância de 5% em todos os testes.

Múltiplos modelos de regressão logística foram utilizados para avaliar os efeitos das variáveis preditoras. As variáveis foram incluídas no modelo incondicional multivariado quando significativas na análise univariada. Tabagismo e relação anal receptiva desprotegida foram tratados como variáveis dependentes. *Odds ratio* (OR) ajustados foram calculados com intervalo de confiança de 95% (IC).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no IBM SPSS Statistics for Windows, versão 22.0. (IBM Corporation, Armonk, NYUSA).

3.7 Resultados

Os grupos consistiram de um total de 88 mulheres HIV +, com idade média de 44 anos. A etnia foi autorreferida. O grupo étnico predominante foi o afro-americano (44,6%), seguido pelos caucasianos (30,7%) e outros (22,7%). Cinquenta por cento dos participantes relataram renda familiar de até um salário mínimo, que na época do início do estudo era equivalente a 243,71 USD (dólar dos EUA), 42% tiveram pelo menos uma gravidez e 60% relataram 1 ou 2 filhos. O índice de massa corporal médio foi de $25,34 \pm 5,04$. Considerando as mulheres que fumaram no passado ou atualmente, 56,3% dos pacientes eram fumantes e 43,7% (38) ex-fumantes. No geral, 45% das mulheres estavam em TARV por 1 a 3 anos. A VB foi detectada em 27,27% das lâminas citológicas.

Dentre as 88 mulheres, 35 estavam em uso de TARV sem IP (39,78%) e 53 com IP (60,22%). As características sociodemográficas e clínicas baseadas nos grupos de mulheres em TARV sem IP e com IP são mostradas na tabela 1.

Um total de 78 (88,64%) mulheres não apresentava carga viral do HIV detectável e/ou contagem de células T CD4 + <200 (32 no grupo TARV sem IP e 46 no grupo TARV com IP).

No grupo sem IP, os antirretrovirais associados foram lamivudina + tenofovir com efavirenz (68,75%), doltegravir (22,86%), nevirapina (5,71%) ou raltegravir (2,86%). No grupo com IP, os regimes associados a IP foram lamivudina + tenofovir (86,36%) ou lamivudina + zidovudina (9,09%) ou lamivudina + abacavir (4,54%). O IP mais prevalente foi o ritonavir (54%), seguido pelo atazanavir (35%).

Em relação ao tempo para o regime de TARV, 69,8% das mulheres em uso de IP e 72,1% das sem IP faziam uso há menos de 3 anos. Considerando o tempo após o diagnóstico do HIV, 29,4% no grupo sem IP e 11,3% no grupo com IP não relataram relação anal receptiva ($p = 0,202$) e 20,6% sem IP e 30,2% com IP relataram relação anal com preservativo.

De acordo com os resultados citológicos, 16 mulheres (18,18%) apresentaram lesões cervicais HPV-relacionadas e 11 (12,5%) apresentaram lesões anais HPV-relacionadas. Das lesões cervicais HPV-relacionadas, uma era ACG, cinco ASC-US, duas ASC-H, três LSIL, quatro HSIL e um carcinoma invasivo. Das lesões anais HPV-relacionadas, oito eram ASC-US, uma ASC-H e duas LSIL. Das 25 mulheres positivas para infecção pelo HPV cervical, 10 apresentaram lesões cervicais HPV-relacionadas (proporção de 2,5). Das 43 mulheres positivas

para infecção anal por HPV, 10 apresentaram lesões anal HPV-relacionadas (proporção de 4,3), conforme tabela 2.

Não houve diferença entre as pacientes do grupo TARV com IP e sem IP ($p = 0,997$) com base nas faixas etárias (20-35 anos, 36-50 anos e > 50 anos). Também não houve diferença entre os grupos com e sem IP em relação à etnia ($p=0,85$), renda familiar ($p=0,98$), carga viral ($p=0,758$), gestação ($p=0,304$), paridade ($p=0,403$) uso de condom ($p=0,466$), atividade sexual ($p=0,687$), troca de parceiros nos últimos 3 meses ($p=0,450$), colposcopia com lesões HPV-relacionadas ($p=0,719$), HPV cervical ($p=0,690$), citologia anal ($p=0,259$), HPV anal ($p=0,721$).

Dentre as mulheres que relataram relação anal receptiva desprotegida, 29,4% se encontravam no grupo TARV sem IP e 11,3% no grupo TARV com IP ($p=0,034$).

No grupo TARV com IP, havia mais mulheres que nunca fumaram do que no grupo TARV sem IP (58% vs 29%, respectivamente; $p= 0,033$).

A prevalência da categoria 'negativo para lesões intraepiteliais ou malignidade' (NLIM) foi de 81,8% e a de lesões cervicais HPV-relacionadas foi de 18,2%.

Apenas 71 das 88 amostras cervicais e 59 das amostras anais foram adequadas para a análise de PCR (gene da β -globina como controle interno).

Das 71 amostras positivas para o gene da β -globina, 25 foram positivas para DNA do HPV (35,21%). As frequências do HPV cervical não mostraram diferenças significativas entre os grupos sem IP e com IP (32,1% e 44,4%, respectivamente; $p=0,342$).

Amostras cervicais adequadas de 9 mulheres (10,2%) e anais adequadas de 7 mulheres (8,0%) apresentaram cargas virais detectáveis e/ou contagem de células T CD4 + <200 (5 positivas para HPV cervical). Não houve diferenças quanto às características sociodemográficas e positividade ao DNA do HPV entre os grupos etários ($p=0,429$), etnias ($p=0,426$), níveis de renda ($p=0,590$), gravidez ($p=0,121$), paridade ($p=0,102$) ou tabagismo histórico ($p=0,451$).

Das 59 mulheres com amostras anais de HPV consideradas adequadas para análise, 43 (72,88%) também foram positivas para o DNA de HPV anal. Não houve diferenças quanto às características sociodemográficas e positividade para o DNA do HPV anal entre as faixas etárias ($p=0,721$), etnias ($p=0,274$), renda familiar ($p=0,352$), histórico de tabagismo ($p=0,230$), gravidez ($p = 0,528$) ou paridade ($p = 0,379$). Em relação às características clínicas, não houve diferenças significativas entre atividade sexual ($p=0,998$), HPV cervical ($p=0,171$), mudança de parceiros nos últimos 3 meses ($p=0,998$), uso de inibidores de protease na TARV ($p=0,721$) e citologia anal com lesões HPV-relacionadas ($p=0,259$). Apenas 18,6% das mulheres positivas para o HPV anal relataram relação anal receptiva desprotegida. A presença de lesões

cervicais HPV-relacionadas, detectadas pela colpocitologia, foi associada à positividade anal do HPV ($p=0,027$). A taxa positiva de HPV anal no grupo de lesões cervicais HPV-relacionadas foi de 100%. Como regra, se em uma tabela de contingência 2x2 a contagem em qualquer célula é zero, o OR é indefinido (Tabela 2).

Entre 50 mulheres com amostras cervicais e anais consideradas adequadas simultaneamente, 15 (30%) apresentaram infecção concomitante por HPV do colo do útero e do ânus, 6 (12%) apresentaram lesões cervicais HPV-relacionadas (uma ASC-US, uma LSIL, uma ASC-H, e três HSIL), e sete apresentaram lesões anais HPV-relacionadas (4 ASC-US, 2LSIL e 1ASC-H).

Das 71 amostras positivas para o gene da β -globina, 25 foram positivas para DNA do HPV (35,21%). As frequências do HPV cervical não mostraram diferenças significativas entre os grupos TARV sem IP e com IP (32,1% e 44,4%, respectivamente; $p = 0,342$).

Não houve diferença na atividade sexual entre os dois grupos ($p = 0,687$). Apenas 2 (5,7%) e 5 (9,4%) mulheres relataram trocar parceiros nos últimos 3 meses e 19 (54,3%) e 34 (64,2%) mulheres no grupo TARV com IP e sem IP, respectivamente, usaram preservativo. Não houve diferença entre os grupos em relação às lesões cervicais HPV-relacionadas: ASC-US, AGC, ASC-H, LSIL, HSIL e carcinoma invasivo ($p = 0,22$).

A tabela 3 mostra a associação entre vaginose bacteriana e variáveis clínicas. Quanto à presença de VB no microbioma vaginal, apenas duas mulheres com VB em citologia, ambas no grupo TARV sem IP, não apresentam clínica de secreção homogênea vaginal com odor de peixe (2,27%).

Seis mulheres do grupo TARV sem IP (17,14%) e 18 do grupo TARV com IP (33,96%) apresentaram flora compatível com VB. Embora a prevalência no grupo IP tenha sido maior, a diferença não foi significativa ($p = 0,066$).

Não houve diferenças entre VB e idade ($p = 0,638$), uso de preservativo ($p = 0,494$), HPV cervical ($p = 0,928$), tempo com o regime atual de TARV ($p = 0,533$), relação anal receptiva sem proteção ($p = 0,229$) e lesões cervicais HPV-relacionadas ($p = 0,221$).

Como a aquisição e persistência do HPV e o microbioma vaginal podem ser afetados por variações no status imunológico, mulheres com carga viral indetectável e / ou contagem de células T CD4 + >200 foram analisadas separadamente para essas variáveis.

A análise de mulheres apenas com carga viral indetectável revelou que 17 de 45 mulheres no grupo TARV com IP e 5 de 33 no grupo TARV sem IP tinham VB na citologia. A VB foi mais prevalente no grupo IP (OR, 3,09 IC95% 0,998-9,569, $p = 0,041$). Após regressão logística, observou-se que a relação anal desprotegida estava mais associada a mulheres em

TARV sem IP (OR, 3,420; IC95% 1,019-11,484, $p=0,049$). O tabagismo não foi associado a TARV com IP (OR, 0,869; IC95% 0,643-1,173).

Após o teste de adequação do modelo, a VB permaneceu mais prevalente no grupo TARV com IP (OR, 3,339; IC 95%, 1,131-11,41, $p=0,049$).

Além disso, 10 mulheres no grupo TARV sem IP e 10 mulheres no grupo TARV com IP foram positivas para HPV cervical ($p = 0,434$). Quatro mulheres no grupo TARV sem IP e 2 mulheres no grupo TARV com IP apresentaram lesões HPV-relacionadas ($p=0,407$).

Não houve diferenças para mulheres com carga viral indetectável entre os grupos TARV sem e com IP. Também não houve diferença em relação ao HPV cervical ($p=0,522$) ou a lesões HPV-relacionadas ($p=0,383$).

O tempo de diagnóstico do HIV não se correlacionou com a idade ($p=0,089$), com lesões cervicais HPV-relacionadas ($p=0,933$) e com o HPV cervical ($p=0,928$).

O uso de preservativo e a relação anal receptiva não foram relacionados à detecção de DNA-HPV cervical ($p=0,375$ e $0,079$, respectivamente), com nível de significância estatística de 5%.

4. DISCUSSÃO

O desenvolvimento da classe de IP como TARV tem sido um dos avanços mais importantes no controle da infecção pelo HIV. No entanto, os benefícios desses medicamentos podem ser comprometidos por efeitos colaterais graves. Distúrbios gastrointestinais, incluindo erosão da mucosa, disfunção da barreira epitelial e diarreia, são os efeitos colaterais mais comuns e deletérios, ocorrendo em 16 a 62% dos pacientes (Lei *et al.*, 2010).

Combinações distintas de TARV têm propriedades antimicrobianas e podem ter efeitos dramáticos no microbioma. Por outro lado, micróbios específicos, principalmente bactérias, podem catabolizar drogas antirretrovirais. (Pinto-Cardoso, 2018). O microbioma vaginal desempenha um papel essencial na saúde do sistema reprodutor feminino através da competição com outros microrganismos por nutrientes e secreção de substâncias como o ácido lático, que tornam o ambiente vaginal inóspito a outros micróbios potencialmente patogênicos e podem ser produzidos por uma variedade de fatores (Leyva-Gomes *et al.*, 2017).

Os resultados deste estudo mostraram que 33,96% das mulheres com IP e 17,14% das mulheres sem IP tinham um perfil citológico compatível com a VB. Não houve diferença entre os grupos, apesar de parecer haver tendência à maior prevalência de VB no grupo com IP ($p = 0,066$). Entretanto, quando excluídas as mulheres com carga viral detectável ou $CD4 < 200$, a VB se mostrou significativamente mais prevalente no grupo com IP ($p = 0,041$). Essa diferença pode indicar que mulheres com IP no regime de TARV podem apresentar microbioma vaginal semelhante àquelas que não obtiveram supressão virológica.

O microbioma pode influenciar a suscetibilidade e a progressão do câncer modulando a inflamação, induzindo o estresse oxidativo e promovendo a instabilidade genômica das células hospedeiras. Diversos estudos mostram que a vaginose bacteriana está associada ao aumento do risco de aquisição, reativação ou eliminação tardia da infecção pelo HPV (Brusselsaers *et al.*, 2019; Piyathilake *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2012; Gillet *et al.*, 2011).

Nwadioha *et al.* avaliaram 700 mulheres e encontraram prevalência de vaginose bacteriana de 20% nas HIV negativas, com prevalência de 36% no grupo HIV/AIDS. (Nwadioha, 2011). Menon *et al.*, avaliando 74 mulheres HIV+, encontraram prevalência de 62.2% (Menon *et al.*, 2016).

A maior ocorrência de VB em mulheres que utilizam IP poderia ser devido a baixa concentração alcançada pelos inibidores da protease nesse sítio por suas características físico-químicas, permitindo um maior desequilíbrio da flora.

Os antirretrovirais entram nos compartimentos extravasculares por difusão passiva, difusão facilitada ou transporte ativo. Drogas que utilizam transporte ativo ou difusões facilitadas, como os inibidores da transcriptase reversa de nucleosídeos, podem penetrar nos fluidos biológicos em concentrações superiores às encontradas no plasma. Os inibidores de protease utilizam difusão passiva e, por isso, é provável que obtenham baixas concentrações em fluidos biológicos devido à sua alta afinidade por proteínas que não permite a passagem através das membranas biológicas. (Benetto-Hood *et al.*, 2009).

Devido a isso, é possível que o grupo de inibidores da protease seja menos eficaz na restauração do microbioma vaginal normal, especialmente se houver relação sexual desprotegida com parceiros HIV+.

