

KELI CARDOSO DE MELO

**Avaliação da excreção genital do HIV-1 em mulheres
menopausadas e em idade fértil: prevalência e
fatores associados**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Aluisio Augusto Cotrim Segurado

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Melo, Keli Cardoso de

Avaliação da excreção genital do HIV-1 em mulheres menopausadas e em idade fértil: prevalência e fatores associados / Keli Cardoso de Melo. – São Paulo, 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Aluisio Augusto Cotrim Segurado.

Descritores: 1.HIV 2.Menopausa 3.Idoso 4.Excreção cervicovaginal 5.Carga viral 6.Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa 7.Vaginose bacteriana 8.Fator de necrose tumoral alfa

USP/FM/SBD-349/09

“Porque de Deus, por meio de Deus,
e para Deus são todas as coisas. A Ele, pois,
a glória eternamente”.

Romanos 11:36

Ao meu filho Pedro, pelo amor incondicional
durante o período de preparação
deste trabalho.

Ao meu amado esposo, melhor amigo e
coidealizador deste trabalho, Murilo,
pelo incentivo constante e por andar de mãos dadas comigo
durante todo o tempo.

Aos meus pais,
Osmando e Umbertina [*in memoriam*],
pela construção de tudo o que sou.

Agradecimentos especiais

Ao Prof. Dr. Aluisio Segurado, meu orientador, pelo apoio, motivação constante em momentos difíceis, pela amizade construída ao longo de quatro anos e pela oportunidade de trabalharmos juntos.

Agradeço às pacientes da Casa da Aids que gentilmente participaram dessa pesquisa e tornaram esse trabalho possível.

A pessoas especiais da minha família que durante o tempo de preparação desse trabalho muitas vezes me substituíram em meu papel de mãe e me sustentaram com orações: meu irmão Eduardo Cardoso, sua esposa Ana Eliza Cardoso e Eliana Cardoso, minha madrastra.

Ao Reverendo Ismael Ramos Teixeira e sua esposa Ana Teixeira, pelas orações constantes e suporte espiritual desde a minha adolescência até hoje.

Agradecimentos

Agradeço à direção da Casa da Aids, Dra. Eliana Battaglia Gutierrez e à administradora Delsa Nagata, por abrirem as portas dessa instituição a mim e permitir a realização do trabalho.

À Enfermeira Camila de Melo Picone e equipe, em especial às auxiliares de enfermagem Magali Sampaio Menezes e Maria Cecília de Melo, pelo suporte fundamental à coleta de amostra das pacientes.

Ao estudante de medicina Bruno Vita Ricci e à equipe do arquivo da Casa da Aids, pela paciência e sorriso constante ao auxiliar no levantamento dos prontuários.

Ao Laboratório de Investigações Médicas (LIM-52) e ao Dr. Claudio Sergio Pannuti pela infraestrutura para realização dos experimentos.

À Dra. Marilene Melo e ao SAE Laboratório Médico/UN Diagnósticos meus profundos agradecimentos, pelo apoio fundamental para realização dessa pesquisa.

Aos professores doutores Ester Cerdeira Sabino, Rosário Dominguez Crespo Hirata, Angela Maggio da Fonseca, José Eduardo Levi, Iara Moreno Linhares e Maria Regina Cardoso pelas valiosas contribuições ao trabalho durante os exames de qualificação.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, Roseli Antonia Santo, Vania Regina Miguel e Rosemeire Aparecida Moraes Ribeiro pelo carinho e parceria.

À Roche Diagnóstica e à DPC Medlab pela doação de alguns dos reagentes utilizados no trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

Sumário

Lista de abreviaturas	
Lista de símbolos	
Lista de siglas	
Lista de figuras	
Lista de gráficos	
Lista de quadros	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1. Introdução	3
2. Revisão Bibliográfica	7
2.1 - Panorama da Infecção por HIV/Aids	7
2.2 - Aids em pacientes com idade acima de 50 anos.....	8
2.3 - Aids em mulheres com idade acima de 50 anos	13
2.4 - Menopausa e Aspectos Ginecológicos	16
2.5 - Excreção Genital do HIV-1 e Fatores Associados	18
2.5.1 - A influência da carga viral plasmática e do uso de terapia antirretroviral (TAR) sobre a excreção genital do HIV	18
2.5.2 - Compartimentalização viral	19
2.5.3 - A excreção genital do HIV ao longo do ciclo menstrual.....	20
2.5.4 - Ativação imune local (citocinas imunorregulatórias e proinflamatórias) e sua relação com a excreção genital do HIV-1	21
2.5.5 - As infecções do trato genital feminino e seu efeito na excreção genital do HIV	23
2.5.6 - Microbiota Vaginal Normal e Vaginose Bacteriana (VB).....	24
2.5.7 - Outras infecções do trato genital: <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Nesseria gonorrhoeae</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> e <i>Candida sp.</i>	26
2.6 - Formas de Análise da Excreção Genital do HIV-1.....	27
3. Importância do estudo	31
4. Objetivos	35
5. Métodos.....	39
5.1 - Seleção das pacientes	39
5.2 - Confirmação do agendamento e instruções pré-coleta.....	42
5.3 - Preparo dos reagentes	42
5.4 - Entrevista e Coleta do Material Biológico	42
5.4.1 - <i>Swab</i> 1 para Exame a Fresco	44
5.4.2 - <i>Swab</i> 2 - Cultura de Aeróbios.....	44
5.4.3 - <i>Swab</i> 3 - Bacterioscópico.....	44
5.4.4 - <i>Swab</i> 4 - pesquisa de aminas com KOH 10%.....	44
5.4.5 - <i>Swab</i> 5 - análise de pH	45
5.4.6 - Coleta de amostra para Citologia Cervicovaginal (Papanicolaou).....	45
5.4.7 - Coleta do Lavado Cervicovaginal (LCV), separação e armazenamento.....	45
5.4.8 - Coleta de sangue, separação e armazenamento	46
5.5 - Separação e armazenamento de linfócitos	46
5.6 - Avaliação da Carga Viral em Plasma e no LCV	47
5.7 - Dosagem do Lítio e cálculo do fator de diluição.....	48

5.8 - Dosagem de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α).....	48
5.9 - Dosagem de Estradiol e Hormônio Folículo Estimulante (FSH) no soro	49
5.10 - Extração do DNA do botão celular do LCV e pesquisa do gene SRY para avaliação de contaminação espermática	49
5.11 - Pesquisa de <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT) e <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (NG) por PCR.....	50
5.12 - Classificação da Microflora Vaginal	50
5.13 - Levantamento de informações clínicas a partir do prontuário médico	50
5.14. Análise dos Resultados.....	52
5.15. Aspectos Éticos	54
6. Resultados	57
6.1 - Dados sócio-demográficos	57
6.2 - Dados da Entrevista, Categoria de Exposição e Exame Físico.....	57
6.3 - Definição do tempo de diagnóstico da infecção e <i>status</i> clínico (“aids” e “não-aids”)	59
6.4 - Terapias antirretrovirais em uso no momento da coleta de material biológico para este estudo	60
6.5 - Avaliação hormonal	62
6.6 - Avaliação microbiológica e da citologia oncótica cervicovaginal	63
6.7 - Atividade sexual por ocasião da inclusão no estudo.....	65
6.8 - Pesquisa do gene SRY para detecção de contaminação espermática dos lavados cervicovaginais	66
6.9 - Pesquisa de <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT) e <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (NG) por PCR.....	66
6.10 - Cálculo do fator de diluição do lavado cervicovaginal a partir da aferição da concentração de Lítio	66
6.11 - Avaliação das concentrações de TNF- α no lavado cervicovaginal	67
6.12 - Avaliação do <i>status</i> imunológico e da carga plasmática viral do HIV.....	67
6.13 - Caracterização da excreção de HIV-RNA em lavados cervicovaginais entre as pacientes menopausadas e as em idade fértil.....	68
6.14 - Investigação dos fatores associados à excreção genital de HIV	72
7. Discussão.....	82
7.1 - Considerações Finais e Perspectivas Futuras	94
8. Conclusões.....	98
9. Anexos.....	102
Anexo A - Formulário de Triagem de Pacientes	102
Anexo B - Termo de Recusa	103
Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	104
Anexo D - Formulário de Entrevista	107
Anexo E - Certificado de Aprovação do Comitê de Ética	108
10. Referências	112
Apêndices	

Lístas

Lista de abreviaturas

Coef.	Coeficiente
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DP	desvio padrão
fd	Fator de Diluição
gFérteis	Grupo de pacientes em idade fértil
gMenopausadas	Grupo de pacientes menopausadas
LCV	Lavado Cervicovaginal
log	logaritmo
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
OR	Odds Ratio
pb	pares de bases
VB	Vaginose Bacteriana

Lista de Símbolos

°C	graus Celsius
µl	microlitro
cel/mm ³	células por milímetro cúbico
g	unidade de gravidade
ml	mililitro
mM	milimolar (10 ⁻³ moles por litro)
mUI/ml	10 ⁻³ Unidades Internacionais por mililitro
ng/ml	nanogramas por mililitro
pg/ml	picogramas por mililitro

Lista de Siglas

aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ASCUS	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
BHI	Brain Heart Infusion
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
CD4/8	<i>Cluster of Differentiation 4/8</i>
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DST	Doença Sexualmente Transmissível
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV-2	Herpes Simplex Vírus tipo 2
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
IL	Interleucina
IP	Inibidores da Protease
ITRN	Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo e Nucleotídeo
ITRNN	Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogos de Nucleosídeo
KOH	Hidróxido de Potássio
LH	Hormônio Luteinizante
LiCl	Cloreto de Lítio
NaCl	Cloreto de Sódio
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa-light chain enhancer of activated B cell</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	Reação em Cadeia por Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PSA	Antígeno Prostático Específico

RNA	Ácido Ribonucléico
SIM	Sistema de Informações de Mortalidade
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SISCEL	Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4+/CD8+ e Carga Viral
SIV	Vírus da Imunodeficiência dos Símios
SRY	<i>Sex Determining Region Y</i>
STARD	<i>Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy</i>
TAR	Terapia Antirretroviral
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
UNAIDS	<i>Joint United Nations Programme on HIV/AIDS</i>

Lista de Figuras

- Figura 1** - Fluxograma de seleção e convocação de pacientes para o estudo, com os motivos de exclusão dos casos, para os grupos gFérteis e gMenopausadas. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....41
- Figura 2** - Fluxograma de coleta de materiais biológicos, com detalhe enfatizando as instruções de coleta transmitidas às pacientes participantes do estudo. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....43

Lista de Gráficos

- Gráfico 1** - Taxa de incidência de aids (por 100.000 hab.) em indivíduos de 50 anos ou mais de idade, segundo região de residência por ano de diagnóstico. Brasil, 1982-2006.....9
- Gráfico 2** - Razão de sexo (M:F) dos casos de aids em indivíduos de 50 anos ou mais de idade, segundo ano de diagnóstico. Brasil, 1985 a 2007.....14
- Gráfico 3** - Distribuição das concentrações de Estradiol (pg/ml) em pacientes dos grupos gFérteis e gMenopausadas ($p < 0,001$). Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....62
- Gráfico 4** - Distribuição das concentrações de FSH (mUI/ml) em pacientes dos grupos gFérteis e gMenopausadas ($p < 0,001$). Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....63
- Gráfico 5** - Concentrações de TNF- α corrigidas pelo fator de diluição do LCV, estabelecido pela concentração de lítio na amostra, em pacientes dos grupos gFérteis e gMenopausadas. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....67
- Gráfico 6** - *Dot-plot* do logaritmo da concentração de RNA viral no LCV (corrigido pelo fator de diluição) nas pacientes dos grupos gFérteis e gMenopausadas. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....69
- Gráfico 7** - Correlação entre a excreção genital de HIV-RNA e carga viral plasmática nas pacientes dos grupos gFérteis e gMenopausadas. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....70
- Gráfico 8** - Correlação entre a excreção genital de HIV-RNA e carga viral plasmática nas pacientes dos grupos gFérteis e gMenopausadas com excreção genital detectável. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....70
- Gráfico 9** - Correlação entre a excreção genital de HIV-RNA e o número de linfócitos T CD4+ periféricos, nas pacientes dos grupos gFérteis e gMenopausadas. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....71
- Gráfico 10** - Correlação entre a excreção genital de HIV e o número de linfócitos T CD4+ periféricos nas pacientes dos grupos gFérteis e gMenopausadas com excreção genital detectável. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....71

Lista de Quadros

- Quadro 1** - Medicamentos utilizados na terapia antirretroviral de pacientes em tratamento no Brasil. Ministério da Saúde, Brasília, 2006.....51

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Distribuição da população feminina na faixa etária superior a 50 anos, casos notificados de aids, óbitos por aids e respectivos coeficientes específicos (para 100.000 mulheres) por faixa etária em anos. Brasil, 1996 e 2005.....	13
Tabela 2 - Valores de Referência e Sensibilidade Analítica para dosagem de FSH e Estradiol em equipamento Architect® ci8200 Abbott®	49
Tabela 3 - Características sociodemográficas das pacientes dos grupos gMenopausadas e gFérteis. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....	57
Tabela 4 - Categorias de exposição das pacientes dos grupos gMenopausadas e gFérteis. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....	58
Tabela 5 - Queixas clínicas genitais relatadas nas entrevistas entre os grupos gMenopausadas e gFérteis. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....	58
Tabela 6 - Inspeção genital das pacientes dos grupos gMenopausadas e gFérteis. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....	59
Tabela 7 - Tempo de diagnóstico e <i>status</i> clínico em pacientes dos grupos gMenopausadas e gFérteis. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....	60
Tabela 8 - Classificação das pacientes dos grupos gMenopausadas e gFérteis de acordo com a terapia antirretroviral em uso no momento da coleta. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....	61
Tabela 9 - Terapia antirretroviral em uso e classificação dos esquemas terapêuticos em 1ª escolha ou resgate, em pacientes dos grupos gMenopausadas e gFérteis. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....	61
Tabela 10 - Resultados do exame microscópico e da classificação do tipo de flora pelo método de coloração de Gram, exame direto, KOH 10%, cultura de fungos, pH e critérios de Amsel, entre os grupos gMenopausadas e gFérteis. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....	64
Tabela 11 - Achados da citologia oncótica cervicovaginal em pacientes dos grupos gMenopausadas e gFérteis. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....	65
Tabela 12 - Descrição das variáveis categóricas segundo detecção de excreção cervicovaginal de HIV-RNA e resultado dos testes de associação. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....	73
Tabela 13 - Descrição das variáveis numéricas segundo detecção de excreção cervicovaginal de HIV-RNA e resultado dos testes de comparação. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....	74
Tabela 14 - Modelo de regressão logística múltipla para avaliação de fatores associados à excreção cervicovaginal de HIV-RNA. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....	75

Tabela 15 - Descrição da intensidade da excreção cervicovaginal de HIV-RNA (log) segundo variáveis categóricas de interesse e resultado do teste de comparação. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....76

Tabela 16 - Correlação entre o logaritmo da concentração de HIV-RNA em lavado cervicovaginal e variáveis numéricas de interesse. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....77

Tabela 17 - Modelo de regressão linear para avaliação de fatores associados à intensidade da excreção cervicovaginal de HIV-RNA. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.....78

RESUMOS

Melo KC. *Avaliação da excreção genital do HIV-1 em mulheres menopausadas e em idade fértil: prevalência e fatores associados [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 138p*

INTRODUÇÃO: Poucos estudos têm focado as modificações fisiológicas que ocorrem no trato genital de mulheres menopausadas infectadas pelo HIV e sua associação com a excreção genital do vírus. Nesse estudo de corte transversal, comparou-se a excreção genital do HIV em mulheres menopausadas e em idade fértil em acompanhamento em um centro especializado em São Paulo, Brasil. Investigou-se também a associação entre a excreção genital de RNA de HIV e a viremia em ambos os grupos. Fatores associados com a intensidade da excreção genital de HIV também foram pesquisados, incluindo achados ginecológicos e marcadores de progressão da infecção por HIV. **MÉTODOS:** 146 mulheres infectadas pelo HIV [73 menopausadas (M)/73 em idade fértil (F)] foram selecionadas em Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes com HIV/Aids - Casa da Aids do Hospital das Clínicas da FMUSP, São Paulo, Brasil. As mulheres menopausadas referiram tempo médio de 8,17 anos (DP=6 anos) de menopausa. A contagem de linfócitos T CD4+ foi obtida por citometria de fluxo e a quantificação do RNA do HIV no plasma e no lavado cervicovaginal (LCV) foi realizada por RT-PCR quantitativo, utilizando-se o *kit* Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Test®, no método ultrasensível. Cloreto de lítio foi introduzido no tampão para obtenção do LCV e quantificado antes e depois da coleta do lavado, a fim de determinar o fator de diluição de cada amostra. A detecção do gene SRY por PCR também foi realizada a fim de eliminar amostras com eventual contaminação espermática. A prevalência de excreção genital foi estimada para ambos os grupos e os fatores associados à intensidade da excreção viral foram investigados, utilizando-se modelo de regressão linear múltipla. As variáveis com $p < 0,2$ na análise bivariada foram incluídas na análise multivariada, assim como o grupo em estudo (M ou F). O modelo final incluiu fatores que se mostraram independentemente associados com a intensidade da excreção genital de HIV. **RESULTADOS:** A prevalência de excreção genital de HIV-RNA foi similar em ambos os grupos (M: 17,8%, IC 95% 9,8 - 28,5; F: 22%, IC 95% 13,1 - 33,1, $p=0,678$). Similarmente, a intensidade de excreção genital do HIV também não se mostrou diferente entre os grupos (mediana - M: 1,4log/mL; F: 1,4log/mL, $p=0,587$). A carga viral plasmática foi detectável em 34,2% das pacientes menopausadas (IC 95% 23,5 - 46,3) e em 42,5% entre as pacientes em idade fértil (IC 95% 31 - 54,6, $p=0,395$). Três pacientes (2 M/1 F) exibiram excreção genital de HIV-RNA na ausência de viremia detectável. Existe evidência de correlação entre a carga viral plasmática e a genital em ambos os grupos ($r_M: 0,658$; $r_F: 0,684$, $p < 0,01$). Adicionalmente, o número de células CD4+ periféricas mostrou-se negativamente correlacionada à excreção genital do HIV em ambos os grupos ($r_M: -0,250$; $r_F: -0,248$, $p < 0,05$). À análise multivariada, a carga viral plasmática mostrou-se independentemente associada à ocorrência de excreção genital do HIV em ambos os grupos (OR 4,03, IC 95% 2,52 - 6,45, $p < 0,001$). Já a intensidade de excreção genital mostrou-se independentemente associada ao pH vaginal ($p < 0,001$), concentração de TNF- α no LCV ($p=0,01$), e à carga viral plasmática ($p=0,001$), todos com correlação positiva. **CONCLUSÕES:** Apesar das modificações significativas que ocorrem na mucosa vaginal da mulher menopausada, a excreção cervicovaginal do HIV parece não ser significativamente influenciada por esse estado. A carga viral plasmática e o número de células CD4+ periféricas estão correlacionadas com a excreção genital do vírus. A frequência de excreção genital mostrou-se independentemente associada à intensidade de viremia. Além disso, o aumento do pH vaginal e evidência de inflamação genital, associada à concentração de TNF- α no LCV, independentemente aumentam a intensidade de excreção genital nas mulheres estudadas.

Descritores: HIV; Menopausa; Idoso; Excreção cervicovaginal; Carga Viral; Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa; Vaginose bacteriana; Fator de necrose tumoral alfa.

Melo KC. HIV cervicovaginal shedding among postmenopausal and fertile-aged women: prevalence and associated factors [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2009. 138p

BACKGROUND: Few studies have focused on physiological modifications that occur in the genital tract of HIV-infected postmenopausal women and their association with HIV cervicovaginal shedding. In this cross-sectional study we evaluated and compared HIV genital shedding among postmenopausal and fertile-aged women under care at a specialized center in Sao Paulo, Brazil, investigating the association between HIV-RNA shedding and HIV plasma viral loads in both groups. Factors associated with higher HIV shedding were also investigated, including gynaecological features and HIV disease progression markers. **METHODS:** 146 women living with HIV [73 postmenopausal (PM)/73 in fertile-aged (F)] were enrolled at the HIV Clinic, University of São Paulo Medical School, Brazil. Postmenopausal women referred a mean duration of 8.17y (SD=6y) since menopause. CD4+ cell counts were obtained by flow cytometry and HIV-RNA was quantified in plasma and in cervicovaginal lavages (CVL) by RT-PCR, using Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Ultrasensitive Test. Lithium chloride was introduced into the CVL buffer and measured before and after CVL collection in order to determine the dilution factor for each specimen. SRY gene detection by PCR was also performed in all samples in order to rule out sperm contamination. Prevalence of HIV genital shedding was estimated for both groups and factors associated with the intensity of viral shedding were investigated, using a multiple linear regression model. Variables with $p < 0.2$ in bivariate analysis were included in multivariate analysis, as well as the study group (PM and F). The final model included factors shown to be independently associated with intensity of HIV genital shedding. **RESULTS:** The prevalence of HIV-RNA genital shedding was similar in both groups. (PM: 17.8%, 95%CI 9.8 - 28.5; F: 22%, 95%CI 13.1 - 33.1, $p=0.678$). Likewise, the intensity of HIV shedding was shown not to differ between PM and F women (means - PM: 1.4log/mL; F: 1.4log/mL, $p=0.587$). Plasma viral loads were detectable in 34.2% of PM patients (95%CI 23.5 - 46.3), as compared to 42.5% among F women (95%CI 31 - 54.6) ($p=0.395$). Three patients (2 PM/1 F) exhibited HIV-RNA genital shedding in the absence of detectable viremia. We found evidence of correlation between HIV plasma viral load and HIV cervicovaginal shedding in both groups ($r_{PM}: 0.658$; $r_F: 0.684$, $p < 0.01$). In addition, CD4+ cell counts were shown negatively correlated to HIV shedding in both groups ($r_{PM}: -0.250$; $r_F: -0.248$, $p < 0.05$). In multivariate analysis, HIV plasma viral load was shown independently associated with occurrence of HIV genital shedding in both groups (OR 4.03, 95%CI 2.52 - 6.45, $p < 0.001$). In addition, the intensity of HIV shedding was shown independently associated with vaginal pH ($p < 0.001$), TNF- α concentrations in CVL ($p=0.01$), and with HIV plasma viral loads ($p=0.001$), all of them with positive correlation. **CONCLUSION:** Despite the significant changes that occur in the vaginal mucosa of postmenopausal women, HIV cervicovaginal shedding does not seem to be significantly influenced by this state. Plasma viral loads and CD4+ cell counts are correlated to HIV genital shedding. The frequency of HIV genital shedding was shown independently associated with viremia intensity. Moreover, increased vaginal pH and evidence of genital inflammation associated with TNF- α concentration independently enhanced the intensity of HIV shedding in postmenopausal and fertile-aged women.

Descriptors: HIV; Menopause; Elderly people; Genital Shedding; HIV viral load; RT-PCR; Bacterial Vaginosis, TNF-alpha.

Introdução

1. Introdução

A síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) é uma doença retroviral causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1). A epidemia de aids afeta principalmente adultos jovens; no entanto, tem ocorrido aumento do número de casos em idosos, representando cerca de 9% de todos os casos de aids desde 1982, quando o primeiro caso em paciente acima de 50 anos foi notificado¹.

Essa doença está se tornando mais frequente em mulheres, inclusive em idosas, as quais representam cerca de 34% de todos os casos de pacientes com aids nessa faixa etária¹. A via de transmissão heterossexual corresponde à maioria dos casos, podendo-se pressupor que relações sexuais sem o uso do preservativo pela ausência de risco de gravidez seja a principal forma de aquisição da infecção por pacientes acima de 50 anos.

A fragilidade da mucosa vaginal decorrente da diminuição dos níveis de estradiol durante o climatério e na pós-menopausa é um fator importante a ser considerado no aumento do risco de infecção em idosas. Com a diminuição da espessura da superfície mucosa, há teoricamente aumento da probabilidade tanto de aquisição do HIV quanto de seu potencial de transmissão sexual.

A carga viral plasmática, a presença de doenças sexualmente transmissíveis, assim como condições inflamatórias também estão relacionadas ao aumento da carga viral do HIV na região genital.

Apesar do crescente aumento da infecção entre os idosos, poucos estudos têm focado as modificações fisiológicas que ocorrem no trato genital de mulheres menopausadas infectadas pelo HIV e sua associação com a excreção genital do vírus.

Este trabalho tem assim como objetivos comparar mulheres menopausadas e em idade fértil infectadas pelo HIV-1 em relação às características sócio-

demográficas, variáveis de exposição ao HIV e alterações clínico-laboratoriais relacionadas à infecção propriamente dita e a outras condições ginecológicas. Procurou-se também caracterizar a excreção genital do HIV-1 em mulheres menopausadas, comparando-a com a de pacientes em idade fértil por meio da quantificação do RNA do HIV-1 em lavado cervicovaginal. Além disso, buscou-se avaliar se a pós-menopausa está associada à presença e intensidade da excreção genital do HIV-1 e por fim investigar fatores de natureza ginecológica ou relacionados à infecção pelo HIV que sejam independentemente associados à frequência e intensidade de excreção genital.

Revisão Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

2.1 - Panorama da Infecção por HIV/Aids

A síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) é uma doença retroviral, causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), caracterizada por imunossupressão profunda que leva a infecções oportunistas, neoplasias secundárias e manifestações neurológicas. Apesar de inicialmente reconhecida nos Estados Unidos, mais de 90% dos 33,2 milhões de indivíduos atualmente infectados por HIV-1 no mundo estão em países em desenvolvimento^{2,3}. De acordo com relatório da UNAIDS, publicado em dezembro de 2008, hoje vivemos a estabilização na proporção de portadores do vírus e declínio no número de novas infecções.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Brasil é responsável por aproximadamente 630 mil casos de pessoas vivendo com HIV em 2008, dos 1,6 milhões na América Latina². Em nosso país, de 1980 a junho de 2008 foram identificados 506.499 casos de aids, dos quais cerca de 80% encontram-se em tratamento¹.

A transmissão do HIV-1 ocorre em condições que facilitam a exposição do indivíduo susceptível ao sangue ou líquidos corporais contendo partículas virais livres ou células infectadas pelo vírus. As três principais formas de infecção são o contato sexual, a inoculação de sangue contaminado e a passagem de vírus de mães infectadas para seus recém-nascidos durante a gestação, parto ou aleitamento materno. No entanto, mais de 90% da transmissão global de HIV ocorre através das superfícies mucosas, seja pelo contato heterossexual ou pela mucosa orofaríngea, como no caso da infecção por meio do aleitamento materno⁴.

Como a epidemia de aids afeta principalmente adultos jovens, as campanhas educativas têm focado o uso de preservativos por esses indivíduos, deixando outras parcelas da população à margem da discussão sobre a prevenção

dessa doença³. Segundo Castro⁵, as campanhas educativas em massa e de impacto voltaram-se sempre a um público específico de jovens, mulheres e populações consideradas mais vulneráveis, não contemplando pessoas da terceira idade. Foi somente a partir de 2005 que o Programa Nacional de DST/aids do Ministério da Saúde, reconhecendo o incremento da participação de idosos no número de casos notificados da doença no país, buscou estabelecer parceria com a Coordenação de Saúde do Idoso do mesmo Ministério, no intuito de desenvolver insumos de educação para a saúde e prevenção dirigidos mais especificamente a essa população para utilização nos níveis estadual e municipal.

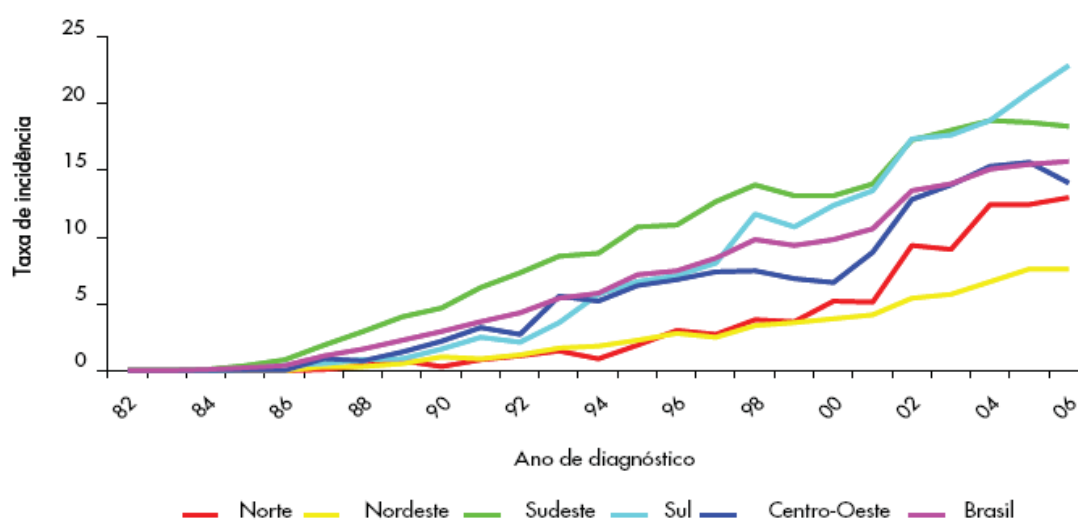
2.2 - Aids em pacientes com idade acima de 50 anos

O número de pacientes infectados por HIV com idade acima de 50 anos tem crescido em virtude da longevidade desses indivíduos quando tratados com terapia antirretroviral de alta potência (*Highly Active Antiretroviral Therapy* - HAART), mas também em decorrência do aumento da ocorrência de infecção primária nessa faixa etária. O Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) Americano estima que o número de adultos infectados, com idade igual ou superior a 50 anos, tenha crescido 213,7% na última década, passando essa faixa etária a ser responsável por 18,9% das pessoas vivendo com HIV/aids. Considerando-se a idade no momento do diagnóstico, estima-se também que esse grupo responda por 18,6% dos novos casos de aids nos Estados Unidos⁶. De acordo com o *United States Senate Special Committee on Aging*, estima-se que no ano de 2015, cerca de 50% de todas as pessoas vivendo com HIV/Aids terão idade maior do que 50 anos^{7,8}.

