

Aline Machiavelli

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E
AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MARCADORES DE
INFLAMAÇÃO EM CRIANÇAS FILHAS DE MULHERES
INFECTADAS PELO HIV**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e
Bióciências da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo R.
Pinto

Coorientador: Prof. Dr. Carlos R.
Zárate-Bládes

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Machiavelli, Aline

Caracterização da microbiota intestinal e
avaliação da presença de marcadores de inflamação em
crianças filhas de mulheres infectadas pelo HIV /
Aline Machiavelli ; orientador, Aguinaldo R Pinto,
coorientador, Carlos R Zárate-Bládes, 2018.

118 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

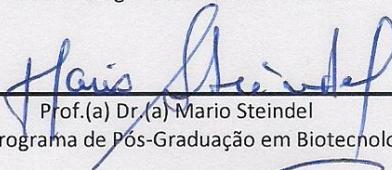
1. Biotecnologia e Biociências. 2. HIV. 3. Bem
estar da criança. 4. Microbioma intestinal. 5.
Inflamação. I. Pinto, Aguinaldo R. II. Zárate
Bládes, Carlos R. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

“Caracterização da microbiota intestinal e avaliação da presença de marcadores de inflamação em crianças filhas de mulheres infectadas pelo HIV”

Por

Aline Machiavelli

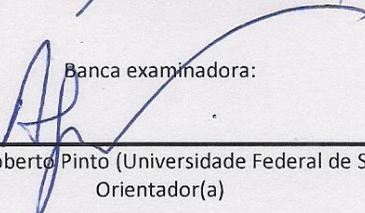
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (012/2018/PPGBQA) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



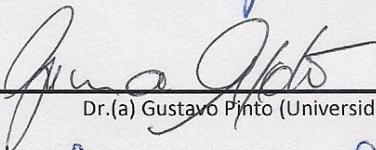
Prof. (a) Dr. (a) Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

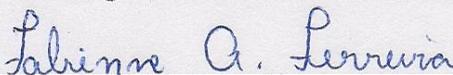
Banca examinadora:



Dr. (a) Aguinaldo Roberto Pinto (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr. (a) Gustavo Pinto (Universidade do Sul de Santa Catarina)



Dr. (a) Fabienne Antunes Ferreira (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 14 de maio de 2018.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Loirí e Adilson, que sempre foram o melhor exemplo que eu poderia ter, aos meus amigos, por todo o apoio e estímulo, e a todas as mães vivendo com HIV.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, Aguinaldo R. Pinto, pela sua confiança e sua dedicação para que esse trabalho seguisse sempre da melhor forma possível;

Ao meu coorientador, Carlos R. Zárate-Bládes, não apenas pelas valiosas contribuições para esse trabalho, mas também por desenvolver e manter o grupo de interesse em imunologia, espaço de discussões pertinentes no qual tive a oportunidade de aprimorar em muito meu conhecimento sobre a área;

Ao professor Rubens Duarte, que apesar de não constar formalmente como orientador desse trabalho acompanhou de perto a construção dos resultados aqui apresentados e sempre se mostrou disponível a auxiliar;

Ao professor Oscar Bruna Romero, por suas contribuições nas fases iniciais desse projeto e por ter iniciado o contato com o Hospital Infantil que permitiu que a ideia desse trabalho surgisse;

À Prof. Dr. Maria Marlene por nos abrir as portas do Hospital Infantil e auxiliar nos trâmites do comitê de ética;

Às enfermeiras do Hospital Infantil, Teresa, Carmen, Renata e Adriana, pelo trabalho incansável e muitas vezes duro que realizam todos os dias no hospital e por todas as vezes que se dispuseram a me ajudar mesmo quando já tinham diversas outras obrigações;

À médica Paola Marian Bridi do Setor de Nutrologia do Hospital Infantil por sua atenção e esforço para que esse trabalho pudesse atravessar momentos difíceis;

Aos médicos Marcos Paulo Guchert e Sonia Ferraz de Andrade do Setor de Infectologia do Hospital Infantil por se disponibilizarem a me auxiliar sempre que possível;

À empresa BPI Biotecnologia, em especial a Dra. Meline Rezende Moraes e Caio Munhoz, por terem me recebido com atenção e permitido que eu acompanhasse seus trabalhos, momento que para mim foi de grande aprendizado;

Aos amigos e colegas, Lívia, Abadio, Sthephany, Wellinton e Luisa por me auxiliarem em diversos momentos durante esse trabalho, seja durante as coletas, experimentos ou discussões;

A Lucas, por estar sempre presente e me acompanhar durante a coleta de amostras;

E por fim, agradeço a todas as mães que participaram desse estudo e confiaram compartilhar uma parte de sua vida comigo. Certamente

vocês são a parte mais importante desse trabalho e sem sua solidariedade nenhum resultado seria obtido.

RESUMO

Com os avanços na terapia antirretroviral e programas de prevenção da transmissão vertical do HIV, o número de crianças expostas, mas não infectadas (HEU, do inglês “HIV exposed but uninfected”) vem crescendo a cada ano. Entretanto, quando comparadas a crianças não expostas ao HIV, crianças HEU apresentam maior morbidade e mortalidade, problemas de crescimento e problemas no desenvolvimento do sistema imune. Considerando o papel fundamental que a microbiota intestinal apresenta na manutenção da homeostase do hospedeiro e desenvolvimento do sistema imune, tem sido levantada a hipótese de que crianças HEU apresentam uma composição da microbiota intestinal alterada, que estaria relacionada aos problemas enfrentados por essas crianças. Para testar essa hipótese, foram avaliados a microbiota intestinal, a presença dos marcadores de translocação microbiana e inflamação, a alimentação, número de infecções passadas e dados socioepidemiológicos de crianças HEU, comparando-as a crianças não expostas ao HIV, além de avaliada a microbiota intestinal e presença de marcadores de translocação microbiana nas mães dessas crianças. De acordo com a percepção das mães, crianças HEU apresentaram uma maior frequência de doenças quando comparadas a crianças não expostas ao HIV. Não foram observadas diferenças significativas quanto a diversidade alfa e beta entre crianças HEU e crianças não expostas ao HIV, nem entre mães HIV positivas e HIV negativas. Foi possível, porém, identificar táxons que apresentaram diferenças significativas na abundância entre os dois grupos de crianças e os dois grupos de mães. Ademais, a partir da predição do conteúdo funcional *in silico*, foi possível identificar alterações na abundância de diversos genes da microbiota intestinal entre os grupos de crianças e os grupos de mães. Não foram encontradas correlações significativas entre índices de diversidade e abundância da microbiota e os demais fatores analisados. Mães HIV positivas apresentaram níveis de CD14 solúvel mais elevados no plasma, quando comparadas a mães HIV negativas, porém não foram observadas diferenças nos níveis de citocinas inflamatórias entre os dois grupos de mães. Este estudo representa a primeira caracterização da microbiota intestinal em crianças HEU que não foram amamentadas, podendo contribuir para discussões sobre a recomendação ou não da amamentação para crianças expostas ao HIV e planejamento da introdução de probióticos ou prebióticos como suplementos na fórmula infantil distribuída para crianças HEU.

Palavras-chave: HIV. Bem-estar da criança. Microbioma intestinal. Metagenoma. Translocação microbiana. Inflamação.

ABSTRACT

With the advancements in antiretroviral therapy and strategies to prevent HIV vertical transmission, the number of HIV exposed but uninfected (HEU) children has been increasing every year. However, when compared to unexposed children, HEU children present increased morbidity and mortality, growth problems, and immune system development issues. Considering the main role that the gut microbiota plays in general host homeostasis and immune system development, it has been hypothesized that HEU children present an altered gut microbiota composition, which may be related to the problems faced by them. In order to evaluate this hypothesis, the gut microbiota, the presence of microbial translocation and inflammation markers, eating habits, number of past infections, and socioepidemiological data from HEU children were analyzed, comparing them to HIV unexposed children, as well as the gut microbiota and microbial translocation and inflammation markers from their mothers. According to mothers' perception, HEU children presented increased frequency of diseases, when compared to unexposed children. No significant differences were observed regarding alpha and beta diversity between HEU and unexposed children, or among HIV positive and negative mothers. However, it was possible to identify taxa with significantly different abundance between the two groups of children and two groups of mothers. Moreover, based on *in silico* prediction of the functional microbiota composition, it was possible to identify abundance alterations in several genes from the gut microbiota in the two groups of children and the two groups of mothers. No significant correlations were observed between children microbiota diversity and abundance and any of the parameters evaluated. HIV positive mothers showed increased soluble CD14 levels when compared to HIV negative mothers, however, no differences were observed on inflammatory cytokine levels among the two groups of mothers. This study represents the first gut microbiota characterization in HEU children that were not breastfed, and thus may contribute to the discussion about whether or not to recommend breastfeeding for HIV exposed children, and for the planning of introduction of probiotics or prebiotics in the infant formula distributed to HEU children.