A vaginose bacteriana também está altamente correlacionada com flutuações hormonais e práticas sexuais. A forte presença da vaginose bacteriana na microbiota oral ou intestinal sugere que a vaginose bacteriana pode estar ligada ao transplante fecal ou oral (Diop *et al.*, 2019).

Apesar de serem mulheres HIV+, para as quais existe forte recomendação de atividade sexual protegida, apenas 59,4% e 62,5% usavam preservativo em seus relacionamentos nos grupos sem IP e com IP, respectivamente.

Além disso, não houve diferenças significativas entre VB e idade, relação anal receptiva e frequência de relações sexuais em nossa amostra.

A suscetibilidade biológica à aquisição do HPV e a competência imunológica para a eliminação de uma infecção por HPV podem ser afetadas pela infecção bacteriana, que perturba o equilíbrio do microbioma vaginal. Gao *et al.*, em um estudo transversal, descobriram que a diversidade bacteriana em mulheres com DNA-HPV positivo era mais complexa com maior frequência de detecção de *Gardnerella vaginalis* e *L. gasseri* do que em mulheres com DNA-HPV negativo, (Gao *et al.*, 2013).

Os mecanismos pelos quais o microbioma vaginal pode influenciar a detecção do HPV não são totalmente conhecidos. Existem evidências de que os *Lactobacillus sp.* produzem vários fatores microbicidas, incluindo ácido lático. O ácido lático é mais eficaz do que a acidez sozinha no controle do crescimento excessivo de bactérias e na prevenção de infecções sexualmente transmissíveis (Brotman *et al.*, 2014). Clarke *et al.*, em um grande estudo de coorte, relataram maior detecção de HPV, lesões intraepiteliais de baixo grau e infecção por *Chlamydia trachomatis* em mulheres com pH alto (Clarke *et al.*, 2012).

Algumas pesquisas sugerem que o acúmulo local de nitrosaminas durante episódios de vaginose bacteriana, em conjunto com outros agentes oncogênicos, como a infecção pelo HPV,

pode induzir a transformação celular do epitélio cervical. Além disso, alterações no perfil de citocinas inflamatórias presentes em um ambiente vaginal alterado podem promover o desenvolvimento de lesões cervicais (Gillet *et al.*, 2011).

Sabe-se que as disfunções da barreira epitelial permitem a infecção viral (Leto *et al.*, 2011) e os inibidores da protease comprometem a integridade da barreira epitelial da mucosa oral (Israr *et al.*, 2011). Além disso, Brotman *et al.* mostraram maior detectabilidade de HPV em mulheres com baixa concentração relativa de *Lactobacillus sp.* Da mesma forma, Clarke *et al.*, em um grande estudo de coorte, relataram maior infecção por HPV e *Chlamydia trachomatis* e maior risco de lesões intraepiteliais de baixo grau entre mulheres com pH alto (Brotman *et al.*, 2014; Clarke *et al.*, 2012).

Assim sendo, as pacientes com vaginose bacteriana seriam mais susceptíveis a aquisição de HPV e, conseqüentemente, teriam mais risco de desenvolver lesões precursoras. Porém, nossos resultados não demonstraram essa correlação e não houve diferença nas frequências de HPV e lesões HPV induzidas em mulheres com e sem vaginose bacteriana em mulheres com e sem IP.

Da mesma forma, Lahiri *et al.* não encontraram diferenças entre prevalência de HPV em mulheres em uso de lopinavir e em uso de outros regimes de TARV (Lahiri *et al.*, 2015).

Schellenberg *et al.* demonstram um declínio ao longo do tempo na taxa de vaginose bacteriana em mulheres HIV+, postulando que a melhora da saúde vaginal pode resultar de repetidas avaliações e tratamentos ou de redução de riscos comportamentais ao longo do tempo (Schellenberg *et al.*, 2012). Mehta *et al.*, ao examinar a composição do microbioma vaginal de mulheres com HIV e com alto risco de HPV por um período de 7 a 12 anos, concluíram que o microbioma vaginal melhora significativamente ao longo do tempo com o tratamento para vaginose bacteriana, independentemente dos sintomas (Mehta *et al.*, 2015).

Apesar de não termos observado associação entre vaginose bacteriana e HPV ou lesões HPV induzidas, é possível que novos estudos prospectivos possam demonstrar que o tratamento da vaginose bacteriana deva ser considerado em mulheres HIV+ mesmo assintomáticas e que maior atenção deva ser dada àquelas em uso de inibidores da protease.

A progressão da metaplasia para displasia e subsequentemente para neoplasia é uma sequência lógica e está bem estabelecida na gênese de carcinomas cervicais. (Mahesha *et al.*, 2006)

Em nosso estudo, a prevalência de HPV cervical foi de 35,21% e de HPV anal foi de 72,88%, com infecção concomitante cervical e anal de 30%.

Em uma revisão sistemática, observou-se prevalência de HPV de alto risco anal entre 16 - 85% em mulheres HIV+ (Stier *et al.*, 2015). Goeieman *et al.*, em estudo transversal com 200 mulheres infectadas pelo HIV com idades entre 25-65 anos em Johannesburgo, encontrou HPV anal de alto risco em 43% das mulheres (Goeieman *et al.*, 2017).

Volpini *et al.*, analisando 126 mulheres HIV+, mostraram uma alta frequência de HPV cervical e anal em mulheres com citologia negativa. O HPV cervical foi observado em 38,9% e o anal em 60,3%. A infecção foi concomitante em 38,9% (Volpini *et al.*, 2017).

Em mulheres, é provável que a infecção anogenital do HPV seja multicêntrica e a infecção cervical possa servir como reservatório e fonte de infecção anal ou vice-versa. Alguns estudos em mulheres infectadas pelo HIV mostraram prevalência de infecção e doença do HPV maior no ânus do que no colo do útero. Como a neoplasia intraepitelial anal pode progredir para o câncer invasivo, uma compreensão da sua biologia em grupos de mulheres de alto risco é importante para a prevenção do câncer anal nessas mulheres (Hessol *et al.*, 2009).

Observamos, no nosso estudo, relação de HPV cervical/lesão HPV-relacionada cervical de 2,5 e HPV anal/ lesão HPV-relacionada anal de 4,3, mostrando que, apesar de uma maior incidência de HPV anal, a progressão para lesão HPV-relacionada não ocorre da mesma maneira no colo do útero e no ânus.

Uma possível explicação para essa diferença de proporção é o fato de que a metaplasia do colo uterino geralmente existe em um estado dinâmico, devido à estímulos hormonais (Soares *et al.*, 2019). No entanto, isso não ocorre no epitélio anal, o que pode explicar por que o desenvolvimento de lesões relacionadas ao HPV é mais provável no colo do que em outros locais.

Além da metaplasia cervical ativa, diferenças anatômicas podem ser responsáveis por essa diferença. Embora a junção anorretal seja presumivelmente uma junção escamocolunar semelhante à do colo, a microanatomia comparativa das zonas de transição evidencia diferenças topográficas distintas que podem influenciar a progressão para o câncer anal. (Yang *et al.*, 2015) Em contraste com as células colunares de camada única que cobrem as células basais da zona de transformação cervical, a zona de transformação anal é revestida por uma multicamada de células colunares. (Clavero *et al.*, 2017)

Processos que causam lesão ao epitélio podem estimular a ocorrência de metaplasia (Giroux & Rustgi, 2017). Como a barreira epitelial é uma parte essencial da defesa do hospedeiro contra vírus patogênicos, comprometer sua integridade pode ser um fator predisponente à maior suscetibilidade a patógenos sexualmente transmissíveis. (Muytjens *et al.*, 2016)

Mosciki *et al.* e Goodman *et al.* demonstraram a infecção por HPV no colo uterino como um fator de risco significativo para o HPV anal (Mosciki *et al.*, 2014; Goodman *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, 100% das mulheres com lesões cervicais relacionadas ao HPV eram positivas para o HPV anal, o que reforça o risco desse grupo de pacientes para aquisição de HPV anal. Embora seja impreciso como efeito na população-alvo (mulheres HIV positivas), um efeito clinicamente significativo não pode ser descartado.

A plausibilidade de que o colo uterino atue como fonte de infecção anal pelo HPV é aumentada pela proximidade anatômica do intróito vaginal em relação ao ânus, mas a probabilidade de que a infecção anal atue como fonte de infecção cervical é um pouco menos provável. A possibilidade de infecção por autoinoculação por secreções vaginais, transferência digital ou por fômites não pode ser excluída (Bucchi *et al.*, 2016)

O *American Cancer Society* propõe que mulheres com histórico de carcinoma cervical ou vulvar podem se beneficiar da triagem do câncer anal (Bregar *et al.*, 2018). Embora não seja amplamente estabelecida, a triagem de lesões anais com testes de Papanicolau têm se mostrado um método de baixo custo para a detecção de lesões precursoras anais em pacientes infectadas pelo HIV. A sensibilidade da citologia anal para identificar lesões escamosas anais varia entre 69-93%, mas sofre de baixa especificidade (Lang *et al.*, 2011).

A literatura sobre a associação entre relação anal receptiva e citologia anal anormal mostra resultados inconsistentes. Cambou *et al.*, em estudo conduzido no Rio de Janeiro, observaram que a relação anal foi positivamente associada à neoplasia intraepitelial anal. (Cambou *et al.*, 2015) Porém, vários estudos demonstraram o HPV anal em mulheres sem histórico de relações sexuais anais receptivas (Daling *et al.*, 2004; Piketty *et al.*, 2003; Marazzo *et al.*, 2001). Koppe *et al.* e Giraldo *et al.* demonstraram não haver associação significativa entre intercurso anal e neoplasia intraepitelial anal (Koppe *et al.*, 2011; Giraldo *et al.*, 2009).

Em nosso trabalho, 81,4% das mulheres com HPV anal positivo não tinham história de relação anal.

As limitações deste estudo estão relacionadas ao desenho transversal e ao tamanho da amostra relativamente pequeno. A causalidade não pode ser inferida a partir de evidências correlacionais e a amostra foi limitada para conduzir algumas análises estratificadas por subgrupos significativos. A composição do microbioma vaginal pode ser alterada por vários fatores, e no nosso estudo, é a representação de um único momento. Além disso, a relação oral como fator comportamental e a positividade do parceiro para o DNA-HPV não foram investigadas. Não foi feita pesquisa de tratamentos prévios para vaginose bacteriana. Além disso, como as infecções por HPV são transitórias, podemos ter superestimado o número de

mulheres com infecções por HPV em alguns momentos. Alguns aspectos, devido à sua complexidade, poderiam ser obtidos com maior confiabilidade em um acompanhamento prospectivo. Períodos de acompanhamento mais longos e amostras maiores podem justificar a aplicabilidade desses dados em populações.

CONCLUSÕES

Não houve diferença na ocorrência de lesões precursoras de colo uterino entre mulheres HIV+ em terapia antiretroviral altamente ativa com e sem inibidores da protease.

Não houve diferença na ocorrência de lesões precursoras de ânus entre mulheres HIV+ em terapia antiretroviral altamente ativa com e sem inibidores da protease.

Houve aumento na ocorrência de vaginose bacteriana encontrada em mulheres HIV+ terapia antiretroviral altamente ativa com inibidores da protease em relação às sem inibidores da protease, após a exclusão de mulheres com carga viral detectável e contagem de células T CD4 + <200.

Não houve diferença na ocorrência de infecções cervicais pelo HPV entre mulheres HIV+ em terapia antiretroviral altamente ativa com e sem inibidores da protease.

Não houve diferença na ocorrência de infecções pelo HPV anal entre mulheres HIV+ em terapia antiretroviral altamente ativa com e sem inibidores da protease.

REFERÊNCIAS

- ABBASAKOOR, F; BOULOS, P B. Anal intraepithelial neoplasia. **The British journal of surgery**, England, v. 92, n. 3, p. 277-290, mar./2005.
- ABRAMOWITZ, L. *et al.* Anal squamous intraepithelial lesions and condyloma in HIV-infected heterosexual men, homosexual men and women: prevalence and associated factors. **AIDS**, England, v. 21, n. 11, p. 1457-1465, jul./2007.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer. Facts & Figures. 2017. Disponível em: <<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2017.html>>. Acesso 05 jun 2020a.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Key Statistics for Anal Cancer. 2020. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/anal-cancer/about/what-is-key-statistics.htm>>. Acesso 05 jun 2020b.
- AZEVEDO-PERERA, J.M.; SANTOS-COSTA, Q. HIV Interaction With Human Host: HIV-2 As a Model of a Less Virulent Infection. **AIDS reviews**, Spain, v. 18, n. 1, p. 44-53, jan./2015.
- BECERRA, J. C.; BILDSTEIN, L. S.; GACH, J. S. Recent Insights into the HIV/AIDS. **Microbial cell**, Austria, v. 3, n. 9, p. 451-475, set./2016.
- BENNETTO-HOOD, C. *et al.* Novel methodology for antiretroviral quantitation in the female genital tract. **HIV clinical trials**, England, v. 10, n. 3, p. 193-199, mai./2009.
- BERRY, J. M. *et al.* . Progression of anal high-grade squamous intraepithelial lesions to invasive anal cancer among HIV-infected men who have sex with men. **International journal of cancer**, United States, v. 134, n. 5, p. 1147-1155, mar./2014.
- BOSCH, F. X.; SANJOSÉ, S. Chapter 1: Human Papillomavirus and Cervical Cancer-- Burden and Assessment of Causality. **Journal of the National Cancer Institute**, United States, v. 31, n. 1, p. 3-13, jun./2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e Condutas Preconizadas. Recomendações para profissionais de saúde. Inst Nac Câncer. 2a. Rio de Janeiro; 2016;1-114.
- BREGAR, A. J. *et al.* Anal and Cervical High-Risk Human Papillomavirus Genotyping in Women With and Without Genital Neoplasia. **Journal of lower genital tract disease**, United States, v. 22, n. 2, p. 115-119, abr./2018.
- BRITES, C. Estratégias de troca (switch) na terapia antirretroviral atual. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** , Brasil, v. 2, n. 1, p. 24-32, fev./2016.
- BRODER, Samuel. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic.. **Antiviral Research**, Netherlands, v. 85, n. 1, p. 1-18, jan./2010.