O primeiro caso brasileiro de aids em pessoas de 50 anos ou mais de idade foi notificado em 1982. Desde então, até junho de 2008 foram identificados 47.437 casos, o que representa 9% do total de casos do país, sendo 15.966 (34%) entre

mulheres e 31.469 (66%) entre homens¹. Apesar da estabilização da epidemia, a taxa de incidência vem apresentando tendência de crescimento em pacientes acima de 50 anos: em 1996, a taxa de incidência por 100.000 habitantes era de 7,5 e passou para 15,7 em 2006¹ (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Taxa de incidência de aids (por 100.000 hab.) em indivíduos de 50 anos ou mais de idade, segundo região de residência por ano de diagnóstico. Brasil, 1982-2006*.



FONTE: Boletim Epidemiológico DST/AIDS - 2008¹

*Casos notificados no SINAN e registrados no SISCEL até 30/06/2008 e no SIM de 2000 a 2007.

Dados preliminares para os últimos 5 anos.

A idade mais avançada é um fator a ser considerado no contexto da infecção por HIV/aids por três principais razões: o organismo possui menos habilidade em resistir a infecções à medida em que o avançar da idade diminui a resposta imune⁹; nesses pacientes, o diagnóstico da infecção por HIV é geralmente tardio¹⁰, aumentando a morbidade e mortalidade a ela associada¹¹; e por fim, pessoas idosas tendem a sofrer mais condições crônicas como diabetes, hipertensão e a utilizar maior número de medicamentos, podendo estes interferir na terapia anti-HIV⁶.

Tanto o envelhecimento quanto a infecção por HIV estão associados com profundas mudanças na imunidade e defesa do hospedeiro, com diminuição e disfunção de linfócitos B, involução do timo e conseqüente diminuição no número de linfócitos T *naive* (CD4+ e CD8+). Com o envelhecimento e a infecção por HIV, as repetidas expansões de células CD8+ levam a um mecanismo de reposição de células CD8+ constantemente, impedindo a sua maturação e proliferação das células T *naive*. Altas proporções de células T citotóxicas CD8+CD28- (imaturas) estão relacionadas à maior progressão para AIDS e maior gravidade de doenças virais causadas por Citomegalovírus e vírus da Varicela-Zoster⁷. A restauração de células CD4+ após início da terapia HAART também parece estar reduzida nesse grupo populacional, quando comparado a pacientes jovens, apesar da melhor resposta virológica e da melhor adesão ao tratamento observada entre os idosos^{7,12}.

Do ponto de vista clínico, os pacientes com aids em idade acima de 50 anos apresentam como principal doença definidora a pneumonia por *Pneumocystis jiroveci*, embora exista relato de maior incidência de encefalopatia ou demência por HIV e síndrome consumptiva relacionada à infecção por HIV nessa faixa etária^{13,14}. Apesar do espectro de doenças oportunistas ser similar em pacientes jovens, indivíduos acima de 50 anos experimentam maior morbidade, progressão de doença mais rápida e maior risco de disseminação sistêmica dessas afecções¹⁴.

Cabe também destacar as particularidades que envolvem o diagnóstico da infecção por HIV entre os grupos de idade mais elevada. O reconhecimento da infecção por HIV costuma ser mais tardio em pacientes com idade acima de 50 anos, devendo-se tal fato à presença de comorbidades que podem confundir o diagnóstico ou mesmo à ocorrência de alguns tipos de neoplasias e manifestações dermatológicas atípicas⁸. Por outro lado, o retardo no diagnóstico pode estar associado à falta de percepção de risco de infecção por HIV, tanto por parte dos

idosos propriamente ditos, como também dos profissionais envolvidos no cuidado a estes, como detalhado mais adiante. Sabe-se que a demora no diagnóstico pode levar a aumento da mortalidade nessa faixa etária. Dados norte-americanos sugerem que adultos acima de 50 anos têm maior probabilidade de morrer no mês do diagnóstico de aids e sobrevivem menos quando comparados a adultos jovens^{8,15}. Em estudo retrospectivo, Perez e colaboradores¹⁶ compararam as taxas de mortalidade em 253 indivíduos com idades acima de 50 anos e 535 jovens, todos infectados pelo HIV. Embora informações como tipo de terapia antirretroviral e presença de comorbidades não tenham sido apresentadas, os indivíduos acima de 50 anos que não estavam recebendo antirretrovirais tiveram probabilidade de morte duas vezes maior quando comparados aos indivíduos jovens sem tratamento. Esses dados sugerem que a falha na terapia ou no diagnóstico da infecção por HIV em pacientes acima de 50 anos pode ter maior impacto em sua sobrevivência do que em pacientes jovens. Por outro lado, nos pacientes que receberam terapia baseada em uso combinado de medicamentos antirretrovirais de alta potência, os pacientes idosos tiveram redução superior a duas vezes na probabilidade de morte e redução de 72% na taxa de mortalidade, após o ajuste de possíveis variáveis de confusão. Nessa investigação, os pacientes foram acompanhados por 3 meses, período no qual não se observou diferença significativa na taxa de sobrevivência entre pacientes jovens e idosos avaliados.¹⁶

A idade avançada e a presença de comorbidades são importantes fatores a serem avaliados no grupo de idosos que vivem com HIV. Shah e colaboradores¹⁷ investigaram 165 pacientes infectados, com idade acima de 55 anos, em uso de terapia antirretroviral. Puderam verificar que 89% dos pacientes possuíam pelo menos uma condição de comorbidade e 81% deles faziam uso de medicamentos não relacionados à infecção pelo HIV.

Uma outra questão de interesse epidemiológico a propósito do aumento significativo da parcela de casos entre pessoas com 50 anos ou mais de idade relaciona-se à transmissão sexual desse agente. Nesse aspecto, é importante enfatizar a vulnerabilidade específica dos indivíduos na terceira idade no que se refere a sua exposição ao HIV. A vulnerabilidade é um conceito multidimensional que pode se expressar em diferentes níveis, entendidos como graus e naturezas de susceptibilidade de indivíduos e coletividades à infecção, adoecimento e morte pela infecção por HIV, segundo particularidades formadas pelo conjunto dos aspectos sociais, programáticos e individuais que os põem em relação com o problema e com os recursos para seu enfrentamento⁵. Assim por exemplo, os indivíduos idosos possuem baixa percepção de risco de infecção pelo HIV, apesar de manterem vida sexual ativa sem risco de gravidez, desestimulando o uso de preservativo. Destaca-se, ainda, a percepção dos profissionais de saúde acerca do risco a que os idosos são submetidos em relações sexuais desprotegidas e à consideração do diagnóstico de HIV/aids em um paciente idoso. Muitos médicos raramente discutem HIV, aids ou comportamento sexual com seus pacientes idosos¹⁵; muitos dos sintomas de HIV/aids podem ser vistos nesse grupo como componente normal do envelhecimento, levando a diagnóstico errôneo ou tardio⁶. Associado a isto, pessoas acima de 50 anos têm menos conhecimento sobre HIV/aids e doenças sexualmente transmissíveis do que pacientes mais jovens. Existe desconhecimento da forma como essas doenças são transmitidas e dos modos de prevenção. Estudo de Stall e colaboradores¹⁸ indicou que 92% dos indivíduos acima de 50 anos arrolados na pesquisa não haviam feito uso de preservativo em nenhuma relação sexual nos últimos 6 meses, mesmo com parceiros casuais.

Além disso, as taxas atuais de infecção de pacientes idosos podem estar subestimadas quando comparadas à população em geral, pelo fato desse grupo ser

menos testado para infecção por HIV¹³. Dados do *National AIDS Behavioral Surveys* mostram que pessoas com idade acima de 50 anos em risco para HIV possuem apenas 20% de probabilidade de terem sido testadas para essa infecção, quando comparadas com indivíduos com idades entre 20 e 30 anos com o mesmo fator de risco¹⁸. Em geral, esses pacientes são testados apenas após exibirem sintomas ou serem hospitalizados com complicações relacionadas à infecção por HIV¹³.

2.3 - Aids em mulheres com idade acima de 50 anos

Cabe destacar que a aids está se tornando particularmente mais frequente em mulheres idosas: a porcentagem de mulheres com idade acima de 50 anos diagnosticadas nos Estados Unidos até 1992 foi de 4,4%, enquanto em 2003 aumentou para 15,4%⁶. No Brasil essa tendência também é observada e as mulheres representam 34% de todos os casos de pacientes acima de 50 anos¹. Estudo recém publicado por Pereira e colaboradores¹⁹ mostra que, no período de 1996 a 2005, houve aumento da incidência e da mortalidade por aids em mulheres acima de 50 anos, como mostra a tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição da população feminina na faixa etária superior a 50 anos, casos notificados de aids, óbitos por aids e respectivos coeficientes específicos (para 100.000 mulheres) por faixa etária em anos. Brasil, 1996 e 2005.

Idade (anos)	1996					2005				
	População	Casos	Coef.*	Óbitos	Coef.**	População	Casos	Coef.*	Óbitos	Coef.**
50-59	5.545.656	204	3,68	241	4,35	7.011.819	596	8,50	445	6,35
60	3.846.773	54	1,40	71	1,85	4.711.919	167	3,54	143	3,03

FONTE: Pereira ECA e cols¹⁹, 2008

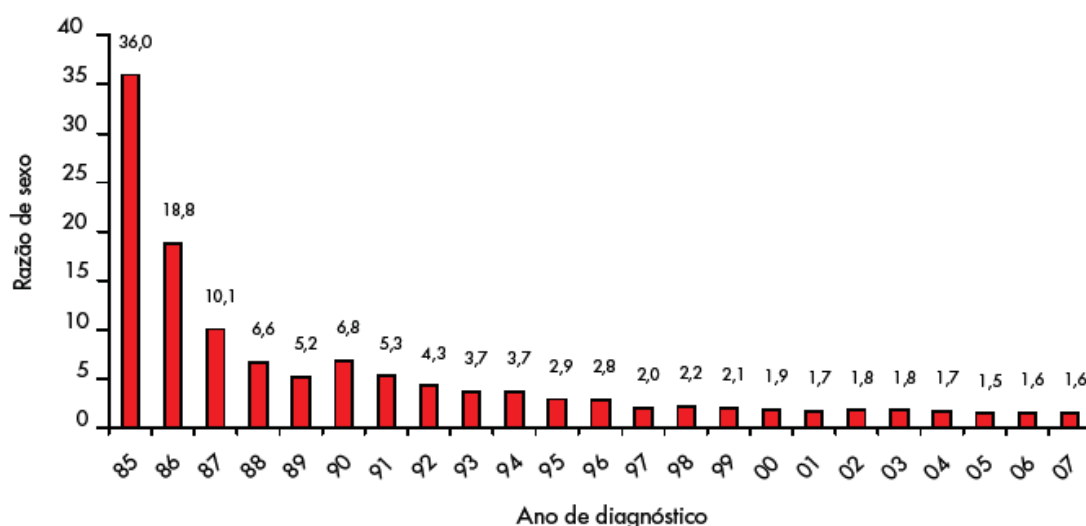
*Coeficiente específico de incidência de aids por faixa etária (para 100.000 mulheres)

**Coeficiente de mortalidade por aids por faixa etária (para 100.000 mulheres)

O aumento da incidência de aids em mulheres, indicado no estudo de Pereira e colaboradores, é corroborado pelos dados do Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, publicado em dezembro de 2008¹: a razão de sexo dos casos

de aids em indivíduos acima de 50 anos mostra tendência de decréscimo. Em 1986, a razão era de aproximadamente 19 casos de aids em homens para cada caso em mulheres e, em 2006 passa de 16 casos de aids em homens para cada 10 casos em mulheres (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Razão de sexo (M:F) dos casos de aids em indivíduos de 50 anos ou mais de idade, segundo ano de diagnóstico. Brasil, 1985 a 2007*.



FONTE: Boletim Epidemiológico DST/AIDS - 2008¹

*Casos notificados no SINAN e registrados no SISCEL até 30/06/2008 e no SIM de 2000 a 2007.

Dados preliminares para os últimos 5 anos.

O aumento da incidência de casos de aids em mulheres nessa faixa etária poderia ser explicado pela exposição a fatores que aumentam sua vulnerabilidade à contaminação por relações heterossexuais: a presença de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), que na maioria das vezes é assintomática e facilita a contaminação; a susceptibilidade da mucosa vaginal da mulher no pós-menopausa, que poderia aumentar o risco de aquisição do HIV durante uma relação sexual²⁰; a desigualdade econômica que ocorre entre os gêneros, de maneira especial nessa

faixa etária, que torna difícil a negociação em relação à prática de sexo mais seguro; a ausência do risco de gravidez, incentivando relações sexuais sem o uso do preservativo; a falta de acesso à educação sobre as formas de transmissão sexual do HIV¹⁹.

Nesse diapasão, estudo conduzido com 514 mulheres com idade acima de 50 anos demonstrou que 82,2% delas pensam que o HIV pode ser transmitido através de beijo, que espermicida ou vasectomia é efetivo na prevenção da transmissão do HIV (49% e 45% respectivamente), enquanto apenas 13% delas entendem que o uso do preservativo é eficaz em prevenir a transmissão do HIV²¹. Outra pesquisa conduzida com mulheres brasileiras com idade acima de 40 anos identificou que 64,3% delas nunca usaram preservativo¹⁹. De fato sabe-se que o uso de preservativos é cerca de seis vezes menor entre idosos que realizam uma dada atividade de risco em relação aos jovens¹⁸. Embora o uso de preservativo diminua com o avançar da idade²², estudo conduzido com 142 mulheres infectadas pelo HIV em menopausa não demonstrou alteração na frequência de seu uso após o diagnóstico da infecção²³. Além disso, mulheres infectadas pelo HIV em menopausa possuem em geral menos anos de estudo e referem ignorar a via de transmissão em quase um terço dos casos (30,8%)³.

Dados sobre os efeitos da menopausa na infecção por HIV não estão completamente esclarecidos^{24,25}. Alguns estudos sugerem que mulheres em menopausa tendem a apresentar menor número de linfócitos CD4+ e menor carga viral, quando comparadas a mulheres em pré-menopausa (333 vx. 399 x 106 cél/mm³, p = 0,09)²⁴⁻²⁶. Os sintomas de menopausa como ondas de calor e secura vaginal também parecem ser mais prevalentes em mulheres HIV positivas, no entanto, é necessário o aprofundamento dessas questões em novos estudos²⁷.

2.4 - Menopausa e Aspectos Ginecológicos

A partir dos 40 anos, as mulheres em geral vivenciam o período chamado climatério, caracterizado por alterações endócrinas, somáticas e psíquicas, com diminuição gradual da função ovariana. A mulher no climatério pode vivenciar sintomas de deficiência estrogênica como secura vaginal, ondas de calor, nervosismo, insônia, fadiga e depressão. Essa fase também é marcada pelo aumento nas concentrações plasmáticas de Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH)²⁸. A menopausa - permanente cessação da menstruação definida após 6 a 12 meses de amenorréia em mulheres acima de 45 anos - em geral ocorre entre 47 e 51 anos nas mulheres HIV positivas²⁸⁻³⁰, não havendo diferença significativa na faixa etária em que isso ocorre, quando comparadas a mulheres sem infecção pelo HIV^{31,32}.

A fragilidade da mucosa vaginal é um fator importante a ser considerado no aumento da probabilidade de infecção em idosas, já que estudos sugerem que a vagina é um importante local de entrada do HIV^{20,33,34}. A diminuição da concentração de estrógeno circulante causa atrofia do epitélio vaginal, provocando desconforto, prurido e dispareunia. Mulheres em pós-menopausa possuem de 4 a 8 vezes mais chance de serem infectadas pelo HIV, quando comparadas a mulheres em pré-menopausa^{20,34}.

A uretra e a vagina possuem receptores de estrógeno e são sensíveis a modificações sistêmicas nas concentrações desse hormônio. Com a diminuição das concentrações de estrógeno, há profunda modificação na estrutura da mucosa vaginal, com progressiva avascularização do tecido, tornando o epitélio pálido com finas petéquias. Fibras colágenas tendem à hialinização, fibras elásticas tendem à fragmentação e existe aumento de tecido conjuntivo. Assim, a mucosa vaginal perde elasticidade com conseqüente redução na distensibilidade. O conteúdo

vaginal diminui, levando à lubrificação reduzida³⁵. Concomitantemente, existe diminuição das células superficiais e intermediárias, com diminuição do glicogênio presente nas células. Isto leva à inibição do crescimento de *Lactobacillus sp* e aumento do pH vaginal. Essa “quebra” da barreira protetora abre caminho para organismos como *Streptococcus sp*, *Staphylococcus sp*, coliformes, difteróides e maior susceptibilidade a outras doenças sexualmente transmissíveis. Todos esses fatores associados podem estar envolvidos no maior risco de aquisição do HIV em mulheres em menopausa^{20,34,35}.

Por outro lado, tais alterações vaginais, próprias do climatério e menopausa, encontradas nas mulheres idosas, ainda não foram estudadas como fator associado à transmissão heterossexual do HIV.

Estudo conduzido com macacas Rhesus demonstrou haver alterações significantes na espessura e integridade do epitélio vaginal decorrentes da idade e do ciclo menstrual³⁶. Existe também evidência de que a taxa de transmissão sexual do vírus da imunodeficiência dos símios (SIV), retrovírus geneticamente relacionado ao HIV, a partir de macacas infectadas, é fortemente afetada por mudanças na espessura da mucosa vaginal^{37,38}.

A ulceração da mucosa está associada com maior excreção genital do HIV, sugerindo que a barreira imune da mucosa pode ser importante na redução da transmissão do HIV³⁹. Cabe destacar também que a mucosa atrófica de mulheres após a menopausa também é mais susceptível a microtraumatismos durante o ato sexual, com maior risco de sangramento e exposição de células e partículas virais livres, podendo assim aumentar o risco de transmissão desse vírus⁴⁰. No entanto, até o momento não encontramos estudos relacionando a excreção genital do HIV à idade ou menopausa.

2.5 - Excreção Genital do HIV-1 e Fatores Associados

Estima-se que a transmissão do HIV pela via heterossexual é responsável por 75% dos casos de infecções no mundo⁴¹. Dessa forma, compreender os fatores virológicos e imunológicos que influenciam a infectividade do HIV em mulheres infectadas pelo HIV numa relação heterossexual torna-se fundamental a fim de reduzir o risco de transmissão da mulher para o homem.

Diversos fatores estão reconhecidamente associados à excreção genital do HIV, a saber: carga viral plasmática^{42,43}, uso de terapia antirretroviral^{43,44}, o fenômeno da compartimentalização viral^{45,46}, variações relativas ao ciclo menstrual⁴⁷⁻⁵⁰, ativação imune local e presença de citocinas imunorregulatórias e próinflamatórias⁵¹⁻⁵⁶ e a presença de infecções genitais, especialmente aquelas que determinam maior aporte de células inflamatórias para o trato genital, na interação agente-hospedeiro⁵⁷⁻⁶³.

2.5.1 - A influência da carga viral plasmática e do uso de terapia antirretroviral (TAR) sobre a excreção genital do HIV

Vários estudos têm sido conduzidos, visando relacionar o potencial de excreção genital com a viremia plasmática de HIV e o uso de TAR. Na maioria desses, verificou-se uma forte correlação positiva entre carga viral plasmática e os níveis de excreção do HIV no trato genital feminino^{43,64,65}. Alguns estudos sugerem que a viremia é o mais importante preditor da excreção genital do HIV^{66,67}, estando também fortemente associada à probabilidade de transmissão. Baseado no estudo Rakai, publicado em 2000, estima-se que a cada aumento de 10 vezes na carga viral, o correspondente a um logaritmo decimal nas mensurações de HIV-RNA habitualmente conduzidas na prática clínica, exista aumento do risco de transmissão sexual do HIV para 2,45 vezes (IC 95% 1,85 - 3,26)⁶⁸. Além disso, pode-

se observar rápida queda na excreção do vírus com o uso de TAR^{44,69}, o que pode ser dependente da forte ação supressora sobre a replicação viral exibida pelos esquemas terapêuticos combinados de alta potência (HAART)⁷⁰. Estudo conduzido em Burkina Faso com 39 mulheres infectadas pelo HIV, que ainda não haviam recebido nenhum tipo de tratamento antirretroviral, demonstrou que, antes do início da terapia HAART, todas apresentavam carga viral plasmática detectável e 72% delas possuíam excreção genital de RNA de HIV-1. Após 18 semanas de uso dos antiretrovirais, apenas uma (2,5%) apresentou viremia e em duas delas (5,1%) pode ser detectada excreção genital de HIV-1. Isso demonstra que a forte supressão virológica em nível sistêmico é acompanhada por marcada supressão da excreção genital⁶⁹. Entretanto, deve-se destacar que nessa avaliação e na maioria dos estudos similares, foi possível identificar excreção genital, mesmo em mulheres com viremia indetectável no plasma^{47,64,66,71-76}.

2.5.2 - Compartimentalização viral

A compartimentalização viral é definida como a heterogeneidade genética dos isolados de HIV encontrados em diferentes territórios orgânicos, correspondendo a subpopulações de isolados virais geneticamente distintos em um mesmo indivíduo⁷⁷. Vários mecanismos e fatores podem contribuir para esse fenômeno. Durante a infecção aguda, o HIV, em sua disseminação hematogênica a partir da porta de entrada, coloniza diversos órgãos e se estabelece nesses diferentes territórios sob forma de populações virais distintas, que conseqüentemente se adaptam a pressões seletivas provenientes do sistema imunológico do hospedeiro. Além desses fatores, deve-se destacar também que caracteristicamente na infecção aguda por HIV, em virtude da intensa atividade de replicação viral, verifica-se alta taxa de mutação viral, resultante

fundamentalmente de erros de transcrição reversa, que podem ampliar o grau de divergência genética entre as subpopulações virais. O uso de medicamentos antirretrovirais, por sua vez, também pode resultar em evoluções divergentes do vírus, desde que haja falha de adesão ao tratamento ou, ainda, por distribuição farmacológica desigual em diferentes territórios orgânicos. Portanto, geram-se populações virais compartimentalizadas, com eventuais características fenotípicas diferentes, como o tropismo celular, resistência a drogas e patogênese viral⁷⁸⁻⁸⁴.

Várias pesquisas confirmam a existência de compartimentalização no âmbito do trato genital. Nunnari e colaboradores⁸⁵ demonstraram em seu estudo que, apesar de sua intensa ação inibidora da replicação viral, a terapia HAART não leva ao clareamento da infecção. Ao contrário, o ambiente cervicovaginal pode continuar como reservatório da infecção. Fiore e colaboradores⁸¹ observaram que mesmo em mulheres com carga viral plasmática indetectável, pode-se encontrar excreção genital do vírus, apesar do tratamento antirretroviral. Tal dado corrobora a afirmação de que a presença do HIV no trato genital não é mero reflexo de contaminação por sangue, mas sim que a replicação local do HIV possa ocorrer independentemente da presença de viremia⁸⁶.

Os resultados indicaram ainda que o cenário virológico sanguíneo e genital representam compartimentos virais diferentes, que podem por vezes conter variantes virais genotipicamente distintas. Com isso, apesar de ser possível reduzir-se a viremia plasmática do HIV a níveis indetectáveis no tratamento com HAART, é importante garantir a continuidade das práticas de sexo protegido^{69,87,88}.

2.5.3 - A excreção genital do HIV ao longo do ciclo menstrual

Especula-se que as variações na capacidade de excreção genital de HIV possam também ser influenciadas pelo ciclo menstrual. Em relação à excreção

genital de HIV, segundo relatos de diversos autores, variações quantitativas de sua intensidade ao longo do ciclo menstrual têm sido observadas, porém de modo inconstante^{47,48,50,89-92}. Diferenças metodológicas na seleção dos casos estudados em diferentes avaliações ou nas técnicas de coleta e análise das amostras biológicas podem justificar as discrepâncias de resultados observados. Assim, Villanueva e colaboradores⁹² avaliaram amostras de lavado cervicovaginal (LCV) de 25 mulheres HIV-positivas durante um ciclo menstrual, nos dias 7, 14 e 21. Esse estudo confirmou a associação da carga viral plasmática à concentração de RNA de HIV no trato genital, mas não verificou influência do ciclo menstrual sobre tais concentrações em LCV.

Já em artigo de revisão de 2003, Coombs e colaboradores⁶⁵ concluíram que a excreção viral no trato genital feminino é menor durante a fase folicular e aumenta sob influência progesteragênica na fase lútea. Atribuíram tais diferenças ao fato do estrógeno induzir a proliferação do epitélio, aumentando a barreira física à excreção do HIV durante a fase folicular, enquanto na fase lútea, sob ação da progesterona, essa barreira diminuiria.

2.5.4 - Ativação imune local (citocinas imunorregulatórias e proinflamatórias) e sua relação com a excreção genital do HIV-1

A ativação imune local e a inflamação são fatores cruciais para avaliação e estudo da replicação e patogênese do HIV. Embora a concentração plasmática de vírions de HIV seja o mais forte preditor de taxas de transmissão, fatores locais da mucosa, tais como a existência de inflamação e de outras infecções sexualmente transmissíveis, estão fortemente associadas tanto com aumento da excreção viral, quanto com a susceptibilidade de aquisição da infecção via mucosa genital^{55,62}.

Existe evidência de que a ativação generalizada da cérvix durante a infecção crônica por HIV ocorre em algumas mulheres, marcada por produção de citocinas inflamatórias (principalmente TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) e a provável ativação de células T CD4⁺⁵⁶. Esses fatores poderiam tornar o trato genital feminino um ambiente bastante favorável à replicação viral. Tal hipótese é suportada em estudos que verificaram que mulheres com concentrações elevadas dessas citocinas no trato genital apresentam maior probabilidade de excretar HIV na mucosa cervical do que mulheres com concentrações reduzidas das mesmas⁵⁵. Isto provavelmente se deve ao papel do TNF- α e IL-6 em estimular a replicação do HIV. Essas citocinas, juntamente com a quimiocina IL-1 β , conhecida por atrair neutrófilos ao local da inflamação, tornam a cérvix um microambiente ativado^{93,94}. A associação entre ativação generalizada de citocinas na mucosa genital feminina e o aumento da excreção local também já foi observado no contexto de infecção por HIV^{93,95}. É possível que o microambiente cervical cronicamente inflamado, que ocorre no trato genital de mulheres infectadas pelo HIV, possa contribuir para danificar a barreira epitelial, aumentando a translocação da microbiota local e causando ativação imune sistêmica⁹⁶.

O fator de necrose tumoral do tipo alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória secretada por diversas células quando estimuladas, como macrófagos e linfócitos B e T. Organismos Gram-negativos, Gram-positivos e fungos induzem a ativação de fator de transcrição NF- κ B e a expressão desta e outras citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas^{97,98}. Embora pesquisa recente tenha revelado que as concentrações locais de TNF- α não se alteram ao longo do ciclo menstrual, não há dados sobre eventual diferença na concentração dessa citocina no conteúdo vaginal nas diferentes faixas etárias^{52,89,99}.

2.5.5 - As infecções do trato genital feminino e seu efeito na excreção genital do HIV

As doenças sexualmente transmissíveis têm sido reconhecidas há muito tempo como importantes cofatores na transmissão sexual do HIV-1. Numerosos estudos têm demonstrado que indivíduos com DST são mais susceptíveis à infecção pelo HIV do que indivíduos que não apresentam tais afecções, além de outras infecções do trato genital inferior, tais como a vaginose bacteriana e a candidíase vulvovaginal¹⁰⁰⁻¹⁰³. Além disso, indivíduos coinfectados pelo HIV e por outras DST oferecem maior risco de transmitir o HIV sexualmente do que pacientes não coinfectados^{104,105}. A compreensão das associações entre as infecções do trato genital e a transmissão do HIV é crítica para a formulação de estratégias preventivas da disseminação deste vírus e deve incluir em sua análise também as pessoas que vivem com HIV em terapia antirretroviral.