Keywords: HIV. Child welfare. Gut microbiome. Metagenomics. Microbial translocation. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Frequência de sintomas de doenças em crianças expostas e não expostas ao HIV de acordo com respostas das mães à pergunta “Com que frequência a criança fica doente?”.....	53
Figura 2: Frequência de infecções em crianças expostas e não expostas ao HIV de acordo com respostas das mães à pergunta “Quando foi a última vez que seu(sua) filho(a) apresentou alguma doença?” (A). Frequência de crianças que apresentaram sinais de doenças pelo menos nos últimos seis meses, de acordo com respostas das mães (B).	54
Figura 3: Concentração de DNA (A), Número de sequências geradas pelo sequenciamento (B), Número de OTUs (C) e Número de gêneros (D) identificados em cada grupo.....	55
Figura 4: Análise de Coordenadas Principais dos índices de diversidade de Bray Curtis entre os grupos de mães e crianças (A), entre crianças expostas e não expostas ao HIV (B) e entre mães HIV positivas e HIV negativas (C).	56
Figura 5: Índices de riqueza (Chao1) e diversidade alfa (diversidade da microbiota de cada indivíduo, Shannon e Simpson) para crianças expostas e não expostas ao HIV, mães HIV positivas e mães HIV negativas.	56
Figura 6: Abundância relativa de famílias de bactérias em crianças expostas e não expostas ao HIV e em mães HIV positivas e HIV negativas.....	57
Figura 7: Mapa de calor (“heat map”) com a abundância relativa de cada gênero encontrado em crianças expostas e não expostas ao HIV (A) e mães HIV positivas e HIV negativas (B).	58
Figura 8: OTUs consideradas significativamente diferentes entre crianças expostas e não expostas ao HIV de acordo com a classificação taxonômica. Cada OTU é representada por um ponto. “o” = Ordem; “f” = Família; “g” = Gênero.....	59
Figura 9: OTUs consideradas significativamente diferentes entre mães HIV positivas e HIV negativas de acordo com a classificação taxonômica. Cada OTU é representada por um ponto. “o” = Ordem; “f” = Família; “g” = Gênero.....	60
Figura 10: Frequência de consumo semanal de alimentos e água para crianças (A) e mães (B).	68
Figura 11: Gráfico de barras com o valor de R ² da explicação de variação interindividual para cada alimento de acordo com o índice de diversidade beta Bray Curtis e mapa de calor representando a correlação entre a frequência de consumo de cada alimento e os índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon e Simpson) para crianças (A) e mães (B).	69

Figura 12: Citocinas inflamatórias IL-12p70, TNF α , IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8 (A); CD14 solúvel (B) e Proteína C reativa (C) no plasma de crianças expostas e não expostas ao HIV.....	71
Figura 13: Citocinas inflamatórias IL-12p70, TNF α , IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8 (A) e CD14 solúvel (B) no plasma de mães HIV positivas e HIV negativas. * p < 0,05.	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Descrição dos ortólogos KEGG diferencialmente abundantes em crianças expostas em relação a crianças não expostas ao HIV e suas vias relacionadas de acordo com a enciclopédia de Genes e Genomas Kyoto (KEGG).....	61
Quadro 2: Descrição dos ortólogos KEGG diferencialmente abundantes em mães HIV positivas em relação a mães HIV negativas e suas vias relacionadas de acordo com a enciclopédia de Genes e Genomas Kyoto (KEGG).....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de referência para conversão dos dados ordinais do questionário de frequência alimentar.	45
Tabela 2: Características clínicas e demográficas de crianças expostas e não expostas ao HIV em Florianópolis, SC, Brasil.	49
Tabela 3: Características clínicas e demográficas de mães HIV positivas e HIV negativas em Florianópolis, SC, Brasil.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês “*Acquired Immunodeficiency Syndrome*”
- CBA - do inglês “*Citometric bead array*”
- CCR5 - Receptor de quimiocina C-C do tipo 5
- cDNA – DNA complementar
- CXCR4 - Receptor de quimiocina C-X-C do tipo 4
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- EndoCAb - do inglês, “*endotoxin core antibody*”
- HEU - Exposto ao HIV, porém não infectado, do inglês “*HIV Exposed Uninfected*”
- HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês “*Human Immunodeficiency Virus*”
- KEGG - Enciclopédia de Genes e Genomas Kyoto, do inglês “*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*”
- KO - Ortólogos KEGG
- LBP - Proteína ligante de lipopolissacarídeo, do inglês “*Lipopolysaccharide binding protein*”
- LPS - Lipopolissacarídeo
- NK - do inglês, “*Natural killer*”
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- OTU - Unidade Taxonômica Operacional, do inglês “*Operational Taxonomic Unit*”
- PBS - Tampão fosfato-salino, do inglês “*Phosphate Buffered Saline*”
- PCR - Reação em cadeia da polimerase, do inglês, “*Polymerase chain reaction*”
- PEAR – do inglês, “*Paired-end read merger*”
- PICRUst – do inglês, “*Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*”
- PMTCT - Prevenção da Transmissão de Mãe para Filho, do inglês “*Prevention of Mother-to-Child Transmission*”
- Qiime – do inglês, “*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*”
- qPCR - PCR quantitativa em tempo real
- RNA - Ácido ribonucleico
- rRNA - RNA ribossomal
- SCFA - ácidos graxos de cadeia curta, do inglês “*short chain fat acids*”
- SFB - Bactérias filamentosas segmentadas, do inglês “*Segmented Filamentous Bacteria*”
- TREC - Círculo de Excisão do Receptor de Célula T, do inglês “*T-cell receptor excision circles*”

UNAIDS - Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids, do inglês “*Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*”

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	CRIANÇAS EXPOSTAS AO HIV	25
1.2	A MICROBIOTA E O HIV	31
1.3	A MICROBIOTA INFANTIL E O HIV	35
1.4	HIPÓTESE	38
1.5	OBJETIVOS	38
1.5.1	Objetivo geral	38
1.5.2	Objetivos específicos	39
2	METODOLOGIA	41
2.1	LOCAL, POPULAÇÃO DE ESTUDO, CRITÉRIO DE INCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	41
2.2	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	41
2.3	PREPARAÇÃO DA BIBLIOTECA METAGENÔMICA E SEQUENCIAMENTO	42
2.4	ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	43
2.5	ANÁLISE DOS MARCADORES DE TRANSLOCAÇÃO MICROBIOANA E INFLAMAÇÃO	44
2.6	AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS AO QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR	45
2.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
2.8	ASPECTOS FINANCEIROS	47
3	RESULTADOS	49
3.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO	49
3.2	FREQUÊNCIA DE INFECÇÕES E CRESCIMENTO DE CRIANÇAS EXPOSTAS E NÃO EXPOSTAS AO HIV	52
3.3	AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL	54
3.3.1	Diversidade e abundância	54
3.3.2	Predição do conteúdo funcional	60
3.3.3	Influência da dieta na microbiota intestinal	67

3.4	MARCADORES DE TRANSLOACÇÃO MICROBIANA E INFLAMAÇÃO	70
4	DISCUSSÃO	73
5	SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	85
6	CONCLUSÕES	87
7	PERSPECTIVAS	89
	APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO SOBRE HÁBITOS DE VIDA E ALIMENTAÇÃO DAS MÃES	105
	APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO SOBRE HÁBITOS DE VIDA E ALIMENTAÇÃO DAS CRIANÇAS.....	111
	ANEXO A –Termo de consentimento livre e esclarecido.....	117

1 INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o vírus responsável pela síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) e infecta células do sistema imune, causando progressiva depressão imunológica devido à morte de linfócitos T CD4⁺, o que predispõe o indivíduo ao desenvolvimento de infecções oportunistas (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014). É um vírus envelopado com aproximadamente 10 nm de diâmetro, pertencente à família Retroviridae e ao gênero *Lentivirus*. O envelope viral é derivado da célula hospedeira e constituído por uma bicamada lipídica. No envelope encontram-se as proteínas gp120 e gp41, as quais são responsáveis pela fusão do vírus à molécula CD4 e aos correceptores CCR5 (receptor de quimiocina C-C do tipo 5) ou CXCR4 (receptor de quimiocina C-X-C do tipo 4) localizados na superfície da célula alvo (BARRÉ-SINOUSI, 1996, BLUMENTHAL; DURELL; VIARD, 2012). Dentro do envelope encontra-se o capsídeo viral, no qual está contido o genoma viral, constituído por duas fitas simples de RNA, e as enzimas protease, transcriptase reversa e integrase (BARRÉ-SINOUSI, 1996). Uma vez dentro da célula, o genoma viral é transcrito em cDNA pela transcriptase reversa e integrado ao DNA da célula com o auxílio da enzima integrase. Após a integração no genoma da célula, o DNA viral passa a ser chamado de provírus, e é utilizado como modelo para que RNA polimerases da célula transcrevam novas cópias do genoma viral, além do RNA mensageiro que será traduzido em proteínas virais (BARRÉ-SINOUSI, 1996, WONG-STAAAL, 1991). Os novos vírions são então montados no citoplasma da célula e brotam a partir da membrana celular, formando novos vírus que são capazes de infectar outras células (SUNDQUIST; KRÄUSSLICH, 2012)

A aids é uma das doenças infecciosas de maior importância para saúde pública mundial. Apenas em 2016, 1,8 milhões de pessoas se infectaram com o agente etiológico da doença e atualmente existem no mundo cerca de 36,7 milhões de pessoas portadoras do vírus (UNAIDS, 2017a). No Brasil, desde o início da epidemia até junho de 2017, foram registrados 882.810 casos de Aids, sendo 576.245 (65,3%) dos casos em homens e 306.444 (34,7%) em mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a).