BROTMAN, R. M. *et al.* Association between the vaginal microbiota, menopause status, and signs of vulvovaginal atrophy. **Menopause**, New York, United States, v. 21, n. 5, p. 450-458, mai./2014.

BRUSSELAERS, N. *et al.* Vaginal dysbiosis and the risk of human papillomavirus and cervical cancer: systematic review and meta-analysis. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, New York, United States, v. 221, n. 1, p. 9-18, jul./2019.

BUCCHI, D. *et al.* Human papillomavirus and gastrointestinal cancer: A review. **World journal of gastroenterology**, United States, v. 22, n. 33, p. 7415-7430, set./2016.

CAMBOU, M. C. *et al.* Anal human papillomavirus (HPV) prevalences and factors associated with abnormal anal cytology in HIV-infected women in an urban cohort from Rio de Janeiro, Brazil. **AIDS patient care and STDs**, United States, v. 29, n. 1, p. 4-12, jan./2015.

CARIAS, A. M. *et al.* Increases in Endogenous or Exogenous Progestins Promote Virus-Target Cell Interactions within the Non-human Primate Female Reproductive Tract. **PLoS pathogens**, United States, v. 12, n. 9, p. e1005885, set./2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). "Revised surveillance case definition for HIV infection--United States, 2014", **MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control**, v. 63, n. RR-03, p. 1-10, 11 abr. 2014.

CLARKE, M. A. *et al.* A large, population-based study of age-related associations between vaginal pH and human papillomavirus infection. **BMC infectious diseases**, London, england, v. 12, p. 33, fev./2012.

CLAVERO, O. *et al.* Squamous intraepithelial lesions of the anal squamocolumnar junction: Histopathological classification and HPV genotyping. **Papillomavirus research**, Netherlands, v. 3, p. 11-17, jun./2017.

CLEMENTE, N. *et al.* Multiple preinvasive and invasive HPV-related lesions of the anogenital tract in a female patient with HIV infection. **Medicine (Baltimore)**, United States, v. 96, n. 4, p. e5948, jan./2017.

CLIFFORD, G. M.; TULLY, S.; FRANCESCHI, S. Carcinogenicity of human papillomavirus types in HIV-positive women: A meta-analysis from HPV infection to cervical cancer. **Clinical infectious diseases**, United States, v. 64, n. 9, p. 1228-1235, mai./2017.

CUEVAS, J. M. *et al.* Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo. **PLoS biology**, United States, v. 13, n. 9, p. e1002251, set./2015.

DALING, J. R. *et al.* Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. **Cancer**, United States, v. 101, n. 2, p. 270-280, jul./2004.

DANAHER, R. J.; WANG, C.; ROLAND, A. T.; et al. HIV protease inhibitors block oral epithelial cell DNA synthesis. *Archives of Oral Biology*, 2010.

DARRAGH, T. M. *et al.* The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. **Archives of pathology & laboratory medicine**, United States, v. 136, n. 10, p. 1266-1297, out./2012.

DEEKS, S. G. *et al.* HIV Infection . **Nature reviews. Disease primers.**, England, v. 1, p. 15035, out./2015.

DEGENHARDT, Y. Y.; SILVERSTEIN, S. J. Gps2, a protein partner for human papillomavirus E6 proteins. **Journal of virology**, United States, v. 75, n. 1, p. 151-160, jan./2001.

DIETRICH, A. *et al.* Human papillomavirus status, anal cytology and histopathological outcome in HIV-positive patients. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, England, v. 29, n. 10, p. 2011-2018, out./2015.

DIOP, K.; DUFOUR, J.; LEVASSEUR, A. Exhaustive repertoire of human vaginal microbiota. **Human Microbiome Journal**, London, England, v. 11, n. 1, p. 100051-7, mar./2019.

DOERFLINGER, S. Y., THROOP, A. L., HERBST-KRALOVETZ, M. M. "Bacteria in the vaginal microbiome alter the innate immune response and barrier properties of the human vaginal epithelia in a species-specific manner", **The Journal of infectious diseases**, v. 209, n. 12, p. 1989–1999, 15 jun. 2014.

DONÀ, M. G. *et al.* Prevalence, genotype diversity and determinants of anal HPV infection in HIV-uninfected men having sex with men. **Journal of clinical virology**, Netherlands, v. 54, n. 2, p. 185-189, jun./2012.

DOORSLAER, K. V. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. **The Journal of general virology**, England, v. 99, n. 8, p. 989-990, ago./2018.

DUPONT, W. D.; PLUMMER, W. D. Power and sample size calculations for studies involving linear regression. **Controlled clinical trials**, United States, v. 19, n. 6, p. 589-601, dez./1998.

EDGREN, G.; SPARÉN, P. Risk of anogenital cancer after diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective population-based study. **The Lancet. Oncology**, England, v. 8, n. 4, p. 311-316, abr./2007.

ENGELMAN, A. N. Multifaceted HIV integrase functionalities and therapeutic strategies for their inhibition. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 294, n. 41, p. 15137-15157, out./2019.

ESSER, S. *et al.* German-Austrian guidelines on anal dysplasia and anal cancer in HIV-positive individuals: prevention, diagnosis, and treatment. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, Germany, v. 13, n. 12, p. 1302-1319, dez./2015.

FANALES-BELASIO, E. *et al.* HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. **Annali dell'Istituto superiore di sanita**, Itália, v. 46, n. 1, p. 5-14, jan./2010.

FEHRMANN, F.; KLUMPP, D. J.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. **Journal of virology**, United States, v. 77, n. 5, p. 2819-2831, mar./2003.

FENGER, C.; NIELSEN, V. T. Intraepithelial neoplasia in the anal canal. The appearance and relation to genital neoplasia. **Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, Denmark, v. 94, n. 5, p. 343-349, set./1986.

FORMAN, D. *et al.* Global burden of human papillomavirus and related diseases. **Vaccine**, Netherlands, v. 30, n. S5, p. F12-23, nov./2012.

FRANK, T. D. *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and mortality of HIV, 1980–2017, and forecasts to 2030, for 195 countries and territories: a systematic analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study 2017. **The Lancet. HIV**, Netherlands, v. 6, n. 12, p. e831-e859, ago./2019.

FRISCH, M. *et al.* Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. **The New England journal of medicine**, United States, v. 337, n. 19, p. 1350-1358, nov./1997.

FRISCH, M.; BIGGAR, R. J.; GOEDERT, J. J. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. **Journal of the National Cancer Institute**, United States, v. 92, n. 18, p. 1500-1510, set./2000.

FURTADO, F. M. S. F. *et al.* 30 anos depois: Representações Sociais acerca da Aids e práticas sexuais de residentes de cidades rurais. **Revista da escola de enfermagem**, Brasil, v. 50, n. especial, p. 74-78, jan./2016.

FURTH, M. **Cancer cells: Molecular diagnostics of human cancer**. 1. ed. Oxford: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p. 209-214.

GAO, W. *et al.* Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. **BMC infectious diseases**, England, v. 13, p. 271, jun./2013.

GILLET, E. *et al.* Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, London, England, v. 11, p. 10, jan./2011.

GIRALDO, P. *et al.* Prevalence of anal squamous intra-epithelial lesion in women presenting genital squamous intra-epithelial lesion. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, Ireland, v. 142, n. 1, p. 73-75, jan./2009.

GIROUX, V.; RUSTGI, A. K. Metaplasia: tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia-cancer sequence. **Nature reviews. Cancer**, England, v. 17, n. 10, p. 594-604, out./2017.

GOEIEMAN, B. J. *et al.* Prevalence of Anal HPV and Anal Dysplasia in HIV-Infected Women From Johannesburg, South Africa. **Journal of acquired immune deficiency syndromes**, United States, v. 75, n. 3, p. e59-e64, jul./2017.

GOODMAN, M. T. *et al.* Sequential acquisition of human papillomavirus (HPV) infection of the anus and cervix: the Hawaii HPV Cohort Study. **The Journal of infectious diseases**, United States, v. 201, n. 9, p. 1331-1339, mai./2010.

GUIDO, R. *et al.* ASCUS LSIL Triage Study (ALTS) Group. Postcolposcopy management strategies for women referred with low-grade squamous intraepithelial lesions or human papillomavirus DNA-positive atypical squamous cells of undetermined significance: a two-year prospective 1 study. **American journal of obstetrics and gynecology**, United States, v. 188, n. 6, p. 1401-1405, jun./2003.

GUIMARÃES, M. L. *et al.* Assessing the HIV-1 Epidemic in Brazilian Drug Users: A Molecular Epidemiology Approach. **Public Library of Science one**, United States, v. 10, n. 11, p. e141372, nov./2015.

GUO, Y. *et al.* Bacterial Vaginosis Is Conducive to the Persistence of HPV Infection. **International Journal of STD & AIDS**, England, v. 23, n. 8, p. 581-584, ago./2012.

HAMPSON, L.; KITCHENER, H. C.; HAMPSON, I. N. Specific HIV protease inhibitors inhibit the ability of HPV16 E6 to degrade p53 and selectively kill E6-dependent cervical carcinoma cells in vitro. **Antiviral therapy**, v. 11, n. 6, p. 813-825, 2006.

HARDEN, M. E.; MUNGER, K. Human papillomavirus molecular biology. **Mutation research**, Netherlands, v. 772, p. 3-12, abr./2017.

HAUSEN, H. Z. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. **Current topics in microbiology and immunology**, Germany, v. 78, n. 1, p. 1-30, jan./1977.

HESSOL, N. A. *et al.* Anal intraepithelial neoplasia in a multisite study of HIV-infected and high-risk HIV-uninfected women. **AIDS**, England, v. 23, n. 1, p. 59-70, jan./2009.

HOLMES, K. K. *et al.* **Disease control priorities: Major infectious diseases**. 3. ed. Washington: world bank group, 2019. p. 29-44.

HOU, S. Y.; WU, S.; CHIANG, C. Transcriptional activity among high and low risk human papillomavirus E2 proteins correlates with E2 DNA binding. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 277, n. 47, p. 45619-45629, nov./2002

HUBERT, W. G.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus type 31 replication modes during the early phases of the viral life cycle depend on transcriptional and posttranscriptional regulation of E1 and E2 expression. **Journal of virology**, United States, v. 76, n. 5, p. 2263-2273, mar./2002.

HUSMAN, A. M. R. *et al.* The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **The Journal of general virology**, England, v. 76, n. 4, p. 1057-1062, abr./1995.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Controle do câncer de colo de útero - conceito e magnitude. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-do-colo-do-utero/conceito-e-magnitude>> Acesso 31 mai 2020.

ISRAR, M. *et al.* HIV protease inhibitor lopinavir/ritonavir (Kaletra) alters growth, differentiation and proliferation of primary gingival epithelium. **HIV Medicine**, England, v. 12, n. 3, p. 145-156, mar./2011.

KIM, H. J.; JIN, Y.; KIM, H.-J. The concentration of carbon source in the medium affects the quality of virus-like particles of human papillomavirus type 16 produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one*, v. 9, n. 4, p. e94467, 2014.

KLUMB, E. M. *et al.* Are women with lupus at higher risk of HPV infection? **Lupus**, England, v. 19, n. 13, p. 1485-1491, nov./2010.

KOPPE, D. C. *et al.* Prevalence of anal intraepithelial neoplasia in women with genital neoplasia. **Diseases of the colon and rectum**, United States, v. 54, n. 4, p. 442-445, abr./2011.

KOUTSKY, L. A.; GALLOWAY, D. A.; HOLMES, K. K. Epidemiology of Genital Human Papillomavirus Infection. **Epidemiologic reviews**, United States, v. 10, n. 1, p. 122-163, set./1988.

KREUTER, A. *et al.* Anal carcinoma in human immunodeficiency virus-positive men: results of a prospective study from Germany. **The British journal of dermatology**, England, v. 162, n. 6, p. 1269-1277, jun./2010.

KUMAR, P. Long term non-progressor (LTNP) HIV infection. **Indian Journal of Medical Research**, India, v. 138, n. 3, p. 291-293, set./2013.

LAHIRI, C. D. *et al.* Oral Lopinavir Use and Human Papillomavirus Infection in HIV-positive Women. **Journal of acquired immune deficiency syndromes**, United States, v. 70, n. 2, p. e63-e66, out./2015.

LANG, T. U. *et al.* Review of HIV-Related Cytopathology. **Pathology research international**, United States, v. 2011, p. 256083, abr./2011.

LEE, D. *et al.* Human papillomavirus E2 down-regulates the human telomerase reverse transcriptase promoter. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 277, n. 31, p. 27748-27756, ago./2002.

LEI, B. *et al.* Development of a novel self-microemulsifying drug delivery system for reducing HIV protease inhibitor-induced intestinal epithelial barrier dysfunction. **Molecular Pharmaceutics**, United States, v. 7, n. 7, p. 844-853, jun./2010.

LETO, M. G. P. *et al.* Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. **Anais brasileiros de dermatologia**, Rio de Janeiro, Brazil, v. 86, n. 2, p. 306-317, abr./2011.