Diversos fatores podem explicar a associação entre infecções do trato genital em indivíduos infectados pelo HIV e a sua infectividade. Esse retrovírus tem sido frequentemente detectado em amostras de úlcera genital de indivíduos HIV positivos. Além do efeito direto que possa haver na presença de soluções de continuidade na barreira mucosa e epitelial, facilitando assim a excreção viral, sabe-se ainda que as infecções genitais também aumentam a infectividade por outros mecanismos. Isto pode ser devido ao recrutamento de leucócitos para o trato genital em resposta à infecção local ou devido ao aumento da produção de citocinas inflamatórias, que podem, *per se*, estimular a replicação do HIV^{106,107}. O vírus do Herpes simplex do tipo 2 (HSV-2) pode coinfectar células CD4+ com HIV e induzir a replicação deste, assim como a microbiota associada à vaginose bacteriana pode estimular a replicação do HIV por meio da secreção da molécula denominada fator termoestável indutor de HIV¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

2.5.6 - Microbiota Vaginal Normal e Vaginose Bacteriana (VB)

A mucosa vaginal de mulheres pré-púberes e menopausadas é constituída por epitélio cujo pH na superfície permanece entre 6,0 e 8,0. Na puberdade, existe aumento da concentração de estrógenos circulantes, resultando em proliferação das células epiteliais vaginais e depósito de glicogênio nas células intermediárias e superficiais. Sob ação dos lactobacilos, ocorre produção de ácido lático e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), diminuindo o pH vaginal para valores entre 3,5 e 4,5. Essa faixa é considerada dentro dos limites de normalidade para pacientes em idade fértil¹¹¹.

A vaginose bacteriana (VB) é resultado da substituição da flora normal e dominante de *Lactobacillus sp* por aumento na prevalência e concentração de flora mista, incluindo bactérias anaeróbias, *Gardnerella vaginalis* e *Mycoplasma hominis*. Em 1983 Amsel *et al.* estabeleceram critério clínico para o diagnóstico de VB. A presença de três dos quatro critérios seguintes é considerada consistente para a presença de VB: pH vaginal superior a 4,5; presença de *clue cells* no exame direto com solução salina (NaCl 0,9%); liberação de odor de amina à adição de 1 gota de KOH 10% em uma porção do conteúdo vaginal e corrimento caracteristicamente fino e homogêneo¹¹². A prevalência de VB entre mulheres infectadas por HIV varia entre 18 e 42%, não existindo diferença significativa quando comparadas a pacientes HIV negativas, nem tampouco relação entre a ocorrência de VB e o número de células CD4+ no sangue periférico em pacientes infectadas^{113,114}. Alguns estudos sugerem que a VB, organismos associados a ela ou falta de *Lactobacillus* na vagina possam aumentar a transmissão do HIV. Isso poderia ocorrer pela falta do H_2O_2 na mucosa vaginal, dado que essa molécula possui efeito viricida sobre o HIV-1, ou ainda pela ativação de linfócitos CD4+ em decorrência do pH elevado, aumentando assim na vagina o número de células-alvo para o HIV^{115,116}. No entanto,

a implicação da vaginose bacteriana com o aumento do risco de transmissão do HIV ainda não parece consensual¹¹⁷.

Além do pH ser um importante preditor de vaginose bacteriana, esse índice pode também ser utilizado como marcador da concentração plasmática de estradiol em mulheres. Estudo conduzido com 253 pacientes demonstrou que pH vaginal entre 6,0 e 7,5, na ausência de bactéria aeróbica potencialmente patogênica, parece ser um marcador do nível plasmático de estradiol na maioria das pacientes menopausadas; essa mesma faixa de pH em pacientes com concentração de estradiol compatíveis com idade reprodutiva poderia ser indicador da presença de vaginose bacteriana¹¹⁸.

Diversos outros agentes infecciosos tais como *Staphylococcus sp*, *Ureaplasma sp*, *Corynebacterium sp*, *Streptococcus sp*, *Enterococcus sp*, *Escherichia coli* e *Candida sp* podem também estar presentes juntamente com a flora normal, mas em pequeno número¹¹⁹. Fatores como uso de medicamentos antivirais, antibacterianos, antifúngicos, corticosteróides ou presença de condições imunossupressoras, muito comuns em pacientes HIV positivas, podem levar à alteração na flora natural e desenvolvimento de vaginose bacteriana. Essa condição não é caracterizada por resposta inflamatória, ao contrário das infecções causadas por *Trichomonas vaginalis*, *Candida sp* e Herpes¹¹⁹.

Existe ainda evidência de que o trato genital de pacientes menopausadas seja mais frequentemente colonizado por *Escherichia coli* do que o de mulheres em idade fértil¹²⁰.

2.5.7 - Outras infecções do trato genital: *Chlamydia trachomatis*, *Nesseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e *Candida sp.*

Diversos pesquisadores apontaram para o fato de que a detecção do HIV no trato genital é aumentada significativamente na presença de infecção por *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis*^{57,121}. Além disso, verifica-se que o tratamento dessas infecções está associado a redução significativa na concentração do RNA do HIV no sêmen e cérvix^{122,123}, embora estudo conflitante tenha demonstrado que em oito mulheres tratadas para gonorréia, a mediana da concentração do RNA do HIV aumentou em 0,7 log após o tratamento¹²⁴.

A tricomoníase, assim como a vaginose bacteriana, exerce discreta influência na detecção do HIV no trato genital (OR 1,0, IC 95% 0,7 - 3,2)⁵⁷. Isto pode ser explicado pelo fato dessas infecções estarem associadas à fraca resposta inflamatória. No entanto, Wang e colaboradores¹²² evidenciaram que o tratamento de tricomoníase sintomática em mulheres associa-se com redução de 0,6 log na concentração de RNA de HIV livre.

A candidíase vulvovaginal em mulheres HIV positivas é na grande maioria causada por *Candida albicans*, com prevalência entre 3 e 15%. As infecções por espécies não *albicans* respondem por cerca de 26% dos casos. A maioria dos estudos sugere que não existe diferença significativa na prevalência de infecção entre mulheres HIV positivas relativamente imunocompetentes e mulheres não infectadas por HIV, nem diferença na proporção de tipos desse fungo presentes nas infecções em mulheres HIV positivas, quando comparadas a pacientes soronegativas. Por outro lado, devido ao fato de essas mulheres muitas vezes fazerem uso constante de antibióticos, este pode ser um fator de confusão na determinação da prevalência de candidíase nesse grupo¹²⁵.

A candidíase vulvovaginal sintomática correlaciona-se positivamente com a excreção genital do HIV-1^{125,126} e está relacionada ao aumento da excreção (OR 1,8, IC 95% : 1,3 - 2,4)⁵⁷. Tal dado aponta para indícios de que a infecção por esse fungo esteja envolvida no aumento da replicação e excreção local do HIV^{127,128}.

2.6 - Formas de Análise da Excreção Genital do HIV-1

A literatura mundial descreve diversas técnicas de coleta de amostras genitais com o intuito de quantificar a excreção de HIV, cada uma delas com suas vantagens e limitações. O emprego de amostras de LCV têm como benefício o grande volume de amostra que se permite obter e a possibilidade de fracionamento desse material biológico em seus componentes celulares e acelulares. Como limitações, podemos citar a dificuldade em padronizar o método de coleta, a diluição variável do fluido vaginal, que pode ocorrer a cada coleta, e ainda a dificuldade na acurácia da quantificação do RNA do HIV na fração acelular (sobrenadante) do LCV⁶⁵. Para correta avaliação do fator de diluição decorrente da lavagem da mucosa vaginal interna, estudo conduzido por Bélec e colaboradores adicionou uma substância inerte (LiCl) no diluente da amostra (PBS) e determinou a concentração desta antes e depois da lavagem vaginal. Tal procedimento permite o cálculo do fator de diluição para cada amostra, sem interferir no desempenho das técnicas de amplificação do RNA do HIV^{96,129}.

Garantir que as secreções cervicovaginais obtidas das pacientes são livres de sêmen é essencial para evitar interpretações errôneas dos dados e obter informações fidedignas sobre a carga viral no trato genital e a presença de infecções e inflamações. Assim, diversos estudos utilizam-se de metodologias para detectar contaminação espermática, como a dosagem de Fosfatase Ácida Prostática e Antígeno Prostático Específico (PSA) no lavado cervicovaginal^{130,131}. No

entanto, esses métodos possuem baixa sensibilidade e especificidade, fazendo com que métodos baseados na detecção por Reação em Cadeia por Polimerase (PCR) do gene SRY, presente no cromossomo Y, constitua o procedimento laboratorial de escolha para a detecção de traços de sêmen em secreções cervicovaginais^{132,133}.

Importância do Estudo

3. Importância do estudo

Este estudo inédito procurou avaliar a influência da idade e de fatores ginecológicos relacionados ou não à menopausa com a excreção genital de HIV-1. Como o contato heterossexual é a forma de aquisição mais frequente no grupo de mulheres com idade acima dos 50 anos, é importante buscar melhor entendimento dos fatores envolvidos nessa forma de transmissão. Em revisão da literatura científica publicada até o momento não foram encontrados estudos que correlacionem a carga viral plasmática com a excreção cervicovaginal do vírus em pacientes menopausadas, comparando-as em tal aspecto a pacientes em idade fértil.

Procurou-se também avaliar a prevalência de outros fatores infecciosos e inflamatórios em mulheres menopausadas e em idade fértil e a associação destes com a excreção de HIV-1 na mucosa genital de mulheres em diferentes períodos de vida.

Objetivos

4. Objetivos

1. Comparar mulheres menopausadas e em idade fértil infectadas pelo HIV-1 em relação a características sócio-demográficas, variáveis de exposição ao HIV e alterações clínicolaboratoriais relacionadas à infecção propriamente dita e a outras condições ginecológicas;
2. Caracterizar a excreção genital do HIV-1 em mulheres menopausadas, comparando-a com a de pacientes em idade fértil por meio da quantificação do RNA do HIV-1 em lavado cervicovaginal;
3. Avaliar se a pós menopausa está associada à presença e intensidade da excreção genital do HIV-1;
4. Investigar fatores de natureza ginecológica ou relacionados à infecção pelo HIV que sejam independentemente associados à frequência e intensidade de excreção genital.

Métodos

5. Métodos

5.1 - Seleção das pacientes

Foram selecionadas para contato telefônico mulheres com cadastro no Serviço de Extensão ao Atendimento de pacientes com HIV/aids da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Casa da Aids), nascidas entre 30/06/1971 a 30/06/1987 para o grupo de pacientes em idade fértil (idade entre 19 e 35 anos até 30/06/2007), aqui denominadas gFérteis, e pacientes nascidas até 30/06/1956 (50 anos ou mais) para o grupo de pacientes menopausadas, denominadas gMenopausadas.

Os critérios de inclusão para ambos os grupos além da idade foram: infecção sorologicamente confirmada por HIV e estar em acompanhamento clínico na Casa da Aids. Foram excluídas do estudo pacientes ooforectomizadas ou histerectomizadas, em tratamento quimioterápico ou hormonal ou aquelas cujo estado clínico impedisse a coleta de informações ou de material biológico. Pacientes do grupo gFérteis que referiram ter ciclo menstrual irregular, que estivessem em gestação ou puerpério, ou ainda em uso de contraceptivos hormonais também foram excluídas. Da mesma forma, as pacientes com idade acima de 50 anos que referiram ter menstruação regular ou estarem em terapia de reposição hormonal foram também excluídas deste estudo.

Selecionaram-se 226 mulheres para o gMenopausadas, ou seja, com nascimento até 30/06/1956. Dessas, 86 não puderam ser localizadas para convite. Das 140 pacientes contactadas desse grupo, 17 não foram consideradas elegíveis, 35 apresentavam algum critério de exclusão e 15 recusaram-se a participar, principalmente citando sua dependência de terceiros ou participação em outros

protocolos de pesquisa. Assim sendo, 73 mulheres menopausadas participaram do estudo.

Das 282 mulheres em idade fértil inicialmente selecionadas, entramos em contato com as primeiras 191 pacientes constantes na listagem obtida, ordenada pela data da próxima consulta. Tal estratégia de amostragem foi escolhida tendo em vista que se desejava fazer coincidir a coleta das amostras biológicas genitais e sanguíneas, sendo que esta última geralmente ocorre por volta de 30 dias antes da consulta médica de rotina. Noventa e uma pacientes listadas não puderam ser localizadas ou não retornaram ligação (listagem continha telefone de recados). Das 100 pacientes com as quais entramos em contato, 10 não eram elegíveis, 11 apresentavam algum critério de exclusão e 6 se recusaram a participar. Ao todo, 73 mulheres em idade fértil participaram do estudo.

O fluxograma de convocação e seleção foi baseado nas recomendações STARD (*Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy*)^{134,135} e está ilustrado na figura 1.

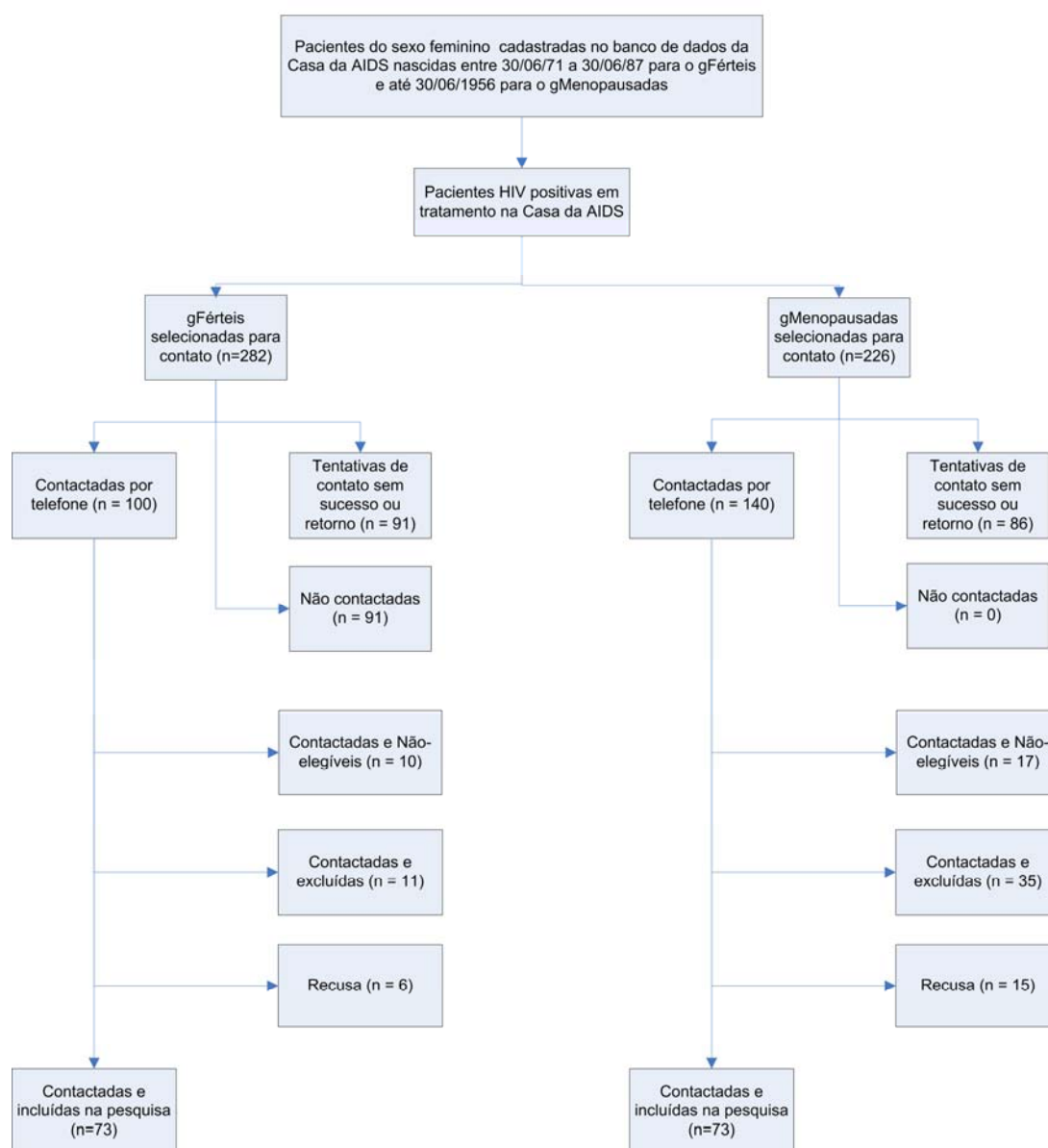


Figura 1 - Fluxograma de seleção e convocação de pacientes para o estudo, com os motivos de exclusão de casos, para os grupos gFérteis e gMenopausadas. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

Para pacientes que apresentaram interesse em participar, as questões do Anexo A (Formulário de Triagem de Pacientes) foram preenchidas pelo pesquisador, com o intuito de verificar a adequação da paciente aos critérios de inclusão e exclusão da pesquisa. O agendamento da entrevista e coleta foram feitos mediante checagem da data prevista para a coleta de sangue para determinação do número de linfócitos CD4+ periféricos e da carga viral plasmática de HIV, exames esses

periodicamente executados na rotina de acompanhamento ambulatorial das pacientes atendidas no serviço. Para as pacientes gFérteis, optou-se por padronizar o agendamento entre 15 a 21 dias após a última menstruação, o que corresponde à fase lútea do ciclo menstrual.

Quando a paciente se negava a participar do estudo, o Termo de Recusa (Anexo B) era preenchido e a paciente excluída da amostra.

5.2 - Confirmação do agendamento e instruções pré-coleta

Três dias antes da data prevista para coleta, as pacientes eram contactadas por telefone para confirmar o dia e horário do agendamento. Todas eram orientadas a se absterem de manter relação sexual, assim como a não utilizarem cremes, duchas ou óvulos intravaginais durante os três próximos dias até a coleta do material ginecológico.

5.3 - Preparo dos reagentes

A descrição detalhada do preparado dos reagentes utilizados na pesquisa encontra-se no Apêndice.

5.4 - Entrevista e Coleta do Material Biológico

Na data da coleta, todas as instruções contidas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo C) eram explicadas à paciente e sanadas dúvidas que estas eventualmente levantassem quanto aos procedimentos. Após completa compreensão e consentimento, o termo foi assinado pela paciente e pela pesquisadora.

Procedeu-se então ao preenchimento do formulário de entrevista (Anexo D) e identificação dos materiais para coleta ginecológica. Os materiais do *kit* de

coleta eram devidamente identificados com etiqueta contendo o nome completo da paciente e registro HC.

A ordem de coleta dos materiais obedeceu ao fluxo descrito na figura 2, a seguir:

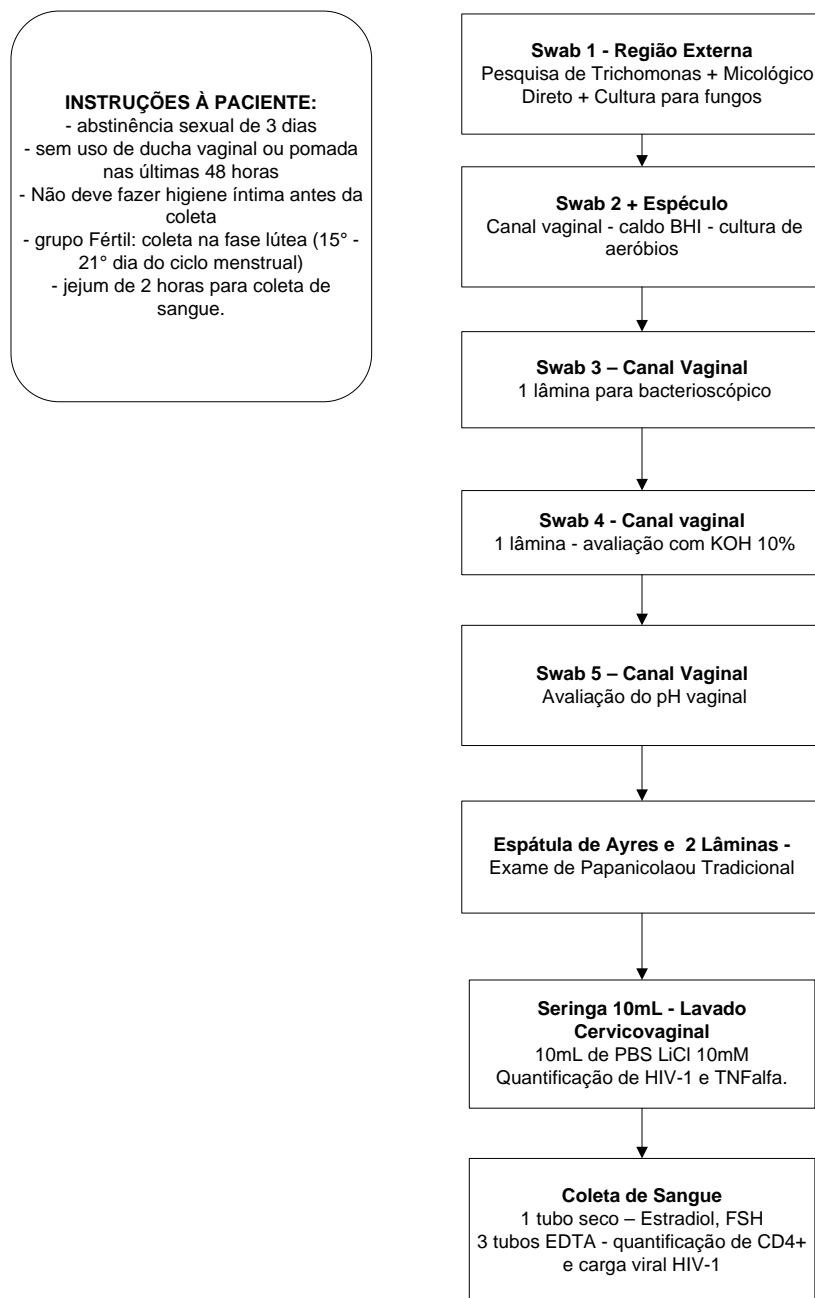


Figura 2 - Fluxograma de coleta de materiais biológicos, com detalhe enfatizando as instruções de coleta transmitidas às pacientes participantes do estudo. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

5.4.1 - Swab 1 para Exame a Fresco

A amostra foi coletada da parte externa da vagina (pequenos lábios, uretra e intróito vaginal) e imediatamente inoculada em solução salina (NaCl 0,9%). A amostra foi utilizada para exame microscópico direto para pesquisa de fungos, *Trichomonas vaginalis* e inoculação em meio *Sabouraud* para cultura de fungos.

5.4.2 - Swab 2 - Cultura de Aeróbios

Após introdução do espéculo, amostra da parede vaginal e fundo de saco foi coletada com *swab* para inoculação em caldo BHI para cultura de aeróbios. O caldo foi mantido a temperatura ambiente por no máximo 3 horas, até ser colocado em estufa a 37° C por 24 horas.

5.4.3 - Swab 3 - Bacterioscópico

A amostra foi coletada do fundo de saco e parede vaginal e realizado esfregaço diretamente em lâmina para coloração de Gram e análise microscópica. A lâmina foi armazenada em caçapa a temperatura ambiente até o momento da coloração.

5.4.4 - Swab 4 - pesquisa de aminas com KOH 10%

A amostra foi coletada com *swab* do fundo de saco e parede vaginal se a paciente não apresentasse conteúdo vaginal abundante (corrimento), sendo esse colocado em lâmina. Uma gota de KOH10% foi colocada na lâmina em contato com a amostra e analisada a eliminação de odor de aminas, característico de vaginose bacteriana. Os resultados foram registrados imediatamente no formulário de entrevista.

5.4.5 - *Swab 5* - análise de pH

Procedeu-se à coleta de amostra do conteúdo vaginal, que era imediatamente colocado em contato com o papel indicador de pH (Merck® 0 - 6 cod. 1095310001). A análise do pH foi feita pelo pesquisador no momento da coleta, comparando-se a coloração da amostra com os padrões de pH fornecidos pelo fabricante.

5.4.6 - Coleta de amostra para Citologia Cervicovaginal (Papanicolaou)

Com a extremidade arredondada da espátula de Ayre, procedeu-se à raspagem da mucosa do fundo de saco vaginal e preparação do esfregaço em lâmina. Com a outra extremidade, foram coletadas células da exocérvice e endocérvice e da mesma forma colocadas em lâmina, sendo aplicado fixador Kolpofix® (Kolplast Ltda.) e armazenamento para posterior coloração e análise. A coloração de Papanicolaou obedeceu critérios já estabelecidos¹³⁶.

5.4.7 - Coleta do Lavado Cervicovaginal (LCV), separação e armazenamento

Ainda com o espécuro, 10ml de PBS com LiCl 10mM foram inoculados na vagina, usando seringa descartável e, em seguida, aspirado todo o conteúdo. O lavado foi armazenado em tubo do tipo Falcon de 15ml em gelo até a centrifugação e separação.

Para separação do botão celular, o tubo foi submetido a centrifugação por 10 minutos a 800g a temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado em alíquotas de 1,0ml e armazenado a -80°C. O botão celular foi ressuspensado em 1,0ml de PBS livre de LiCl e armazenado à mesma temperatura. O sobrenadante foi utilizado para a análise de carga viral excretada, da concentração de Lítio para

correção da diluição e para dosagem de TNF- α . Já o botão celular foi utilizado para extração de DNA.

5.4.8 - Coleta de sangue, separação e armazenamento

Na mesma data da coleta de material ginecológico, procedeu-se também à coleta de sangue venoso para determinação da carga viral plasmática de HIV e do número de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ periféricos (executados no Laboratório de Investigação Médica em Virologia - LIM52 - HCFMUSP). A carga viral foi realizada a partir do *kit Cobas[®] Amplicor HIV Monitor version 1.5* - Roche, utilizando-se como amostra, plasma colhido em EDTA. Para a avaliação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, utilizou-se citômetro de fluxo FACSCalibur[®] BD *Immunocytometry Systems*. Para esse protocolo de pesquisa foram coletados também um tubo de sangue em EDTA e em tubo sem anticoagulante (Vaccuette, Greiner Bio-One Ref. 454036 - 4ml - K3 EDTA, Ref. 455092 - 9ml - Z Soro Ativador de Coágulo). O sangue colhido em EDTA foi utilizado para armazenamento de linfócitos, enquanto o sangue colhido em tubo seco foi utilizado para separação do soro e dosagem de Estradiol e Hormônio Folículo Estimulante (FSH).

5.5 - Separação e armazenamento de linfócitos

O sangue colhido em EDTA foi adicionado lentamente a um tubo cônico estéril de 15ml, contendo 4ml de Histopaque 1077 (Sigma, Cat. N° 10771 - 500ml), que foi submetido a centrifugação a 1900 *g* por 30 minutos. As células mononucleares separadas pelo gradiente de densidade foram transferidas com pipeta estéril tipo Pasteur para um tubo novo de 15ml. Após completar o volume de 15ml com PBS, o tubo foi centrifugado por 15 minutos à mesma velocidade e o sobrenadante foi desprezado, obtendo-se o precipitado celular. Este foi lavado

novamente, com a adição de 10ml de PBS, centrifugação por 10 minutos, sendo desprezado o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensão em 1ml de PBS e transferido para tubo de 1,5ml, ao qual foram adicionados 100µl de dimetil-sulfóxido (DMSO. Sigma, Cat. N° D8418) para armazenamento a -80°C.

5.6 - Avaliação da Carga Viral em Plasma e no LCV

A análise da carga viral foi realizada por meio do *kit Cobas® AmpliCor HIV Monitor version 1.5 - Roche Diagnostics, Chicago - EUA*, de acordo com as instruções do fabricante. Ambas as amostras foram analisadas, utilizando-se o método Ultrassensível, cuja sensibilidade é de 50 cópias/ml. Partindo-se de 500µl de plasma ou LCV, essas amostras foram centrifugadas por 60 minutos, a 4°C à rotação de 24000g para concentração das partículas virais. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado, adicionando-se então o tampão de lise, contendo o padrão de quantificação. Após o processo de lise, adicionou-se isopropanol para precipitação do RNA viral e centrifugação, conforme instruções do fabricante. O sobrenadante foi desprezado, adicionou-se 1ml de etanol e procedeu-se a nova centrifugação por 15 minutos para as amostras de LCV. O sobrenadante foi desprezado e centrifugado por mais 5 minutos na mesma velocidade, a fim de garantir a fixação do sedimento no tubo, já que esse é muito pequeno em amostras de LCV. Após a eliminação de todo o etanol restante, o sedimento foi ressuspensão em 100µl do diluente do kit.