O Brasil encontra-se entre os países com maior número de casos de infecção por HIV, sendo o país com maior incidência de infecção na América Latina (UNAIDS, 2017a). A distribuição proporcional dos casos de aids no Brasil mostra uma concentração maior nas regiões Sudeste e

Sul, correspondendo respectivamente a 52,3% e 20,1% do total de casos identificados de 1980 até junho de 2017. A taxa nacional de detecção de aids vem diminuindo nos últimos anos, apresentando uma média de 18,5 casos notificados de aids para cada 100 mil habitantes em 2016. Também se observa uma tendência de queda desta taxa na região Sul, com uma média de 25,3 casos para cada 100 mil habitantes em 2016. Dentre os estados dessa região, o Rio Grande do Sul apresentou em 2016 uma taxa de detecção igual a 31,8 casos por 100 mil habitantes, sendo que Porto Alegre apresentou a maior taxa de detecção dentre todas as capitais brasileiras (65,9 casos para cada 100 mil habitantes), mais que o dobro da taxa do Estado e 3,6 vezes mais alta que a média nacional. No Paraná, a taxa de detecção no mesmo ano foi igual a 16,3 casos por 100 mil habitantes e sua capital, Curitiba, apresentou taxa igual a 20,2 casos por 100 mil habitantes. Já o estado de Santa Catarina apresentou a quarta maior taxa de detecção do país, com 29,2 casos por 100 mil habitantes sendo que Florianópolis contou com uma incidência de 61,5 casos por 100 mil habitantes, a segunda maior taxa de detecção dentre as capitais brasileiras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a).

Em gestantes, a taxa de detecção de HIV no Brasil vem apresentando tendência de aumento nos últimos dez anos. Em 2006 a taxa observada foi de 2,1 casos para cada mil nascidos vivos, passando para 2,6 em 2016, indicando um aumento de 23,8%. Desde 2000 até junho de 2017, foram notificados 108.134 casos de gestantes infectadas com o HIV, sendo a maioria da região Sudeste (39,1%), seguida pela região Sul (30,6%). A região Sul apresentou em 2016 a maior taxa de detecção de aids em gestantes dentre todas as regiões brasileiras (5,6 casos para cada mil nascidos vivos), mais que o dobro da taxa do Brasil. Dentre os estados da região Sul, Rio Grande do Sul e Santa Catarina também apresentam taxa de detecção superior a taxa nacional, correspondendo respectivamente a 8,8 e 5,7 casos para cada mil nascidos vivos e representando os dois estados com as maiores taxas de detecção de HIV em gestantes dentre todos os Estados do país. O Paraná, por sua vez, apresenta taxa de detecção igual a 2,7 casos para cada mil nascidos vivos. Quanto às capitais, Florianópolis é a segunda capital no Brasil com a maior taxa de detecção de HIV em gestantes (8,6 gestantes com HIV para cada mil nascidos vivos em 2014), superada apenas por Porto Alegre (20,0 gestantes com HIV para cada mil nascidos vivos em 2014), enquanto Curitiba ocupa a décima primeira posição, com 3,6 casos para cada mil nascidos vivos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a).

1.1 CRIANÇAS EXPOSTAS AO HIV

Nos últimos anos, a combinação do tratamento antirretroviral para mãe e para a criança, com cuidados na hora do parto e a substituição da amamentação por outro tipo de alimentação, reduziu drasticamente a transmissão vertical do HIV (AFRAN *et al.*, 2014). De acordo com o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids (UNAIDS, do inglês *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*), cerca de 1,4 milhões de novas infecções em crianças foram evitadas entre 2000 e 2014 devido ao tratamento com antirretrovirais e aos programas de prevenção da transmissão do HIV de mãe para filho (PMTCT, do inglês *prevention of mother-to-child transmission*). Assim, a implementação desses programas tem sido um dos grandes sucessos na história da saúde pública. Em 1994 foi proposto o primeiro regime para evitar novas infecções por HIV em crianças, sendo que entre 2001 e 2013, os programas PMTCT foram grandemente expandidos. Em 2009, quando foi lançado o plano global para a eliminação de novas infecções por HIV em crianças, o número de gestantes recebendo tratamento correspondia a apenas 36% do total de infectadas, enquanto que em dezembro de 2014, 73% de todas as gestantes vivendo com HIV no mundo já recebiam tratamento antirretroviral (UNAIDS, 2015). Como resultado, novas infecções por HIV em crianças caíram 60% de 2009 para 2015, com cerca de 80% das gestantes HIV positivas recebendo tratamento antirretroviral (UNAIDS, 2017b). No Brasil, a taxa de detecção de aids em menores de cinco anos é utilizada como indicador para o monitoramento da transmissão vertical e nos últimos dez anos, essa taxa caiu 34%, passando de 3,6 em 2006 para 2,4 em 2016. As regiões Sul e Sudeste apresentaram a maior tendência de queda, correspondendo a 49,2% e 51,4% respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a). Atualmente, em casos de gestações planejadas e acompanhadas durante o pré-natal, parto e amamentação, realizando-se todos os procedimentos recomendados para a redução da chance de transmissão vertical do HIV, a chance de transmissão chega a ser menor do que 2%. Entretanto, sem o devido acompanhamento o risco de transmissão vertical pode variar de 15% a 45% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o fornecimento de tratamento para todas as mulheres gestantes e durante a amamentação, a fim de evitar a transmissão do HIV para seus filhos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). No Brasil, o Ministério

da Saúde recomenda o início de tratamento antirretroviral para todas as pessoas vivendo com HIV, independentemente do número de linfócitos TCD4⁺, com o objetivo de reduzir o comprometimento do sistema imunológico e os níveis de inflamação do paciente, além de reduzir a transmissibilidade do HIV. Da mesma forma, para gestantes, no Brasil é recomendado o tratamento antirretroviral durante a gravidez e após o parto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b). Nos casos em que a gestante HIV positiva seja assintomática, não tenha infecções oportunistas e com número de linfócitos TCD4⁺ acima de 350 células/mm³ é recomendado o início de tratamento antirretroviral a partir do terceiro trimestre de gravidez, a fim de se evitar possíveis efeitos colaterais causados devido a exposição a antirretrovirais durante o primeiro trimestre de gravidez (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b). Dentre os procedimentos recomendados pelo Ministério da Saúde para se evitar a transmissão vertical do HIV está o acompanhamento clínico da gestante soropositiva, durante o qual a mãe é aconselhada a não amamentar sua criança. Para que isso seja possível sem comprometer o estado nutricional e desenvolvimento da criança, o governo brasileiro distribui fórmula infantil para todas as mães HIV positivas até que a criança complete 6 meses de idade. Além do incentivo a não amamentação, crianças expostas ao HIV recebem também tratamento antirretroviral, usualmente com zidovudina, até que a criança apresente duas cargas virais negativas (HOFER *et al.*, 2017). Com o uso constante de antirretrovirais durante a gestação, atualmente grande parte das gestantes apresenta carga viral indetectável no momento do parto. Isso tem feito com que cada vez mais algumas das medidas antigamente recomendadas para se evitar a transmissão vertical venham tendo sua validade debatida, como é o caso da recomendação de parto por cesárea e do uso de antirretrovirais injetáveis no momento do parto (HOFER *et al.*, 2017). Como resultado, atualmente no Brasil, no caso de mulheres que apresentem carga viral indetectável no momento do parto, o parto vaginal é recomendado, contrariando recomendações prévias de que mulheres HIV positivas deveriam realizar parto por cesárea (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b).

Com o aumento no número de gestantes com diagnóstico de infecção por HIV no Brasil e concomitante avanço das terapias antirretrovirais e programas PMTCT, o número de crianças soronegativas filhas de mulheres soropositivas (crianças HEU, do inglês *HIV Exposed-Uninfected*) tende a crescer cada vez mais. Os efeitos adversos da infecção materna e do tratamento pré-natal com antirretrovirais na saúde das crianças sempre foram uma preocupação e com o crescente número de

crianças HEU essa preocupação se tornou ainda maior (ADLER *et al.*, 2015). Esperava-se que com essas terapias a condição de vida das crianças filhas de mulheres infectadas pelo HIV melhorasse; entretanto, o que se observa é que comparados aos filhos de mulheres não infectadas, crianças HEU enfrentam diversos comprometimentos, incluindo uma quantidade significativamente maior de doenças infecciosas no início da vida, associada a uma série de alterações imunológicas funcionais e fenotípicas (AFRAN *et al.*, 2014).

Estudos realizados antes da existência de tratamento amplo com antirretrovirais demonstram que crianças HEU apresentavam maior mortalidade, comprometimento do crescimento, menor circunferência craniana, maior risco de desenvolvimento de infecções respiratórias e maior número de hospitalizações em relação a crianças não expostas ao HIV (BRAHMBHATT *et al.*, 2006; EVANS; JONES; PRENDERGAST, 2016; FILTEAU *et al.*, 2011; KOYANAGI *et al.*, 2011; MARINDA *et al.*, 2007). Estudos realizados após a implementação dos tratamentos com antirretrovirais apresentam resultados semelhantes. Na África do Sul, crianças HEU filhas de mulheres que receberam tratamento com antirretrovirais apresentaram maior número de hospitalizações devido a infecções durante o primeiro ano de vida, quando comparadas a crianças não expostas ao HIV (SLOGROVE *et al.*, 2012). Em outro estudo realizado na Bélgica comparando crianças não expostas ao HIV a crianças HEU filhas de mulheres que receberam tratamento durante a gestação demonstrou-se que crianças HEU apresentaram maior susceptibilidade à infecção severa por *Streptococcus* do grupo B (EPALZA; GOETGHEBUER, 2010).