- LEVI, J. E. *et al.* Human papillomavirus prevalence, viral load and cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Brazil, v. 6, n. 3, p. 129-135, jun./2002.
- LEYVA-GÓMEZ, G. *et al.* Modifications in Vaginal Microbiota and Their Influence on Drug Release: Challenges and Opportunities. **Pharmaceutics**, Switzerland, v. 11, n. 5, p. 217, mai./2017.
- LIBRELOTTO, C. S. *et al.* HIV-1 epidemiology and circulating subtypes in the countryside of South Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brazil, v. 48, n. 3, p. 249-257, jun./2015.
- LORINCZ, A. T. *et al.* Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. **Obstetrics and gynecology**, United States, v. 79, n. 3, p. 328-337, mar./1992.
- LV, Zhengtong; C., CHU Y.; WANG, Y. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. **HIV/AIDS : research and palliative care**, New Zealand, v. 7, p. 95-104, abr./2015.
- MAHESHA, V. *et al.* Squamous Metaplasia of the Rectum in a Case of Hirschprung's Disease: A Coincidence or an Association. **Journal of clinical pathology**, England, v. 59, n. 8, p. 889-890, ago./2006.
- MAHONY, J. B. *et al.* Comparison of plasmid and chromosome based polymerase chain reaction assays for detecting Chlamydia trachomatis nucleic acids. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 31, n. 7, p. 1753-1758, jul./1993.
- MANOS, M. M. *et al.* Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, New York, v. 7, p. 209-214, 1989.
- MARRAZZO, J. M. *et al.* Papanicolaou test screening and prevalence of genital human papillomavirus among women who have sex with women. **American journal of public health**, United States, v. 91, n. 6, p. 947-952, jan./2001.
- MASO, L. D. *et al.* Risk of cancer in persons with AIDS in Italy, 1985-1998. **British journal of cancer**, England, v. 89, n. 1, p. 94-100, jul./2003.
- MEDEIROS, R. C. S. C. *et al.* Quality of Life, Socioeconomic and Clinical Factors, and Physical Exercise in Persons Living With HIV/AIDS. **Revista de saúde pública**, Brasil, v. 51, n. 1, p. 66, jul./2017.
- MEHTA, S. D. *et al.* The Vaginal Microbiota Over an 8- To 10-year Period in a Cohort of HIV-infected and HIV-uninfected Women. **Public Library of Science one**, United States, v. 10, n. 2, p. e0116894, fev./2015.
- MENON, S. S. *et al.* Distribution of human papillomaviruses and bacterial vaginosis in HIV positive women with abnormal cytology in Mombasa, Kenya. **Infectious agent and cancer**, London, England, v. 11, p. 17, abr./2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico-HIV/Aids. Brasília: dez/2019. disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2019/boletim-epidemiologico-de-hiv-aids-2019>>. Acesso em 30/09/2020.

MOSCICKI, A. *et al.* Natural history of anal human papillomavirus infection in heterosexual women and risks associated with persistence. **Clinical infectious diseases**, United States, v. 58, n. 6, p. 804-811, mar./2014.

MUYTJENS, C. M. J. *et al.* Putative functions of tissue kallikrein-related peptidases in vaginal fluid. **Nature reviews. Urology.**, London, England, v. 13, n. 10, p. 596-607, out./2016.

MUÑOZ, N. *et al.* Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, Netherlands, v. 24, Suppl 3:S3/1-S3/10, ago./2006.

MUÑOZ, N. *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **The New England journal of medicine**, United States, v. 348, n. 6, p. 518-527, fev./2003.

MÜNGER, K. *et al.* Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. **Journal of virology**, United States, v. 78, n. 21, p. 11451-11460, nov./2004.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI) Bethesda, MD - SEER Cancer Stat Facts: Anal Cancer. 2020. Disponível em: <<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/anus.html>>. Acesso em: 5 jun. 2020.

NWADIOHA, S. *et al.* Prevalence of bacterial vaginosis and its risk factors in HIV/AIDS patients with abnormal vaginal discharge. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, India, v. 4, n. 2, p. 156-158, fev./2011.

NKEZE, J.; LI, L.; BENKO, Z.; LI, G.; ZHAO, R. Y. Molecular characterization of HIV-1 genome in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell & bioscience*, v. 5, p. 47, 2015.

OETTE, M. *et al.* HIV-Associated Anal Dysplasia and Anal Carcinoma. **Oncology research and treatment**, Netherlands, v. 40, n. 3, p. 100-105, fev./2017.

ORIEL, J. D.; WHIMSTER, I W. Carcinoma in situ associated with virus-containing anal warts. **The British journal of dermatology**, England, v. 84, n. 1, p. 71-73, jan./1971.

PALEFSKY, J. M. *et al.* Anal intraepithelial neoplasia in the highly active antiretroviral therapy era among HIV-positive men who have sex with men. **AIDS**, England, v. 19, n. 13, p. 1407-1414, set./2005.

PALEFSKY, J. M. *et al.* Virologic, immunologic, and clinical parameters in the incidence and progression of anal squamous intraepithelial lesions in HIV-positive and HIV-negative homosexual men. **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology**, United States, v. 17, n. 4, p. 314-319, abr./1998.

PALEFSKY, J. Human papillomavirus-related disease in people with HIV. **Current opinion in HIV and AIDS**, United States, v. 4, n. 1, p. 52-56, jan./2009.

PALEFSKY, J. Human papillomavirus-related tumors in HIV. **Current opinion in oncology**, United States, v. 18, n. 5, p. 463-468, set./2006.

PARK, R. B.; ANDROPHY, E. J. Genetic analysis of high-risk e6 in episomal maintenance of human papillomavirus genomes in primary human keratinocytes. **Journal of virology**, United States, v. 76, n. 22, p. 11359-11364, nov./2002.

PAU, A. K.; GEORGE, J. M. Antiretroviral Therapy: Current Drugs. **Infectious disease clinics of North America**, United States, v. 28, n. 3, p. 371-402, set./2014.

PERREAU, M.; LEVY, Y.; PANTALEO, G. Immune response to HIV. **Current opinion in HIV and AIDS**, United States, v. 8, n. 4, p. 333-340, jul./2013.

PETTIT, A. C. *et al.* Increased non-AIDS mortality among persons with AIDS-defining events after antiretroviral therapy initiation. **Journal of the International AIDS Society**, Switzerland, v. 21, n. 1, p. e25031, jan./2018.

PIKETTY, C. *et al.* High Prevalence of Anal Human Papillomavirus Infection and Anal Cancer Precursors Among HIV-infected Persons in the Absence of Anal Intercourse. **Annals of internal medicine**, United States, v. 138, n. 6, p. 453-459, mar./2003.

PINTO-CARDOSO, S.; KLATT, N. R.; REYES-TERÁN, G. Impact of antiretroviral drugs on the microbiome: unknown answers to important questions. **Current Opinion in HIV and AIDS**, Sydney, v. 13, n. 1, p. 53-60, jan./2018.

PIYATHILAKE, C. J. *et al.* Cervical Microbiota Associated with Higher Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women Infected with High-Risk Human Papillomaviruses. **Cancer prevention research**, United States, v. 9, n. 5, p. 357-366, mai./2016.

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL. 1996b. “Lei N°9.313. Dispõe sobre a distribuição gratuita de medicamentos aos portadores do HIV e doentes de AIDS.” Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9313.htm . Acesso em 11/10/2017.

RICHEL, O. *et al.* Brief Report: Anal Cancer in the HIV-Positive Population: Slowly Declining Incidence After a Decade of cART. **Journal of acquired immune deficiency syndromes**, United States, v. 69, n. 5, p. 602-605, ago./2015.

de RODA, HUSMAN A. M.; WALBOOMERS J. M.; van den BRULE A. J. *et al.* The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **J Gen Virol** 1995; 76:1057–1062.

ROSSI, S. M. G. D. *et al.* Impacto da terapia antirretroviral conforme diferentes consensos de tratamento da Aids no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, United States, v. 32, n. 2, p. 117-123, mai./2012.

SALATI, S.A.; KADI, A.A. Anal cancer - a review. **International journal of health sciences**, Saudi Arabia, v. 6, n. 2, p. 206-230, jun./2012.

SANTOS, J. C. M. Câncer ano-reto-cólico - aspectos atuais: I – câncer anal. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Brazil, v. 27, n. 2, p. 219-223, abr./2007.

SCHELLENBERG, J. J. *et al.* Bacterial vaginosis, HIV serostatus and T-cell subset distribution in a cohort of East African commercial sex workers: retrospective analysis. **AIDS**, England, v. 26, n. 3, p. 387-393, jan./2012.

SEHNAL, B. *et al.* The Relationship Between the Cervical and Anal HPV Infection in Women With Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Journal of clinical virology**, Netherlands, v. 59, n. 1, p. 18-23, jan./2014.

SHAH, K. V. Human papillomaviruses and anogenital cancers. **The New England journal of medicine**, United States, v. 337, n. 19, p. 1386-1388, nov./1997.

SHERMAN, M. E. *et al.* Qualification of ASCUS. A comparison of equivocal LSIL and equivocal HSIL cervical cytology in the ASCUS LSIL Triage study. **American journal of clinical pathology**, England, v. 116, n. 3, p. 386-394, set./2001.

SILVERBERG, M. J. *et al.* Cumulative Incidence of Cancer Among Persons With HIV in North America: A Cohort Study. **Annals of internal medicine**, United States, v. 163, n. 7, p. 507-518, out./2015.

SIMARD, E. P. *et al.* Trends in the occurrence of high-grade anal intraepithelial neoplasia in San Francisco: 2000-2009. **Cancer**, United States, v. 119, n. 19, p. 3539-3545, out./2013.

SOARES, L. C. *et al.* Association of Sexually Transmitted Diseases with Cervical Ectopy: A Systematic Review. **Sexually transmitted diseases**, Philadelphia, United States, v. 46, n. 7, p. 452-457, jul./2019.

STEWART BW, WILD CP, EDITORS. **World Cancer Report 2014**. 2014. Lyon, France: International Agency for research on Cancer. < <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>> acesso 02 junho 2020.

STIER, E. A. *et al.* Prevalence of anal human papillomavirus infection and anal HPV-related disorders in women: a systematic review. **American journal of obstetrics and gynecology**, United States, v. 213, n. 3, p. 278-309, set./2015.

STUBENRAUCH, F. *et al.* The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. **Journal of virology**, United States, v. 74, n. 3, p. 1178-1186, fev./2000.

SWEDISH, K. A.; LEE, E. Q.; GOLDSTONE, S. E. The changing picture of high-grade anal intraepithelial neoplasia in men who have sex with men: the effects of 10 years of experience performing high-resolution anoscopy. **Diseases of the colon and rectum**, United States, v. 54, n. 8, p. 1003-1007, ago./2011.

TASHIRO, H.; BRENNER, M. K. Immunotherapy against cancer-related viruses. **Cell research**, England, v. 27, n. 1, p. 59-73, jan./2017.

TUGIZOV, S. M. *et al.* HIV-associated disruption of mucosal epithelium facilitates paracellular penetration by human papillomavirus. **Virology**, United States, v. 446, n. 1, p. 378-388, nov./2013.

VERMA, I.; JAIN, V.; KAUR, T. Application of Bethesda System for Cervical Cytology in Unhealthy Cervix. **Journal of clinical and diagnostic research**, India, v. 8, n. 9, p. OC26-OC30, set./2014.

VILLA, L. L. Human Papillomaviruses and Cervical Cancer . **Advances in cancer research**, United States, v. 71, n. 1, p. 321-341, jan./1997.

VOLPINI, L. P. B. *et al.* The high prevalence of HPV and HPV16 European variants in cervical and anal samples of HIV-seropositive women with normal Pap test results.. **Public Library of Science one**, United States, v. 12, n. 4, p. 176422, abr./2017.

VÖLTER, C. *et al.* Novel HPV types present in oral papillomatous lesions from patients with HIV infection. **International journal of cancer**, United States, v. 66, n. 4, p. 453-456, mai./1996.

WANG, X. *et al.* Regulation of HIV-1 Gag-Pol Expression by Shiftless, an Inhibitor of Programmed -1 Ribosomal Frameshifting. **Cell**, United States, v. 176, n. 3, p. 625-635e14, jan./2019.

WEIS, S. E. *et al.* Prevalence of anal intraepithelial neoplasia defined by anal cytology screening and high-resolution anoscopy in a primary care population of HIV-infected men and women. **Diseases of the colon and rectum**, United States, v. 54, n. 4, p. 433-441, abr./2011.

YANG, E. J. *et al.* Microanatomy of the cervical and anorectal squamocolumnar junctions: a proposed model for anatomical differences in HPV-related cancer risk. **Modern pathology**, Baltimore, United States, v. 28, n. 7, p. 994-1000, jul./2015.

APÊNDICE A – Tabela 1: Características sociodemográficas e clínicas

	<i>TARV sem IP</i>		<i>TARV com IP</i>		<i>P</i>
	N	%	N	%	
Idade (anos)					
20–35	8	22,9	12	22,6	0,997**
36–50	18	51,4	27	50,9	
>51	9	25,7	14	26,4	
IMC (média + DP)	24,64± 5,85		25,80±5,10		
Etnia					
Caucasiana	10	28,6	17	32,1	
Afro-americana	16	45,7	25	47,2	0,85**
Outras	9	25,7	11	20,7	
Renda familiar (Salário mínimo brasileiro=243,71USD)					
Até 1 SM	17	48,6	27	50,9	0,98**
>1–2 SM	9	25,7	15	28,3	
>2–3 SM	5	14,3	6	11,3	
>4–5 SM	2	5,7	2	3,8	
>5 SM	2	5,7	3	5,7	
Carga viral detectável ou CD4+ <200					
Não	32	91,4	46	86,8	0,758*
Sim	3	8,6	7	13,2	
Gestações					
0	1	2,9	2	3,8	0,304**
1–2	11	31,4	26	49,1	
3–4	14	40,0	18	34,0	
>5	9	25,7	7	13,2	
Paridade					
0	2	5,7	4	7,5	0,403**
1–2	18	51,4	35	66,0	
3–4	13	37,1	11	20,8	
>5	2	5,7	3	5,7	
Uso de condom					
Não	16	45,7	19	35,8	0,466*
Sim	19	54,3	34	64,2	
Relação anal desprotegida					
Não	24	70,6	47	88,7	0,034**
Sim	10	29,4	6	11,3	
Tabagismo					
Nunca	10	29,4%	28	52,8%	0,033**
Alguma vez ou atualmente	23	70,6%	25	47,2%	
Atividade sexual					
≤1 ano	27	77,14	40	75,74	0,687**
>1 ano	7	22,86	13	24,35	
Troca de parceiros nos últimos 3 meses					
Não	33	94,3	48	90,6	0,698**
Sim	2	5,7	5	9,4	
Tempo de TARV					
≤3 anos	27	77,1	37	69,8	0,450**
>3 anos	8	22,9	16	30,2	
Colpocitologia					
NLIM	28	80	44	83	0,719**
Lesões HPV-relacionadas	7	20	9	17	
HPV cervical					
Negativo	18	62,1	28	66,7	0,690**
Positivo	11	37,9	14	33,3	
Citologia anal					
NLIM	15	93,8	33	76,7	0,259*
Lesões HPV-relacionadas	1	6,3	10	23,3	
HPV anal					
Negativo	6	37,5	14	32,6	0,721**
Positivo	10	62,5	29	67,4	