Para fins estatísticos, as amostras de plasma e LCV, nas quais quantificação de RNA de HIV não foi possível por estar abaixo do limite de detecção do teste, esta foi reportada como 25 cópias/ml ou 1,4 log cópias/ml, de acordo com estudo previamente publicado⁴⁴.

5.7 - Dosagem do Lítio e cálculo do fator de diluição

A análise da concentração de Lítio no sobrenadante do LCV foi realizada por fotometria de chama em equipamento Celm FC-180, utilizando-se a mesma alíquota na qual foi realizada a carga viral em LCV. A curva-padrão foi construída nas concentrações 10mM, 7,5mM, 5mM, 2,5mM, a partir de solução estoque 100mM.

Para o cálculo do fator de diluição (fd), utilizou-se a fórmula matemática como previamente publicado¹²⁹:

$$fd = [Li]_1 / [Li]_1 - [Li]_2$$

Sendo:

[Li]₁ = concentração de lítio inicial (10mM)

[Li]₂ = concentração de lítio final (analisado por fotometria de chama)

As amostras cujos resultados estavam abaixo do limite de detecção do teste não foram corrigidas pelo fator de diluição.

5.8 - Dosagem de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)

A quantificação do TNF- α foi realizada no sobrenadante por ensaio imunométrico em fase sólida quimioluminescente (*TNF alpha* - LKNFZ *Immulite*[®] 1000 - DPC[®] Los Angeles, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Esse teste possui sensibilidade de 1,7pg/ml e linearidade até 1000pg/ml. O fator de diluição, obtido por meio da dosagem do Lítio, foi aplicado para correção da concentração de TNF- α nas amostras genitais.

5.9 - Dosagem de Estradiol e Hormônio Folículo Estimulante (FSH) no soro

As amostras de soro foram conservadas a -80°C até o momento da análise. A dosagem foi realizada por imunoensaio quimioluminescente por micropartículas, empregando o equipamento *Architect® ci8200 Abbott®* IL, EUA e os reagentes específicos para análise de FSH (Ref. 6C24) e Estradiol (Ref. 2k25) ambos da *Abbott® Laboratories Diagnostics Division*, IL, EUA. Os valores de referência e sensibilidade para cada analito encontram-se na tabela 2:

Tabela 2 - Valores de Referência e Sensibilidade Analítica para dosagem de FSH e Estradiol em equipamento Architect® ci8200 Abbott®

	Fase Lútea	Pós-Menopausa	Sensibilidade
FSH	Até 14mUI/ml	Superior a 35mUI/ml	0,05mUI/ml
Estradiol	53 a 191pg/ml	Inferior a 18 a 110pg/ml	10pg/ml

Para fins estatísticos, utilizou-se o valor de 5 pg/ml para as amostras com estradiol inferior ao limite de detecção do teste.

5.10 - Extração do DNA do botão celular do LCV e pesquisa do gene SRY para avaliação de contaminação espermática

Garantir que as secreções cervicovaginais obtidas das pacientes estejam livres de sêmen é essencial para evitar interpretações errôneas dos dados e assim obter informações fidedignas sobre a excreção viral no trato genital e a presença de infecções e inflamações.

Dessa forma, inicialmente foi extraído o DNA da porção celular das amostras de LCV, empregando-se para tal o *kit* comercial *QIAamp DNA Mini Kit (50)* QIAGEN Cat. No. 51304, conforme especificações do protocolo. Para a detecção do gene SRY, foi utilizado 1 μL do DNA extraído do botão celular do LCV para realização da PCR, conforme protocolo já padronizado e publicado por Domenice e colaboradores¹³⁷.

5.11 - Pesquisa de *Chlamydia trachomatis* (CT) e *Neisseria gonorrhoeae* (NG) por PCR

Alíquota do mesmo DNA extraído, como anteriormente descrito, foi utilizada para pesquisa de CT e NG, por meio de amplificação genômica de sequências específicas desses agentes microbianos, pela técnica de PCR, utilizando-se o *kit* Cobas AmpliCor CT/NG system (*Roche Diagnostic Systems, Branchburg, EUA*).

5.12 - Classificação da Microflora Vaginal

A fim de agrupar as pacientes de acordo com a composição da microbiota vaginal observada na microscopia, adotou-se a classificação em tipos I, II e III de acordo com Amaral e colaboradores¹³⁸. Foi considerada flora Tipo I, quando foram observados 80% ou mais de *Lactobacillus sp* no exame microscópico; Tipo II, quando 25% a 79% das bactérias presentes são *Lactobacillus sp* e Tipo III, quando estes representavam até 25% das bactérias presentes.

5.13 - Levantamento de informações clínicas a partir do prontuário médico

As informações como categoria de exposição ao HIV, uso de terapia antirretroviral e *status* clínico foram obtidas através de levantamento de dados constantes do prontuário de cada paciente admitida ao estudo, trabalho esse realizado pelo médico orientador e pela pesquisadora executante deste projeto, com auxílio de aluno de medicina, bolsista de iniciação científica.

O momento do diagnóstico da infecção pelo HIV foi definido pela data de coleta da primeira amostra de sangue que resultou reagentes ao teste sorológico confirmatório empregando-se o método de *Western blot*. Os critérios de definição de casos de aids para as pacientes envolvidas na pesquisa foram baseados nos

adotados pelo Ministério da Saúde do Brasil para definição de caso em indivíduos com treze (13) anos de idade ou mais, a saber: existência de dois (2) testes de triagem reagentes ou um (1) confirmatório para detecção de anticorpos anti-HIV + evidência de imunodeficiência com diagnóstico de pelo menos uma (1) doença indicativa de aids e/ou contagem de linfócitos TCD4+ com resultado inferior a 350 células/mm³¹³⁹. Para determinação do tempo do diagnóstico de aids, verificou-se o tempo decorrido entre a data de confirmação do sorodiagnóstico e a data em que foi detectada doença definidora de aids ou número de linfócitos T CD4+ inferior a 350 células/mm³.

Para informação da terapia antirretroviral em uso no momento da coleta, os medicamentos foram classificados de acordo com sua classe terapêutica, de acordo com o quadro 1 abaixo¹⁴⁰.

Quadro 1 - Medicamentos utilizados na terapia antirretroviral de pacientes em tratamento no Brasil. Ministério da Saúde, Brasília, 2006.

Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo e Nucleotídeo (ITRN)				Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Análogos de Nucleosídeo (ITRNN)			
ABC	Abacavir	3TC	Lamivudina	EFZ	Efavirenz	NVP	Nevirapina
DDI	Didanosina	TDF	Tenofovir				
d4T	Estavudina	AZT/ZDV	Zidovudina				
Inibidores de Protease e Fusão (IP)							
APV	Amprenavir	IDV	Indinavir	NFV	Nelfinavir	SQV	Saquinavir
ATV	Atazanavir	LPV/r*	Lopinavir/r*	RTV	Ritonavir	ENF	Enfuvirtida (T20)
*r = ritonavir como adjuvante farmacológico							
FONTE: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para Terapia Antirretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV, 2006 ¹⁴⁰ .							

5.14. Análise dos Resultados

Os dados obtidos nas entrevistas, na inspeção ginecológica e nos exames laboratoriais realizados foram inseridos em banco de dados informatizado, empregando-se o programa computacional Microsoft® Office Excel 2003.

Os grupos gMenopausadas e gFérteis foram comparados no tocante às variáveis sociodemográficas, queixas e sinais clínicos, à ocorrência de infecção ou inflamação genital, a alterações na citologia oncótica vaginal e às concentrações de estradiol e FSH no sangue.

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa computacional Minitab (Release 14 - Statistical Software) e SPSS (Versão 15). Para a comparação entre grupos, utilizaram-se os testes de qui-quadrado ou teste exato de Fisher para avaliação das variáveis qualitativas, enquanto para as variáveis contínuas foram empregados os testes Kruskal-Wallis ou t-Student, após verificação de normalidade na distribuição da variável pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Foram ainda utilizadas regressões lineares para análise de correlação (teste de correlação de Pearson) entre variáveis: carga viral plasmática e excreção genital do RNA viral para cada um dos grupos de pacientes estudadas.

A prevalência de excreção genital do HIV foi estimada em ambos os grupos, com base na frequência de detecção de RNA viral no LCV com cálculo dos respectivos intervalos de confiança 95%. A seguir, comparou-se a intensidade de excreção entre ambos os grupos e buscou-se avaliar a correlação entre a excreção genital do HIV e a carga viral plasmática.

Para buscar responder aos objetivos do estudo, definiu-se como desfecho de interesse a presença de excreção cervicovaginal de HIV-RNA, caracterizada de forma dicotômica pela detecção de sequências genômicas virais no LCV (sim ou não). A partir disso, foram realizados cruzamentos entre a variável desfecho e cada

variável explanatória, conforme a categorização adotada no estudo, testando-se a associação entre elas pelos testes qui-quadrado ou exato de Fisher. Para avaliação das variáveis numéricas, foi empregado o teste de Mann-Whitney.

Em seguida, passou-se ao modelo de regressão logística múltipla com intuito de identificar os fatores independentemente associados à excreção cervicovaginal de HIV. Na construção de tal modelo foram incluídas todas as variáveis que apresentaram níveis de significância abaixo de 0,2 ($p < 0,2$) na análise bivariada inicial. Além disso, a variável grupo de estudo (gMenopausadas ou gFérteis) foi introduzida no modelo, independentemente do valor de p para ela observado à análise bivariada, uma vez que o principal objetivo do presente estudo consistia em buscar identificar se haveria diferença entre a excreção cervicovaginal de HIV-RNA entre mulheres menopausadas e aquelas em idade fértil, após controle de possíveis variáveis de confusão. Calcularam-se então, para cada uma das variáveis explanatórias, os *odds ratios* e seus respectivos intervalos de confiança 95% como medidas de associação entre essas e a excreção cervicovaginal de HIV-RNA. Permaneceram no modelo final as variáveis que apresentaram níveis de significância abaixo de 5% ($p < 0,05$).

Para as mulheres estudadas que exibiram excreção cervicovaginal de HIV-RNA, buscou-se a seguir identificar eventual associação entre a intensidade dessa e outras variáveis de interesse. Para tal, as concentrações de HIV-RNA detectadas nas amostras de LCV foram confrontadas com variáveis numéricas de interesse, por meio da correlação de Pearson e com as variáveis categóricas, usando-se o teste t-Student. Para essa avaliação foi finalmente construído um modelo de regressão linear múltipla, a partir das variáveis explanatórias, cujos níveis de significância estatística resultaram inferiores a 0,2 ($p < 0,2$), além da variável grupo de estudo

(gMenopausadas ou gFérteis), com permanência no modelo final daquelas que apresentaram nível de significância abaixo de 5% ($p < 0,05$).

5.15. Aspectos Éticos

A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob número 477/05 (Anexo E) .

Resultados

6. Resultados

6.1 - Dados sociodemográficos

A tabela 3 resume as características sociodemográficas dos grupos de pacientes estudadas. As pacientes menopausadas apresentaram significativamente menos anos de estudo. No tocante à cor da pele auto-referida, não se observou diferença entre os grupos. As mulheres gMenopausadas estavam sem menstruar, em média, há 8,17 anos (12 meses a 31,2 anos).

Tabela 3 - Características sociodemográficas das pacientes dos grupos gMenopausadas e em gFérteis. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

	gMenopausadas (n = 73)	gFérteis (n = 73)	<i>p</i>
Idade (anos)			
Média (DP)	56,5 (4,41)	31,6 (3,07)	<0,001†
Escolaridade (anos)			
Mediana (intervalo)	5 (4 a 11)	11 (8,5 a 19)	<0,001‡
Cor da pele autoreferida (n, %)			
Branca	37 (50,7%)	43 (58,9%)	0,484 [¶]
Parda	28 (38,4%)	24 (32,9%)	
Negra	8 (11%)	5 (6,8%)	
Amarela	–	1 (1,4%)	

† t-Student; ‡Kruskal-Wallis; [¶]qui-quadrado

6.2 - Dados da Entrevista, Categoria de Exposição e Exame Físico

O comportamento sexual referido na entrevista por 145 mulheres foi heterossexual, havendo apenas uma mulher do gFérteis que referiu ser homossexual. Com relação à categoria de exposição, a aquisição por via sexual do HIV prevaleceu como a forma mais comum, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos menopausadas e férteis. Os dados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Categorias de exposição levantadas em prontuários das pacientes dos grupos gMenopausadas e gFérteis. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

	gMenopausadas (n = 73)	gFérteis (n = 73)	<i>p</i>
Sexual	55 (75,3%)	61 (83,6%)	0,236 ^α
Transfusão sanguínea (antes de 1992)	3 (4,1%)	—	
Usuária de drogas endovenosas	—	1 (1,4%)	
Ignorada	9 (12,3%)	5 (6,8%)	
Não-informada	5 (6,8%)	6 (8,2%)	

^αqui-quadrado

O uso de antibióticos nas 48 horas que antecederam o exame foi semelhante entre os grupos (4 gFérteis e 5 gMenopausadas), assim como o uso de creme vaginal 15 dias antes da coleta (4 gFérteis e 2 gMenopausadas). As queixas clínicas genitais estão resumidas na tabela 5.

Tabela 5 - Queixas clínicas genitais relatadas nas entrevistas entre os grupos gMenopausadas e gFérteis. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

	gMenopausadas (n = 73)	gFérteis (n = 73)	<i>p</i>
Disúria	5 (7%)	8 (11%)	0,383 ^α
Dispareunia	18 (24,7%)	18 (24,7%)	1,0 ^α
Dor pélvica	8 (11%)	18 (24,7%)	0,031 ^α
Prurido vaginal	5 (7%)	23 (31%)	<0,001 [§]
Corrimento vaginal	11 (15%)	35 (48%)	<0,001 ^α

^αqui-quadrado; [§]teste exato de Fischer

Dispareunia foi uma queixa frequente; no entanto, não se observou diferença significativa entre os grupos. No gFérteis, 18 mulheres queixaram-se de dor pélvica, enquanto no gMenopausadas apenas 8 apresentaram essa queixa ($p=0,031$). Quando os dois grupos foram considerados conjuntamente, 11 (42%) das 26 mulheres com dor pélvica apresentavam dispareunia, enquanto tal sintoma foi relatado por apenas 25 (21%) das 120 mulheres sem dor pélvica ($p=0,02$). Prurido e corrimento vaginal foram queixas relatadas com maior frequência no gFérteis do que no gMenopausadas ($p<0,001$).

Os dados referentes à presença de corrimento vaginal no momento da coleta e à observação de lesões genitais em vulva, região perianal ou parede vaginal estão sumarizados na tabela 6. Não houve diferença entre os grupos quando se comparou o tipo de lesão e nem associação entre a presença dessas e a queixa de dispareunia; houve esse sintoma e lesão concomitante em apenas 8 mulheres, sintoma sem lesão em 28 mulheres e lesão sem sintoma em 22 mulheres (NS, $p=0,77$).

Tabela 6 - Inspeção genital das pacientes dos grupos gMenopausadas e gFérteis. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

	gMenopausadas (n = 73)	gFérteis (n = 73)	p^{χ^2}
Presença de corrimento vaginal	8 (11%)	36 (49,3%)	<0,001
Lesões genitais			0,436
Ausentes	59 (80,8%)	57 (78,1%)	
Verrucosas	6 (8,2%)	10 (13,7%)	
Ulceradas	8 (11%)	5 (6,8%)	
Rágades	—	1 (1,4%)	

χ^2 qui-quadrado

6.3 - Definição do tempo de diagnóstico da infecção e *status* clínico (“aids” e “não-aids”)

As mulheres do gMenopausadas foram diagnosticadas como soropositivas para o HIV há 10,2 anos (mediana), enquanto as do gFérteis o foram há 7,4 anos, havendo diferença significativa entre os grupos ($p=0,001$).

Das pacientes do gFérteis, 51 (69,9%) já haviam recebido o diagnóstico de aids quando foram incluídas nesta pesquisa, enquanto no gMenopausadas, 64 (87,7%) haviam recebido o diagnóstico de aids, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p = 0,015$).

O tempo de diagnóstico de aids também foi maior nas mulheres menopausadas (média de 8,04 anos, DP = 2,77anos) do que nas em idade fértil (média de 5,85 anos, DP=3,11anos, $p<0,001$). Entretanto, os tempos entre os

diagnósticos de HIV e de aids foram semelhantes entre os grupos, sendo a mediana de 0,123 anos (45 dias) e o percentil 75 de 1,98 anos no gMenopausadas (n=64) e de 0,252 anos (92 dias) e 3,64 anos, respectivamente, entre as mulheres em idade fértil (n=51) (p=0,193). A proporção de mulheres que desenvolveu aids em até 365 dias após o diagnóstico da infecção também foi semelhante entre os grupos, 66% (42/64) no gMenopausadas e 59% (30/51) no gFérteis (p=0,454).

Tabela 7 - Tempo de diagnóstico e *status* clínico em pacientes dos grupos gMenopausadas e gFérteis. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

	gMenopausadas (n = 73)	gFérteis (n = 73)	p
Tempo de diagnóstico de infecção por HIV em anos (mediana)	10,2	7,4	<0,001‡
Idade ao diagnóstico de infecção por HIV (média/DP)	45,9 (12,8)	23,9 (3,4)	<0,001†
Diagnóstico de aids	87,7%	69,9%	0,015‡
Tempo de diagnóstico de aids em anos (média/DP)	8,04 (2,77)	5,85 (3,11)	<0,001†
Tempo entre o diagnóstico da infecção por HIV e progressão para aids (mediana/percentil 75)	45 dias (1,98 anos) n = 64	92 dias (3,64 anos) n = 51	0,193‡
Proporção de pacientes que desenvolveram aids em até 365 dias após o diagnóstico da infecção por HIV	66% (42/64)	59% (30/51)	0,454‡

‡Kruskal-Wallis; † t-Student; ‡qui-quadrado

6.4 - Terapias antirretrovirais em uso no momento da coleta de material biológico para este estudo

As pacientes dos grupos gFérteis e gMenopausadas foram também classificadas de acordo com o uso de terapia antirretroviral na data da coleta, assim como os tipos de medicamentos utilizados. Os dados estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Classificação das pacientes dos grupos gMenopausadas e gFérteis de acordo com a terapia antirretroviral em uso no momento da coleta. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

	gMenopausadas (n = 73)	gFérteis (n = 73)	p
Sem uso de antirretroviral	12 (16,4%)	19 (26,0%)	0,122 ^α
Em uso de antirretroviral			
2ITRN + 1ITRNN*	24 (32,9%)	29 (39,7%)	
2ITRN + 1IP*	15 (20,5%)	14 (19,2%)	
2ITRN + 2IP	4 (5,5%)	6 (8,2%)	
3ITRN + 1IP	10 (13,7%)	2 (2,7%)	
3ITRN + 2IP	2 (2,7%)	3 (4,1%)	
1ITRN + 1ITRNN	1 (1,4%)	—	
2ITRN + 1ITRNN + 1IP	1 (1,4%)	—	
3ITRN + 1IP + 1ITRNN	1 (1,4%)	—	
3ITRN + 1ITRNN	3 (4,1%)	—	

^αqui-quadrado

*Terapias de 1ª escolha;

ITRN - Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo e Nucleotídeo; ITRNN - Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogos de Nucleosídeo; IP - Inibidores da Protease

Os resultados demonstraram não haver diferença significativa no número de pacientes em uso ou não de antirretrovirais entre os grupos. No entanto, quando agrupamos apenas as pacientes em uso de medicamento anti-HIV e classificamos as drogas em 1ª escolha (**2ITRN + 1ITRNN** ou **2ITRN + 1IP** - em negrito na tabela 8) ou esquemas de resgate (demais medicamentos), verificamos que as pacientes do gMenopausadas encontravam-se em uso mais frequente desse tipo de terapia, quando comparadas às pacientes do gFérteis (tabela 9), embora tal diferença não tenha se mostrado significativa ($p = 0,066$).

Tabela 9 - Terapia antirretroviral em uso e classificação dos esquemas terapêuticos em 1ª escolha ou resgate em pacientes gMenopausadas e gFérteis. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

	gMenopausadas (n = 73)	gFérteis (n = 73)	p
Sem uso de antirretroviral	12 (16,4%)	19 (26,0%)	0,066 ^α
Em uso de antirretroviral			
1ª Escolha	39 (53,4%)	43 (58,9%)	
Esquemas de resgate	22 (30,1%)	11 (15,1%)	

^αqui-quadrado

6.5 - Avaliação hormonal

Com o intuito de confirmar o *status* hormonal das pacientes incluídas nos grupos gFérteis e gMenopausadas, determinamos as concentrações séricas de estradiol e FSH. Conforme esperado, as medianas das concentrações ilustradas nos gráficos 3 e 4 foram significativamente menores para o estradiol no gMenopausadas e menores para o FSH no gFérteis. Ainda neste grupo, as concentrações de estradiol e FSH variaram, respectivamente, de inferior a 10pg/ml até 418pg/ml (mediana 130pg/ml) e de 0,7 a 13mUI/ml (mediana 4,1mUI/ml). Já no gMenopausadas, as concentrações desses hormônios variaram de inferior a 10pg/ml até 205pg/ml (mediana 5pg/ml) para o estradiol e de 15 a 159mUI/ml (mediana 61,15 mUI/ml) para o FSH.

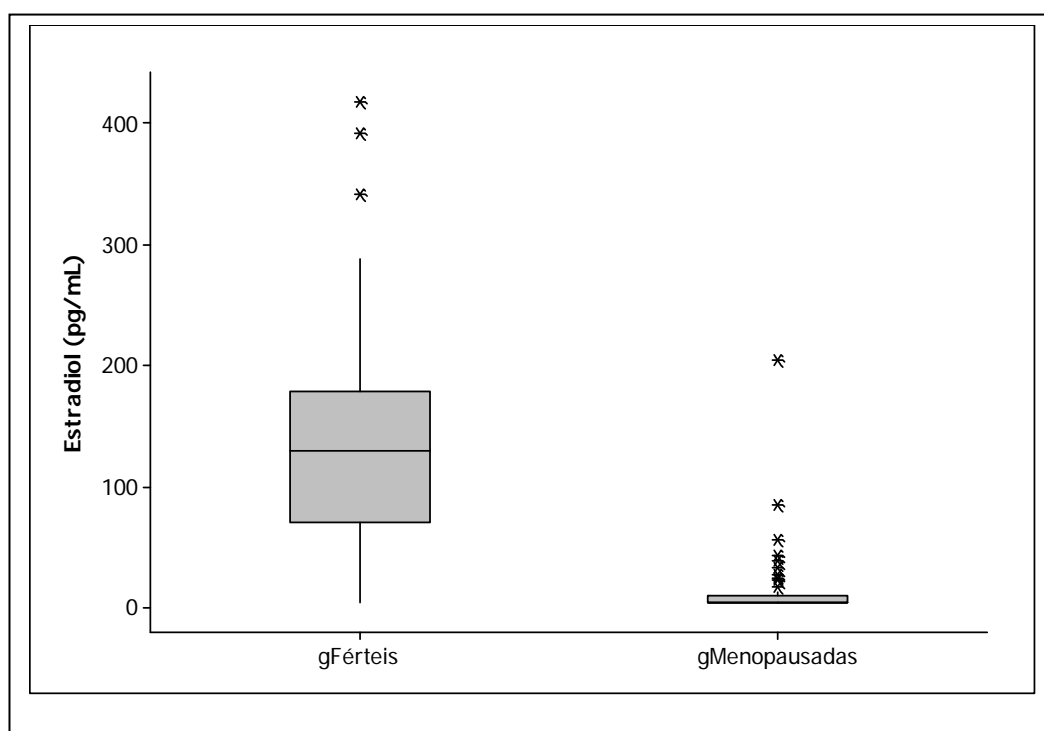


Gráfico 3 - Distribuição das concentrações de Estradiol (pg/ml) em pacientes dos grupos gFérteis e gMenopausadas ($p < 0,001$). Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

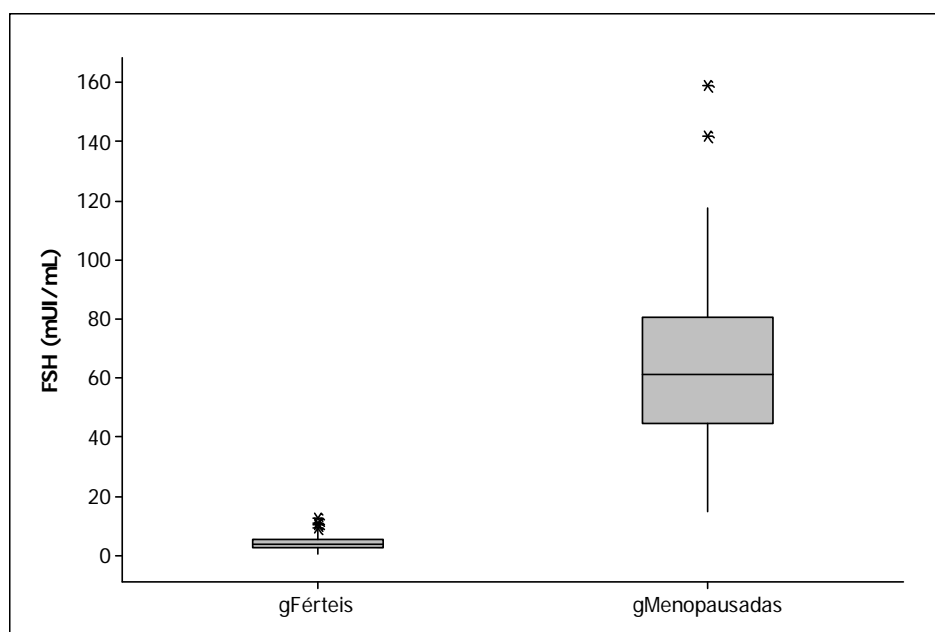


Gráfico 4 - Distribuição das concentrações de FSH (mUI/ml) em pacientes dos grupos gFérteis e gMenopausadas ($p < 0,001$). Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

6.6 - Avaliação microbiológica e da citologia oncótica cervicovaginal

No tocante à avaliação microscópica, embora tenha sido frequentemente detectada flora mista em pacientes de ambos os grupos (composta por bacilos Gram-negativos, Gram-positivos e cocobacilos Gram-negativos), houve diferença apenas em relação à presença de bacilos Gram-positivos, com maior frequência dessas bactérias entre as mulheres do gFérteis. Esses e outros achados estão sumarizados na tabela 10.

Não foram observados cocos ou diplococos Gram-negativos intra ou extracelulares em nenhuma das amostras avaliadas. Conforme esperado, houve diferença significativa na presença de células profundas entre os grupos, estando essas mais presentes no gMenopausadas ($p < 0,001$). Da mesma forma, os bacilos de Doderlëin foram mais frequentes no gFérteis ($p < 0,001$), assim como o pH vaginal nesse grupo foi significativamente mais baixo (4,5 gFérteis x 5,9 gMenopausadas,

$p < 0,001$). Houve diferença com relação à presença de *Gardnerella vaginalis* ($p = 0,028$), leveduras ($p = 0,007$), positividade ao teste das aminas com KOH 10% ($p = 0,016$) e positividade aos critérios de Amsel ($p = 0,004$), com maior frequência desses achados entre pacientes do gFérteis. Apenas uma amostra, de paciente do gFérteis, apresentava *Trichomonas vaginalis*.

Tabela 10 - Resultados do exame microscópico e da classificação do tipo de flora pelo método de coloração de Gram, exame direto, KOH 10%, cultura de fungos, pH e critérios de Amsel, entre os grupos gMenopausadas e gFérteis. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

	gMenopausadas (n = 72)*	gFérteis (n = 73)	p
Tipo de Flora			<0,001\square
1	–	1 (1,4%)	
2	4 (5,6%)	51 (69,9%)	
3	68 (94,4%)	21 (28,8%)	
Células profundas			<0,001\square
0	1 (1,4%)	38 (52,1%)	
1+	62 (86,1%)	34 (46,6%)	
2+	8 (11,1%)	1 (1,4%)	
3+	1 (1,4%)	–	
Bacilos de Doderlêin	4 (5,6%)	52 (71,2%)	<0,001\square
Leucócitos			0,875\square
1+	26 (36,1%)	28 (38,4%)	
2+	43 (59,7%)	43 (58,9%)	
3+	3 (4,2%)	2 (2,7%)	
<i>Gardnerella vaginalis</i>	2 (2,8%)	9 (12,3%)	0,028\square
Leveduras (exame direto)	6 (8,3%)	18 (24,7%)	0,007\square
<i>Trichomonas vaginalis</i> (exame direto)	–	1 (1,4%)	0,994\square
Teste KOH 10% positivo	1 (1,4%)	8 (11,0%)	0,016\square
Cultura de Fungos			0,03\square
Sem crescimento	66 (91,7%)	55 (75,3%)	
<i>Candida albicans</i>	4 (5,6%)	12 (16,4%)	
<i>Candida</i> não-albicans	2 (2,8%)	6 (8,2%)	
pH (média e DP)	5,9 (0,6)	4,5 (0,5)	<0,001\dagger
Positividade do Critério de Amsel	–	8 (11%)	0,004\square

\square qui-quadrado; $\$$ teste exato de Fischer; \dagger t-Student

*Em virtude de dor intensa, uma paciente do gMenopausadas não permitiu a coleta da amostra, ficando o grupo, portanto, com 72 mulheres para essa avaliação.