A própria exposição ao tratamento com antirretrovirais pode ser responsável por parte das alterações observadas nessas crianças, uma vez que alguns dos medicamentos utilizados durante a gravidez são capazes de atravessar a barreira placentária (ELSE *et al.*, 2011). Acredita-se que o tratamento materno com antirretrovirais possa ter importantes consequências para a criança, dependendo do antirretroviral utilizado, com possibilidade de alterações na função mitocondrial, alterações na função e crescimento cardíaco e alterações na função de células progenitoras CD34⁺ (AFRAN *et al.*, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b). Em um estudo retrospectivo realizado na Bélgica, Adler e colaboradores (ADLER *et al.*, 2015) observaram que crianças HEU, filhas de mulheres que receberam tratamento com antirretrovirais apresentaram maior risco de desenvolver infecções severas quando comparadas a crianças não expostas ao tratamento. No Brasil, um estudo

recente avaliou o crescimento de crianças HEU no estado do Rio de Janeiro, comparando crianças filhas de mulheres que receberam tratamento antirretroviral a crianças filhas de mulheres que não receberam tratamento e a conclusão foi que a exposição a antirretrovirais no início da vida está relacionada a menor peso e tamanho dessas crianças (HOFER *et al.*, 2015). Um maior número de hospitalizações, menor taxa de sobrevivência e maior taxa de desnutrição também foram observadas em uma coorte de crianças HEU em Moçambique, quando comparadas a crianças não expostas ao HIV (RUPÉREZ *et al.*, 2017). Em 2016, um estudo retrospectivo avaliando dados de crianças jamaicanas também apontou elevado número de infecções em crianças expostas ao HIV (PIERRE *et al.*, 2016). Um estudo realizado utilizando dados de crianças expostas ao HIV da Dinamarca também revelou um maior número de admissões em hospitais de crianças HEU quando comparadas a crianças não expostas ao HIV. Entretanto, de acordo com os autores, essas admissões seriam principalmente devido ao acompanhamento padrão de crianças com histórico de infecção por HIV na família e a profilaxia da transmissão em crianças expostas ao HIV, não sendo encontradas diferenças entre crianças expostas e não expostas quanto ao número de internações devido a infecções. Nesse estudo crianças expostas ao HIV não foram amamentadas (MOSEHOLM *et al.*, 2016), sugerindo que é possível que a exposição ao HIV tenha impactos distintos dependendo das características da população.

Estudos também apontam que crianças HEU apresentam alterações no sistema imunológico, como por exemplo variações no número de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, comprometimento na função de células progenitoras, maior ativação de células T e maiores níveis de IL-7 plasmática (BORGES-ALMEIDA *et al.*, 2011; CLERICI *et al.*, 2000; NIELSEN *et al.*, 2001). Na África do Sul, um estudo avaliando a respostas humoral em crianças HEU demonstrou que a exposição ao HIV durante a gestação está associada a menores níveis de anticorpos no nascimento (JONES *et al.*, 2011). Na Itália, Clerici e colaboradores (2000) avaliaram diversos aspectos relacionados ao sistema imune de crianças HEU filhas de mulheres que receberam tratamento, comparando-as a crianças saudáveis não expostas ao HIV e concluíram que alterações na imunidade celular e no desenvolvimento de células T ocorrem em recém-nascidos HEU, sendo que algumas dessas alterações podem persistir durante a infância. Kidzeru e colaboradores (KIDZERU *et al.*, 2014) avaliaram a resposta de células T a vacinas em crianças HEU, comparando-as a crianças não expostas ao HIV, e observaram alterações significativas na

resposta imune de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Crianças HEU apresentam também uma maior proporção de linfócitos TCD4⁺ naïves quando comparados a crianças filhas de mães HIV negativas (BUNDERS *et al.*, 2014), além de poderem apresentar reduzida função tímica, comprometimento da função de células apresentadoras de antígenos, diferenças na proporção de linfócitos Th1 e Th17 e maior ativação imune, sendo que algumas dessas alterações podem ser observadas nas crianças por até 8 anos (AFRAN *et al.*, 2014; BORGES-ALMEIDA *et al.*, 2011). Jallow e colaboradores (2017) avaliaram o efeito da infecção por HIV materna na transferência de anticorpos contra o sarampo e observaram que, apesar de mães HIV positivas e HIV negativas apresentarem títulos semelhantes de anticorpos contra o sarampo, a quantidade de anticorpos em plasma proveniente do cordão umbilical de crianças expostas ao HIV foi muito inferior a de crianças não expostas, indicando uma deficiência na transferência de anticorpos maternos (JALLOW *et al.*, 2017).

Em crianças brasileiras foram também relatadas diferenças significativas quanto a proporção, fenótipo e função de células NK no sangue periférico de crianças expostas ao HIV quando comparadas a crianças não expostas (SMITH *et al.*, 2017). O desenvolvimento imune foi avaliado em crianças brasileiras através da imunofenotipagem de linfócitos e avaliação de círculos de excisão do receptor de célula T (TRECs, do inglês *T-cell receptor excision circles*) e níveis de LPS, sCD14 e citocinas no plasma de crianças com diferentes idades, revelando alterações nos níveis de MIP-1 β em crianças de 12 meses, e nos níveis de IL-4 e ativação imune em crianças entre 6 a 12 anos (MIYAMOTO *et al.*, 2017). O comprometimento do sistema imune em diversos aspectos observado nas crianças HEU pode explicar, pelo menos em parte, a maior frequência de infecções que acomete essa população.

Mulheres infectadas pelo HIV apresentam elevados níveis de citocinas pró inflamatórias e ativação de linfócitos T e B durante a gravidez e existem evidências de maior ativação imune tanto de células da imunidade inata quanto adaptativa em crianças HEU, quando comparadas a crianças não expostas ao HIV (BUNDERS *et al.*, 2014; EVANS; JONES; PRENDERGAST, 2016). As citocinas pró inflamatórias IL-1 β e IL-8 foram encontradas em concentrações significativamente mais altas no plasma de crianças HEU filhas de mães que receberam tratamento antirretroviral, comparadas a crianças não expostas ao HIV (BUNDERS *et al.*, 2014). Ademais, monócitos e células dendríticas de crianças HEU apresentam produção significativamente

maior de citocinas pró inflamatórias quando estimulados *in vitro*, comparado a crianças não expostas ao HIV (REIKIE *et al.*, 2014).

Acredita-se que a maior causa da ativação imune crônica, seja a disseminação de bactérias intestinais e de seus subprodutos (como o LPS, por exemplo) do lúmen intestinal para a corrente sanguínea, conhecida como translocação microbiana (BRENCHLEY *et al.*, 2006; KLATT; FUNDERBURG; BRENCHLEY, 2013; ZEVIN *et al.*, 2016). O epitélio intestinal atua como uma barreira prevenindo a passagem de compostos e micro-organismos presentes no lúmen intestinal para a lâmina própria do intestino. Sendo assim, o dano causado a essa barreira resulta na possibilidade de que endotoxinas ou mesmo micro-organismos inteiros atravessem a mucosa intestinal, chegando aos tecidos e a circulação sistêmica (DILLON *et al.*, 2014; DINH *et al.*, 2015; PÉREZ-SANTIAGO *et al.*, 2013; VÁZQUEZ-CASTELLANOS *et al.*, 2014). Alguns marcadores de translocação microbiana clássicos usualmente avaliados no plasma ou soro são LPS bacteriano, EndoCAb (do inglês *endotoxin core antibody*), proteína ligante de LPS (LBP, do inglês *Lipopolysaccharide binding protein*) e o marcador de ativação de monócitos CD14 solúvel (sCD14), além da quantificação de RNA ribossomal bacteriano (NOVATI *et al.*, 2015; SANDLER; DOUEK, 2012).

Ativação imune crônica e inflamação sistêmica causadas pela translocação microbiana podem ser fatores relacionados à maior susceptibilidade a doenças observadas nessas crianças, uma vez que uma maior ativação imune deixa o organismo mais susceptível a outras infecções. A ativação imune pode ser causada pela exposição do feto a um ambiente pró inflamatório durante a gestação ou pela exposição ao próprio HIV. A translocação microbiana que ocorre nas mães infectadas pelo HIV pode afetar o desenvolvimento do sistema imune do feto, ou ainda, a exposição ao HIV durante a amamentação pode comprometer a barreira da mucosa intestinal das crianças, levando a translocação microbiana e ativação imune (EVANS; JONES; PRENDERGAST, 2016; KLATT; FUNDERBURG; BRENCHLEY, 2013). A translocação microbiana também tem sido relacionada a alterações na microbiota intestinal; assim, é possível que essas crianças apresentem alterações na comunidade de micro-organismos intestinais e que essas alterações estejam relacionadas a translocação microbiana e consequente ativação imune aumentada, o que pode explicar algumas das complicações enfrentadas por essas crianças (ZEVIN *et al.*, 2016).