IMC: índice de massa corporal; SM: salário mínimo; TARV: terapia antiretroviral; NLIM - negativo para lesões intraepiteliais ou malignidade; *teste de Fisher; ** qui-quadrado

APÊNDICE B – Tabela 2: Características sociodemográficas e clínicas estratificadas por diagnóstico de HPV anal e associações

	Negativo		Positivo		P-valor
	N	%	N	%	
Idade (anos)					
≤50	13	81,2	31	72,1	0,721*
>50	3	18,8	12	27,9	
Etnia					
Caucasiana	3	18,8	14	32,6	0,274**
Afro-americana	7	43,8	21	48,8	
Outras	6	37,5	8	18,6	
Renda familiar (Salário mínimo brasileiro=243,71USD)					
Até 1 SM	10	62,5	22	51,2	0,352**
>1–2 SM	3	18,8	11	25,6	
>2–3 SM	1	6,3	8	18,6	
>4–5 SM	0	0,0	1	2,3	
>5 SM	2	12,5	1	2,3	
Gestações					
0	0	0,0	2	4,7	0,528**
≥ 1	16	100	41	65,3	
Paridade					
0	0	0	3	7,0	0,379**
≥ 1	16	100	40	93	
Tabagismo					
Nunca	10	62,5	19	44,2	0,230**
Alguma vez ou atualmente	6	37,5	24	55,8	
Carga viral detectável ou CD4+ <200					
Sim	1	11,9	6	13,1	0,760*
Não	15	88,1	37	85,9	
Colpocitologia					
NLIM	16	100,0	31	72,1	0,027*
Lesões HPV-relacionadas	0	0,0	12	27,9	
Citologia anal					
NLIM	15	93,8	33	76,7	0,259*
Lesões HPV-relacionadas	1	6,3	10	23,3	
HPV cervical					
Negativo	12	80,0	21	60,0	0,171**
Positivo	3	20,0	14	40,0	
Atividade sexual					
No último ano	13	81,3	34	79,1	0,998*
>1 ano	3	18,8	9	20,9	
Relação sexual anal desprotegida					
Não	14	87,5	35	81,4	0,713*
Sim	2	12,5	8	18,6	
Troca de parceiro nos últimos 3 meses					
Não	15	93,8	39	90,7	0,998*
Sim	1	6,3	4	9,3	
TARV com inibidores da protease					
Não	6	37,5	14	32,6	0,721**
Sim	10	62,5	29	67,4	

SM: salário mínimo; TARV: terapia antirretroviral * Teste de Fisher ** qui-quadrado

APÊNDICE C – Tabela 3: Vaginose bacteriana e variáveis clínicas:

Vaginose bacteriana	Não		Sim		P-valor
	N	%	N	%	
Idade (anos)					
20–35	15	28,8	5	25,0	
36–50	33	63,5	12	60,0	0,638**
>51	4	7,7	3	15,0	
Grupos					
Com IP	29	45,3	6	25,0	0,066* †
Sem IP	35	54,7	18	75,0	
Grupos excluindo carga viral detectável e/ou CD4<200					
Sem IP	28	50	5	22,73	0,048*
Com IP	28	50	17	77,27	
Uso de condom					
Não	26	40,6	9	37,5	0,494*
Sim	38	59,4	15	62,5	
Relação anal desprotegida					
Não	49	77,77	22	91,66	
Sim	14	22,23	2	8,34	0,229*
HPV cervical					
Não	18	62,07	24	63,16	
Sim	11	37,93	14	36,84	0,928*
Colpocitologia					
NLIM	52	82,53	19	79,17	0,933*
Lesões HPV-relacionadas:	11	17,47	5	20,83	
AGC	1	9,1	0	0,0	
ASC-H	2	18,2	0	0,0	
ASC-US	4	36,4	1	20,0	0,477**
LSIL	1	9,1	2	40,0	
HSIL	2	18,2	2	40,0	
Carcinoma invasivo	1	9,1	0	0,0	

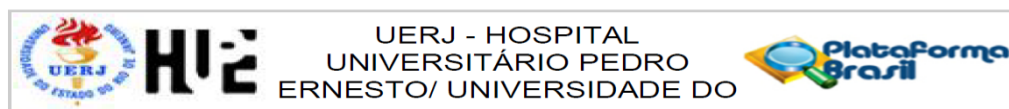
* Teste de Fisher test; ** Qui-quadrado, † Avaliação unicaudal

TARV: terapia antirretroviral; NLIM: negativo para lesões intraepiteliais ou malignidade

ACG: células glandulares atípicas; ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado;

ASC-H: células escamosas atípicas não podem excluir lesões intraepiteliais escamosas de alto grau; LSIL: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau, HSIL: lesão intraepitelial escamosa de alto grau

ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética.



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Correlação entre status da flora e lesões precursoras em esfregaço cervical e anal de pacientes com e sem uso de lopinavir

Pesquisador: Marcos Paulo Cardoso Marques

Versão: 2

CAAE: 58111916.3.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 072690/2016

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto Correlação entre status da flora e lesões precursoras em esfregaço cervical e anal de pacientes com e sem uso de lopinavir que tem como pesquisador responsável Marcos Paulo Cardoso Marques, foi recebido para análise ética no CEP UERJ - Hospital Universitário Pedro Ernesto/ Universidade do Estado do Rio de Janeiro em 26/07/2016 às 15:42.

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **E-mail:** cep.hupe.interno@gmail.com

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido

Título da pesquisa:

Correlação entre *status* do microbioma vaginal e lesões precursoras em esfregaços uterino e canal anal de mulheres com e sem o uso de inibidores da protease

Pesquisador responsável: Marcos Paulo Cardoso Marques CRM 5264913-9

Instituição: UERJ/ Departamento de Ginecologia

Telefone para contato: 2868-8269 – Departamento de Ginecologia - contato Prof.^a

Leila Soares

Local da coleta de dados: Ambulatório de Ginecologia – Hospital Universitário Pedro Ernesto

Prezada Senhora:

O objetivo deste estudo é analisar a ação dos antirretrovirais sobre o colo uterino e a vagina, com o objetivo de identificar as alterações do mesmo no epitélio e na flora vaginal. Gostaríamos de solicitar, portanto, que a senhora tenha a gentileza de nos autorizar a coleta de material durante a realização do exame preventivo para realização de outras análises. Será realizada a coleta da colpocitologia oncótica (preventivo), citologia anal e DNA-HPV do colo uterino e do ânus. Antes de concordar em participar desta pesquisa, é muito importante que a senhora compreenda as informações e instruções contidas neste documento. Os pesquisadores deverão responder a todas as suas dúvidas antes da sua participação. A senhora tem o direito de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.

Benefícios: Esta pesquisa trará maior conhecimento sobre o tema abordado. O benefício direto para você será o de realizar seu exame preventivo, necessário para prevenção do câncer de colo uterino.

Riscos: A coleta da citologia e do exame de DNA-HPV não representará qualquer risco importante de ordem física para a senhora, com pequenos riscos de desconforto, pequenos sangramentos ou constrangimento no momento do exame e nós nos comprometemos a minimizar os riscos ou desconfortos indiretos que possam vir a ser causados.

Sigilo: As informações fornecidas por você serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em duas consultas: a primeira para coleta da citologia (preventivo) e respostas a algumas perguntas formuladas; a segunda para resultado da citologia e eventual esclarecimento de dúvidas.

Concordo em participar da pesquisa, em ____/____/____.

Data: ____/____/____

Pesquisador:

ANEXO C – Comprovação de submissão do 1^o artigo científico .

Artigo submetido em 14 de novembro de 2019 ao *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, com o título: *Protease inhibitor effects on prevalence of bacterial vaginosis and human papillomavirus-related lesions*.

14-Nov-2019

Dear Prof. Soares:

Your manuscript entitled "PROTEASE INHIBITORS EFFECTS IN VAGINAL MICROBIOME AND HPV RELATED-LESIONS" by Marques, Marcos; Pinto, Amanda; Soares, Leila; Macedo, Jacyara; dos Santos, Débora; Oliveira, Marco, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is JOGR-2019-1344.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/jogr> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/jogr>.

Thank you for submitting your manuscript to The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research.

ANEXO D – Aceite do 1^o artigo científico

Artigo aceito para publicação em 07 de março de 2020, no *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, com o título: *Protease inhibitor effects on prevalence of bacterial vaginosis and human papillomavirus-related lesions*. doi:10.1111/jog.14245

JOGR-2019-1344.R1: PROTEASE INHIBITOR EFFECTS ON PREVALENCE OF BACTERIAL VAGINOSIS AND HPV-RELATED LESIONS

Date submitted: 14-Nov-2019

Date accepted: 07-Mar-2020

Dear Prof. Soares:

It is a pleasure to accept your manuscript in its current form for publication in The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. The comments of the reviewer(s) who re-evaluated your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, we look forward to your continued contributions to the Journal.

First Look NEW: Please note although the manuscript is accepted the files will now be checked to ensure that everything is ready for publication, and you may be contacted if final versions of files for publication are required.

**Your article cannot be published until the publisher has received the appropriate signed license agreement. Once your article has been received by Wiley for production the corresponding author will receive an email from Wiley's Author Services system which will ask them to log in and will present them with the appropriate license for completion.


Yours sincerely,
Kiyoko Kato

Editor in Chief, The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research

Editorial Office email address:
jog@wiley.com

ANEXO E – Formato final do 1^o artigo científico publicado

Protease inhibitor effects on prevalence of bacterial vaginosis and human papillomavirus-related lesions

Marcos P. C. Marques^{1,2}, Amanda C. Pinto³, Leila C. Soares¹ , Jacyara M. B. Macedo³, Débora F. dos Santos⁴ and Marco A. P. de Oliveira¹

¹Department of Gynaecology, ³Department of Biochemistry, ⁴Outpatient Service, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro and ²Department of Gynaecology, University of Grande Rio, Duque de Caxias, Brazil

Abstract

Aim: Antiretrovirals of the protease inhibitor (PI) class tend to achieve low concentrations in biological fluids. This study aimed to analyze possible changes in the vaginal microbiome and frequency of cervical human papillomavirus (HPV)-DNA and HPV-related lesions associated with the use of PI in antiretroviral therapy (ART).

Methods: Eighty-eight women with human immunodeficiency virus infection were divided in two groups: ART with PI and without PI. All the participants underwent anamnesis with demographic data collection. The total DNA, used as the template in the polymerase chain reaction-based assays for the detection of HPV-DNA, was extracted from cervical samples during cervical cytopathology.

Results: There were no differences between the groups with respect to HPV-related lesions. Despite the higher prevalence of bacterial vaginosis (BV) in the PI group (33.96% vs 17.14%), the difference was insignificant when considering all women ($P = 0.066$). When women with a detectable viral load and a CD4+ T-cell count <200 were excluded in both groups, BV was found to be more prevalent in the PI group (odds ratio, 3.349; 95% confidence interval, 1.113–11.41, $P = 0.049$). No associations were found between BV and age, condom use, cervical HPV, time with current ART regimen, unprotected receptive anal intercourse and cervical HPV-related lesions.

Conclusion: The use of PI did not alter the frequencies of HPV-DNA and HPV-related lesions. However, an increased frequency of BV was found in women using PI after excluding women with a detectable viral load and a CD4+ T-cell count of <200.

Key words: benign disease of vulva and vagina, cytology and gynecologic pathology, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia.

Introduction

Therapeutic regimens employed in clinical practice for treatment of human immunodeficiency virus (HIV) have proven effective in reducing the morbidity and mortality rates of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).¹ This reduction is related to the suppression of viral replication and the substantial protection of the immune system by the highly active antiretroviral therapy (ART).^{2,3}

The majority of studies about vaginal microbiome and HIV investigate the role of the first in HIV susceptibility. Among women with HIV who have not achieved virologic suppression, the vaginal microbiome is characterized by a high abundance of anaerobes, which are associated with vaginal inflammation. However, among those who are virologically suppressed and are on ART, the vaginal microbiome is associated with vaginal antiretroviral concentration.⁴ Optimizing ART to achieve adequate female genital tract concentrations is

Received: November 14 2019.

Accepted: March 7 2020.

Correspondence: Professor Leila C. Soares, Gynecology Department, Rio de Janeiro State University, Av 28 de setembro, 75, 5° andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro, Brazil, CEP 20551031. Email: lcs1507@yahoo.com.br

essential for prevention strategies.⁵ Because anti-retrovirals enter the extravascular compartment of the bloodstream by passive and/or facilitated diffusion and active transport, drugs that use facilitated diffusion, such as nucleoside reverse transcriptase inhibitors or active transport, can penetrate biological fluids at higher concentrations. However, protease inhibitors (PIs) use passive diffusion and are, therefore, likely to achieve low concentrations in biological fluids because their high protein affinity does not allow passage through biological membranes.⁶

The microbiome can influence cancer susceptibility and progression by modulating inflammation, inducing oxidative stress and promoting genomic instability of host cells. Several studies have shown that bacterial vaginosis (BV) is associated with an increased risk of acquiring, reactivating or deleting human papillomavirus (HPV) infection.^{7–10}

Cytological diagnosis, through Pap smears, is a widely accepted screening method for the detection of precancerous lesions and early cervical cancer. Because it is a fast and inexpensive examination, several studies have demonstrated the importance of the Papanicolaou method for the diagnosis of BV, with good sensitivity, specificity and positive predictive value.^{11–13}

Based on the strong association between altered microbiome and a variety of chronic inflammation-induced diseases,³ the present study aimed to analyze possible changes in the vaginal microbiome and frequency of HPV-DNA and HPV-related lesions associated with the use of PIs in ART regimens.

Methods

Study design

We performed a prospective cross-sectional study. Sample size calculation was based on the preliminary supposition that the occurrence of BV is approximately 20% among women without PI and 50% among those with PI. The sample size was estimated using the calculation suggested by Dupont and Plummer,¹⁴ with an alpha error type of 5% and a power of 80% of detecting a prevalence difference of 30%. The program suggested 36 cases in each group.