Na cultura de fungos, verificou-se isolamento de *Candida sp* em 24,6% das amostras genitais de pacientes do gFérteis e em 8,2% das pacientes do gMenopausadas, diferença esta estatisticamente significativa ($p=0,03$). Cabe ressaltar que a espécie mais frequentemente identificada foi a *C. albicans* em ambos os grupos (tabela 10).

Os resultados do exame de citologia oncológica cervicovaginal podem ser verificados na tabela 11. A maioria das pacientes de ambos os grupos apresentou citologia atípica sem evidências de malignidade (classe II), sendo que 8 pacientes do gFérteis e 3 do gMenopausadas apresentaram células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), não havendo diferença entre os grupos ($p=0,139$).

Tabela 11 - Achados da citologia oncológica cervicovaginal em pacientes dos grupos gMenopausadas e gFérteis. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

	gMenopausadas (n = 72)*	gFérteis (n = 73)	p
Classe I	4 (5,6%)	2 (2,7%)	0,139 [□]
Classe II	61 (84,7%)	60 (82,2%)	
Classe II + Atrofia/hipotrofia	3 (4,2%)	—	
ASCUS	3 (4,2%)	8 (11%)	
Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau	1 (1,4%)	3 (4,1%)	

[□]qui-quadrado

*Em virtude de dor intensa, uma paciente do gMenopausadas não permitiu a coleta dessa amostra, ficando esse grupo, portanto, com 72 mulheres para essa avaliação.

6.7 - Atividade sexual por ocasião da inclusão no estudo

Através de levantamento de dados do prontuário ginecológico ou ligações telefônicas (para aquelas cuja informação não estava disponível) foi possível obter essa informação das 146 pacientes estudadas.

Dentre as pacientes em idade fértil, 87,7% (64/73) relataram estar em atividade sexual por ocasião de sua inclusão no estudo, enquanto no gMenopausadas, apenas 21,9% (16/73) informaram ter vida sexual ativa, sendo essa diferença significativa ($p<0,001$). Este dado pode contribuir para melhor elucidação

da maior prevalência de infecções e inflamações genitais nas pacientes em idade fértil.

6.8 - Pesquisa do gene SRY para detecção de contaminação espermática dos lavados cervicovaginais

O fragmento de 778pb, específico do gene SRY presente exclusivamente no cromossomo Y, não foi encontrado em nenhuma das 146 pacientes estudadas, demonstrando assim não haver evidência de contaminação espermática nas amostras de LCV analisadas. Desse modo o conjunto da amostra de pacientes admitidas no estudo pode ser analisado quanto a excreção cervicovaginal de HIV e fatores a ela relacionados.

6.9 - Pesquisa de *Chlamydia trachomatis* (CT) e *Neisseria gonorrhoeae* (NG) por PCR

Apenas uma paciente do gFérteis apresentou resultado positivo para a pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, enquanto no gMenopausadas, uma paciente foi positiva para a pesquisa dos dois agentes, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos, no tocante a frequência de detecção dessas coinfeções genitais.

6.10 - Cálculo do fator de diluição do lavado cervicovaginal a partir da aferição da concentração de Lítio

As amostras de LCV, obtidas pela infusão de tampão PBS com 10mM de LiCl, foram utilizadas para cálculo do fator de diluição com base na concentração de lítio. A mediana dos valores de lítio em ambos os grupos foi de 8,2mM (mínimo de

4mM, máximo de 9,8mM), não havendo diferença entre eles (Kruskal-Wallis). O fator de diluição calculado variou de 1,7 a 50, com mediana de 5,6.

6.11 - Avaliação das concentrações de TNF- α no lavado cervicovaginal

Na determinação das concentrações de TNF- α aplicou-se a correção pelo fator de diluição acima descrito, sendo assim expressas como TNF- α (c). Essas variaram de 21,2 a 675ng/ml, com mediana de 82,5ng/ml, não tendo sido verificado diferença significativa entre os grupos ($p=0,8$, gráfico 3). Também não houve diferença nas concentrações de TNF- α (c), quando confrontadas com a positividade do critério de Amsel ($p=0,724$), à presença de leveduras ao micológico direto ($p=0,135$) ou à cultura de fungos ($p=0,317$), nem tampouco em relação ao achado de *Gardnerella vaginalis* no exame microscópico ($p=0,686$).

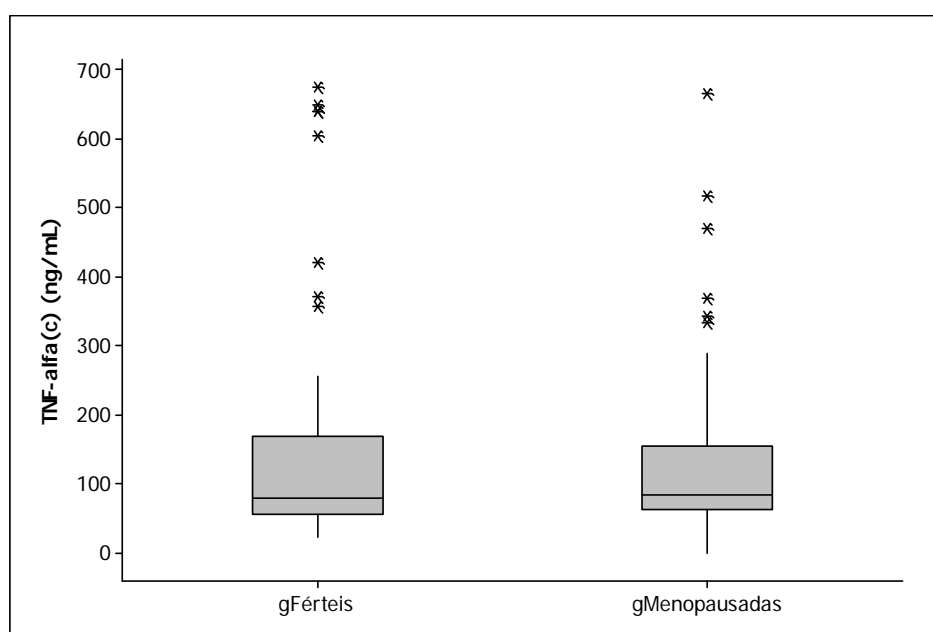


Gráfico 5 - Concentrações de TNF- α corrigidas pelo fator de diluição do LCV estabelecido pela concentração de lítio na amostra (TNF- α (c), $p=0,8$), nas pacientes dos grupos gFérteis e gMenopausadas. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007

6.12 - Avaliação do *status* imunológico e da carga plasmática viral do HIV

A quantificação do RNA viral plasmático foi semelhante nos dois grupos, com mediana de 1,4 log cópias/ml ($p=0,404$). De modo análogo, as determinações

de linfócitos T CD4+ periféricos também foram semelhantes, com mediana de 518 células/ml no gFérteis e 505 células/ml no gMenopausadas ($p=0,632$). A mediana da contagem de linfócitos CD8+ foi de 756 células/ml no gFérteis e 803 células/ml no gMenopausadas ($p=0,512$).

6.13 - Caracterização da excreção de HIV-RNA em lavados cervicovaginais entre as pacientes menopausadas e as em idade fértil

Após correção pelo fator de diluição e conversão logarítmica, verificou-se que a excreção genital de HIV no LCV foi semelhante, com mediana de 1,4 log de cópias/ml em ambos os grupos ($p=0,587$) como mostra o gráfico 6.

Doze (17,8%, IC95% 9,8 – 28,5%) pacientes do gMenopausadas e 16 (21,9%, IC95% 13,1 – 33,1%) pacientes gFérteis exibiram excreção genital de HIV pela análise do RNA viral no LCV ($p=0,678$). Já no que se refere à viremia, ocorreram 25 (34,2%, IC95% 23,5 – 46,3%) casos com carga viral detectável nas mulheres menopausadas e 31 (42,5%, IC95% 31 – 54,6%) nas pacientes do grupo gFérteis ($p=0,395$). Apenas 3 pacientes apresentaram excreção genital de HIV-RNA na ausência de carga viral plasmática detectável, sendo duas menopausadas e uma em idade fértil (2%, IC95% 0,4 – 5,8%).

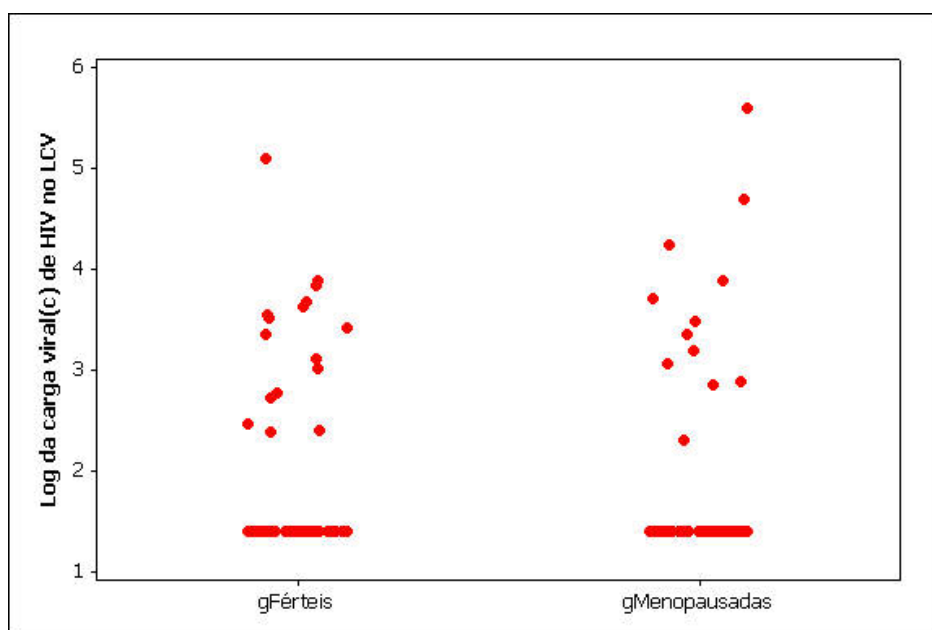


Gráfico 6 - *Dot-plot* do logaritmo da concentração de RNA viral no LCV (corrigido pelo fator de diluição) nas pacientes dos grupos gFérteis e gMenopausadas. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

No gráfico 7, apresenta-se a correlação entre a carga viral plasmática e a obtida no LCV das pacientes dos grupos gFérteis ($r = 0,684$, $t = 7,89$) e gMenopausadas ($r = 0,658$, $t = 7,36$). Já o gráfico 8 inclui dados apenas das pacientes com excreção genital detectável, não havendo diferença significativa nos coeficientes de correlação, quando se excluíram as pacientes com carga viral genital indetectável. Conclui-se pela existência de correlação linear significativa entre a carga viral plasmática e a excreção genital do HIV em ambos os grupos ($p < 0,01$).

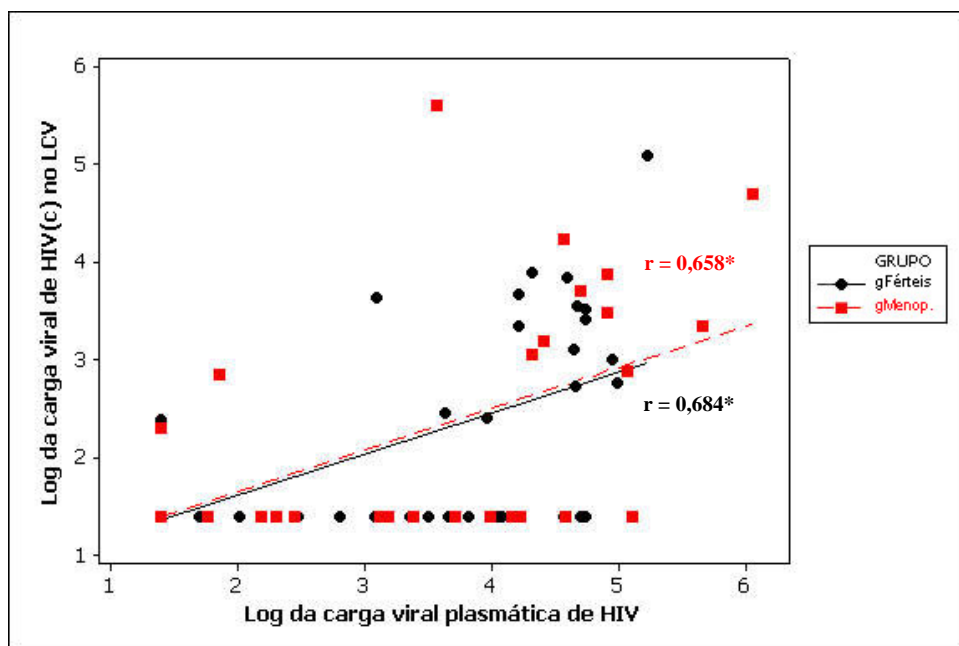


Gráfico 7 - Correlação entre excreção genital de HIV-RNA e a carga viral plasmática em pacientes dos grupos gMenopausadas e gFérteis. As linhas referem-se à regressão linear obtida para cada grupo. * $p < 0,01$. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

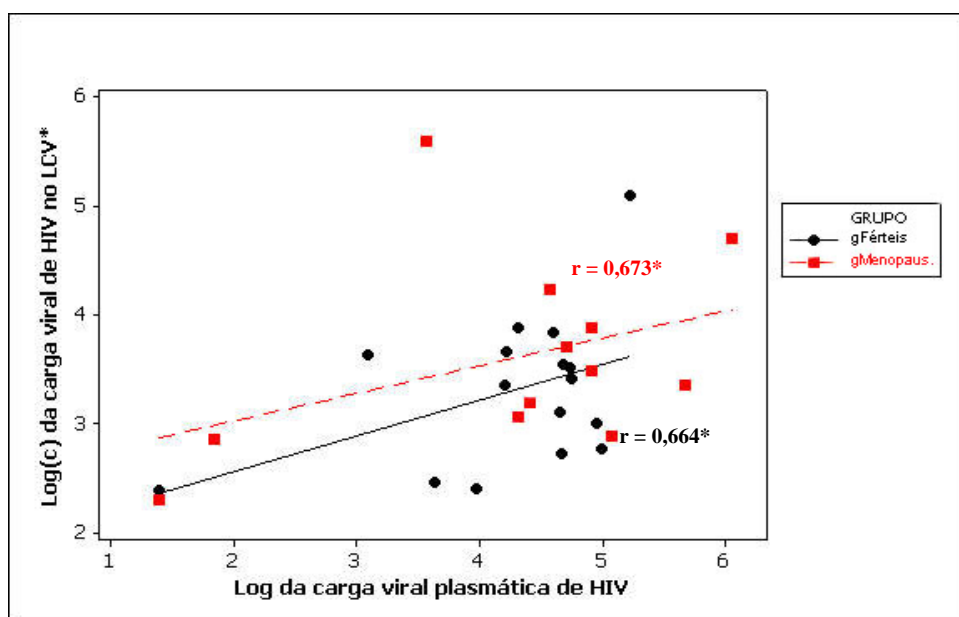


Gráfico 8 - Correlação entre excreção genital de HIV-RNA e a carga viral plasmática em pacientes dos grupos gMenopausadas e gFérteis com excreção genital detectável. As linhas referem-se à regressão linear obtida para cada grupo. * $p < 0,01$. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

No que concerne à correlação entre o número de linfócitos T CD4+ periféricos e a carga viral no LCV, em ambos os grupos verificou-se existir

correlação linear inversa significativa, porém de menor magnitude (gFérteis $r = -0,248$, $p < 0,05$; gMenopausadas $r = -0,250$, $p < 0,05$), como demonstrado no gráfico 9. O gráfico 10 demonstra a correlação, considerando-se apenas a excreção genital detectável.

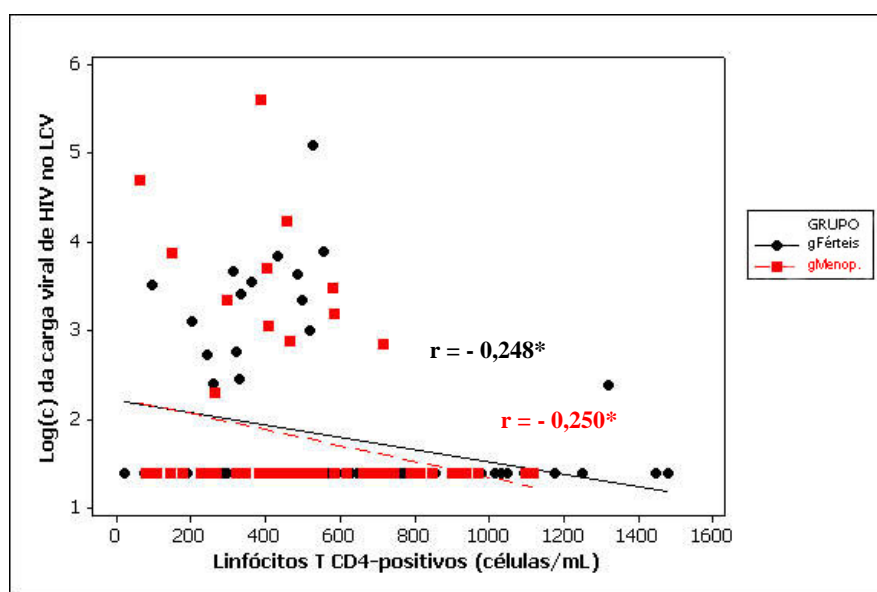


Gráfico 9 - Correlação entre a excreção genital do HIV e o número de linfócitos T CD4+ periféricos, nas pacientes dos grupos gMenopausadas e gFérteis. As linhas referem-se à regressão linear obtida para cada grupo. * $p < 0,01$. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

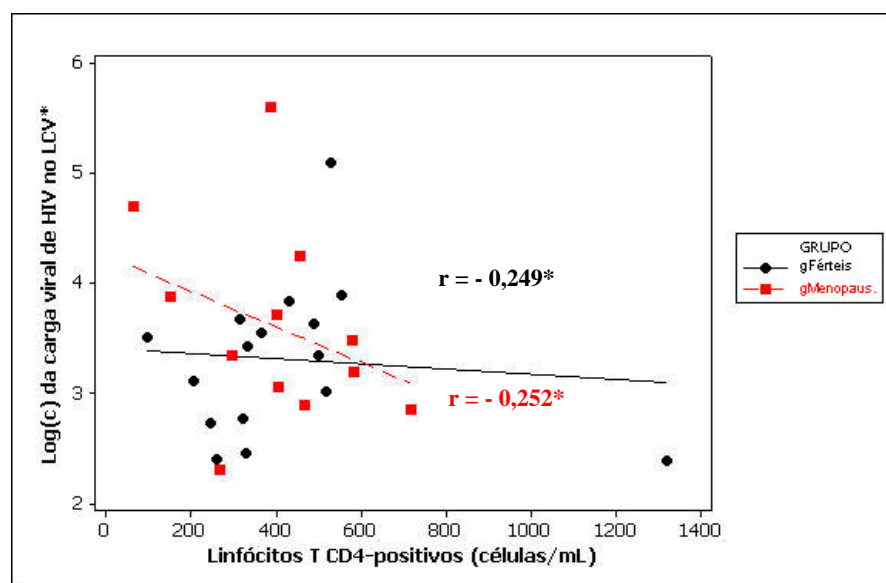


Gráfico 10 - Correlação entre a excreção genital do HIV e o número de linfócitos T CD4+ periféricos, nas pacientes dos grupos gMenopausadas e gFérteis com excreção genital detectável. As linhas referem-se à regressão linear obtida para cada grupo. * $p < 0,01$. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

6.14 - Investigação dos fatores associados à excreção genital de HIV

A fim de elucidar os fatores independentemente associados à excreção genital do HIV e, especialmente, testar a hipótese de que as mulheres menopausadas teriam maior probabilidade de excretar esse agente retroviral, em função de características próprias de sua mucosa genital, inicialmente definiu-se como desfecho de interesse a presença de excreção cervicovaginal de HIV-RNA. A variável desfecho foi caracterizada de forma dicotômica pela detecção de sequências genômicas virais nos lavados cervicovaginais (sim ou não). A partir disso, foram realizados cruzamentos entre a variável desfecho e cada variável explanatória, conforme a categorização adotada no estudo, testando-se a associação entre elas pelos testes qui-quadrado ou exato de Fisher (Tabela 12). Para avaliação das variáveis numéricas, foi empregado o teste de Mann-Whitney (Tabela 13).

Tabela 12 - Descrição das variáveis categóricas segundo detecção de excreção cervicovaginal de HIV-RNA e resultado dos testes de associação. Casa da Aids, São Paulo, 2006 - 2007.

	NÃO		SIM		Total	OR Bruto	IC95%	p
	n	%	n	%				
Grupo de Estudo								0,400 [□]
gMenopausadas	61	51,7	12	42,9	73	1,43	(0,62 - 3,28)	
gFérteis	57	48,3	16	57,1	73	1,0	—	
Atividade sexual	65	55,1	15	53,6	80	0,94	(0,41 - 2,15)	0,885 [□]
Queixas ginecológicas								
Dispareunia	30	25,4	6	21,4	36	0,8	(0,3 - 2,16)	0,659 [□]
Disúria	11	9,3	2	7,1	13	0,75	(0,16 - 3,58)	>0,999 [§]
Dor pélvica	22	18,6	4	14,3	26	0,73	(0,23 - 2,31)	0,785 [§]
Prurido	19	16,1	9	32,1	28	2,47	(2,47 - 6,27)	0,053 [□]
Úlceras	12	10,2	5	17,9	17	1,92	(0,62 - 5,98)	0,322 [§]
Corrimento vaginal	36	30,5	8	28,6	44	0,91	(0,37 - 2,26)	0,841 [□]
Lesões à inspeção vaginal	24	20,3	6	21,4	30	1,07	(0,39 - 2,93)	0,898 [□]
Classificação da flora vaginal								
Tipo II	41	35,0	15	53,6	56	1,0	—	0,070 [□]
Tipo III	76	65,0	13	46,4	89	0,47	(0,20 - 1,08)	
Infecções genitais								
Vaginose bacteriana (Critério de Amsel)	6	5,1	2	7,1	8	1,44	(0,27 - 7,52)	0,650 [§]
<i>Chlamydia trachomatis</i> (PCR)	2	1,7	—	—	2	—	—	>0,999 [§]
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (PCR)	1	0,8	—	—	1	—	—	>0,999 [§]
<i>Candida sp.</i>	18	15,3	7	25,0	25	1,85	(0,69 - 4,99)	0,264 [§]
Estadio clínico (aids)	98	83,1	17	60,7	115	0,32	(0,13 - 0,77)	0,009[□]
Em tratamento antirretroviral	102	87,2	12	42,9	114	0,11	(0,04 - 0,28)	<0,001[□]
TOTAL	118	100	28	100	146	—	—	

□qui-quadrado; §teste exato de Fischer. * Informação não disponível para uma paciente.

Conforme ilustra a tabela 12, observou-se na população de mulheres vivendo com HIV estudada que a excreção cervicovaginal de HIV-RNA foi significativamente menos frequente entre as mulheres que se encontravam no estadió clínico mais avançado da infecção por HIV/aids ($p = 0,009$) e entre aquelas em uso de tratamento antirretroviral ($p < 0,001$). Por outro lado, identificou-se maior probabilidade de excreção genital do vírus entre as mulheres que apresentavam carga viral plasmática de HIV mais elevada ($p < 0,001$) e menor número de células CD4+ no sangue periférico ($p = 0,001$) (Tabela 13).

Tabela 13 - Descrição das variáveis numéricas segundo detecção de excreção cervicovaginal de HIV-RNA e resultado dos testes de comparação. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

Variável	Excreção Cervicovaginal de HIV-RNA	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	n	p^\ddagger
Carga Viral Plasmática de HIV (log, cópias/ml)	Não	1,9	1,0	1,4	1,4	5,11	118	<0,001
	Sim	4,3	1,1	4,6	1,4	6,06	28	
Nº. linfócitos CD4+ periféricos (n°/mm^3)	Não	583,8	282,7	542	25	1483	118	0,001
	Sim	415,0	234,7	397	65	1320	28	
pH Vaginal	Não	4,8	0,7	5	3,5	6	117	0,280
	Sim	4,7	0,8	4,5	3,5	6	28	
TNF- α (ng/ml)	Não	144,5	147,8	82,8	21,2	675	118	0,809
	Sim	125,7	95,0	80,0	43,8	470	28	

\ddagger Mann-Whitney

Em seguida, passou-se ao modelo de regressão logística múltipla com intuito de identificar os fatores independentemente associados à excreção cervicovaginal de HIV. Na construção de tal modelo foram incluídas todas as variáveis que apresentaram níveis de significância abaixo de 0,2 ($p < 0,2$) na análise bivariada inicial. Além disso, a variável grupo de estudo (gMenopausadas ou gFérteis) foi

introduzida no modelo, independentemente do valor de p para ela observado à análise bivariada, uma vez que o principal objetivo do presente estudo consistia em buscar identificar se haveria diferença entre a excreção cervicovaginal de HIV-RNA entre mulheres menopausadas e aquelas em idade fértil, após controle de possíveis variáveis de confusão. Calcularam-se então, para cada uma das variáveis explanatórias, os *odds ratios* e seus respectivos intervalos de confiança 95% como medidas de associação entre essas e a excreção cervicovaginal de HIV-RNA. Permaneceram no modelo final as variáveis que apresentaram níveis de significância abaixo de 0,05 ($p < 0,05$).

O modelo de regressão logística múltipla, construído para identificação dos fatores independentemente associados à excreção cervicovaginal de HIV-RNA, encontra-se resumido na tabela 14. Como se pode observar, após ajuste para as demais variáveis incluídas no modelo, apenas o logaritmo da carga viral plasmática de HIV se mostrou independentemente associado à ocorrência de excreção genital do vírus ($p < 0,001$). Adicionalmente, é possível se verificar que o incremento de um *log* na carga viral plasmática, determina elevação da chance de se detectar excreção cervicovaginal do HIV para 4,03 (2,52 - 6,45) vezes.

Tabela 14 - Modelo de regressão logística múltipla para avaliação de fatores associados à excreção cervicovaginal de HIV-RNA. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

	Variável	OR	IC (95%)	p
Modelo	Grupo de Estudo (gMenopausadas)	1,67	(0,29 - 9,57)	0,563
Parcial	Queixa de prurido genital	1,50	(0,37 - 6,09)	0,571
	Flora vaginal (tipo III)	0,42	(0,08 - 2,35)	0,324
	Estadio clínico (aids)	0,67	(0,13 - 3,55)	0,638
	Uso de antirretrovirais	1,22	(0,26 - 5,75)	0,804
	Nº. de linfócitos CD4+ periféricos	1,00	—	0,435
	Carga Viral plasmática de HIV (log)	4,67	(2,29 - 9,54)	<0,001
	Modelo Final	Carga Viral plasmática de HIV (log)	4,03	(2,52 - 6,45)

Cabe destacar, contudo, que contrariando a hipótese deste estudo, não se conseguiu verificar influência estatisticamente significativa sobre a excreção genital pelo fato das mulheres serem menopausadas ou estarem em idade fértil ($p = 0,563$), após ajuste para as demais variáveis analisadas.