1.2 A MICROBIOTA E O HIV

Nos últimos anos diversos trabalhos têm sido publicados demonstrando o papel crítico dos micro-organismos comensais (microbiota), especialmente do intestino, no desenvolvimento e modulação do sistema imune. Estudos iniciais com animais *germ-free* demonstraram que bactérias intestinais são importantes para o desenvolvimento normal do sistema imune (BAUER *et al.*, 1963; THORBECKE, 1959). Estudos mais recentes têm ampliado esse conhecimento e revelado fatores celulares e moleculares envolvidos nessa relação, especialmente referente às células secretoras de IL-17 e T regulatórias. No caso dos linfócitos T auxiliares 17 (Th17), estes dependem de um grupo específico de bactérias intestinais para sua diferenciação e estimulação, conhecidas como bactérias filamentosas segmentadas (SFB, do inglês *Segmented Filamentous Bacteria*) (IVANOV *et al.*, 2009). Outras bactérias intestinais, incluindo *Bacteroides fragilis* e algumas espécies dos grupos IV e XIV do gênero *Clostridium*, também se mostraram importantes para direcionar a diferenciação de células Treg e na secreção da citocina regulatória IL-10 (ATARASHI *et al.*, 2011; MAZMANIAN *et al.*, 2005; MAZMANIAN; ROUND; KASPER, 2008). As recentemente descritas células linfóides inatas, tipicamente encontradas em mucosas, também apresentam relações estreitas com a microbiota (BRITANOVA; DIEFENBACH, 2017).

Estima-se que 40% a 65% de todas as células do sistema imune estejam localizadas no trato gastrointestinal (SHU *et al.*, 2013), sendo esse o primeiro alvo na infecção por HIV e onde ocorre maior perda de linfócitos TCD4⁺ durante a infecção (BRENCHLEY *et al.*, 2004). Essa depleção de linfócitos TCD4⁺ causada pela infecção por HIV no trato gastrointestinal ocorre rapidamente já no início da infecção e continua durante todos os estágios da progressão da doença (BRENCHLEY *et al.*, 2006). Com a constante depleção dessas células, a infecção pelo HIV impacta o delicado equilíbrio entre o trato gastrointestinal e a microbiota, o que leva ao comprometimento da barreira epitelial do intestino e consequente translocação microbiana (SHU *et al.*, 2013). Experimentos *in vitro* demonstram que a exposição ao HIV causa comprometimento de junções de oclusão em células epiteliais e acredita-se que o mesmo possa ocorrer no epitélio intestinal (NAZLI *et al.*, 2010). Ademais, acredita-se que essas bactérias e seus subprodutos, quando presentes na circulação,

estimulem receptores do tipo Toll (do inglês, *Toll-like receptors*), em especial TLR-4 de células dendríticas e macrófagos, estimulando a produção de IL-10 por linfócitos B (JUDE *et al.*, 2003; SHU *et al.*, 2013). A citocina IL-10 é conhecida por inibir citocinas pró-inflamatórias, conduzindo à tolerância imunológica. Maiores proporções de linfócitos B produtores de IL-10 são encontradas em indivíduos HIV positivos e altos níveis de IL-10 no plasma são relacionados a elevada carga viral nesses indivíduos (SAMBLEBEN *et al.*, 2018; SIEWE *et al.*, 2013). Foi demonstrado também que a produção de IL-10 por linfócitos B pode inibir células TCD8⁺ específicas para o HIV (LIU *et al.*, 2014; SIEWE *et al.*, 2013). Dessa forma, as bactérias intestinais indiretamente poderiam contribuir para que se mantenha um estado de tolerância imunológica, que pode promover a replicação e transmissão do vírus (SHU *et al.*, 2013).

Algumas das células do sistema imune que sofrem maior depleção no trato gastrointestinal são os linfócitos Th17. Essas células auxiliam na manutenção da homeostase dos enterócitos, além de ter um papel importante na imunidade antimicrobiana pela indução de defensinas e recrutamento de neutrófilos (BRENCHLEY *et al.*, 2008). A depleção preferencial e constante de linfócitos Th17 no trato gastrointestinal de indivíduos infectados pelo HIV pode levar à redução do controle de bactérias intestinais, tornando o indivíduo especialmente suscetível à translocação microbiana e, conseqüentemente, à ativação imune crônica (BRENCHLEY *et al.*, 2008).

Por outro lado, a ingestão de bactérias probióticas já demonstrou prover benefícios para indivíduos infectados por HIV, incluindo um aumento no número de linfócitos TCD4⁺. O consumo de iogurte suplementado com os probióticos *Lactobacillus rhamnosus*, GR-1 e *L. reuteri* RC-14 levou a um aumento no número de linfócitos TCD4⁺ em mulheres HIV positivas na Nigéria (ANUKAM *et al.*, 2008) e o consumo de *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus thermophilus* também levou a um aumento na média de linfócitos TCD4⁺ em crianças soropositivas no Brasil (TROIS; CARDOSO; MIURA, 2008). O impacto positivo do uso de probióticos em sintomas de translocação microbiana e ativação imune também foi reportado em um estudo clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo. Após a administração de *Saccharomyces boulardii* por 12 semanas, indivíduos HIV positivos apresentaram menores níveis de LBP e IL-6 no plasma, quando comparados ao grupo que recebeu placebo (VILLAR-GARCÍA *et al.*, 2015).

Estudos clínicos têm apontado relações entre alterações na microbiota intestinal (disbiose) e doenças de diversos tipos, como

obesidade (MONDOT *et al.*, 2013), diabetes tipo 1 (ALKANANI *et al.*, 2015), cirrose (MACNAUGHTAN; JALAN, 2015) e doenças cardiovasculares (YAMASHITA *et al.*, 2015). Quanto ao HIV, estudos já apontam diferenças na composição da microbiota de indivíduos soropositivos em comparação a indivíduos não infectados. Gori e colaboradores (GORI *et al.*, 2008) foram os primeiros a avaliar alterações na comunidade de bactérias intestinais na infecção por HIV, demonstrando que indivíduos soropositivos, além de apresentarem alterações na microbiota, com predominância de patógenos oportunistas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*) e menor abundância de bactérias consideradas protetoras (Bifidobacteria e Lactobacilli), apresentaram também maiores níveis de calprotectina nas fezes, indicando inflamação na mucosa intestinal. Posteriormente, biópsias de duodeno demonstraram uma maior quantidade de bactérias pertencentes a ordens consideradas pró inflamatórias (como Enterobacteriales e Bacteroidales) na mucosa de pacientes HIV positivos, em relação a indivíduos saudáveis. Ademais, a quantidade de bactérias pertencentes a essas ordens nas fezes se mostrou associada à depleção de linfócitos TCD4⁺ no duodeno e a ativação de linfócitos TCD8⁺ no sangue periférico (ELLIS *et al.*, 2011). Outro estudo demonstrou que uma maior proporção de bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillales* está associada a um maior número de linfócitos TCD4⁺ no sangue, menor carga viral e reduzida translocação microbiana em indivíduos com infecção recente por HIV que não recebiam tratamento (PÉREZ-SANTIAGO *et al.*, 2013).

Atualmente tem se tentado identificar aspectos que caracterizem a alteração da microbiota nos indivíduos infectados pelo HIV. Entretanto, alguns estudos apresentam resultados contraditórios, principalmente devido a consideração ou não dos demais fatores que possam causar alterações na composição da microbiota, de modo que ainda não é possível determinar um perfil de alteração na microbiota que seja correspondente a infecção pelo HIV. Diversos estudos apontam uma diminuição da diversidade de bactérias em indivíduos HIV positivos e essa menor diversidade parece estar relacionada a um menor número de linfócitos T CD4⁺ e maior translocação microbiana (DUBOURG *et al.*, 2016; MCHARDY *et al.*, 2013; MONACO *et al.*, 2016; MUTLU *et al.*, 2014; NOWAK *et al.*, 2015). Entretanto Lozupone e colaboradores (LOZUPONE *et al.*, 2013) encontraram uma maior diversidade de bactérias na microbiota intestinal de indivíduos HIV positivos quando comparados a indivíduos saudáveis. Quanto aos gêneros presentes na microbiota intestinal, estudos apontam um aumento na proporção de

bactérias pertencentes ao gênero *Prevotella* e diminuição de *Bacteroides* em indivíduos infectados pelo HIV-1 (DILLON *et al.*, 2014; PAQUIN-PROULX *et al.*, 2016; VÁZQUEZ-CASTELLANOS *et al.*, 2014). Entretanto, a variação nas proporções de *Prevotella* e *Bacteroides* também podem ser associadas a fatores ambientais, estilo de vida, dieta e preferências sexuais. De acordo com Noguera-Julian e colaboradores (NOGUERA-JULIAN *et al.*, 2016) a maior proporção de *Prevotella* em indivíduos HIV positivos estaria mais relacionada a maior prevalência de homens que mantém relações sexuais com homens nesse grupo, já que, segundo os autores, a maior proporção de *Prevotella* das fezes mostra grande associação a preferência sexual. Os autores também afirmam que uma das possíveis marcas da disbiose relacionada a infecção por HIV seria a redução do número de espécies de bactérias (riqueza), que nesse estudo, correlacionou-se fortemente a infecção pelo HIV mesmo quando considerados os demais fatores. Nowak e colaboradores (NOWAK *et al.*, 2015) também encontraram um menor número de espécies de bactérias nas fezes de indivíduos infectados por HIV, quando comparados a indivíduos saudáveis não infectados.