Patients and settings

Female patients aged 18–65 years, with HIV infection on ART who were being treated at outpatient clinics at the Pedro Ernesto University Hospital were invited to

participate from October 2017 to January 2019. Participants with a prior hysterectomy or who had not experienced sexual intercourse at the time of enrollment in the study were excluded.

In total, 88 women participated in this study and were divided in two groups: women on ART with PIs and women on ART without PIs.

Ethical aspects

All the participants signed an informed consent form. The study was approved by the Ethics Committee via Plataforma Brasil (CAAE number 581119163.0000.5259).

Data collection

Each patient underwent anamnesis with demographic data collection and identification of risk factors.

Cervical specimen collection

During the gynecological examination, samples were taken from the ectocervix and endocervix using wooden Ayres spatula and cytobrush, respectively.

The slides were prepared using standard cytological methods, fixed and stored in 90% alcohol, stained by Papanicolaou method and analyzed under an optical microscope. The result was classified according to the 2014 Bethesda System, as determined by the Brazilian Unic Health System. The predominant vaginal microbiome was evaluated and BV diagnosis was predominantly characterized by supracitoplasmatic bacillus (suggestive of *Gardnerella/Mobiluncus*) and absent lactobacilli. The presence of HPV-related lesions was also evaluated. The following were considered as potential HPV-related lesions: results that were not indicative of benign alterations were presence of atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US), atypical glandular cells (AGC), atypical squamous cells that do not exclude high-grade squamous intraepithelial lesions (ASC-H), low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) and invasive carcinoma. ASC-US was considered an HPV-related lesion. This result is debatable because ASC-US can be HPV-negative in approximate HPV-negative in approximately 50% of cases. However, numerically, more high-grade lesions were preceded by ASC-US than by ASC-H.¹⁵

In addition, a polymerase chain reaction (PCR)-based technique was used to detect HPV-DNA in cervical swab samples, as previously described by Klumb *et al.*¹⁶ Only samples positive for human

β -globin gene (primer set PC03/PC04) were subjected to viral DNA amplification using total DNA as templates and two primers sets, MY09/MY11–MY-PCR and GP05+/GP06+–GP-PCR, separately. A nested-PCR with two sets of primers was also performed using the MY-PCR amplicons as templates.^{17,18} Cervical samples were defined as HPV-DNA positive when at least one of the amplifications reactions, MY-PCR, GP-PCR and nested-PCR, gave a positive result.

Statistical analysis

For qualitative variables, the chi-square test or Fisher's exact test was used to observe possible existing associations, with the second test being a substitute for when the expected value is below 5, which is a premise of the chi-square test. When the Fisher test was used, the result was indicated with an asterisk. All statistical analyses were performed using a significance level of 5 in all tests.

Multiple logistic regression models were used to assess the effects of predictor variables. The variables were included in the multivariate unconditional model if they were significant in univariate analysis. Smoking and unprotected receptive anal intercourse were treated as dependent variables. Adjusted odds ratios (OR) were computed with 95% confidence intervals (CI). Data entry and statistical analysis was conducted with the Statistical Package for the Social Sciences (IBM-SPSS) version 22, 2013.

Results

The groups consisted of a total of 88 HIV+ women, with a mean age of 44 years. The predominant self-reported ethnic group was African Americans (44.6%), followed by Caucasians (30.7%) and others (22.7%). Fifty percent of the participants reported a family income of up to one minimum wage, equivalent to US\$243.71, 42% had at least one pregnancy and 60% reported one or two previous births. The average body mass index was 25.34 ± 5.04 . Considering women who smoked in the past or presently, 56.3% of the patients were smokers, 24.1% had quit smoking and 43.7% (38) had never smoked. Overall, 45% of the women had been on ART for 1–3 years. BV was detected in 27.27% of the cytological slides.

Among the 88 women, 35 (39.78%) were on ART without PI and 53 (60.22%) had PI.

The prevalence of negative for intraepithelial lesions or malignancy was 81.8% and that of HPV-related cervical lesions was 18.2%.

Among the 71 positive samples for β -globin gene, 25 (35.21%) were HPV DNA positive and 46 (64.79%) were negative for HPV DNA.

Among the HPV-related changes, ASC-US, HSIL and LSIL were the most prevalent changes with 31%, 25% and 19%, respectively.

A total of 78 (88.64%) women had no detectable viral load and/or CD4+ T-cell count <200 (32 without PI and 46 with PI).

The socio-demographic and clinical characteristics based on the groups of women on ART without PI and with PI are shown in Table 1.

There were no significant differences between patients who use PIs and those who did not ($P = 0.997$) based on age groups (20–35 years, 36–50 years, and >50 years).

In the group without PI, the associated anti-retrovirals were lamivudine + tenofovir with efavirenz (68.75%), dolutegravir (22.86%), nevirapine (5.71%) or raltegravir (2.86%). In the group with PI, the regimens associated with PI were lamivudine + tenofovir (86.36%) or lamivudine + zidovudine (9.09%) or lamivudine + abacavir (4.54%). The most prevalent PI was ritonavir (54%), followed by atazanavir (35%).

Regarding time to ART regimen, 69.8% of women using PI and 72.1% of those without PI had been using it for less than 3 years. Considering the time after HIV diagnosis, 29.4% in the group without PI and 11.3% in the group with PI reported no receptive anal intercourse ($P = 0.202$) and 20.6% without PI and 30.2% with PI reported condom anal intercourse. Those who reported unprotected receptive anal intercourse were 29.4% and 11.3% in the non-PI and PI groups, respectively ($P = 0.034$).

There were more women who never smoked in the PI group than in the non-PI group (58% vs 29%, respectively; $P = 0.033$). Unprotected receptive anal intercourse was more frequent in patients without PI than in those with PI (29.4% vs 11.3%, respectively; $P = 0.034$).

Only 71 of 88 cervical samples were adequate for PCR analysis (β -globin gene as internal control). Among the 71 samples positive for the β -globin gene, 25 (35.21%) were HPV-DNA positive. The frequencies of cervical HPV showed no significant differences between the groups without PI and those with PI (32.1% and 44.4%, respectively; $P = 0.342$).

M. P. C. Marques *et al.*

women on ARVs without PIs (OR 3.420; 95% CI 1.019–11.484, $P = 0.049$). Smoking were not associated with PIs (OR 0.869; 95% CI 0.643–1.173).

After model adequacy testing, BV remained more prevalent in the PI group with OR 3.349; 95% CI 1.113–11.41, $P = 0.049$.

Moreover, 10 women in the group without PI and 10 women in the PI group were positive for cervical HPV ($P = 0.434$). Furthermore, four women in the group without PI and two women in the PI group had HPV-related lesions ($P = 0.407$).

There were no significant differences for women with undetectable viral load between the groups without and with PI and cervical HPV ($P = 0.522$) or HPV related diseases ($P = 0.383$).

The time of HIV diagnosis did not correlate with age ($P = 0.089$), with cervical HPV-related lesions ($P = 0.933$), and with cervical HPV ($P = 0.928$).

Condom use and receptive anal intercourse were not related to cervical HPV-DNA detection ($P = 0.375$ and 0.079 , respectively) at a statistically significant level of 5%.

Discussion

The development of the PI class as ART has been one of the most important advances in controlling HIV infection.¹⁹

The vaginal microbiome plays an essential role in the health of the female reproductive system through competition with other microorganisms for nutrients and secretion of substances, which make the vaginal environment inhospitable to other potentially pathogenic microbes.²⁰

Distinct combinations of ART have antimicrobial properties and can have dramatic effects on the microbiome. Conversely, specific microbes, mainly bacteria, can catabolize antiretroviral drugs.³

With respect to the vaginal microbiome, the results of this study showed that 33.96% of the women with PI and 17.14% of the women without PI had a cytological profile that was compatible with BV. No difference was observed between the groups, despite a higher BV prevalence in the PI group ($P = 0.066$).

Analysis of only women with an undetectable viral load showed that BV was more prevalent in the PI group.

Liu *et al.*,⁴ analyzing the microbiome of 92 HIV+ women, demonstrated that the bacterial burden in women with *Gardnerella vaginalis* predominance

decreased significantly after ART initiation. Thus, it is possible that the group of PIs, because of its low concentrations in vaginal fluid, may be less effective in impacting the vaginal microbiome.

Donahue *et al.* observed that certain female genital tract microbiomes are associated with decreased vaginal antiretroviral concentrations.⁵

BV is also highly correlated with hormonal fluctuations and sexual practices. The strong presence of the BV microbiome in oral or gut bacterial populations suggests that BV may be linked to fecal or oral transplantation.²¹

Despite being HIV+ women (for whom there is a strong recommendation for protective sexual activity), only 59.4% and 62.5% used condom in their relationships in the groups without PI and PI, respectively.

Furthermore, there were no significant differences between BV and age, condom use, receptive anal intercourse and frequency of sexual intercourse in our sample.

The association of BV and cervical preneoplasia is still an unsettled issue.¹³ A meta-analysis by Gillet *et al.* (2011) reported a positive association between BV and cervical HPV infection.¹⁰

The mechanisms by which the vaginal microbiome may influence HPV detection remain unknown. *Lactobacillus* sp. has been shown to produce several microbicidal factors, including lactic acid.²² Clarke *et al.*,²³ in a large cohort study, reported higher detection of HPV, low-grade intraepithelial lesions, and *Chlamydia trachomatis* infection in women with a high vaginal pH.

Therefore, patients with BV would be more susceptible to HPV acquisition and, consequently, be more at risk of developing HPV-related lesions. However, our study showed no association between altered microbiome and HPV.

HPV infection among women living with HIV/AIDS occurs more frequently, and presents a higher rate of persistent infections and an earlier progression to cancer. Persistence of high-risk HPV infection is necessary for the development of cervical cancer and precursor lesions. Adherence to ART and viral suppression seem to be the most important factors in the decrease of HPV infection.²⁴

The present study did not find an association between BV and HPV-DNA and HPV-related lesions. However, as most patients had between 1 and 3 years of antiretroviral use, it is possible that prospective studies may demonstrate differences in the frequency of long-term HPV-related lesions.

Human immunodeficiency virus-related immunodeficiency is known to have an unfavorable impact on the natural history of HPV and is associated with increased acquisition and persistence of HPV infection. It is also associated with an increased risk of high- and low-grade intraepithelial lesions and invasive carcinoma, in addition to a higher co-infection rate with multiple high-risk HPV types compared with HIV-negative individuals.²⁵ Persistent detection of the HPV is associated with increased risk for cervical dysplasia and malignancy.²²

Our study showed that 18.2% of the women had HPV-related lesions and 35.21% were cervical HPV-DNA positive, which is lower than that reported in other studies. Tartaglia *et al.*,²⁶ in a cross-sectional study with 200 HIV+ and HIV-women, showed that overall HPV-prevalence was 33% with a higher prevalence (48%) in the HIV-positive group. Badial *et al.*^{23,27} found that prevalence of HPV, collected in two consecutive years, in 40 HIV-positive women was 73.5%.

The current study has some limitations. One of these is that it is a cross-sectional study and the participants represented a convenient sample. Some aspects of the study, due to its complexity, could be obtained with greater reliability in a prospective follow-up. Moreover, causality cannot be inferred from correlational evidence. In addition, the composition of the vaginal microbiome can be altered due to multiple factors. Also, oral relationship as a behavioral factor and partner positivity for HPV-DNA were not investigated. Therefore, further studies are needed in order to determine the causal relationship between PIs use and BV prevalence in the vaginal microbiome.

The use of PIs in antiretroviral regimens did not alter the detection rates of HPV-DNA and HPV-related lesions. Despite the higher prevalence in the PI group compared with that in the non-PI group (33.96% vs 17.4%, respectively), this difference was not significant among all women; however, when excluding women with a detectable viral load or a CD4+ T-cell count <200, BV was found to be more prevalent in the PI group. This difference might indicate that women with PI in the ART regimen could have similar vaginal microbiota as those who did not achieve virologic suppression.

Acknowledgments

The authors would like to thank Enago (<https://www.enago.com>) for the English language review.

Disclosure

None declared.

References

1. Broder S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Res* 2010; **85**: 1–18.
2. Becerra JC, Bildstein LS, Gach JS. Recent insights into the HIV/AIDS pandemic. *Microb Cell* 2016; **3**: 451–475.
3. Pinto-Cardoso S, Klatt NR, Reyes-Terán G. Impact of antiretroviral drugs on the microbiome: Unknown answers to important questions. *Curr Opin HIV AIDS* 2018; **13**: 53–60.
4. Liu CM, Packman ZR, Abraham AG, Serwadda DM, Nalugoda F *et al.* The effect of antiretroviral therapy initiation on the vaginal microbiome in HIV-infected women. *Open Forum Infect Dis* 2019; **6**: 1–7.
5. Donahue Carlson R, Sheth AN, Read TD *et al.* The female genital tract microbiome is associated with vaginal antiretroviral drug concentrations in human immunodeficiency virus-infected women on antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2017; **216**: 990–999.
6. Bennetto-Hood C, Johnson VA, King JR, Hoesley CJ, Acosta EP. Novel methodology for antiretroviral quantitation in the female genital tract. *HIV Clin Trials* 2009; **10**: 193–199.
7. Brusselaers N, Shrestha S, van de Wijgert J, Verstraelen H. Vaginal dysbiosis and the risk of human papillomavirus and cervical cancer: Systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2019; **221**: 9–18.e8.
8. Piyathilake CJ, Ollberding NJ, Kumar R, Macaluso M, Alvarez RD, Morrow CD. Cervical microbiota associated with risk of higher grade cervical intraepithelial neoplasia in women infected with high-risk human papillomaviruses. *Cancer Prev Res (Phila)* 2016; **9**: 357–366.
9. Guo Y, You K, Qiao J, Zhao Y, Geng L. Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection. *Int J STD AIDS* 2012; **23**: 581–584.
10. Gillet E, Meys JF, Verstraelen H *et al.* Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: A meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2011; **11**: 10.
11. Eriksson K, Forsum U, Björnerem A, Platz-Christensen JJ, Larsson PG. Validation of the use of Pap-stained vaginal smears for diagnosis of bacterial vaginosis. *APMIS* 2007; **115**: 809–813.
12. Turovskiy Y, Noll KS, Chikindas ML. The etiology of bacterial vaginosis. *J Appl Microbiol* 2011; **110**: 1105–1128.
13. Sodhani P, Gupta S, Gupta R, Mehrotra R. Bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia: Is there an association or is co-existence incidental? *Asian Pac J Cancer Prev* 2017; **18**: 1289–1292.
14. Dupont WD, Plummer WD Jr. Power and sample size calculations for studies involving linear regression. *Control Clin Trials* 1998; **19**: 589–601.
15. Sherman ME, Solomon D, Schiffman MA, ASCUS LSIL Triage Study Group. Qualification of ASCUS. A comparison of equivocal LSIL and equivocal HSIL cervical cytology in the ASCUS LSIL triage study. *Am J Clin Pathol* 2001; **116**: 386–394.
16. Klumb EM, Pinto AC, Jesus GR *et al.* Are women with lupus at higher risk of HPV infection? *Lupus* 2010; **19**: 1485–1491.