Para as mulheres estudadas que exibiram excreção cervicovaginal de HIV-RNA, buscou-se, a seguir, identificar associação entre a intensidade dessa e outras variáveis de interesse. Os resultados estão apresentados nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15 - Descrição da intensidade da excreção cervicovaginal de HIV-RNA (log) segundo variáveis categóricas de interesse e resultado do teste de comparação. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

Variável	Categoria	Média	DP	n	p^{\dagger}
Grupo de Estudo	gMenopausadas	3,61	0,90	12	0,326
	gFérteis	3,30	0,70	16	
Atividade Sexual	Não	3,53	0,91	13	0,536
	Sim	3,34	0,69	15	
Queixas ginecológicas					
Dispareunia	Não	3,49	0,85	22	0,443
	Sim	3,21	0,54	6	
Disúria	Não	3,39	0,74	26	0,381
	Sim	3,92	1,68	2	
Dor pélvica	Não	3,50	0,82	24	0,255
	Sim	3,01	0,51	4	
Prurido	Não	3,26	0,62	19	0,094
	Sim	3,80	1,01	9	
Úlceras	Não	3,50	0,85	23	0,320
	Sim	3,11	0,34	5	
Corrimento vaginal	Não	3,41	0,73	20	0,847
	Sim	3,48	0,98	8	
Lesões à inspeção genital	Não	3,38	0,71	22	0,478
	Sim	3,64	1,10	6	
Classificação da flora vaginal	Tipo II	3,33	0,67	15	0,470
	Tipo III	3,55	0,93	13	
Infecções genitais					
Vaginose bacteriana (segundo critério de Amsel)	Não	3,46	0,80	26	0,451
	Sim	3,02	0,87	2	
<i>Candida sp.</i>	Não	3,42	0,78	21	0,933
	Sim	3,45	0,90	7	
Estadio clínico (aids)	Não	3,47	0,76	11	0,834
	Sim	3,41	0,84	17	
Em tratamento antirretroviral	Não	3,50	0,63	16	0,618
	Sim	3,34	0,99	12	

\dagger t-Student

Tabela 16 - Correlação entre o logaritmo da concentração de HIV-RNA em lavado cervicovaginal e variáveis numéricas de interesse. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

Variável	Concentração cervicovaginal de HIV-RNA (log)	
	Correlação	<i>p</i>
Carga Viral plasmática de HIV (log)	0,407	0,032
Nº. de linfócitos CD4+ periféricos	-0,184	0,348
pH vaginal	0,315	0,103
Concentração de TNF- α em LCV	0,453	0,015

Como ilustrado na tabela 16, notou-se que carga viral plasmática de HIV e a concentração de TNF- α nos lavados cervicovaginais apresentaram correlação direta com a excreção genital de HIV-RNA ($p < 0,05$), ou seja, o aumento do logaritmo da carga viral de HIV no plasma ou das concentrações de TNF- α em secreções cervicovaginais acarreta aumento na eliminação viral a partir do trato genital. Em contraste, nenhuma das variáveis categóricas testadas mostrou ter influência significativa sobre a intensidade da excreção viral, como mostra a tabela 15.

Para esclarecer os fatores independentemente associados à intensidade de excreção genital de HIV foi finalmente construído um modelo de regressão linear múltipla, a partir das variáveis explanatórias cujos níveis de significância estatística resultaram inferiores a 0,2 ($p < 0,2$), além da variável grupo de estudo (gMenopausadas ou gFérteis), cujo resultado pode ser analisado a partir da tabela 17.

Tabela 17 - Modelo de regressão linear para avaliação de fatores associados à intensidade da excreção cervicovaginal de HIV-RNA. Casa da Aids, São Paulo, 2006-2007.

Modelo	Variável	Coefficiente	Erro Padrão	Valor t	p†
Modelo Parcial	Constante	0,1046	1,0963	0,10	0,925
	Grupo de Estudo (gMenopausadas)	-0,5787	0,5143	-1,13	0,273
	Queixa de prurido genital	0,2782	0,3385	0,82	0,420
	pH Vaginal	0,2904	0,2115	1,37	0,184
	Carga Viral plasmática de HIV (log)	0,3242	0,1055	3,07	0,006
	TNF- α em LCV	0,0034	0,0014	2,41	0,025
Modelo Final	pH vaginal	0,3480	0,0785	4,43	<0,001
	TNF- α em LCV	0,0034	0,0012	2,81	0,010
	Carga Viral plasmática de HIV (log)	0,3196	0,0806	3,97	0,001

† t-Student

Verificou-se que a intensidade da excreção cervicovaginal de RNA-HIV sofre influência conjuntamente do pH vaginal ($p < 0,001$), da concentração de TNF- α observada no LCV ($p = 0,010$) e da carga viral plasmática ($p = 0,001$). Para todas essas, incremento de seus valores acarreta maior intensidade de excreção genital do HIV. De forma análoga ao observado no tocante à presença de excreção genital do vírus, também em relação a sua intensidade, não se verificou influência estatisticamente significativa do grupo de estudo, ou seja, do fato das mulheres serem menopausadas ou estarem em idade fértil ($p = 0,273$). Por fim, avaliamos a possibilidade de existir interação e entre as variáveis explanatórias “grupo de estudo” (Menopausadas vs. Férteis) e “pH vaginal” na pesquisa de fatores independentemente associados à variável desfecho “intensidade de excreção cervicovaginal de HIV-RNA”, tendo em vista ter sido observada diferença estatisticamente significativa entre os valores de pH vaginal observados entre pacientes menopausadas e em idade fértil. Como tal interação não pode ser demonstrada, a variável “grupo de estudo” não permaneceu no modelo final de regressão linear.

Discussão

7. Discussão

Neste estudo, aparentemente inédito na literatura, procurou-se avaliar mulheres infectadas pelo HIV com idade igual ou superior a 50 anos e menopausadas, no tocante a seu potencial de excreção genital do vírus. Dado que a incidência de casos de aids em pacientes nessa faixa etária em nosso país passou de 7,5 para 15,7 casos por 100 mil habitantes entre 1996 e 2006¹ e que a população feminina vem apresentando participação crescente nos casos notificados, torna-se fundamental a melhor caracterização dos aspectos clínicos e laboratoriais particulares dessas pacientes.

Buscou-se assim estudar um número significativo de mulheres menopausadas, a partir do universo de pacientes com essa característica que frequentam uma unidade de referência no cuidado a pessoas que vivem com HIV, e compará-las com a faixa etária mais atingida pela epidemia de infecção pelo HIV, ou seja, pacientes entre 19 e 35 anos.

No que se refere à sua caracterização sociodemográfica, pode-se observar que as mulheres com idades acima de 50 anos apresentaram significativamente menos anos de estudo (mediana de 5 anos), quando comparadas às mulheres em idade fértil. Entretanto, esse dado se mostrou ainda superior à média de escolaridade da população idosa do Estado de São Paulo que, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), é de 3,2 anos¹⁴¹. O reconhecimento desse aspecto é de fundamental relevância para a proposição de ações de controle e prevenção. A mensagem a ser veiculada, tanto em termos de educação para a saúde, como também no acompanhamento clínico de pacientes, deve necessariamente levar em conta a linguagem e o formato mais adequados para que uma comunicação efetiva possa se estabelecer entre essa população e os profissionais envolvidos no cuidado e atendimento desses.

Com relação à categoria de exposição referida como forma presumida de aquisição do HIV, observou-se que a forma sexual foi a mais comum em ambos os grupos estudados. No entanto, cabe destacar que dentre as mulheres com idade superior a 50 anos avaliadas neste estudo, 12,3% referiram ignorar a forma de aquisição do HIV. Tal informação é convergente com resultados de outros estudos, que informam que entre 9 a 21% dos pacientes idosos desconhecem a forma de aquisição do vírus¹⁴²⁻¹⁴⁴. No entanto, diverge daqueles descritos no Boletim Epidemiológico de 2008, do Ministério da Saúde¹. Esse documento pela primeira vez enfatizou os casos notificados de aids em pacientes acima de 50 anos e mostrou que, dentre os casos de aids em mulheres dessa faixa etária, apenas 0,3% estavam classificados como forma de transmissão desconhecida ou ignorada. Paralelamente, em 13,9% dos homens com aids nessa faixa etária a forma de aquisição do vírus era desconhecida. Tal divergência de dados pode ser talvez explicada pela forma como as informações foram acessadas. Em nosso estudo, a informação foi coletada dos prontuários médicos, nos quais consta o relato obtido diretamente do paciente. Os dados oficiais, por sua vez, podem refletir uma categorização feita pelo profissional responsável pela notificação dos casos, levando-se em conta o relato de que as mulheres referem não terem sido usuárias de drogas endovenosas ou recebido transfusão sanguínea. De qualquer forma, acredita-se que muitas dessas pacientes parecem ignorar a forma como adquiriram o HIV por desconhecerem as formas de transmissão do vírus, ou ainda, por não avaliarem as implicações de terem relações sexuais sem proteção, face à sua falta de percepção de risco, particularmente quando envolvidas em parcerias sexuais fixas e de longa duração. De fato, apenas no ano de 2009 o Ministério da Saúde direcionou sua campanha preventiva anual para as pessoas da chamada “Terceira Idade”, mostrando que, até

esse momento, não se havia atentado para população acima de 50 anos como vulnerável à aquisição e transmissão do HIV.

No tocante à atividade sexual por ocasião da inclusão no estudo, apenas 21,9% das mulheres menopausadas informaram ter vida sexual ativa. Esse dado chamou a atenção pelo fato de que 55,3% da população feminina de 50 a 64 anos ser sexualmente ativa, de acordo com pesquisa de comportamento promovido pelo Ministério da Saúde Brasileiro¹⁴⁵. Dentre os motivos que podem justificar a menor frequência de atividade sexual entre as mulheres menopausadas estudadas, pode-se pensar no medo de transmitir HIV ao parceiro, perda de libido por alterações psicológicas, modificações na forma corporal devido ao uso de antirretrovirais (lipodistrofia), ou mesmo, ausência de parceiro. Aliada a isso, as alterações fisiológicas que tornam a mucosa vaginal mais delgada e seca com evolução para atrofia, fazem com que a dispareunia seja um motivo a mais para reduzir a frequência de pacientes com atividade sexual nessa faixa etária. De acordo com Dennerstein e colaboradores¹⁴⁶, as queixas de secura vaginal, desconforto e dispareunia são descritas por cerca de 47% das mulheres menopausadas. Entretanto, em nosso estudo, a queixa de dispareunia foi similar em ambos os grupos, mesmo quando se analisaram apenas as mulheres com atividade sexual no período da entrevista ($p=0,387$, qui-quadrado).

Em relação aos aspectos clínicos da infecção pelo HIV, as pacientes menopausadas apresentaram maior tempo de diagnóstico de infecção e também de aids. Cabe ressaltar que estas apresentaram média de idade superior no momento do diagnóstico da infecção. No entanto, quando comparamos o tempo entre o diagnóstico da infecção por HIV e progressão para aids, assim como a proporção de pacientes que desenvolveram aids em até 365 dias após o diagnóstico da infecção por HIV, não houve diferença significativa entre os grupos estudados. Luther e

colaboradores, em revisão de literatura⁸, afirmaram que pacientes com idade acima de 50 anos são propensos a perda mais rápida de células CD4+ periféricas e a maior risco de progressão para aids dentro de 1 a 3 anos após o diagnóstico de HIV. Apesar de haver consenso de que a mortalidade é maior em pacientes com aids com idade acima de 50 anos, mesmo na era HAART, aparentemente não está claro se o comportamento evolutivo da infecção diverge entre indivíduos de faixas etárias distintas. Em nosso estudo, a determinação de linfócitos CD4+ e a quantificação do RNA viral plasmático não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos de mulheres menopausadas e em idade fértil. Esse dado é ainda controverso na literatura; alguns estudos sugerem que apesar da carga viral ser mais alta quando da infecção aguda, os indivíduos com idades superiores a 50 anos, após o início da terapia antirretroviral, alcançam melhor supressão virológica do que pacientes jovens^{32,147-150}. Tal fato tem sido atribuído a melhor adesão de pacientes idosos às intervenções terapêuticas⁵. Da mesma forma, existe divergência com relação à contagem de linfócitos CD4+: alguns estudos têm demonstrado que pacientes idosos possuem menores taxas de recuperação do número de células CD4+ e menor magnitude de incremento no número dessas células^{151,152}, provavelmente em função de supressão tímica. Por outro lado, outros estudos não observaram diferença na resposta de células CD4+ entre grupos de pacientes de diferentes idades¹⁵³⁻¹⁵⁶. Uma possível causa para divergência entre os dados é que a maioria dos estudos que relatam piores condições imunológicas e de supressão viral utilizam-se de dados anteriores à era HAART. Ao lado disso, diferenças entre as populações estudadas, incluindo comorbidades, são potenciais variáveis confundidoras que deveriam ser levadas em conta para comparação da reconstituição imunológica. Nesse aspecto deve-se ressaltar que 83,6% das pacientes menopausadas envolvidas no presente estudo

estavam sob terapia antirretroviral, com carga viral e contagem de células CD4+ em níveis satisfatórios, o que poderia ter contribuído para a não verificação de diferença nesses parâmetros entre os grupos de mulheres estudadas.

Buscando identificar as características clínicas peculiares das mulheres menopausadas que vivem com HIV, avaliaram-se também as infecções genitais. Pode-se verificar que as pacientes menopausadas apresentaram menor frequência de infecção por leveduras e *Gardnerella vaginalis*, com base em achados ao exame microscópico. Além disso, nenhuma delas apresentou vaginose bacteriana pelo critério de Amsel ou diagnóstico de infecção por *Trichomonas vaginalis*. Até o momento não se encontraram em literatura estudos que avaliassem a prevalência de doenças sexualmente transmissíveis em mulheres infectadas por HIV com idades acima de 50 anos. No entanto, outros estudos conduzidos com mulheres em idade fértil demonstraram prevalência maior de doenças sexualmente transmissíveis em mulheres HIV positivas. Watts e colaboradores¹⁵⁷ avaliaram a prevalência de infecções genitais em 2056 mulheres infectadas pelo HIV e 554 mulheres não infectadas, embora com alto risco de aquisição de HIV, e encontraram prevalência de 42,8% de vaginose bacteriana, 6,1% de *Trichomonas vaginalis* e 10% de leveduras no exame microscópico direto. Avaliações da frequência de infecções genitais no presente estudo revelaram menor prevalência de vaginose bacteriana (10,9% F / 0% M, $p=0,004$), de infecção por *Trichomonas vaginalis* (1,3% F / 0% M) e por leveduras (24,6% F / 8,3% M). Em ambos os grupos estudados a menor prevalência das principais infecções genitais pode refletir melhor acompanhamento dessas pacientes pelo serviço de ginecologia da unidade onde são atendidas.

A menor prevalência de vaginose bacteriana e leveduras no grupo de mulheres menopausadas pode ser reflexo da menor taxa de atividade sexual nesse

grupo, já que apenas 21,9% destas informaram ter vida sexual ativa por ocasião de sua inclusão no estudo em contraste com 87,7% das pacientes em idade fértil.

No tocante às infecções por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, apenas uma paciente do grupo menopausadas foi positiva para os dois agentes (1,36%), enquanto para pacientes em idade fértil, uma delas foi positiva para *Chlamydia trachomatis* (1,36%).

Page e colaboradores¹⁵⁸, em estudo retrospectivo de 1037 mulheres entre 18 e 39 anos HIV positivas, encontrou prevalência de 3,6% para *Chlamydia trachomatis* e 4,6% para *Neisseria gonorrhoeae*, com 0,9% delas apresentando coinfeção. Nesse estudo à análise univariada, a positividade para um dos agentes esteve associada à idade inferior a 35 anos, carga viral plasmática de HIV entre 400 e 10.000 cópias/mL e ausência de terapia antirretroviral, enquanto à análise multivariada, apenas a idade inferior a 35 anos mostrou-se associada à ocorrência de infecção por esses agentes.

Em nosso estudo, apesar de ter sido utilizada a técnica de PCR, devido à sua alta sensibilidade para detecção desses agentes, convém lembrar que o DNA detectado foi extraído do botão celular do lavado cervicovaginal centrifugado, o que poderia ter contribuído para diminuir a sensibilidade do teste. Seria importante para essa análise ter contado também com material da região endocervical.

Como objetivo central do presente estudo, avaliou-se a frequência de excreção genital de HIV nas pacientes menopausadas e em idade fértil. Observou-se que 17,8% das menopausadas e 21,9% daquelas em idade fértil exibiram excreção cervicovaginal do vírus, não sendo essa diferença estatisticamente significativa à análise univariada. Deve-se ressaltar, como anteriormente mencionado, que a prevalência de uso de antirretrovirais nos grupos estudados foi

de 83,6% nas pacientes menopausadas e de 74% entre as pacientes em idade fértil. Na literatura mundial, a frequência relatada de excreção genital do HIV em mulheres difere vastamente, em função de diversas condições associadas que podem determinar maior ou menor excreção viral. Assim, a frequência de excreção viral varia de 15 a 35% em mulheres em uso de antirretrovirais^{42,44,67}, enquanto em mulheres não tratadas, a excreção viral pode ocorrer em até 52% das pacientes^{56,62}. Campos e colaboradores¹⁵⁹, ao estudarem 200 mulheres brasileiras HIV positivas, sendo 73,5% delas em uso de antirretrovirais, encontraram frequência de excreção genital do vírus de 9%. Diversos estudos têm destacado o papel do uso de antirretrovirais na diminuição da excreção genital de HIV por meio da pesquisa de RNA viral em secreções do trato reprodutor. Anderson e colaboradores¹⁶⁰ verificaram que, apesar de haver diferença na penetração dos diversos antirretrovirais no trato genital, com aparente melhor eficácia dos medicamentos inibidores da protease viral e de fusão na diminuição da excreção genital⁶⁷, existe rápido declínio da excreção viral após dois dias do início do uso dos antirretrovirais⁴⁴. É importante salientar que o declínio na excreção genital do vírus tem relevância epidemiológica, por contribuir para reduzir o risco de transmissão^{68,160}. No entanto, a melhor compreensão do impacto da terapia antirretroviral na dinâmica de transmissão do vírus exigirá a condução de estudos que avaliem tanto o RNA viral livre como o DNA proviral em secreções genitais, a fim de determinar qual desses seria o mais preciso e exato marcador de risco de transmissibilidade.

Embora a terapia antirretroviral seja uma importante ferramenta para a prevenção de transmissão sexual do HIV, é pouco provável que esta sozinha previna a veiculação inter-humana desse agente viral e outras ações devem ser tomadas a fim de promover prevenção primária de modo eficaz. Pesquisas voltadas para o

entendimento dos diversos fatores envolvidos na transmissão sexual do HIV devem portanto ser avaliadas. A maioria dos casos de transmissão do HIV ocorre através das superfícies mucosas. Nesse contexto, o sistema imune do trato genital passa a ser uma chave determinante na transmissão sexual. Existem lacunas em nosso conhecimento referentes ao papel e função da imunidade mucosa, particularmente no trato genital feminino, e se tais fatores se alteram ao longo do ciclo menstrual, gravidez e após a menopausa. A perda de barreiras naturais da imunidade e eventuais disfunções na mucosa propriamente dita devem interferir nesse processo, e certamente ocorrem nas situações mencionadas.

A carga viral plasmática de HIV é o mais robusto preditor de transmissão sexual em parceiros sorodiscordantes. Isto provavelmente não reflete o contato com sangue durante o ato sexual, mas sim a quantidade de RNA ou DNA do HIV presente nas secreções genitais, uma vez que esses se correlacionam com a carga viral plasmática^{39,161}. Ao lado disso, a carga viral plasmática mostra-se como o mais forte preditor da excreção genital, independentemente do tipo do HIV envolvido na infecção¹⁶¹⁻¹⁶⁵.

Apesar do reconhecido potencial dos antirretrovirais em diminuir significativamente a excreção genital do vírus, verifica-se em diversos estudos a presença de excreção genital na ausência de viremia. Analogamente neste trabalho, duas mulheres menopausadas e uma em idade fértil apresentaram excreção genital com carga viral plasmática indetectável. Kaul *et al*³⁹ estudaram 13 mulheres com carga viral plasmática indetectável e encontraram excreção genital em duas delas. Já Cu-Uvin e colaboradores¹⁶⁶ verificaram que 3% das pacientes em uso de terapia antirretroviral permaneceram excretando HIV, mesmo na ausência de viremia. Isto pode ser explicado com base na ocorrência de replicação local de HIV¹⁶⁷, em função de fatores que a afetam no trato genital e podem ser diferentes

daqueles que modulam sua ocorrência no sangue. De qualquer forma, os dados demonstram que a terapia antirretroviral não consegue isoladamente prevenir a transmissão sexual. Sendo assim, deve-se enfatizar a necessidade de adesão das pacientes, mesmo que avirêmicas, às práticas de sexo mais seguro.

Em nosso estudo, embora se tenha observado à análise univariada que número mais reduzido de células CD4+ periféricas e maiores intensidades de viremia estivessem associados à presença da excreção genital de HIV, à análise multivariada apenas a carga viral plasmática permaneceu como fator independentemente associado à excreção genital do vírus. Similarmente, a maioria dos estudos^{43,49,66,164,168}, embora não todos^{162,169} ao avaliarem tanto a viremia quanto o número de células CD4+ periféricas, demonstraram que apenas a carga viral plasmática é fator independentemente associado à detecção do HIV no trato genital. Esse dado sugere que a carga viral plasmática, mais do que a imunossupressão, refletida pela diminuição do número de células CD4+, deve ser o mais importante determinante da excreção genital do HIV.

Além da presença ou não de excreção genital nos grupos estudados e dos fatores associados à esta, nossa pesquisa procurou avaliar a intensidade de excreção genital em mulheres menopausadas e em idade fértil, assim como os fatores associados à maior ou menor intensidade de excreção cervicovaginal do HIV. No presente estudo, após análise multivariada demonstrou-se que a carga viral plasmática de HIV, a concentração de TNF- α no lavado cervicovaginal e o pH vaginal são fatores independentemente associados e, de forma positiva, com a intensidade da excreção genital do vírus.

A associação entre concentrações mais elevadas da citocina proinflamatória TNF- α e maior excreção genital do HIV tem sido amplamente descrita na literatura^{55,170,171}. De fato, a ativação imune e a inflamação são fatores cruciais na

replicação do HIV e de sua patogênese. Gumbi e colaboradores⁵⁶ sugerem que a ativação generalizada da cérvix durante a infecção crônica do HIV ocorre em algumas mulheres. Esse fenômeno é marcado por produção de diversas citocinas inflamatórias (incluindo TNF- α) e a provável ativação de células CD4+, tornando o trato genital um ambiente propício para a replicação viral, com consequente aumento da excreção do HIV. Outra hipótese seria a ruptura da barreira epitelial, causada pelo microambiente inflamatório durante a infecção pelo HIV, ocasionando também aumento da excreção do vírus. Por outro lado, embora alguns estudos mostrem significativo aumento na inflamação de superfícies mucosas após a infecção pelo HIV e replicação¹⁷², a relação de causa e efeito ainda permanece a ser esclarecida⁵⁵.

De modo análogo, cabe rever os mecanismos pelos quais as alterações do pH vaginal poderiam interferir sobre o potencial de excreção genital do HIV. Diversos estudos apontam para o aumento do pH como fator associado à maior frequência e intensidade de excreção genital do HIV^{61,90,173,174}. O mecanismo exato de intensificação da excreção genital do vírus na presença de vaginose bacteriana ainda permanece a ser elucidado. Zariffard e colaboradores¹⁷⁵ evidenciaram que a vaginose bacteriana aumenta a expressão de HIV por estímulo ou recrutamento de células infectadas, por meio da indução de secreção de TNF- α . Essa citocina, produzida por monócitos, macrófagos e neutrófilos em resposta a produtos microbianos, atuaria no aumento da replicação do HIV, por sua capacidade de ativar o fator de transcrição celular NF- κ B e consequente interação deste com a região promotora do genoma viral^{62,176}. De fato, tanto o aumento do pH como o aumento da concentração de TNF- α mostraram-se em nosso estudo fatores independentemente associados à intensidade da excreção genital do HIV.

Por outro lado, existe evidência na literatura de que patógenos associados à vaginose bacteriana poderiam contribuir diretamente para maior expressão de Fator Indutor de HIV (HIF)^{177,178}. Essa substância, caracterizada em 2001 por Hashemi e colaboradores e denominado *Myeloid-related protein* (MRP-8), é uma proteína inflamatória encontrada em secreções mucosas que provoca o aumento da replicação do HIV em linhagem de célula monocítica humana U1. O mecanismo exato de indução do HIV pela proteína MRP-8 ainda não está completamente esclarecido; no entanto, este está associado a sintomas de vaginose bacteriana, e a sinais como pH vaginal superior a 4,5, presença de *clue cells* e detecção de *Mycoplasma hominis* e *Gardnerella vaginalis*^{110,116,179-181}.

Aliado a isso, deve-se ressaltar a importante relação entre a condição de pós menopausa e o aumento do pH vaginal. Roy e colaboradores^{182,183} estudaram 152 pacientes menopausadas e sem uso de terapia de reposição hormonal. Verificaram que pH vaginal entre 6,0 e 7,5, na ausência de bactéria patogênica, é marcador de concentrações diminuídas de estradiol (inferior a 40pg/mL) e que está altamente associado à FSH superior a 15mIU/mL, valor de corte utilizado para diagnosticar menopausa de acordo com o *Third National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III)¹⁸⁴. Na ausência de vaginite, o pH vaginal é uma alternativa para determinar se uma paciente está em menopausa. Estudos epidemiológicos revisados por Roy e colaboradores^{182,183} indicaram que o FSH sérico e o pH vaginal possuem sensibilidade similar na identificação de pacientes em menopausa. Assim, uma das hipóteses levantadas para os achados observados em nosso estudo seria de que a associação entre o pH vaginal aumentado e excreção genital do HIV pudesse refletir excreção genital mais acentuada nas mulheres menopausadas. No entanto, a análise estatística efetuada visando eliminar o efeito de possível interação entre as variáveis grupo de estudo (menopausada e em idade

fértil) e pH vaginal sobre a intensidade de excreção genital do HIV, não propiciou evidência de diferença significativa da excreção viral entre os grupos avaliados.

Em síntese, no presente estudo foi estimada a frequência de excreção genital de RNA do HIV em mulheres menopausadas e em idade fértil assistidas em ambulatório de referência da cidade de São Paulo. Adicionalmente, identificaram-se fatores independentemente associados à intensidade de excreção genital do HIV, como a carga viral plasmática, o pH vaginal e a concentração de TNF- α no lavado cervicovaginal. Não foi possível, contudo, verificar associação entre a condição de menopausada ou em idade fértil e a excreção genital do vírus.

A análise desses resultados deve ser efetuada à luz de suas limitações metodológicas: a baixa frequência de excreção genital de HIV observada na amostra estudada, tanto entre as mulheres menopausadas, como também nas em idade fértil, se por um lado reflete a eficiência das intervenções propostas a essas pacientes, que incluem o uso de medicamentos antirretrovirais e também o cuidado sobre sua saúde sexual, em relação aos objetivos propostos para o estudo acarretou redução do poder estatístico do estudo em detectar diferenças entre os grupos em relação à excreção genital do HIV. Além disso, o tamanho amostral ideal, dado à baixa frequência e intensidade de excreção genital observado nessas pacientes, não pode ser atingido. Uma alternativa para procurar melhor elucidar a relação de menopausa com excreção genital seria, portanto, conduzir avaliação multicêntrica, com vistas ao aumento da população de estudo, considerando que o número de mulheres menopausadas deve crescer progressivamente em centros especializados, dado o aumento da sobrevivência de mulheres que vivem com HIV.

De fato, observou-se em nossa amostra alta frequência de mulheres com carga viral plasmática indetectável, dado ao frequente uso de antirretrovirais, resultado da política de acesso universal a medicamentos altamente eficazes

praticada em nosso país e que determinam profunda alteração na dinâmica da epidemia brasileira, com conseqüente aumento da sobrevivência e da qualidade de vida das pacientes.

7.1 - Considerações Finais e Perspectivas Futuras

Este foi o primeiro estudo de que temos conhecimento que avaliou a excreção genital de HIV em mulheres com idade acima de 50 anos e menopausadas. A quantificação do HIV em material genital foi criteriosa, incluindo-se o uso de LiCl para determinação do fator de diluição das amostras de LCV e excluindo-se eventual contaminação espermática. O uso do LCV para esse tipo de análise possui a vantagem de obtenção de grande volume de amostra, o que permitiu a condução de diversas análises laboratoriais. Pode-se ainda fracionar a amostra em seus componentes celular e acelular, com o intuito de permitir a identificação não só de componentes humorais como também de elementos intracelulares.

Por outro lado, a realização do presente estudo expande a linha de pesquisa relacionada à infecção por HIV no trato genital, abrindo espaço para investigações complementares. Outros fatores de possível importância na determinação da excreção genital do HIV, tais como a ativação de Herpes Simplex 2 (HSV-2), Citomegalovírus e outras infecções genitais causadoras de ulceração, assim como a presença de HPV poderão ser objeto de estudos futuros em pacientes menopausadas. A associação de outras citocinas próinflamatórias e antiinflamatórias e condições características próprias da menopausa como atrofia vaginal, diminuição da imunidade local e alterações fisiológicas da mucosa também representam lacunas que poderão ser elucidadas em pesquisas futuras.

Da mesma forma, a avaliação da frequência e intensidade da excreção genital do vírus associado à célula por meio da quantificação do DNA proviral,

também poderá ser conduzida oportunamente. Estudos de transmissibilidade apontam para maior eficiência de transmissão do HIV associado à célula do que a partir do HIV livre, principalmente quando associado a monócito¹⁸⁵. No entanto, não há consenso em relação a qual componente genético viral (RNA livre ou o DNA proviral) seria o marcador mais exato para predizer o risco de transmissão sexual. Por fim, o potencial de transmissibilidade viral a partir de mulheres menopausadas poderá também ser objeto de um dos estudos futuros.

Conclusões

8. Conclusões

Com base nos resultados deste trabalho, pode-se concluir que:

As mulheres menopausadas apresentaram menor escolaridade, quando comparadas às mulheres em idade fértil. A via sexual foi a forma predominante de exposição à infecção por HIV, sem diferença significativa entre os grupos estudados.