Alterações nas proporções entre os principais filos de bactérias encontradas na microbiota intestinal também têm sido reportadas. Estudos apontam a existência de uma maior quantidade de bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria em indivíduos HIV positivos quando comparados a indivíduos HIV negativos saudáveis (NOWAK *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2016; VUJKOVIC-CVIJIN *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2016), o que parece estar relacionado a maior translocação microbiana nesses indivíduos (WILLIAMS; LANDAY; PRESTI, 2016). Diversos estudos demonstram também que pacientes infectados pelo HIV apresentam maior proporção de patógenos oportunistas e diminuição na quantidade de bactérias comensais (LOZUPONE *et al.*, 2013; MCHARDY *et al.*, 2013; MUTLU *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2016) e que a disbiose do intestino está fortemente associada a translocação microbiana e ativação imune (DILLON *et al.*, 2014; DINH *et al.*, 2015; PÉREZ-SANTIAGO *et al.*, 2013; VÁZQUEZ-CASTELLANOS *et al.*, 2014).

Foi demonstrado também que a terapia antirretroviral não recupera a comunidade bacteriana completamente (LOZUPONE *et al.*, 2013; NOWAK *et al.*, 2015). Indivíduos infectados pelo HIV que recebem tratamento antirretroviral apresentam alterações na microbiota e podem apresentar maior abundância de diversos grupos da comunidade de microorganismos intestinais, quando comparados a indivíduos saudáveis não infectados (DINH *et al.*, 2015; MUTLU *et al.*, 2014; VUJKOVIC-

CVIJIN *et al.*, 2013). Em uma avaliação longitudinal da microbiota intestinal de pacientes HIV positivos antes e depois de iniciarem o tratamento com antirretrovirais, Nowak e colaboradores (NOWAK *et al.*, 2015) observaram que a diversidade de bactérias na microbiota desses indivíduos diminuiu ainda mais após o início do tratamento.

Nowak e colaboradores (NOWAK *et al.*, 2017) avaliaram a microbiota intestinal de homens que tem relações sexuais com homens (HSH) infectados por HIV sob tratamento antirretroviral e os comparou a HSH infectados por HIV porém sem tratamento antirretroviral e HSH não infectados. Foi observada menor diversidade alfa do filo Bacteroidetes em indivíduos que receberam tratamento antirretroviral em relação aos demais grupos. Apesar de não encontrarem diferenças significativas na abundância de táxons da microbiota entre indivíduos HIV positivos não tratados e indivíduos HIV negativos, foram encontradas diferenças na abundância de diversos gêneros entre indivíduos tratados e não infectados.

Em uma análise metagenômica, Vázquez-Castellanos e colaboradores (VÁZQUEZ-CASTELLANOS *et al.*, 2014) avaliaram a composição da microbiota intestinal e seu conteúdo de genes funcionais e determinaram vias metabólicas da comunidade bacteriana relacionadas à disfunção imune. Os autores observaram que além da disbiose, indivíduos infectados pelo HIV apresentavam um perfil genético alterado da comunidade de micro-organismos intestinais, com maior quantidade de genes da microbiota envolvidos em diversas vias relacionadas a inflamação, como genes envolvidos em processos patológicos e relacionados a translocação microbiana, enquanto que genes relacionados a processos energéticos e ao metabolismo de aminoácidos encontravam-se em menor quantidade na microbiota intestinal desses indivíduos.

Alterações na composição viral do intestino também têm sido estudadas em indivíduos HIV positivos. Monaco e colaboradores avaliaram o viroma e o microbioma de indivíduos infectados por HIV tratados e não tratados com antirretrovirais, comparando-os a indivíduos não infectados por HIV e observaram que níveis de linfócitos TCD4⁺ na circulação sistêmica estavam relacionados a uma maior quantidade de adenovírus entéricos em indivíduos infectados por HIV, independente de tratamento antirretroviral (MONACO *et al.*, 2016).

1.3 A MICROBIOTA INFANTIL E O HIV

Durante os primeiros anos de vida, a colonização da mucosa intestinal pela microbiota é caracterizada por flutuações na diversidade, até que se alcance um ponto de equilíbrio a partir do qual a comunidade de micro-organismos se mantém relativamente estável, quando na ausência de perturbações ambientais. Essas alterações da microbiota no início da vida ocorrem concomitantemente ao desenvolvimento, expansão e educação do sistema imune das mucosas. Assim, a maturação imune é provavelmente influenciada, direta ou indiretamente, pela presença da microbiota comensal e a colonização do intestino no início da vida pode ter um grande impacto na saúde do indivíduo, com consequências que podem ser observadas até a vida adulta (GENSOLLEN *et al.*, 2016). Existem evidências de que a composição da microbiota no início da vida, apesar de sofrer diversas alterações, está correlacionada à composição da microbiota em idades mais avançadas, sugerindo que a disbiose durante a infância pode ter consequências para a saúde do indivíduo no futuro (SODERBORG *et al.*, 2016).

Ainda não se conhece exatamente a idade em que a microbiota infantil se estabiliza e passa a apresentar uma composição mais semelhante a do adulto (CHENG *et al.*, 2015). Um estudo transversal com 531 indivíduos de três diferentes países mostrou que a microbiota infantil gradualmente “amadurece”, ou seja, transforma-se em uma microbiota mais semelhante à do adulto, até os três anos de idade (YATSUNENKO *et al.*, 2012). Recentemente, um grande estudo longitudinal que acompanhou 415 mulheres e seus filhos determinou que o amadurecimento da microbiota infantil ocorre entre 1 e 2 anos de idade e, portanto, o estabelecimento da microbiota adulta ocorreria a partir dos dois anos de idade (AVERSHINA *et al.*, 2016). Cheng e colaboradores (2016), por outro lado, após avaliar a microbiota intestinal de 28 crianças entre 1 e 4 anos acompanhadas durante um ano e 23 adultos, concluíram que a microbiota intestinal de crianças não se estabiliza antes dos 5 anos de idade. Entretanto, um dos fatores mais importantes no amadurecimento da microbiota intestinal infantil é o término da amamentação e a introdução de alimentos sólidos (BERGSTRÖM *et al.*, 2014; LAURSEN *et al.*, 2017).

O amadurecimento da microbiota intestinal em crianças parece não ser um processo aleatório. Espécies distintas e interações específicas entre táxons importantes podem ser identificadas em diferentes idades. Um estudo que avaliou a microbiota intestinal de 98 crianças nos primeiros dias de vida e em diferentes pontos do desenvolvimento até um ano de idade demonstrou que os principais fatores responsáveis pela maior

variação na microbiota intestinal de crianças saudáveis são o tipo de parto e a alimentação. Em crianças nascidas por parto normal, a maioria das espécies que fazem parte da microbiota infantil são provenientes da microbiota vaginal materna, enquanto que em crianças nascidas por cesariana, a microbiota intestinal foi colonizada por bactérias provenientes da pele, boca e do ambiente (BÄCKHED *et al.*, 2015; DOMINGUEZ-BELLO *et al.*, 2010).

Diversos estudos já identificaram alterações na microbiota intestinal de crianças e associaram essas alterações a diferentes doenças, como dermatite atópica (NYLUND *et al.*, 2015), autismo (SON *et al.*, 2015), obesidade (AZAD *et al.*, 2014), esclerose múltipla (TREMLETT; WAUBANT, 2018) e doenças gastrointestinais (ABRAHAMSSON; WU; SHERMAN, 2017). Estudos avaliando a microbiota intestinal de crianças HIV positivas, por outro lado, são escassos. A microbiota oral de crianças infectadas pelo HIV já foi investigada e não foram encontradas diferenças significativas entre crianças com infecção controlada e crianças saudáveis não infectadas (GOLDBERG *et al.*, 2015). Entretanto, a microbiota intestinal é bastante distinta da microbiota oral, sendo que alterações da microbiota intestinal podem ser independentes da microbiota oral (HUTTENHOWER *et al.*, 2012). A frequência de algumas bactérias intestinais cultiváveis também foi avaliada em crianças expostas ao HIV através da amamentação, não tendo sido encontradas diferenças na composição dessas bactérias em crianças expostas ao HIV e crianças não expostas (GONZÁLEZ *et al.*, 2013).