M. P. C. Marques *et al.*

17. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995; **76** (Pt 4): 1057–1062. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-4-1057>.
18. Manos MM, Ting Y, Wright DK *et al.* The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. In: Furth M, Greaves M (eds). *Molecular Diagnostics of Human Cancer: Cancer Cells*, Vol. 7. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 209–214.
19. Lei B, Zha W, Wang Y *et al.* Development of a novel self-microemulsifying drug delivery system for reducing HIV protease inhibitor-induced intestinal epithelial barrier dysfunction. *Mol Pharm* 2010; **7**: 844–853.
20. Leyva-Gomes G, Prado-Audelo ML, Ortega-Peña S *et al.* Modifications in vaginal microbiota and their influence on drug release: Challenges and opportunities. *Pharmaceutics* 2019; **11**: E217.
21. Diop K, Dufour JC, Levasseur A, Fenollar F. Exhaustive repertoire of human vaginal microbiota. *Human Microb J* 2019; **11**: 100051.
22. Brotman RM, Shardell MD, Gajer P *et al.* Association between the vaginal microbiota, menopause status, and signs of vulvovaginal atrophy. *Menopause* 2014; **21**: 450–458.
23. Clarke MA, Rodriguez AC, Gage JC *et al.* A large, population-based study of age-related associations between vaginal pH and human papillomavirus infection. *BMC Infect Dis* 2012; **12**: 33.
24. Travassos AG, Netto E, Xavier-Souza E *et al.* Predictors of HPV incidence and clearance in a cohort of Brazilian HIV-infected women. *PLoS One* 2018; **12**: e0185423.
25. Clemente N, Alessandrini L, Vaccher E *et al.* Multiple preinvasive and invasive HPV-related lesions of the anogenital tract in a female patient with HIV infection: A case report. *Medicine* 2017; **96**: e5948.
26. Tartaglia E, Falasca K, Vecchiet J *et al.* Prevalence of HPV infection among HIV positive and HIV-negative women in central/eastern Italy: Strategies of prevention. *Oncol Lett* 2017; **14**: 7629–7635.
27. Badial RM, Dias MC, Stuqui B *et al.* Detection and genotyping of human papillomavirus (HPV) in HIV-infected women and its relationship with HPV/HIV co-infection. *Medicine* 2018; **97**: e9545.

ANEXO F – Comprovação de submissão do 2^o artigo científico submetido

Artigo submetido em 17 de janeiro de 2020 ao *The Journal of Midwifery & Women's Health*, com o título: *Differences in human papillomavirus infection and human papillomavirus-related lesions between the cervix and anus in human immunodeficiency virus-positive women: a cross-sectional study*.

17-Jan-2020

SPMJ-2020-0003 - DIFFERENCES IN HPV INFECTION AND HPV-RELATED LESIONS BETWEEN CERVIX AND ANUS IN HIV-POSITIVE WOMEN

Dear Dr. Soares:

We accept the submission of your manuscript, which will be evaluated by the editor-in-chief as to the appointment of referees. However, we are attaching to this e-mail the "Main Document" and "Title Page" files with multiple notes for corrections. We ask that you save these files to your computer and make the requested corrections, but wait for the result of the first referees' evaluation to resubmit the corrected files via ScholarOne system. We are also attaching to this e-mail a model of copyright document, which should be sent with the signatures of the authors.

We emphasize that the authors should send a copy of the Ethics Committee approval to the Journal.

We notify the authors that, in the next submission, we will not accept any files other than those that the Journal staff have already reviewed and formatted (the files that were attached to this email).

Sincerely,
Miss Bruna Sales
São Paulo Medical Journal



Differences in human papillomavirus infection and human papillomavirus-related lesions between the cervix and anus in human immunodeficiency virus-positive women: a cross-sectional study

Journal:	<i>Journal of Midwifery & Women's Health</i>
Manuscript ID:	JMWH-20-326
Wiley - Manuscript type:	Original Research
Keywords:	Sexually Transmitted Infections, Gynecology, Preventive Health Care
Abstract:	<p>Introduction: The prevalence of cervical and anal human papillomavirus (HPV) infection in women infected with human immunodeficiency virus (HIV) is high however, little is known about the differences in the susceptibility of these infections and related lesions. The aim of this study was to describe the association between the prevalence of cervical and anal HPV infection and HPV-related lesions in HIV-positive women.</p> <p>Methods: This cross-sectional study included 88 HIV-positive women attending an outpatient clinic in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil, from October 2017 to January 2019. Ectocervical, endocervical, and anal samples were collected for colposcopy and anal cytology. A polymerase chain reaction-based technique was used to detect HPV deoxyribonucleic acid (DNA) in endocervical and anal swab samples.</p> <p>Results: The cervical and anal HPV positivity rates were 35.21% and 78.8%, respectively. Positive anal cytology tended to be associated with cervical HPV positivity ($P = 0.064$). The presence of HPV-related lesions on colposcopy was associated with anal HPV positivity ($P = 0.027$). The ratio between cervical HPV infection and cervical HPV-related lesions was 2.5. The ratio between anal HPV infection and anal HPV-related lesions was 4.3. Overall, 30% had concomitant HPV DNA in the cervix and anus.</p> <p>Discussion: There are differences in the susceptibility of infections and related lesions between the cervix and anus, with higher prevalence noted for the anus. Cervical HPV-related lesions in HIV-positive women may serve as a cue for anal preventive strategies, and further investigations in these women may be useful.</p>

SCHOLARONE™
Manuscripts

ANEXO F – Formato final do 2^o artigo científico submetido

Differences in human papillomavirus infection and human papillomavirus-related lesions between the cervix and anus in human immunodeficiency virus-positive women: a cross-sectional study

PRÉCIS

There is more susceptibility to HPV infection with less association among HPV and HPV-related lesions in the anus than in the cervix.

ABSTRACT

Introduction: The prevalence of cervical and anal human papillomavirus (HPV) infection in women infected with human immunodeficiency virus (HIV) is high however, little is known about the differences in the susceptibility of these infections and related lesions. The aim of this study was to describe the association between the prevalence of cervical and anal HPV infection and HPV-related lesions in HIV-positive women.

Methods: This cross-sectional study included 88 HIV-positive women attending an outpatient clinic in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil, from October 2017 to January 2019. Ectocervical, endocervical, and anal samples were collected for colposcopy and anal cytology. A polymerase chain reaction-based technique was used to detect HPV deoxyribonucleic acid (DNA) in endocervical and anal swab samples.

Results: The cervical and anal HPV positivity rates were 35.21% and 78.8%, respectively. Positive anal cytology tended to be associated with cervical HPV positivity ($P = 0.064$). The presence of HPV-related lesions on colposcopy was associated with anal HPV positivity ($P = 0.027$). The ratio between cervical HPV infection and cervical HPV-related lesions was 2.5. The ratio between anal HPV infection and anal HPV-related lesions was 4.3. Overall, 30% had concomitant HPV DNA in the cervix and anus.

Discussion: There are differences in the susceptibility of infections and related lesions between the cervix and anus, with higher prevalence noted for the anus. Cervical HPV-related

lesions in HIV-positive women may serve as a cue for anal preventive strategies, and further investigations in these women may be useful.

Keywords: Sexually Transmitted Infections; Gynecology; Preventive Health Care

KEY WORDS (MeSH terms): Anus Neoplasms, Cervical Intraepithelial Neoplasia, Human Immunodeficiency Virus, Human Papillomavirus

Quick points:

1. Anal HPV positivity is highly related to cervical HPV-related lesion.
2. Anal HPV is not dependent of anal intercourse and is more prevalent than cervical HPV.
3. In the anus, there is less association among HPV and HPV-related lesions than in the cervix.
4. Positive cervical HPV and anal cytology with HPV-related lesions may be associated.

INTRODUCTION

Human immunodeficiency virus (HIV)-related immunodeficiency has a negative effect on the natural lifecycle of human papillomavirus (HPV) and is associated with an increased risk of the onset and tenacity of HPV infection as well as the development of HPV-related lesions.¹

At present, anal cancer is among the most common non-acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-defining tumors in patients with HIV infection, and invasive cervical cancer has been identified as a defining diagnostic factor for AIDS since 1993.^{2,3} Although relatively uncommon in the general population, immunocompromized patients are at a higher risk of anal cancer. Moreover, there is no evidence of a decrease in the incidence of anal cancer following the introduction of an effective antiretroviral therapy (ART).⁴

Compared with the current knowledge about the associations of cervical HPV infection and cervical cytohistopathological results with cervical cancer and precursor lesions, little is known about the prognostic benefits of anal screening to predict the risk of anal cancer, given that the incidence of new cases of anal squamous carcinoma has continued to increase by 2%–3% annually over the past decade.^{5,6}

OBJECTIVE

The aim of the present study was to identify the association between the prevalence of cervical and anal HPV infections and the development of HPV-related lesions in HIV-positive women.

METHODS

This cross-sectional study included HIV-positive women attending an outpatient clinic in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil, from October 2017 to January 2019. The study protocol was approved by the Local Ethics Committee on August 12, 2016 (CAAE number 58111916.3.0000.5259) and conducted in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki.

Participants with a prior hysterectomy or who had not experienced sexual intercourse at the time of enrollment in the study were excluded. A total of 88 women were included. All the participants signed an informed consent form prior to inclusion in the study.

Following collection of demographic data, each woman underwent anamnesis and a gynecological examination, during which ectocervical and endocervical samples were collected using a wooden Ayres spatula and a cytobrush, respectively. Anal cytological samples were collected by making gentle rotation movements with a cytobrush at a depth of approximately 4 cm, while avoiding contact with any external lesion. The slides were prepared by the conventional method, fixed, and stored in alcohol at 90°C until further analysis. The cytological findings were interpreted based on the 2014 Bethesda System for Reporting Cervical Cytology, in accordance with the Brazilian Unic Health System criteria. Samples classified as atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US), atypical glandular cells, atypical squamous cells that do not exclude high-grade squamous intraepithelial lesions (ASC-H), low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL), and invasive carcinoma were considered to be positive for HPV-related lesions.

Total deoxyribonucleic acid (DNA) was isolated from cervical swabs, as described previously,⁷ whereas that from anal swabs was extracted using the Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (Invitek Molecular GmbH, Berlin, Germany), in accordance with the manufacturer's instructions. HPV DNA in biological samples was detected using a polymerase chain reaction (PCR)-based technique, as described by Klumb et al.⁷ Samples positive for human β -globin expression (primers set PC03/PC04) were subjected to viral DNA amplification using total DNA as templates and the following two primers sets separately: MY09/MY11–MY-PCR and GP05+/GP06+–GP-PCR.^{8,9} Nested PCR was also performed using the two sets of specific primers with the MY-PCR amplicons as templates. Cervical samples were defined as HPV DNA-positive when at least one of the amplification reactions (MY-PCR, GP-PCR, or nested PCR) gave a positive result.

All statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics for Windows, version 22.0. (IBM Corporation, Armonk, NYUSA). Data were compared using the Fisher's exact test or chi-square test, as appropriate. A probability (P) value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Of the 88 women included in this study, a total of 71 (80.7%) with cervical material and 59 (67.0%) with anal material deemed adequate for PCR analysis (globin gene as internal control) were included for analysis. The predominant self-reported ethnic groups were African American (41, 46.6%), followed by Caucasian (27, 30.7%) and others (20, 22.7%). Most women reported low family incomes of up to the equivalent of \$243.71 (minimum wage in Brazil at the time of the study).

Overall, 49 (56.3%) women were past or present smokers. Cervical and anal samples deemed adequate for analysis of HPV DNA were collected from 71 (81.0%) and 59 (67.0%) women, respectively. Samples from 50 (56.8%) women were adequate for both.

Adequate cervical samples from 9 (10.2%) women and anal samples from 7 (8.0%) women had detectable viral loads and/or CD4+ T-cell counts of < 200 (5 positive for cervical HPV). Of the 71 cervical HPV samples deemed adequate, 25 (35.21%) were positive for HPV DNA. There were no differences in terms of sociodemographic characteristics and HPV DNA positivity within age groups ($P = 0.429$), ethnicities ($P = 0.426$), income levels ($P = 0.590$), pregnancy ($P = 0.121$), parity ($P = 0.102$), or smoking history ($P = 0.451$).

Colpocytology with HPV-related diseases was associated with positive cervical HPV [odds ratio (OR) 5.317; 95% confidence interval (CI): 1.572–19.83; $P = 0.006$]. Although not significant, positive cervical HPV tended to be associated with the presence of anal HPV-related lesions (OR 3.777; 95% CI 0.934–19.83; $P = 0.064$). No significant differences were noted in cervical HPV frequency and sexual activity ($P = 0.126$), unprotected receptive anal intercourse ($P = 0.930$), exchange of partners within the last 3 months ($P = 0.097$), anal HPV ($P = 0.171$), and protease inhibitor use in ART ($P = 0.690$) (Table 1).