No que se refere à infecção pelo HIV, as mulheres menopausadas apresentaram maior tempo de diagnóstico de HIV e de aids, quando comparadas às mulheres em idade fértil. No entanto, o período entre o diagnóstico de infecção pelo HIV e o desenvolvimento de aids foi semelhante entre os grupos.

Não se observou entre os grupos avaliados diferença significativa entre as médias das cargas virais plasmáticas de HIV e do número de células CD4+ periféricas.

Do ponto de vista ginecológico, observou-se maior frequência de infecção por *Gardnerella vaginalis* e por leveduras entre as mulheres em idade fértil. Analogamente, a frequência de vaginose bacteriana, diagnosticada segundo critério de Amsel, foi mais elevada nesse grupo. Em contraste, não foi verificada diferença significativa entre os grupos no tocante à frequência de dispareunia, infecção por NG/CT ou ainda concentração de TNF- α em lavado cervicovaginal.

Identificou-se excreção genital de RNA de HIV em frequência semelhante entre os grupos estudados. Ao lado disso, em duas pacientes menopausadas e uma em idade fértil houve evidência de excreção genital do HIV na ausência de viremia detectável. O estadio clínico mais avançado da infecção por HIV e o uso de antirretrovirais mostrou-se associado à menor probabilidade de excreção genital do vírus. Em contrapartida, maior frequência de excreção genital foi observada entre

mulheres com carga viral plasmática mais elevada e com número inferior de linfócitos CD4+ no sangue periférico.

Em ambos os grupos, a concentração de RNA do HIV no lavado cervicovaginal correlacionou-se positivamente com a carga viral plasmática e inversamente com o número de linfócitos CD4+ periféricos, sendo esta última correlação de menor magnitude.

Após controle para possíveis variáveis de confusão, não se observou diferença estatisticamente significativa na frequência e na intensidade da excreção genital de HIV entre mulheres menopausadas e em idade fértil.

A frequência de excreção genital de HIV mostrou-se independentemente associada à intensidade da carga viral plasmática. No que se refere à intensidade da excreção genital, as variáveis preditoras incluíram: carga viral plasmática, pH vaginal e concentração de TNF- α em lavado cervicovaginal, todas com correlação positiva.

ANEXOS

9. Anexos**Anexo A - Formulário de Triagem de Pacientes****Avaliação da Excreção Genital do HIV-1 em Mulheres Menopausadas e em Idade Fértil**

Registro HC	Iniciais	Data de Nascimento	Data da Entrevista	Triado por:

Check-list

	SIM	NÃO	N/A
HIV +			
≤ 30/06/1956			
30/06/1971 ≤ x ≤ 30/06/1987			
É menopausada?			
É gestante?			
É ooforectomizada?			
Histerectomizada?			
Ciclos menstruais regulares?			
Em TRH?			
Em quimioterapia?			
Estado clínico comprometido?			

CONCLUSÃO			
Incluída			

Incluída G1 – Férteis ()
 Incluída G2 – Menopausadas ()

Data da última menstruação: ____ / ____ / ____

Anexo B - Termo de Recusa

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Av. Dr. Arnaldo 455 – CEP 01246-903

Caixa Postal 54199 – São Paulo – SP

TERMO DE RECUSA PARA PROTOCOLO DE PESQUISA
TÍTULO: AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO GENITAL DO HIV-1 EM MULHERES
MENOPAUSADAS E EM IDADE FÉRTIL

Eu, _____ (iniciais) n° de registro _____ não desejo participar da pesquisa supra citada.

Motivo da recusa:

Data de Nascimento: ____ / ____ / ____

Cor

- branca
 negra
 amarela
 parda

Escolaridade

- Não-alfabetizada
 Primário
 Secundário
 Superior
 Pós-graduação

São Paulo, ____ de _____ de 20____.

Ciência do Pesquisador

Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Av. Dr. Arnaldo 455 – CEP 01246-903

Caixa Postal 54199 – São Paulo – SP

CONSENTIMENTO ESCLARECIDO PARA PROTOCOLO DE PESQUISA
TÍTULO: AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO GENITAL DO HIV-1 EM MULHERES
MENOPAUSADAS E EM IDADE FÉRTIL

Objetivo do estudo: Gostaríamos de convidá-la a participar de uma pesquisa. O objetivo da mesma é comparar a excreção vaginal do vírus HIV em mulheres em menopausa (acima de 50 anos) e mulheres jovens em idade fértil (19 a 35 anos). Para isto estamos selecionando portadoras do HIV para participar do estudo. Se você concordar em participar, será chamada a vir ao ambulatório da Casa da AIDS uma vez, em data marcada pelo seu médico, para coleta de amostras de sangue e de material vaginal/cervical. As amostras colhidas serão utilizadas para identificar a presença e a quantidade de HIV em suas secreções vaginais/cervicais, assim como para verificar a saúde da sua vagina (identificando eventual inflamação no local). Na primeira coleta de amostras vaginais/cervicais faremos o exame de Papanicolaou para prevenção do câncer de colo de útero e também a pesquisa de micróbios causadores de infecção local. Caso seja detectada alguma anormalidade, você receberá tratamento adequado. As amostras de sangue serão usadas para dosagens de hormônios femininos, para pesquisa da quantidade de HIV presente no seu sangue (carga viral) e contagem de linfócitos CD4 para acompanhamento do seu sistema imune (sistema de defesa).

Procedimentos: As amostras vaginais/cervicais serão colhidas por sua médica ginecologista ou pela enfermeira, durante exame ginecológico completo, da seguinte forma:

1. faremos uma lavagem da sua vagina com soro fisiológico, usando para isto uma seringa sem agulha;
2. colheremos as amostras com uma haste recoberta por algodão na ponta (semelhante a um cotonete grande) e uma pequena escova, como se faz rotineiramente em exames ginecológicos. Na primeira consulta será ainda colhida amostra de material vaginal para o exame de Papanicolaou. Além disto, colheremos uma amostra de sangue, por punção de sua veia, a cada consulta. Pediremos também a você que responda um questionário na primeira consulta.

Riscos e desconfortos: A lavagem da vagina com solução fisiológica não apresenta qualquer risco nem provoca desconforto. A coleta de material vaginal/cervical pode provocar

uma pequena lesão (arranhão) na superfície da vagina. A coleta de sangue pode provocar discreta dor no local da punção da veia e um pequeno hematoma.

Benefícios: Sua participação não trará diretamente a você qualquer benefício pessoal. No entanto as informações obtidas com a análise das amostras nos permitirão compreender melhor como se dá a eliminação do HIV na vagina e portanto como ocorre a transmissão sexual desse vírus.

Alternativas: Você poderá não participar do estudo, se assim desejar. Sua recusa não modificará em nada seu atendimento na Casa da Aids. Todas as participantes do estudo, se necessário, receberão tratamento adequado para o HIV, seguindo as recomendações estabelecidas pelo Ministério da Saúde.

Caso você tenha qualquer dúvida em relação ao estudo, poderá procurar esclarecê-la com Dr. Aluisio Segurado ou Keli Melo através do telefone 3120.5290.

Se, a qualquer momento durante o estudo, você sentir não ter sido adequadamente informada sobre os riscos, benefícios, procedimentos alternativos, ou em relação a seus direitos como participante da pesquisa, ou ainda, se sentir-se constrangida a continuar participando do estudo contra a sua vontade, poderá entrar em contato com um membro da Comissão de Ética e Pesquisas do Departamento de Doenças Infecciosas, em horário comercial (das 8 às 16:30 horas), pelo telefone 3069.6530.

As informações confidenciais do seu prontuário médico não serão divulgadas a ninguém externo à Universidade de São Paulo, sem sua prévia autorização, exceto se por obrigação legal.

Se você sofrer qualquer consequência negativa, em decorrência de sua participação no estudo, receberá todos os cuidados necessários no Hospital das Clínicas da FMUSP.

Você receberá uma cópia assinada deste formulário de consentimento esclarecido. Lembre-se que você poderá retirar seu consentimento e abandonar sua participação na pesquisa a qualquer momento, sem que isto provoque qualquer interrupção em seu tratamento ou modificação dos cuidados médicos que você estiver recebendo.

Eu expliquei os todos os procedimentos envolvidos neste estudo e esclareci sua finalidade. Perguntei se havia alguma dúvida a respeito dos mesmos e a esclareci da melhor forma possível.

São Paulo, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do Pesquisador

Eu fui informada sobre todos os procedimentos que serão utilizados nessa pesquisa, fui orientada sobre eventuais desconfortos, riscos e benefícios, que possam ocorrer e das alternativas existentes. Ao assinar este formulário de consentimento esclarecido, eu concordo em participar da pesquisa e entendo que posso livremente retirar meu consentimento e abandonar o estudo, a qualquer momento. Entendo ainda que, caso tiver qualquer dúvida adicional sobre a pesquisa, serei devidamente esclarecida.

São Paulo, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do Paciente/Participante
da Pesquisa

Anexo D - Formulário de Entrevista

Avaliação da Excreção Genital do HIV-1 em Mulheres Menopausadas e em Idade Fértil

Cor	_____	Naturalidade	_____
Peso	_____	Anos de estudo	_____
D.U.M	____/____/____	Altura	_____
Diag.	____/____/____	Comp. Sexual	_____
Infecção	_____	Diag. AIDS	____/____/____

Questionário de Avaliação de Doenças Genitais

Está utilizando antibióticos nas últimas 48 horas? () Sim () Não

Medicamentos: _____

Urinou nas últimas 2 horas? () Sim () Não

1. Paciente refere presença de:

- () Dor pélvica
 () Úlceras
 () Prurido (coceira)
 () Dispareunia
 () Disúria
 () Corrimento vaginal (se sim, prosseguir com as perguntas)

2. Cor do corrimento:

- () Esbranquiçado
 () Esverdeado
 () Amarelado

3. Fétido

- () Sim () Não

4. Bolhoso

- () Sim () Não

5. Presença de corrimento durante a coleta

- () Sim () Não

6. Presença de lesões anogenitais:

- () Ausentes
 () Tipo úlcera
 () Tipo verruga
 () Outro tipo _____

7. Paciente em uso de creme vaginal nos últimos 15 dias?

- () Sim () Não

8. Outras observações importantes durante a coleta

9. Teste KOH 10% () Positivo () Negativo

10. pH _____

Anexo E - Certificado de Aprovação do Comitê de Ética


 RECEBIDO SPG 06.06.06
 ASS: Amor

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12.06.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **477/05**, intitulado: "Avaliação da excreção genital do HIV-1 em mulheres menopausadas e em idade fértil" apresentado pelo Departamento de **MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Prof. Dr. Aluisio Augusto Cotrim Segurado** (Orientador)

Pesquisador (a) Executante: **Sra. Keli Cardoso de Melo** (Pós-Graduando)

CAPPesq, 22 de Junho de 2005.

 Recebido em: 06.06.06

Aluisio Augusto Cotrim Segurado
 Prof. Associado Aluisio Augusto Cotrim Segurado
 Coordenador da Comissão de Pós-Graduação "stricto-sensu"
 Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
 Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

SP.05.06.2006

Euclides Ayres de Castilho
PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
 Presidente da Comissão de Ética para Análise
 de Projetos de Pesquisa

Referências

10. Referências

1. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico DST/AIDS - Ano V, N.1 - 1^a a 26^a Semanas Epidemiológicas. 2008.
2. UNAIDS/WHO AIDS Epidemic Update: December 2008. [Internet] , [citado 1-12-2008]. Disponível em : <http://www.unaids.org>.
3. Melo MR, Gorzoni M, Melo KC, Melo E. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida no Idoso. *Diagnóstico & Tratamento* 2002;7:13-7.
4. Devito C, Broliden K, Kaul R, Svensson L, Johansen K, Kiama P, Kimani J, Lopalco L, Piconi S, Bwayo JJ, Plummer F, Clerici M, Hinkula J. Mucosal and plasma IgA from HIV-1-exposed uninfected individual inhibit HIV-1 transcytosis across human epithelial cells. *J Immunol* 2000;165:5170-6.
5. Castro, M. P. O viver com HIV/aids na perspectiva de pessoas idosas atendidas em ambulatório especializado na cidade de São Paulo [Dissertação]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.
6. Paul SM, Martin RM, Lu SE, Lin Y. Changing trends in human immunodeficiency virus and acquired immunodeficiency syndrome in the population aged 50 and older. *J Am Geriatr Soc* 2007;55:1393-7.
7. Effros RB, Fletcher CV, Gebo K, Halter JB, Hazzard WR, Horne FM, Huebner RE, Janoff EN, Justice AC, Kuritzkes D, Nayfield SG, Plaeger SF, Schmader KE, Ashworth JR, Campanelli C, Clayton CP, Rada B, Woolard NF, High KP. Aging and infectious diseases: workshop on HIV infection and aging: what is known and future research directions. *Clin Infect Dis* 2008;47:542-53.

8. Luther VP, Wilkin AM. HIV infection in older adults. *Clin Geriatr Med* 2007;23:567-83.
9. Appay V, Almeida JR, Sauce D, Autran B, Papagno L. Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. *Exp Gerontol* 2007;42:432-7.
10. Anton E, Sala M, Mallolas J, Navarro G, Cervantes M, Gatell JM, Segura F. [Clinical and epidemiological study of a series of HIV-infected patients over 50 years old]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23:145-8.
11. Braga P, Cardoso MR, Segurado AC. Gender differences in survival in an HIV/AIDS cohort from Sao Paulo, Brazil. *AIDS Patient Care STDS* 2007;21:321-8.
12. Kalayjian RC, Landay A, Pollard RB, Taub DD, Gross BH, Francis IR, Sevin A, Pu M, Spritzler J, Chernoff M, Namkung A, Fox L, Martinez A, Waterman K, Fiscus SA, Sha B, Johnson D, Slater S, Rousseau F, Lederman MM. Age-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus (HIV) disease: association of age and HIV infection with naive CD8+ cell depletion, reduced expression of CD28 on CD8+ cells, and reduced thymic volumes. *J Infect Dis* 2003;187:1924-33.
13. Lekas HM, Schrimshaw EW, Siegel K. Pathways to HIV testing among adults aged fifty and older with HIV/AIDS. *AIDS Care* 2005;17:674-87.
14. Casau NC. Perspective on HIV infection and aging: emerging research on the horizon. *Clin Infect Dis* 2005;41:855-63.
15. Fisher M. Late diagnosis of HIV infection: major consequences and missed opportunities. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21:1-3.

16. Perez JL, Moore RD. Greater effect of highly active antiretroviral therapy on survival in people aged > or =50 years compared with younger people in an urban observational cohort. *Clin Infect Dis* 2003;36:212-8.
17. Shah SS, McGowan JP, Smith C, Blum S, Klein RS. Comorbid conditions, treatment, and health maintenance in older persons with human immunodeficiency virus infection in New York City. *Clin Infect Dis* 2002;35:1238-43.
18. Stall R, Catania J. AIDS risk behaviors among late middle-aged and elderly Americans. The National AIDS Behavioral Surveys. *Arch Intern Med* 1994;154:57-63.
19. Pereira ECA, Schmitt ACB, Cardoso MRA, Aldrighi JM. Tendência da incidência e da mortalidade por aids em mulheres na transição menopausal e pós-menopausa no Brasil, 1996-2005. *Rev Assoc Med Bras* 2008;54:422-5.
20. Dwyer JM, Penny R, Gatenby PA, Learmont J. Susceptibility of postmenopausal women to infection with HIV during vaginal intercourse. *Med J Aust* 1990;153:299.
21. Henderson SJ, Bernstein LB, George DM, Doyle JP, Paranjape AS, Corbie-Smith G. Older women and HIV: how much do they know and where are they getting their information? *J Am Geriatr Soc* 2004;52:1549-53.
22. Schable B, Chu SY, Diaz T. Characteristics of women 50 years of age or older with heterosexually acquired AIDS. *Am J Public Health* 1996;86:1616-8.
23. Massad LS, Evans CT, Wilson TE, Golub ET, Goparaju L, Howard A, Greenblatt RM, Weber K, Schilder K. Impact of menopause on condom use

- by HIV-seropositive and comparison seronegative women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008;47:401-2.
24. Operskalski EA, Mosley JW, Busch MP, Stram DO. Influences of age, viral load, and CD4+ count on the rate of progression of HIV-1 infection to AIDS. Transfusion Safety Study Group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997;15:243-4.
 25. Manfredi R, Calza L, Cocchi D, Chiodo F. Antiretroviral treatment and advanced age: epidemiologic, laboratory, and clinical features in the elderly. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;33:112-4.
 26. van Benthem BH, Vernazza P, Coutinho RA, Prins M. The impact of pregnancy and menopause on CD4 lymphocyte counts in HIV-infected women. *AIDS* 2002;16:919-24.
 27. Kojic EM, Wang CC, Cu-Uvin S. HIV and menopause: a review. *J Womens Health (Larchmt)* 2007;16:1402-11.
 28. Wilson MM. Menopause. *Clin Geriatr Med* 2003;19:483-506.
 29. Gold EB, Bromberger J, Crawford S, Samuels S, Greendale GA, Harlow SD, Skurnick J. Factors associated with age at natural menopause in a multiethnic sample of midlife women. *Am J Epidemiol* 2001;153:865-74.
 30. Fantry LE, Zhan M, Taylor GH, Sill AM, Flaws JA. Age of menopause and menopausal symptoms in HIV-infected women. *AIDS Patient Care STDS* 2005;19:703-11.

31. Clark RA, Cohn SE, Jarek C, Craven KS, Lyons C, Jacobson M, Kamemoto L. Perimenopausal symptomatology among HIV-infected women at least 40 years of age. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000;23:99-100.
32. Clark RA, Bessinger R. Clinical manifestations and predictors of survival in older women infected with HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997;15:341-5.
33. Miller CJ, Alexander NJ, Sutjipto S, Lackner AA, Gettie A, Hendrickx AG, Lowenstine LJ, Jennings M, Marx PA. Genital mucosal transmission of simian immunodeficiency virus: animal model for heterosexual transmission of human immunodeficiency virus. *J Virol* 1989;63:4277-84.
34. Mingjia L, Short R. How oestrogen or progesterone might change a woman's susceptibility to HIV-1 infection. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2002;42:472-5.
35. Pandit L, Ouslander JG. Postmenopausal vaginal atrophy and atrophic vaginitis. *Am J Med Sci* 1997;314:228-31.
36. Poonia B, Walter L, Dufour J, Harrison R, Marx PA, Veazey RS. Cyclic changes in the vaginal epithelium of normal Rhesus macaques. *J Endocrinol* 2006;190:829-35.
37. Marx PA, Spira AI, Gettie A, Dailey PJ, Veazey RS, Lackner AA, Mahoney CJ, Miller CJ, Claypool LE, Ho DD, Alexander NJ. Progesterone implants enhance SIV vaginal transmission and early virus load. *Nat Med* 1996;2:1084-9.
38. Veazey RS, Shattock RJ, Pope M, Kirijian JC, Jones J, Hu Q, Ketas T, Marx PA, Klasse PJ, Burton DR, Moore JP. Prevention of virus transmission to

- macaque monkeys by a vaginally applied monoclonal antibody to HIV-1 gp120. *Nat Med* 2003;9:343-6.
39. Kaul R, Pettengell C, Sheth PM, Sunderji S, Biringer A, MacDonald K, Walmsley S, Rebbapragada A. The genital tract immune milieu: an important determinant of HIV susceptibility and secondary transmission. *J Reprod Immunol* 2008;77:32-40.
40. Bouschbacher M, Bomsel M, Verronese E, Gofflo S, Ganor Y, Dezutter-Dambuyant C, Valladeau J. Early events in HIV transmission through a human reconstructed vaginal mucosa. *AIDS* 2008;22:1257-66.
41. UNAIDS/WHO AIDS Epidemic Update: December 2007. [Internet] , [citado 1-12-2007]. Disponível em : <http://www.unaids.org>.
42. Vettore MV, Schechter M, Melo MF, Boechat LJ, Barroso PF. Genital HIV-1 viral load is correlated with blood plasma HIV-1 viral load in Brazilian women and is reduced by antiretroviral therapy. *J Infect* 2006;52:290-3.
43. Debiaggi M, Zara F, Spinillo A, De Santolo A, Maserati R, Bruno R, Sacchi P, Achilli G, Pistorio A, Romero E, Filice G. Viral excretion in cervicovaginal secretions of HIV-1-infected women receiving antiretroviral therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:91-6.
44. Graham SM, Holte SE, Peshu NM, Richardson BA, Panteleeff DD, Jaoko WG, Ndinya-Achola JO, Mandaliya KN, Overbaugh JM, McClelland RS. Initiation of antiretroviral therapy leads to a rapid decline in cervical and vaginal HIV-1 shedding. *AIDS* 2007;21:501-7.

45. Devereux HL, Burke A, Lee CA, Johnson MA. In vivo HIV-1 compartmentalization: drug resistance-associated mutation distribution. *J Med Virol* 2002;66:8-12.
46. Chan DJ. HIV-1 in the male genital tract: evidence and impact of compartmentalization. *J HIV Ther* 2005;10:5-10.
47. Mostad SB, Jackson S, Overbaugh J, Reilly M, Chohan B, Mandaliya K, Nyange P, Ndinya-Achola J, Bwayo JJ, Kreiss JK. Cervical and vaginal shedding of human immunodeficiency virus type 1-infected cells throughout the menstrual cycle. *J Infect Dis* 1998;178:983-91.
48. Reichelderfer PS, Coombs RW, Wright DJ, Cohn J, Burns DN, Cu-Uvin S, Baron PA, Coheng MH, Landay AL, Beckner SK, Lewis SR, Kovacs AA. Effect of menstrual cycle on HIV-1 levels in the peripheral blood and genital tract. WHS 001 Study Team. *AIDS* 2000;14:2101-7.
49. Coombs RW, Wright DJ, Reichelderfer PS, Burns DN, Cohn J, Cu-Uvin S, Baron PA, Cohen MH, Landay AL, Lewis S, Kovacs A. Variation of human immunodeficiency virus type 1 viral RNA levels in the female genital tract: implications for applying measurements to individual women. *J Infect Dis* 2001;184:1187-91.
50. Benki S, Mostad SB, Richardson BA, Mandaliya K, Kreiss JK, Overbaugh J. Cyclic shedding of HIV-1 RNA in cervical secretions during the menstrual cycle. *J Infect Dis* 2004;189:2192-201.
51. Iversen AK, Fugger L, Eugen-Olsen J, Balslev U, Jensen T, Wahl S, Gerstoft J, Mullins JI, Skinhoj P. Cervical human immunodeficiency virus type 1

- shedding is associated with genital beta-chemokine secretion. *J Infect Dis* 1998;178:1334-42.
52. Al Harthi L, Spear GT, Hashemi FB, Landay A, Sha BE, Roebuck KA. A human immunodeficiency virus (HIV)-inducing factor from the female genital tract activates HIV-1 gene expression through the kappaB enhancer. *J Infect Dis* 1998;178:1343-51.
53. Spear GT, Sha BE, Saarloos MN, Benson CA, Rydman R, Massad LS, Gilmore R, Landay AL. Chemokines are present in the genital tract of HIV-seropositive and HIV-seronegative women: correlation with other immune mediators. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;18:454-9.
54. Anderson DJ, Politch JA, Tucker LD, Fichorova R, Haimovici F, Tuomala RE, Mayer KH. Quantitation of mediators of inflammation and immunity in genital tract secretions and their relevance to HIV type 1 transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14 Suppl 1:S43-S49.
55. Cummins JE, Christensen L, Lennox JL, Bush TJ, Wu Z, Malamud D, Evans-Strickfaden T, Siddig A, Caliendo AM, Hart CE, Dezzutti CS. Mucosal innate immune factors in the female genital tract are associated with vaginal HIV-1 shedding independent of plasma viral load. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22:788-95.
56. Gumbi PP, Nkwanyana NN, Bere A, Burgers WA, Gray CM, Williamson AL, Hoffman M, Coetzee D, Denny L, Passmore JA. Impact of mucosal inflammation on cervical human immunodeficiency virus (HIV-1)-specific CD8 T-cell responses in the female genital tract during chronic HIV infection. *J Virol* 2008;82:8529-36.

57. Johnson LF, Lewis DA. The effect of genital tract infections on HIV-1 shedding in the genital tract: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Dis* 2008;35:946-59.
58. Kemal KS, Foley B, Burger H, Anastos K, Minkoff H, Kitchen C, Philpott SM, Gao W, Robison E, Holman S, Dehner C, Beck S, Meyer WA, III, Landay A, Kovacs A, Bremer J, Weiser B. HIV-1 in genital tract and plasma of women: compartmentalization of viral sequences, coreceptor usage, and glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:12972-7.
59. Garcia-Bujalance S, Ruiz G, De Guevara CL, Pena JM, Bates I, Vazquez JJ, Gutierrez A. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA loads in cervicovaginal secretions in pregnant women and relationship between viral loads in the genital tract and blood. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:111-5.
60. Nagot N, Foulongne V, Becquart P, Mayaud P, Konate I, Ouedraogo A, Defer MC, Weiss H, Van de PP, Segondy M. Longitudinal assessment of HIV-1 and HSV-2 shedding in the genital tract of West African women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;39:632-4.
61. Sha BE, Zariffard MR, Wang QJ, Chen HY, Bremer J, Cohen MH, Spear GT. Female genital-tract HIV load correlates inversely with *Lactobacillus* species but positively with bacterial vaginosis and *Mycoplasma hominis*. *J Infect Dis* 2005;191:25-32.
62. Coleman JS, Hitti J, Bukusi EA, Mwachari C, Muliro A, Nguti R, Gausman R, Jensen S, Patton D, Lockhart D, Coombs R, Cohen CR. Infectious correlates

- of HIV-1 shedding in the female upper and lower genital tracts. *AIDS* 2007;21:755-9.
63. Abu-Raddad LJ, Magaret AS, Celum C, Wald A, Longini IM, Jr., Self SG, Corey L. Genital herpes has played a more important role than any other sexually transmitted infection in driving HIV prevalence in Africa. *PLoS ONE* 2008;3:e2230.
64. Iversen AK. Genital HIV shedding in women. *AIDS Patient Care STDS* 1999;13:695-701.
65. Coombs RW, Reichelderfer PS, Landay AL. Recent observations on HIV type-1 infection in the genital tract of men and women. *AIDS* 2003;17:455-80.
66. Kovacs A, Wasserman SS, Burns D, Wright DJ, Cohn J, Landay A, Weber K, Cohen M, Levine A, Minkoff H, Miotti P, Palefsky J, Young M, Reichelderfer P. Determinants of HIV-1 shedding in the genital tract of women. *Lancet* 2001;358:1593-601.
67. Neely MN, Benning L, Xu J, Strickler HD, Greenblatt RM, Minkoff H, Young M, Bremer J, Levine AM, Kovacs A. Cervical shedding of HIV-1 RNA among women with low levels of viremia while receiving highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;44:38-42.
68. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F, Meehan MO, Lutalo T, Gray RH. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med* 2000;342:921-9.

69. Nagot N, Ouedraogo A, Weiss HA, Konate I, Sanon A, Defer MC, Sawadogo A, Andonaba JB, Vallo R, Becquart P, Segondy M, Mayaud P, Van de PP. Longitudinal effect following initiation of highly active antiretroviral therapy on plasma and cervicovaginal HIV-1 RNA among women in Burkina Faso. *Sex Transm Infect* 2008;84:167-70.
70. Uvin SC, Anderson D, Parekh B. Human immunodeficiency virus-1 shedding in the genital tract of a female long-term nonprogressor without detectable plasma human immunodeficiency virus ribonucleic acid. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:490-1.
71. Mostad SB, Kreiss JK. Shedding of HIV-1 in the genital tract. *AIDS* 1996;10:1305-15.
72. Mostad SB. Prevalence and correlates of HIV type 1 shedding in the female genital tract. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14 Suppl 1:S11-S15.
73. Goulston C, McFarland W, Katzenstein D. Human immunodeficiency virus type 1 RNA shedding in the female genital tract. *J Infect Dis* 1998;177:1100-3.
74. Shields JW. HIV-1 shedding in genital tract of infected women. *Lancet* 2002;359:1526.
75. Ghosn J, Chaix ML, Peytavin G, Bresson JL, Galimand J, Girard PM, Raffi F, Cohen-Codar I, Delfraissy JF, Rouzioux C. Absence of HIV-1 shedding in male genital tract after 1 year of first-line lopinavir/ritonavir alone or in combination with zidovudine/lamivudine. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1344-7.