Considerando que a microbiota intestinal e vaginal em mulheres adultas apresenta alterações (WILLIAMS; LANDAY; PRESTI, 2016) e que a microbiota de crianças sofre grande influência da microbiota materna (ROMANO-KEELER; WEITKAMP, 2015), é esperado que a microbiota intestinal de crianças filhas de mulheres infectadas pelo HIV também apresente alterações. Com os avanços das técnicas de sequenciamento, foi possível identificar bactérias não cultiváveis e menos conhecidas da microbiota intestinal, permitindo uma avaliação muito mais detalhada da composição dessa microbiota, que levou ao conhecimento das importantes relações entre a comunidade de micro-organismos intestinais e diversos fatores importantes para a manutenção da homeostasia do indivíduo (WOOLEY; YE, 2009). Explorar os perfis metagenômicos que resultam das alterações na microbiota promovem um melhor entendimento do papel da microbiota no desenvolvimento da doença, podendo levar a determinação de novos marcadores para a identificação da doença antes da apresentação de sinais clínicos

(ARRIETA *et al.*, 2014). Um estudo recente avaliou a microbiota intestinal, oral e da pele de 25 crianças expostas ao HIV e a microbiota vaginal, da mama e do leite de suas mães, comparando-as a microbiota de crianças e mulheres não expostas e não infectadas por HIV. Foi observado que a microbiota de crianças expostas ao HIV foi significativamente diferente da microbiota de crianças não expostas, indicando que o status da infecção por HIV materna tem influência na microbiota infantil (BENDER *et al.*, 2016).

Com a generalização dos tratamentos com antirretrovirais e dos programas de prevenção da transmissão vertical do HIV, o número de crianças HEU continuará a aumentar no mundo sendo, portanto, importante que sejam determinadas as causas das diversas alterações observadas nessas crianças, tais como comprometimento do crescimento, maior mortalidade, maior risco de desenvolvimento de infecções, maior número de hospitalizações e alterações no sistema imune. Considerando a importância da microbiota intestinal para o desenvolvimento do sistema imune e homeostase do hospedeiro, é possível que alterações na microbiota intestinal de crianças HEU estejam relacionadas aos problemas enfrentados por elas. Entretanto, estudos avaliando a microbiota intestinal de crianças HEU são bastante escassos e ainda inexistentes no Brasil. Assim, objetiva-se que o estudo detalhado da microbiota intestinal e marcadores de inflamação nesses indivíduos auxilie na compreensão das causas da maior susceptibilidade a doenças e demais alterações observadas nessas crianças.

1.4 HIPÓTESE

Crianças HEU apresentam microbiota intestinal distinta das crianças filhas de mulheres não infectadas pelo HIV, sendo essa disbiose relacionada ao maior número de infecções e problemas de desenvolvimento que essas crianças apresentam.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Caracterizar a microbiota intestinal e avaliar a presença de marcadores de inflamação, relacionando-os ao número de infecções

sofridas e crescimento de crianças filhas de mulheres infectadas pelo HIV, e comparando-as a crianças filhas de mulheres não infectadas.

1.5.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar a microbiota intestinal de crianças filhas de mulheres infectadas ou não pelo HIV e de suas respectivas mães;
- b) Comparar a microbiota intestinal de crianças HEU à microbiota de crianças HIV negativas filhas de mulheres HIV negativas;
- c) Correlacionar hábitos alimentares das mães e das crianças à composição de sua microbiota intestinal;
- d) Relacionar alterações na composição da microbiota intestinal das mães à microbiota intestinal de seus filhos;
- e) Quantificar marcadores de inflamação e translocação microbiana no plasma das mães e das crianças;
- f) Comparar a presença de marcadores de inflamação e translocação microbiana nas crianças HEU às crianças filhas de mulheres HIV negativas;
- g) Correlacionar alterações na microbiota intestinal e a presença de marcadores de inflamação e translocação microbiana ao número de doenças e crescimento dessas crianças.

2 METODOLOGIA

2.1 LOCAL, POPULAÇÃO DE ESTUDO, CRITÉRIO DE INCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este foi um estudo transversal. A população de estudo é constituída por mulheres e seus filhos com por volta de dois anos de idade, recrutados no Hospital Infantil Joana de Gusmão, em Florianópolis, SC. Os pacientes recrutados foram classificados de acordo com a determinação de infecção ou exposição ao HIV nas mulheres e nas crianças em dois grupos: i- Crianças expostas ao HIV e não infectadas (HEU) e suas respectivas mães HIV positivas; ii- Crianças não expostas e não infectadas por HIV e suas respectivas mães HIV negativas. Crianças expostas ao HIV foram recrutadas no setor de infectologia, enquanto que crianças não expostas ao HIV foram recrutadas no setor de puericultura do hospital. Tendo em vista que a amamentação tem um grande impacto na microbiota infantil, e que as recomendações do Ministério da Saúde brasileiro são de que todas as mulheres infectadas por HIV não devem amamentar suas crianças, foram feitos esforços para que todas as crianças recrutadas, expostas ou não ao HIV, não estivessem recebendo leite materno na data da coleta, bem como não tivessem sido amamentadas por cerca de 1 ano.

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Infantil Joana de Gusmão sob o parecer nº 2.022.007. As mães foram abordadas durante a espera para consultas de rotina das crianças e convidadas a participar do estudo. Todas as mães foram esclarecidas em relação a sua participação neste estudo e assinaram voluntariamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando sua participação e a de seu(ua) filho(a) (Anexo A).

2.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

No momento do recrutamento das voluntárias, foram solicitadas amostras de fezes e de sangue tanto das mães como das crianças, acesso aos prontuários e algumas informações a serem fornecidas pelas mães através do preenchimento de um questionário.

Para a caracterização da microbiota intestinal, as mães foram orientadas a como coletar suas amostras de fezes e de suas crianças e mantê-las refrigeradas. As amostras foram então recolhidas na residência das voluntárias ou no Hospital Infantil, de acordo com a preferência da

própria voluntária, e levadas até o Laboratório de Imunologia Aplicada (MIP/CCB/UFSC) onde foram realizadas as extrações de DNA bacteriano utilizando o *kit* QIAamp DNA Stool Mini Kit (Quiagen), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi imediatamente armazenado a -20°C para uso posterior.

Para a avaliação da presença de marcadores de translocação microbiana, foram coletados 4ml de sangue periférico das mães e 2ml de sangue periférico das crianças. As amostras foram coletadas em tubo com EDTA e centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm para separação do plasma, que foi armazenado a -80°C .

Para a avaliação do crescimento e número de infecções das crianças foram utilizados dados dos prontuários e informações fornecidas pelas mães por meio de dois questionários, um sobre seus hábitos de vida e alimentação e outro sobre a alimentação e a saúde da criança (Apêndices A e B). Dados de contagem de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, carga viral e níveis de proteína C reativa e albumina no sangue periférico também foram obtidos dos prontuários das pacientes.

2.3 PREPARAÇÃO DA BIBLIOTECA METAGENÔMICA E SEQUENCIAMENTO

O DNA extraído foi quantificado utilizando o kit comercial Qubit dsDNA HS (Thermo Fisher) e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 2%. As regiões V3 e V4 do gene do rRNA 16S foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores Illumina universais para Eubacteria 16S_F (5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGG GNGGCWGCAG-3') e 16S_R (5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTAC HVGGGTATCTAATCC3') e a confirmação da amplificação de cada amostra foi também realizada através de eletroforese em gel de agarose 2%. Para a preparação da biblioteca de rRNA 16S, o produto da PCR foi purificado utilizando microesferas magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), sendo que os adaptadores para identificação das amostras foram adicionados utilizando o kit Nextera XT Index (Illumina) e em seguida as amostras foram quantificadas por qPCR utilizando o *kit* KAPA Library Quantification Kit Universal para plataforma Illumina (Kapa Biosystems). Após a quantificação, foi montado um pool

equimolar a 3nM e o sequenciamento foi realizado na plataforma MiSeq (Illumina) utilizando o *kit* de reagentes de 500 ciclos (V2).

2.4 ANÁLISES *IN SILICO*

As sequências de baixa qualidade foram filtradas utilizando a ferramenta Trimmomatic versão 0.36 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) de acordo com o tamanho das sequências e valor de *phred score*. Nucleotídeos com qualidade abaixo de 20 no início ou final das sequências, ou que apresentassem qualidade média inferior a 20 a cada grupo de 5 nucleotídeos foram considerados como de baixa qualidade e excluídos. Em seguida, foram excluídas sequências com tamanho total menor que 100 nucleotídeos. Os pares de fragmentos foram pareados utilizando a ferramenta PEAR versão 0.9.8 (ZHANG *et al.*, 2014) e as sequências resultantes foram novamente filtradas para que se mantivessem apenas sequências com entre 435 e 468 nucleotídeos, correspondendo aos tamanhos mais frequentes, com objetivo de remover sequências de tamanho muito reduzido e sequências que não foram pareadas corretamente.

A remoção de quimeras, determinação das unidades taxonômicas operacionais (OTUs, do inglês *operational taxonomic units*) e a determinação taxonômica das OTUs foram realizadas no programa Qiime 1 (CAPORASO *et al.*, 2010), de acordo com o descrito por Comeau, Douglas e Langille (COMEAU; DOUGLAS; LANGILLE, 2017). As sequências quiméricas foram removidas utilizando a ferramenta VSEARCH versão 1.11.1 (ROGNES *et al.*, 2016) e a determinação de OTUs foi realizada utilizando um *pipeline* de referência aberta com as ferramentas SortMeRNA versão 2.0-dev (KOPYLOVA; NOÉ; LÈ NE TOUZET, 2012) e SUMACLUST versão 1.0.00 (MERCIER *et al.*, 2013), identificando as OTUs com identidade igual a 97%. A identificação taxonômica foi realizada utilizando a base de dados do Greengenes, v. 13.8 (MCDONALD *et al.*, 2011). A tabela de OTUs resultante foi então filtrada para a remoção de OTUs de baixa confiança e normalizada de acordo com a amostra com o menor número de sequências, para que todas as amostras mantivessem a mesma cobertura. A predição do conteúdo funcional foi realizada utilizando a ferramenta PICRUSt (LANGILLE *et al.*, 2013) com a tabela de OTUs normalizada considerando o número de cópias do gene 16S.