Of the 59 women with anal HPV samples deemed adequate for analysis, 43 (72.88%) were also positive for anal HPV DNA. There were no differences in sociodemographic characteristics and HPV DNA positivity within age groups ($P = 0.721$), ethnicities ($P = 0.274$), family income levels ($P = 0.352$), smoking history ($P =$

0.230), pregnancy ($P = 0.528$), or parity ($P = 0.379$). Regarding clinical characteristics, there were no significant differences between sexual activity ($P = 0.998$), cervical HPV ($P =$

0.171), change of partners within the last 3 months ($P = 0.998$), use of protease inhibitors in ART ($P = 0.721$), and anal cytology ($P = 0.259$). Only 18.6% of the women positive for anal HPV reported unprotected receptive anal intercourse, although there was no correlation with anal HPV frequency ($P = 0.713$). The presence of HPV-related lesions, as detected by colpocytology, was associated with anal HPV positivity ($P = 0.027$). The anal HPV positive rate in this group was 100%. As a rule, if in a 2×2 contingency table the count in any cell is zero, the odds ratio is undefined (Table 2).

According to cytological results, 15 (21.1%) women had HPV-related cervical lesions and 11 (18.6%) had HPV-related anal lesions. Of the HPV-related cervical lesions, five were ASC-US, two ASC-H, three LSIL, four HSIL, and one invasive carcinoma. Of the HPV-related anal lesions, eight were ASC-US, one ASC-H, and two LSIL. Of the 25 women positive for cervical HPV infection, 10 had cervical HPV-related lesions (ratio of 2.5). Of the 43 women positive for anal HPV infection, 10 had anal HPV-related lesions (ratio of 4.3).

Among the 50 women with adequate cervical and anal samples, 15 (30%) had concomitant HPV infection of the cervix and anus, 6 (12%) had cervical HPV-related lesions (one ASC-US, one LSIL, one ASC-H, and three HSIL), and 7 had anal HPV-related lesions (4 ASC-US, 2LSIL, and 1ASC-H).

DISCUSSION

Several studies have consistently reported a high prevalence and incidence of anal and cervical HPV infections in HIV-positive women and that the majority of anal HPV infections resolved within 3 years.^{10,11}

The results of the present study revealed high positivity for anal HPV (72.88%), which is higher than the 43% reported in a cross-sectional study conducted by Goeieman et al. of 200 HIV-infected women.¹²

Hessol et al.¹³ observed that women who engaged in anal intercourse were 3.8 times more likely to develop anal intraepithelial neoplasia, regardless of their immune status. However, no such association was noted in the 16% of women who reported unprotected receptive anal intercourse in the present study.

Anogenital HPV infection is often multicentric.¹³ A study conducted by Volpini et al.¹⁴ included 126 HIV-positive women and reported a high frequency of cervical and anal HPV infections in those with negative cytology and a 38.9% incidence of concomitant infection. The plausibility that the cervix acts as a source of anal HPV infection is increased by the anatomical proximity of the vaginal introitus to the anus, but the likelihood that anal infection acts as a source of cervical infection is somewhat less.¹⁵ However, the prevalence of anal infection

seems to be higher than that of cervical infection. In the present study, the incidence of cervical HPV infection was 35.21%, almost half of that of anal infection.

As a mechanism for the introduction of HPV into the anal canal in high-risk women, Simpson et al.¹⁶ suggested that front-to-back wiping was associated with a significant increase in the prevalence of HPV carriage/co-carriage.

There is a dearth of studies documenting the incidence of simultaneous cervical and anal dysplasia.¹⁷ For instance, Slama et al.¹⁸ who tested HPV at both sites noted concurrent anal and cervical HPV in 42% of women with a history of cytologically high-grade lesions. Comparatively, the results of the present study showed that the concurrency of HPV-related lesions was 30%, mostly represented by ASC-US at both sites.

The progression of metaplasia to dysplasia and subsequently to neoplasia is a logical sequence and well-established as the genesis of cervical carcinomas. In the transformation zone, there is a transition from columnar epithelium to squamous epithelium through the process of squamous metaplasia, which is a reversible adaptive change in which one differentiated cell type is replaced by another that is better able to tolerate the adverse environment. If the condition promoting metaplasia persists, metaplasia can progress to dysplasia and occasionally to malignancy.¹⁹⁻²¹

Our results showed an anal HPV/anal HPV-related lesion ratio of 4.3 and cervical HPV/cervical HPV-related lesion ratio of 2.5, indicating that despite a higher incidence of anal HPV, the progression to HPV-related lesion does not occur via the same manner in the cervix and anus.

Cervical metaplasia often exists in a dynamic state due to hormone stimulation.²² However, this does not occur in the anal epithelium, which may explain why the development of HPV-related lesions is more likely in the cervix than in other sites.

In addition to active cervical metaplasia, anatomical differences may be responsible for this diversity in the infectious capabilities of HPV. Although the anorectal junction is presumably a squamocolumnar junction similar to that of the cervix, comparative microanatomy of the transition zones showed distinct topographic differences that may influence progression to anal cancer.²³ In contrast to the single-layered columnar cells covering the basal cells of the cervical transformation zone, the anal transformation zone is lined by a multilayer of columnar cells.²⁴

Processes that cause injury to the epithelium may stimulate the occurrence of metaplasia.¹⁹ Although the development of HIV protease inhibitors has resulted in major advancements in infection control, the benefits of these drugs are undermined by serious side

effects, including mucosal erosion and epithelial barrier dysfunction even at low concentrations.^{25,26} Because the epithelial barrier is an essential part of host defense against pathogenic viruses, compromising its integrity could be a predisposing factor to greater susceptibility to sexually transmitted pathogens.²⁷ Thus, we analyzed the frequency of cervical and anal HPV DNA in relation to the use of protease inhibitors. However, our results showed no differences, corroborating the findings of Lahiri et al.²⁸ who found no differences in the prevalence of cervical HPV in women using lopinavir versus other ART regimens.

The American Cancer Society has proposed that women with a history of cervical or vulvar carcinoma benefit from anal cancer screening.²⁹ In the present study, 100% of women with HPV-related cervical lesions were positive for anal HPV, which reinforces the risk of anal HPV acquisition in this group of patients. Although inaccurate as the effect on the target population (HIV positive women), given that no confident intervals could be established, a clinically significant effect cannot be ruled out.

The limitations of this study are related to the cross-sectional design and the relatively small sample size. As HPV infections are transient, we may have overestimated the number of women with HPV infections at some time points. Nonetheless, future prospective studies with longer follow-up periods and larger sample sizes could justify the applicability of these data in larger populations.

Cervical HPV-related lesions in HIV-positive women may serve as cue for anal preventive strategies. Although there are differences in the susceptibility to HPV infections between the cervix and anus, with higher prevalence noted in the anus, further investigations of anal HPV infection of HIV-positive women with HPV-related lesions may be useful for screening of cervical cancer.

Sources of funding: The authors have no funding to report.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCE

1. Clemente N, Alessandrini L, Vaccher E, et al. Multiple preinvasive and invasive HPV-related lesions of the anogenital tract in a female patient with HIV infection: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(4):e5948. PMID: 28121939; doi: 10.1097/MD.0000000000005948.
2. Hidalgo-Tenorio C, de Jesus SE, Esquivias J, Pasquau J. High prevalence and incidence of HPV-related anal cancer precursor lesions in HIV-positive women in the late HAART era.

Enferm Infec Microbiol Clin. 2018;36(9):555-62.PMID:29208455;doi:10.1016/j.eimc.2017.10.014.

3. Frazier EL, Sutton MY, Tie Y, et al. Screening for cervical cancer and sexually transmitted diseases among HIV-infected women. *J Womens Health (Larchmt)*.2016;25(2):12432.PMID: 26447835;doi:10.1089/jwh.2015.5368.

4. Machalek DA, Poynten M, Jin F, et al. Anal human papillomavirus infection and associated neoplastic lesions in men who have sex with men: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 10.1016/S1470-2045(12)70080-3.

5. Lin C, Slama J, Gonzalez P, et al. Cervical determinants of anal HPV infection and high-grade anal lesions in women: a collaborative pooled analysis. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(8):880-91. PMID: 31204304; doi: 10.1016/S1473-3099(19)30164-1.

6. Davis KG, Orangio GR. Basic science, epidemiology, and screening for anal intraepithelial neoplasia and its relationship to anal squamous cell cancer. *Clin Colon Rectal Surg*. 2018;31(6):368-78. PMID: 30397396; doi: 10.1055/s-0038-1668107.

7. Klumb EM, Pinto AC, Jesus GR, et al. Are women with lúpus at higher risk of HPV infection? *Lupus*. 2010;19(13):1485-91 PMID: 101177/0961203310372952.

8. Manos MM, Ting Y, Wright DK, et al. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. In: *Molecular diagnostics of human cancer: Cancer cells*, Vol.7, p.209-214. Furth M, Greaves M (eds). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

9. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*. 1995;76(Pt 4):1057-62. PMID: 9049358; doi: 10.1099/0022-1317-76-4-1057.

10. Palefsky J. Human papillomavirus-related disease in people with HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. 2009;4(1):52-6. PMID: 19339939; doi 10.1097/COH.0b013e32831a7246.

11. Moscicki AB, Ma Y, Farhat S, et al. Natural history of anal human papillomavirus infection in heterosexual women and risks associated with persistence. *Clin Infect Dis*. 2014;58(6):804-11. PMID: 24368624; doi: 10.1093/cid/cit947.

12. Goeieman BJ, Firnhaber CS, Jong E, et al. Prevalence of anal HPV and anal dysplasia in HIV-infected women from Johannesburg, South Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2017;75(3): e59-e64. PMID: 28141783; doi:10.1097/QAI.0000000000001300.

13. Hessol NA, Holly EA, Efird JT, et al. Anal intraepithelial neoplasia in a multisite study of HIV-infected and high-risk HIV-uninfected women. *AIDS*. 2009;23(1):59-70. PMID: 19050387; doi: 10.1097/QAD.0b013e32831cc101.

14. Volpini LPB, Boldrini NAT, de Freitas LB, Miranda AE, Spano LC. The high prevalence of HPV and HPV16 European variants in cervical and anal samples of HIV-seropositive women

with normal Pap test results. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176422. PMID: 28426837; doi: 10.1371/journal.pone.0176422.

15. Bucchi D, Stracci F, Buonora N, Masanotti G. Human papillomavirus and gastrointestinal cancer: A review. *World J Gastroenterol*. 2016;22(33):7415-30. PMID: 27672265; doi: 10.3748/wjg.v22.i33.7415.

16. Simpson S Jr, Blomfield P, Cornall A, et al. Front-to-back & dabbing wiping behaviour post-toilet associated with anal neoplasia & HR-HPV carriage in women with previous HPV-mediated gynaecological neoplasia. *Cancer Epidemiol*. 2016; 42:124-32. PMID: 27107173; doi: 10.1016/j.canep.2016.04.001.

17. Bisherwal K, Pandhi D, Singal A, Guleria K, Mishra K. Evaluation of cervical and anal intraepithelial neoplasia in women attending a sexually transmitted infection clinic. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2016; 82(5):498-504. PMID: 27297278; doi: 10.4103/0378-6323.183634.

18. Slama J, Sehnal B, Dusek L, Zima T, Cibula D. Impact of risk factors on prevalence of anal HPV infection in women with simultaneous cervical lesion. *Neoplasma*. 2015;62(2):308-14. PMID: 25591597; doi: 10.4149/neo_2015_037.

19. Giroux V, Rustgi AK. Metaplasia: tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia-cancer sequence. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(10):594-604. PMID: 28860646; doi: 10.1038/nrc.2017.68.

20. Wang CJ, Sparano J, Palefsky JM. Human immunodeficiency virus/AIDS, human papillomavirus, and anal cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2017;26(1):17-31. PMID: 27889034; doi: 10.1016/j.soc.2016.07.010.

21. Assarzagdegan N, Solano FJ. Squamous metaplasia in colorectal polyps. *Pathol Lab Med Open J*. 2015;1(1):1-2. Doi: 10.17140/PLMOJ-1-101. Soares LC, Braz FLTA, Araújo AR, Oliveira MAP. association of sexually transmitted diseases with cervical ectopy: a systematic review. *Sex Transm Dis*. 2019;46(7):452-7. PMID: 30913163; doi: 10.1097/OLQ.0000000000000992.

22. Yang EJ, Quick MC, Hanamornroongruang S, et al. Microanatomy of the cervical and anorectal squamocolumnar junctions: a proposed model for anatomical differences in HPV-related cancer risk. *Mod Pathol*. 2015;28(7):994-1000. PMID: 25975286; doi: 10.1038/modpathol.2015.54.

23. Clavero O, McCloskey J, Molina VM, et al. Squamous intraepithelial lesions of the anal squamocolumnar junction: Histopathological classification and HPV genotyping. *Papillomavirus Res*. 2017; 3:11-7. PMID: 28720443; doi: 10.1016/j.pvr.2016.12.001.

24. Lei B, Zha W, Wang Y, et al. Development of a novel self-microemulsifying drug delivery system for reducing HIV protease inhibitor-induced intestinal epithelial barrier dysfunction. *Mol Pharm*. 2010;7(3):844-53. PMID: 20349948; doi: 10.1021/mp100003r.

25. Israr M, Mitchell D, Alam S, et al. Effect of the HIV protease inhibitor amprenavir on the growth and differentiation of primary gingival epithelium. *Antivir Ther.* 2010;15(2):253-65. PMID: 20386081; doi: 10.3851/IMP1512.
26. Muytjens CM, Vasiliou SK, Oikonomopoulou K, Prassas I, Diamandis EP. Putative functions of tissue kallikrein-related peptidases in vaginal fluid. *Nat Rev Urol.* 2016;13(10):596-607. PMID: 27603220; doi: 10.1038/nrurol.2016.161.
27. Lahiri CD, Dugan KB, Xie X, et al. Oral lopinavir use and human papillomavirus infection in HIV-positive women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2015;70(2):e63-PMID: 26181819; doi: 10.1097/QAI.0000000000000752.
28. Lahiri CD, Dugan KB, Xie X, et al. Oral lopinavir use and human papillomavirus infection in HIV-positive women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2015;70(2):e63-PMID: 26181819; doi: 10.1097/QAI.0000000000000752.
29. Bregar AJ, Cronin B, Luis C, et al. Anal and cervical high-risk human papillomavirus genotyping in women with and without genital neoplasia. *J Low Genit Tract Dis.* 2018;22(2):115-9. PMID: 29481422; doi: 10.1097/LGT.0000000000000368.