76. Cowan FM, Pascoe S, Barlow K, Langhaug L, Jaffar S, Hargrove J, Robinson N, Bassett MT, Wilson D, Brown DW, Hayes RJ. A randomised placebo controlled trial to explore the effect of suppressive therapy with acyclovir on genital shedding of HIV-1 and herpes simplex virus type 2 among Zimbabwean sex workers. *Sex Transm Infect* 2008;84:548-53.
77. Chan DJ. HIV-1 in the male genital tract: evidence and impact of compartmentalisation. *J HIV Ther* 2005;10:5-10.
78. Androletti L, Chomont N, Gresenguet G, Matta M, de Dieu LJ, Carreno MP, Si-Mohamed A, Legoff J, Kazatchkine MD, Belec L. Independent levels of cell-free and cell-associated human immunodeficiency virus-1 in genital-tract secretions of clinically asymptomatic, treatment-naive African women. *J Infect Dis* 2003;188:549-54.
79. Chomont N, Hocini H, Gresenguet G, Brochier C, Bouhlal H, Androletti L, Becquart P, Charpentier C, de Dieu LJ, Si-Mohamed A, Kazatchkine MD, Belec L. Early archives of genetically-restricted proviral DNA in the female genital tract after heterosexual transmission of HIV-1. *AIDS* 2007;21:153-62.
80. Fiore JR, Suligoi B, Monno L, Angarano G, Pastore G. HIV-1 shedding in genital tract of infected women. *Lancet* 2002;359:1525-6.
81. Fiore JR, Suligoi B, Saracino A, Di Stefano M, Bugarini R, Lepera A, Favia A, Monno L, Angarano G, Pastore G. Correlates of HIV-1 shedding in cervicovaginal secretions and effects of antiretroviral therapies. *AIDS* 2003;17:2169-76.
82. Philpott S, Burger H, Tsoukas C, Foley B, Anastos K, Kitchen C, Weiser B. Human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA sequences in the

- female genital tract and blood: compartmentalization and inpatient recombination. *J Virol* 2005;79:353-63.
83. Zarate S, Pond SL, Shapshak P, Frost SD. Comparative study of methods for detecting sequence compartmentalization in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2007;81:6643-51.
84. Andreoletti L, Skrabal K, Perrin V, Chomont N, Saragosti S, Gresenguet G, Moret H, Jacques J, Longo JD, Matta M, Mammano F, Belec L. Genetic and phenotypic features of blood and genital viral populations of clinically asymptomatic and antiretroviral-treatment-naive clade A human immunodeficiency virus type 1-infected women. *J Clin Microbiol* 2007;45:1838-42.
85. Nunnari G, Sullivan J, Xu Y, Nyirjesy P, Kulkosky J, Cavert W, Frank I, Pomerantz RJ. HIV type 1 cervicovaginal reservoirs in the era of HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005;21:714-8.
86. Rasheed S, Li Z, Xu D, Kovacs A. Presence of cell-free human immunodeficiency virus in cervicovaginal secretions is independent of viral load in the blood of human immunodeficiency virus-infected women. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:122-9.
87. Iversen AK, Attermann J, Gerstoft J, Fugger L, Mullins JI, Skinhoj P. Longitudinal and cross-sectional studies of HIV-1 RNA and DNA loads in blood and the female genital tract. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;117:227-35.

88. Wilson DP, Law MG, Grulich AE, Cooper DA, Kaldor JM. Relation between HIV viral load and infectiousness: a model-based analysis. *Lancet* 2008;372:314-20.
89. Al Harthi L, Kovacs A, Coombs RW, Reichelderfer PS, Wright DJ, Cohen MH, Cohn J, Cu-Uvin S, Watts H, Lewis S, Beckner S, Landay A. A menstrual cycle pattern for cytokine levels exists in HIV-positive women: implication for HIV vaginal and plasma shedding. *AIDS* 2001;15:1535-43.
90. Ghanem KG, Shah N, Klein RS, Mayer KH, Sobel JD, Warren DL, Jamieson DJ, Duerr AC, Rompalo AM. Influence of sex hormones, HIV status, and concomitant sexually transmitted infection on cervicovaginal inflammation. *J Infect Dis* 2005;191:358-66.
91. Goulston C, Stevens E, Gallo D, Mullins JI, Hanson CV, Katzenstein D. Human immunodeficiency virus in plasma and genital secretions during the menstrual cycle. *J Infect Dis* 1996;174:858-61.
92. Natividad-Villanueva GU, Santiago E, Manalastas RM, Jr., Brown HW, Ingersoll J, Caliendo AM, Mayer KH, Cu-Uvin S. Human immunodeficiency virus in plasma and cervicovaginal secretions in Filipino women. *Int J STD AIDS* 2003;14:826-9.
93. Al Harthi L, Roebuck KA, Kessler H, Landay A. Inhibition of cytokine-driven human immunodeficiency virus type 1 replication by protease inhibitor. *J Infect Dis* 1997;176:1175-9.
94. Spear GT, Al Harthi L, Sha B, Saarloos MN, Hayden M, Massad LS, Benson C, Roebuck KA, Glick NR, Landay A. A potent activator of HIV-1 replication is

- present in the genital tract of a subset of HIV-1-infected and uninfected women. *AIDS* 1997;11:1319-26.
95. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000;118:503-8.
96. Belec L, Gherardi R, Payan C, Prazuck T, Malkin JE, Tevi-Benissan C, Pillot J. Proinflammatory cytokine expression in cervicovaginal secretions of normal and HIV-infected women. *Cytokine* 1995;7:568-74.
97. Poli G, Kinter A, Justement JS, Kehrl JH, Bressler P, Stanley S, Fauci AS. Tumor necrosis factor alpha functions in an autocrine manner in the induction of human immunodeficiency virus expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:782-5.
98. Poli G, Fauci AS. Cytokine modulation of HIV expression. *Semin Immunol* 1993;5:165-73.
99. Al Harthi L, Landay A. HIV in the female genital tract: viral shedding and mucosal immunity. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44:144-53.
100. Wasserheit JN. Epidemiological synergy. Interrelationships between human immunodeficiency virus infection and other sexually transmitted diseases. *Sex Transm Dis* 1992;19:61-77.
101. Fleming DT, Wasserheit JN. From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex Transm Infect* 1999;75:3-17.
102. Wasserheit JN. HIV infection and other STDs: so close and yet so far. *Sex Transm Dis* 1999;26:549-50.

103. Rothenberg RB, Wasserheit JN, St Louis ME, Douglas JM. The effect of treating sexually transmitted diseases on the transmission of HIV in dually infected persons: a clinic-based estimate. Ad Hoc STD/HIV Transmission Group. *Sex Transm Dis* 2000;27:411-6.
104. Deschamps MM, Pape JW, Hafner A, Johnson WD, Jr. Heterosexual transmission of HIV in Haiti. *Ann Intern Med* 1996;125:324-30.
105. Gray RH, Wawer MJ, Sewankambo NK, Serwadda D, Li C, Moulton LH, Lutalo T, Wabwire-Mangen F, Meehan MP, Ahmed S, Paxton LA, Kiwanuka N, Nalugoda F, Korenromp EL, Quinn TC. Relative risks and population attributable fraction of incident HIV associated with symptoms of sexually transmitted diseases and treatable symptomatic sexually transmitted diseases in Rakai District, Uganda. Rakai Project Team. *AIDS* 1999;13:2113-23.
106. Lawn SD, Subbarao S, Wright TC, Jr., Evans-Strickfaden T, Ellerbrock TV, Lennox JL, Butera ST, Hart CE. Correlation between human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in the female genital tract and immune activation associated with ulceration of the cervix. *J Infect Dis* 2000;181:1950-6.
107. Zara F, Nappi RE, Brerra R, Migliavacca R, Maserati R, Spinillo A. Markers of local immunity in cervicovaginal secretions of HIV infected women: implications for HIV shedding. *Sex Transm Infect* 2004;80:108-12.
108. Kucera LS, Leake E, Iyer N, Raben D, Myrvik QN. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and herpes simplex virus type 2 (HSV-2) can coinfect and simultaneously replicate in the same human CD4+ cell: effect of

- coinfection on infectious HSV-2 and HIV-1 replication. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1990;6:641-7.
109. Moriuchi M, Moriuchi H, Williams R, Straus SE. Herpes simplex virus infection induces replication of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 2000;278:534-40.
110. Cohn JA, Hashemi FB, Camarca M, Kong F, Xu J, Beckner SK, Kovacs AA, Reichelderfer PS, Spear GT. HIV-inducing factor in cervicovaginal secretions is associated with bacterial vaginosis in HIV-1-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;39:340-6.
111. Larsen B, Galask RP. Vaginal microbial flora: composition and influences of host physiology. *Ann Intern Med* 1982;96:926-30.
112. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983;74:14-22.
113. Cu-Uvin S, Hogan JW, Caliendo AM, Harwell J, Mayer KH, Carpenter CC. Association between bacterial vaginosis and expression of human immunodeficiency virus type 1 RNA in the female genital tract. *Clin Infect Dis* 2001;33:894-6.
114. Cu US, Caliendo AM, Reinert SE, Mayer KH, Flanigan TP, Carpenter CC. HIV-1 in the female genital tract and the effect of antiretroviral therapy. *AIDS* 1998;12:826-7.
115. Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, Paxton L, McNaim D, Wabwire-Mangen F, Serwadda D, Li C, Kiwanuka N, Hillier SL, Rabe L, Gaydos CA, Quinn TC,

- Konde-Lule J. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet* 1997;350:546-50.
116. Olinger GG, Hashemi FB, Sha BE, Spear GT. Association of indicators of bacterial vaginosis with a female genital tract factor that induces expression of HIV-1. *AIDS* 1999;13:1905-12.
117. Ugwumadu A, Hay P, Taylor-Robinson D. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet* 1997;350:1251.
118. Caillouette JC, Sharp CF, Jr., Zimmerman GJ, Roy S. Vaginal pH as a marker for bacterial pathogens and menopausal status. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:1270-5.
119. Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology* 2004;150:2565-73.
120. Gonzalez Pedraza AA, Sanchez HG, Ponce Rosas RE. [Frequency, risk factors and vaginal colonization due to *Escherichia coli*]. *Ginecol Obstet Mex* 2004;72:68-75.
121. Rotchford K, Strum AW, Wilkinson D. Effect of coinfection with STDs and of STD treatment on HIV shedding in genital tract secretions: systematic review and data synthesis. *Sex Transm Dis* 2000;27:243-8.
122. Wang CC, McClelland RS, Reilly M, Overbaugh J, Emery SR, Mandaliya K, Chohan B, Ndinya-Achola J, Bwayo J, Kreiss JK. The effect of treatment of

- vaginal infections on shedding of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 2001;183:1017-22.
123. McClelland RS, Wang CC, Mandaliya K, Overbaugh J, Reiner MT, Panteleeff DD, Lavreys L, Ndinya-Achola J, Bwayo JJ, Kreiss JK. Treatment of cervicitis is associated with decreased cervical shedding of HIV-1. *AIDS* 2001;15:105-10.
124. Wolday D, Gebremariam Z, Mohammed Z, Dorigo-Zetsma W, Meles H, Messele T, Geyid A, Sanders E, Maayan S. The impact of syndromic treatment of sexually transmitted diseases on genital shedding of HIV-1. *AIDS* 2004;18:781-5.
125. Spinillo A, Zara F, Gardella B, Preti E, Mainini R, Maserati R. The effect of vaginal candidiasis on the shedding of human immunodeficiency virus in cervicovaginal secretions. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:774-9.
126. Spinillo A, Debiaggi M, Zara F, Maserati R, Polatti F, De Santolo A. Factors associated with nucleic acids related to human immunodeficiency virus type 1 in cervico-vaginal secretions. *BJOG* 2001;108:634-41.
127. Beltrame A, Matteelli A, Carvalho AC, Saleri N, Casalini C, Capone S, Patroni A, Manfrin M, Carosi G. Vaginal colonization with *Candida spp.* in human immunodeficiency virus-infected women: a cohort study. *Int J STD AIDS* 2006;17:260-6.
128. Oliveira FA, Pflieger V, Lang K, Heukelbach J, Miralles I, Fraga F, Sousa AQ, Stoffler-Meilicke M, Ignatius R, Kerr LF, Feldmeier H. Sexually transmitted infections, bacterial vaginosis, and candidiasis in women of reproductive

- age in rural Northeast Brazil: a population-based study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102:751-6.
129. Mohamed AS, Becquart P, Hocini H, Metais P, Kazatchkine M, Belec L. Dilution assessment of cervicovaginal secretions collected by vaginal washing to evaluate mucosal shedding of free human immunodeficiency virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:624-6.
130. Kamenev L, Leclercq M, Francois-Gerard C. An enzyme immunoassay for prostate-specific p30 antigen detection in the postcoital vaginal tract. *J Forensic Sci Soc* 1989;29:233-41.
131. Haimovici F, Anderson DJ. Detection of semen in cervicovaginal secretions. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995;8:236-8.
132. Chomont N, Gresenguet G, Hocini H, Becquart P, Matta M, Andreoletti L, Si-Mohamed A, Carreno MP, Kazatchkine M, Belec L. Polymerase chain reaction for Y chromosome to detect semen in cervicovaginal fluid: a prerequisite to assess HIV-specific vaginal immunity and HIV genital shedding. *AIDS* 2001;15:801-2.
133. Chomont N, Gresenguet G, Levy M, Hocini H, Becquart P, Matta M, Tranchot-Diallo J, Andreoletti L, Carreno MP, Kazatchkine MD, Belec L. Detection of Y chromosome DNA as evidence of semen in cervicovaginal secretions of sexually active women. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:955-8.
134. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, Moher D, Rennie D, de Vet HC, Lijmer JG. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. *Clin Chem* 2003;49:7-18.

135. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, Lijmer JG, Moher D, Rennie D, de Vet HC. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:68-73.
136. Gompel C, Koss LG. Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas 1a ed. São Paulo: Manole; 1997: 31-8: Técnicas de colheita, de fixação e de coloração.
137. Domenice S, Billerbeck AE, Rocha RO, Nishi MY, Medeiros MA, Bachega TA, Budunki V, Mendonca BB. Protocol for rapid fetal sex determination in chorionic villus through polimerase chain reaction. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1998;53:80-2.
138. Amaral R, Giraldo PC, Goncalves AK, Junior JE, Santos-Pereira S, Linhares I, Passos MR. Evaluation of hygienic douching on the vaginal microflora of female sex workers. *Int J STD AIDS* 2007;18:770-3.
139. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. Critérios de definição de casos de aids em adultos e crianças. 2004.
140. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV. 2006.
141. Síntese de Indicadores Sociais 2006. [Internet] , [citado 11-22-2008].
Disponível em :
www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/perfilidoso/default.shtm .

142. Tordoff C. The prevalence of HIV and AIDS in older people. *Prof Nurse* 1996;12:193-5.
143. Terpenning M. AIDS in older people. *J Am Geriatr Soc* 1998;46:244-5.
144. Special report: the aging AIDS epidemic. Older HIV patients have different counseling needs. Prevention messages often lacking for older people. *AIDS Alert* 2004;19:102-5.
145. Berquó A. Comportamento sexual e percepções sobre o HIV/Aids no Brasil, 1998-2005. *Rev Saude Publica* 2008;42:32-44.
146. Dennerstein L, Dudley EC, Hopper JL, Guthrie JR, Burger HG. A prospective population-based study of menopausal symptoms. *Obstet Gynecol* 2000;96:351-8.
147. Chen HX, Ryan PA, Ferguson RP, Yataco A, Markowitz JA, Raksis K. Characteristics of acquired immunodeficiency syndrome in older adults. *J Am Geriatr Soc* 1998;46:153-6.
148. Allison-Ottey S, Ferguson RP, Heym K. Characteristics of AIDS in older patients: a follow-up study. *J Am Geriatr Soc* 1999;47:764-5.
149. Welch K, Morse A. Predictors of survival in older men with AIDS. *Geriatr Nurs* 2002;23:62-8.
150. Silverberg MJ, Leyden W, Horberg MA, DeLorenze GN, Klein D, Quesenberry CP, Jr. Older age and the response to and tolerability of antiretroviral therapy. *Arch Intern Med* 2007;167:684-91.

151. Manfredi R, Chiodo F. A case-control study of virological and immunological effects of highly active antiretroviral therapy in HIV-infected patients with advanced age. *AIDS* 2000;14:1475-7.
152. Viard JP, Mocroft A, Chiesi A, Kirk O, Roge B, Panos G, Vetter N, Bruun JN, Johnson M, Lundgren JD. Influence of age on CD4 cell recovery in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy: evidence from the EuroSIDA study. *J Infect Dis* 2001;183:1290-4.
153. Tumbarello M, Rabagliati R, De Gaetano DK, Bertagnolio S, Tamburrini E, Tacconelli E, Cauda R. Older HIV-positive patients in the era of highly active antiretroviral therapy: changing of a scenario. *AIDS* 2003;17:128-31.
154. Greenbaum AH, Wilson LE, Keruly JC, Moore RD, Gebo KA. Effect of age and HAART regimen on clinical response in an urban cohort of HIV-infected individuals. *AIDS* 2008;22:2331-9.
155. Orlando G, Meraviglia P, Cordier L, Meroni L, Landonio S, Giorgi R, Fasolo M, Faggion I, Riva A, Zambelli A, Beretta R, Gubertini G, Dedivitiis G, Jacchetti G, Cargnel A. Antiretroviral treatment and age-related comorbidities in a cohort of older HIV-infected patients. *HIV Med* 2006;7:549-57.
156. Patterson K, Napravnik S, Eron J, Keruly J, Moore R. Effects of age and sex on immunological and virological responses to initial highly active antiretroviral therapy. *HIV Med* 2007;8:406-10.
157. Watts DH, Springer G, Minkoff H, Hillier SL, Jacobson L, Moxley M, Justman J, Cejtin H, O'Connell C, Greenblatt RM. The occurrence of vaginal infections among HIV-infected and high-risk HIV-uninfected women:

- longitudinal findings of the Women's Interagency HIV Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;43:161-8.
158. Page KR, Moore RD, Wilgus B, Gindi R, Erbelding EJ. *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* among human immunodeficiency virus-infected women. *Sex Transm Dis* 2008;35:859-61.
159. Campos C, Amaral E, Levi JE, Portugal P, Villarroel M, Bezerra K, Silva M, Morais S. Carga viral de HIV em mulheres brasileiras infectadas pelo HIV. *Rev Assoc Med Bras* 2008;54:67-71.
160. Anderson BL, Cu-Uvin S. Determinants of HIV shedding in the lower genital tract of women. *Curr Infect Dis Rep* 2008;10:505-11.
161. Hawes SE, Sow PS, Stern JE, Critchlow CW, Gottlieb GS, Kiviat NB. Lower levels of HIV-2 than HIV-1 in the female genital tract: correlates and longitudinal assessment of viral shedding. *AIDS* 2008;22:2517-25.
162. Ghys PD, Fransen K, Diallo MO, Ettiegne-Traore V, Coulibaly IM, Yeboue KM, Kalish ML, Maurice C, Whitaker JP, Greenberg AE, Laga M. The associations between cervicovaginal HIV shedding, sexually transmitted diseases and immunosuppression in female sex workers in Abidjan, Cote d'Ivoire. *AIDS* 1997;11:F85-F93.
163. Critchlow CW, Kiviat NB. Detection of human immunodeficiency virus type 1 and type 2 in the female genital tract: implications for the understanding of virus transmission. *Obstet Gynecol Surv* 1997;52:315-24.
164. Seck K, Samb N, Tempesta S, Mulanga-Kabeya C, Henzel D, Sow PS, Coll-Seck A, Mboup S, Ndoeye I, Delaporte E. Prevalence and risk factors of

- cervicovaginal HIV shedding among HIV-1 and HIV-2 infected women in Dakar, Senegal. *Sex Transm Infect* 2001;77:190-3.
165. Gottlieb GS, Hawes SE, Kiviat NB, Sow PS. Differences in proviral DNA load between HIV-1-infected and HIV-2-infected patients. *AIDS* 2008;22:1379-80.
166. Cu-Uvin S, Caliendo AM, Reinert S, Chang A, Juliano-Remollino C, Flanigan TP, Mayer KH, Carpenter CC. Effect of highly active antiretroviral therapy on cervicovaginal HIV-1 RNA. *AIDS* 2000;14:415-21.
167. Ellerbrock TV, Lennox JL, Clancy KA, Schinazi RF, Wright TC, Pratt-Palmore M, Evans-Strickfaden T, Schnell C, Pai R, Conley LJ, Parrish-Kohler EE, Bush TJ, Tatti K, Hart CE. Cellular replication of human immunodeficiency virus type 1 occurs in vaginal secretions. *J Infect Dis* 2001;184:28-36.
168. Kovacs A, Chan LS, Chen ZC, Meyer WA, III, Muderspach L, Young M, Anastos K, Levine AM. HIV-1 RNA in plasma and genital tract secretions in women infected with HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;22:124-31.
169. Cowan FF, Pascoe SJ, Barlow KL, Langhaug LF, Jaffar S, Hargrove JW, Robinson NJ, Latif AS, Bassett MT, Wilson D, Brown DW, Hayes RJ. Association of genital shedding of herpes simplex virus type 2 and HIV-1 among sex workers in rural Zimbabwe. *AIDS* 2006;20:261-7.
170. Zara F, Nappi RE, Brerra R, Migliavacca R, Maserati R, Spinillo A. Markers of local immunity in cervico-vaginal secretions of HIV infected women: implications for HIV shedding. *Sex Transm Infect* 2004;80:108-12.
171. Bebell LM, Passmore JA, Williamson C, Mlisana K, Iriogbe I, van Loggerenberg F, Karim QA, Karim SA. Relationship between levels of

- inflammatory cytokines in the genital tract and CD4(+) cell counts in women with acute HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2008;198:710-4.
172. Sankaran S, George MD, Reay E, Guadalupe M, Flamm J, Prindiville T, Dandekar S. Rapid onset of intestinal epithelial barrier dysfunction in primary human immunodeficiency virus infection is driven by an imbalance between immune response and mucosal repair and regeneration. *J Virol* 2008;82:538-45.
173. Zara F, Nappi RE, Brerra R, Migliavacca R, Maserati R, Spinillo A. Markers of local immunity in cervico-vaginal secretions of HIV infected women: implications for HIV shedding. *Sex Transm Infect* 2004;80:108-12.
174. Watts DH, Fazzari M, Minkoff H, Hillier SL, Sha B, Glesby M, Levine AM, Burk R, Palefsky JM, Moxley M, Ahdieh-Grant L, Strickler HD. Effects of bacterial vaginosis and other genital infections on the natural history of human papillomavirus infection in HIV-1-infected and high-risk HIV-1-uninfected women. *J Infect Dis* 2005;191:1129-39.
175. Zariffard MR, Novak RM, Lurain N, Sha BE, Graham P, Spear GT. Induction of Tumor Necrosis Factor-alpha secretion and toll-like receptor 2 and 4 mRNA expression by genital mucosal fluids from women with bacterial vaginosis. *J Infect Dis* 2005;191:1913-21.
176. Krasnow SW, Zhang LQ, Leung KY, Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1, and phorbol myristate acetate are independent activators of NF-kappa B which differentially activate T cells. *Cytokine* 1991;3:372-9.

177. Al Harthi L, Roebuck KA, Olinger GG, Landay A, Sha BE, Hashemi FB, Spear GT. Bacterial vaginosis-associated microflora isolated from the female genital tract activates HIV-1 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;21:194-202.
178. Hashemi FB, Mollenhauer J, Madsen LD, Sha BE, Nacken W, Moyer MB, Sorg C, Spear GT. Myeloid-related protein (MRP)-8 from cervicovaginal secretions activates HIV replication. *AIDS* 2001;15:441-9.
179. Hashemi FB, Ghassemi M, Roebuck KA, Spear GT. Activation of human immunodeficiency virus type 1 expression by *Gardnerella vaginalis*. *J Infect Dis* 1999;179:924-30.
180. Hashemi FB, Ghassemi M, Faro S, Aroutcheva A, Spear GT. Induction of human immunodeficiency virus type 1 expression by anaerobes associated with bacterial vaginosis. *J Infect Dis* 2000;181:1574-80.
181. Hashemi FB, Mollenhauer J, Madsen LD, Sha BE, Nacken W, Moyer MB, Sorg C, Spear GT. Myeloid-related protein (MRP)-8 from cervico-vaginal secretions activates HIV replication. *AIDS* 2001;15:441-9.
182. Roy S, Caillouette JC, Roy T, Faden JS. Vaginal pH is similar to follicle-stimulating hormone for menopause diagnosis. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:1272-7.
183. Caillouette JC, Sharp CF, Jr., Zimmerman GJ, Roy S. Vaginal pH as a marker for bacterial pathogens and menopausal status. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:1270-5.

184. Backer LC, Rubin CS, Marcus M, Kieszak SM, Schober SE. Serum follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone levels in women aged 35-60 in the U.S. population: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III, 1988-1994). *Menopause* 1999;6:29-35.
185. Chancey CJ, Khanna KV, Seegers JF, Zhang GW, Hildreth J, Langan A, Markham RB. Lactobacilli-expressed single-chain variable fragment (scFv) specific for intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) blocks cell-associated HIV-1 transmission across a cervical epithelial monolayer. *J Immunol* 2006;176:5627-36.

Apêndices

Apêndices

Apêndice 1 - Preparo dos Reagentes

C.1 - Phosphate-buffered Saline (PBS)

Foram dissolvidos 8g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,44g de Na₂HPO₄ e 0,24g de KH₂PO₄ em 800ml de água destilada. O pH foi ajustado para 7,4 com HCl. Adicionou-se então água destilada para atingir o volume de 1l e procedeu-se à autoclavagem por 20 minutos a 15psi (1,05kg/cm²). A solução foi estocada a temperatura ambiente.

C.2 - Preparo do PBS com LiCl 10mM

A partir de 423,9mg de LiCl (*Lithium chloride* MM 42,39g - Sigma Aldrich, CAS number 7447-41-8), adicionaram-se 100ml de PBS para preparação da solução estoque 100mM. A partir dessa, foram feitas diluições para construção da curva-padrão com soluções 20mM, 10mM, 5mM e 2,5mM para validação da análise por fotometria de chama. Para preparação da solução de PBS 10mM, a ser utilizada na obtenção do lavado cervicovaginal, adicionaram-se 100ml da solução estoque 100mM em 900ml de PBS.

C.3 - Solução salina (NaCl 0,9%)

Para preparo da solução salina utilizada para armazenamento do conteúdo vaginal para o exame Micológico Direto, pesquisa de *Trichomonas vaginalis*, *clue cells* e cultura de fungos, preparou-se solução de Cloreto de Sódio 0,9% (Cloreto de Sódio P.A 1010055 - CRQ® Cromato). A partir de 9g de NaCl, adicionou-se água destilada em balão volumétrico de 1000ml. A solução foi distribuída em tubos de 5ml, sendo esses vedados com algodão hidrófobo e autoclavados por 15 minutos a 121° C. Os tubos foram mantidos a 4°C até o momento da coleta.

C.4 - Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI)

Utilizado para cultura de aeróbios do conteúdo vaginal, foi obtido pela adição de 37g de Caldo Infusão Cérebro Coração (Oxoid® CM225) em 1000ml de água destilada. A solução foi homogeneizada até dissolução total, distribuída em tubos de 5ml, vedados com algodão hidrófobo e esses autoclavados a 121°C por 15 minutos, sendo armazenados a 4°C até o momento da coleta.

C.5 - Ágar Sangue

Meio de cultura utilizado no cultivo de bactérias da flora cocóide Gram-positivas e leveduras. Adicionaram-se 1000ml de água destilada a 30g de *Azide Blood Agar Base* (Oxoid® CM259). O meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e resfriado até aproximadamente 40°C. Ao atingir essa temperatura, adicionou-se 5% do volume de hemácias desfibrinadas de carneiro. A distribuição em placas foi feita em meio livre de contaminação bacteriana.

C.6 - Ágar chocolate

Meio de cultura utilizado no cultivo e isolamento de *Neisseria gonorrhoeae*. Adicionaram-se 1000ml de água destilada a 30g de *Azide Blood Agar Base* (Oxoid® CM259). O meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e resfriado até aproximadamente 70°C. Ao atingir essa temperatura, adicionou-se 5% do volume de hemácias de carneiro, homogeneizando-se sempre para que as hemácias se rompessem e o meio ficasse com tonalidade amarronzada. A distribuição em placas foi feita em meio livre de contaminação bacteriana.

C.7 - Ágar MacConkey

Meio de cultura utilizado no cultivo e isolamento de enterobactérias. Adicionaram-se 50g de *MacConkey Agar* (Difco™ 212123 - BD) em 1000ml de água destilada até completa dissolução. Procedeu-se à autoclavagem e distribuição do meio de cultura nas mesmas condições já mencionadas.

C.8 - Ágar Sabouraud

Meio de cultura utilizado no cultivo e isolamento de fungos. Adicionaram-se 65g de *Sabouraud Dextrose Agar* (Oxoid® CM0041) em 1000ml de água destilada até completa dissolução. Procedeu-se à autoclavagem e distribuição em tubos de 9ml, sendo esses vedados com algodão hidrófobo. O resfriamento foi feito em posição inclinada.