2.5 ANÁLISE DOS MARCADORES DE TRANSLOCAÇÃO MICROBIOANA E INFLAMAÇÃO

Para a análise de marcadores de translocação microbiana e inflamação foram quantificados CD14 solúvel (sCD14) e as citocinas inflamatórias IL-12p70, TNF α , IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8. As citocinas inflamatórias foram avaliadas por citometria através de CBA (do inglês, “*cytometric bead array*”) utilizando o kit comercial Human Inflammatory Cytokines (BD Biosciences), seguindo as recomendações do fabricante e os resultados foram analisados utilizando o programa FCAP Array (BD Biosciences). Para alguns pacientes, foram também avaliados os níveis de proteína C reativa circulantes, que foram mensurados pelo laboratório do hospital infantil e obtidos dos prontuários dos pacientes.

Para a quantificação de sCD14 foi utilizado plasma diluído 2.000 vezes e o *kit* comercial ELISA-sCD14 DuoSet (R&D Systems). Para sensibilização da placa foi adicionado anticorpo de captura diluído em tampão fosfato-salino (PBS) na concentração indicada pelo fabricante a uma placa de 96 poços transparente (MicrotestTM, BD FalconTM), que foi incubada a 6°C por 10 horas. Após esse período, a placa foi lavada três vezes com solução de lavagem (PBS e Tween 20 0,05%), sendo posteriormente aplicada a solução de bloqueio (PBS e gelatina incolor 0,5%) e incubada a 6°C durante a noite seguida de incubação por 30 min a 37°C. Para a preparação da curva padrão, sCD14 recombinante foi diluído a uma concentração inicial de 5000 pg/mL de acordo com a recomendação do fabricante e diluído serialmente na base 2 para um total de 7 diferentes concentrações. Após o bloqueio, a placa foi novamente lavada três vezes com solução de lavagem e as diluições da curva padrão e o branco foram aplicados a placa em duplicata, as amostras aplicadas em triplicata e a placa foi incubada por duas horas a 37°C. Em seguida, a placa foi lavada como anteriormente, sendo então adicionado o anticorpo de detecção, diluído em solução de bloqueio de acordo com as recomendações do fabricante, sendo a placa incubada por duas horas a 37°C. Foi realizada então nova lavagem, como descrito, adicionada a solução de Streptavidina, diluída 200 vezes em solução de bloqueio, e a placa incubada por 20 minutos a 37°C. A placa foi lavada três vezes novamente com solução de lavagem, sendo então adicionado o substrato cromógeno (1 mg tetrametilbenzidina diluída em dimetilsulfóxido adicionado a 9ml de tampão fosfato citrato [2,57 ml de fosfato de sódio dibásico 0,2 M; 2,43 ml de ácido cítrico 0,1 M; 5 mL de água]) e incubada

por 20 minutos a 37°C. Para parar a reação enzimática foi adicionado ácido sulfúrico a 2 N a todos os poços. A densidade óptica de cada poço foi determinada a 450 nm, com correção a 570 nm.

2.6 AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS AO QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

Para avaliar a alimentação dos participantes do estudo, foi desenvolvido um questionário de frequência alimentar (QFA), utilizando alimentos usualmente consumidos na região e com alguma indicação de interferência na microbiota intestinal (ZHERNAKOVA *et al.*, 2016). O QFA foi aplicado juntamente com os questionários sobre hábitos de vida e alimentação (Apêndices A e B). Para a avaliação dos resultados do QFA, os dados categóricos ordinais do questionário foram convertidos em valores numéricos, tendo como referência o valor de consumo por semana (baseado em MARKHUS *et al.*, 2013). No caso de valores que correspondiam a um intervalo foi utilizada a média do intervalo, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Valores de referência para conversão dos dados ordinais do questionário de frequência alimentar.

Frequência	Intervalo numérico por semana	Valor numérico
Todos os dias, pelo menos uma vez por dia	7	7
5 ou mais vezes por semana	5-6	5,5
2 a 4 vezes por semana	2-4	3
1 vez por semana	1	1
1 a 3 vezes por mês	0,25 - 0,75	0,5
Menos de uma vez por mês	0,2 - 0,019	0,1
Nunca	0	0

2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Dados sociodemográficos e clínicos foram analisados no programa R (R CORE TEAM, 2017) utilizados os testes de Student (t) para variáveis paramétricas ou Mann-Whitney-Wilcoxon para variáveis não paramétricas. O teste de Kolmogorov-Smirnov com correção Lilliefors foi utilizado para avaliar a distribuição dos dados. Diferenças entre variáveis qualitativas foram avaliadas pelo teste de Fisher. O cálculo do índice z de peso por idade foi realizado com base em dados da Organização Mundial de Saúde, utilizando o pacote igrowup no programa R (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

Alterações na microbiota intestinal entre os diferentes grupos foram avaliadas com o pacote Phyloseq (MCMURDIE; HOLMES, 2013) no programa R. Para avaliar a diferenças na composição da microbiota entre indivíduos (diversidade beta) foi utilizada o índice de dissimilaridade de Bray Curtis e para determinar diferenças significativas entre os grupos foi utilizado PERMANOVA (adonis com 999 permutações). Para avaliar diversidade alfa foram utilizados os índices de diversidade de Shannon e Simpson e para avaliar a riqueza foi utilizado o índice Chao1.

Para identificar diferenças na abundância de táxons da microbiota intestinal entre os grupos estudados, foi utilizada uma tabela de OTUs não normalizada e foram removidas dessa tabela as OTUs com valor igual a zero em mais de 80% das amostras. Diferenças foram identificadas utilizando o pacote DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) no R, que realiza uma análise diferencial baseada em distribuição binomial negativa. Foram consideradas como significativamente diferentes as OTUs que apresentaram valor de p corrigido menor que 0,05 de acordo com o teste binomial de Wald com correção para falsos positivos de Benjamini-Hochberg. Diferenças entre grupos nos resultados da predição de conteúdo funcional foram também avaliadas com o pacote DESeq2, utilizando os mesmos parâmetros acima descritos.

As relações entre consumo de alimentos e a microbiota intestinal foram avaliadas por correlação de Spearman entre a frequência de atividades ou consumo de alimentos e os índices de diversidade e riqueza e através da avaliação do índice de dissimilaridade de Bray Curtis para cada item do questionário de frequência alimentar, ambos realizados no programa R.

2.8 ASPECTOS FINANCEIROS

Esse trabalho não recebeu nenhum auxílio financeiro direto. A autora do trabalho recebeu bolsa de mestrado pelo programa de demanda social da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES -DS).

3 RESULTADOS

3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

As mães foram recrutadas durante o período de outubro de 2016 a maio de 2017. Foram recrutados ao todo 38 indivíduos, sendo 12 crianças HEU e suas mães HIV positivas, mais 7 crianças não expostas e não infectadas e suas 7 mães HIV negativas. Nenhuma criança estava sendo amamentada no momento do recrutamento e coleta de amostras e não tinham sido amamentadas por no mínimo 8 meses anteriores ao seu ingresso na pesquisa. Não foram observadas diferenças estatísticas quanto a sexo, cor de pele, ou tipo de parto entre crianças expostas e não expostas ao HIV, como pode ser observado na Tabela 2. De acordo com o descrito pelas mães durante o preenchimento do questionário, quatro crianças expostas, duas crianças não expostas ao HIV e quatro mães HIV positivas consumiram antibióticos dentro de 3 meses anteriores ao recrutamento. Nenhum dos participantes consumiu probióticos nesse mesmo período. Uma das mães HIV positivas se declarou como fumante e afirmou ter fumado durante a gravidez. Essa mesma mãe afirmou não fazer o acompanhamento de sua infecção e, portanto, não possuía registros recentes de carga viral e linfócitos TCD4+ e TCD8+. Dentre as demais mães, todas estavam recebendo tratamento antirretroviral e apresentaram números de linfócitos TCD4+ e TCD8+ relativamente elevados, apenas uma mãe possuía carga viral detectável (Tabela 3).

Tabela 2: Características clínicas e demográficas de crianças expostas e não expostas ao HIV em Florianópolis, SC, Brasil.

	Não expostas ao HIV	Expostas ao HIV	p
Número de indivíduos	7	12	-
Idade (meses, mediana(IQ))	24 (21 a 25)	18 (16,75 a 22,25)	0,02
Sexo feminino (%)	4 (57,14)	6 (50)	1,00
Cor da pele (%)			

Branca	4 (57,14)	9 (75)	
Negra	0	1 (8,33)	
Mulata/Parda	2 (28,57)	2 (16,67)	
Não declarado	1 (14,29)	0	
Parto vaginal (%)	4 (57,14)	6 (50)	1,00
Nascimento a termo (%)	5 (71,43)	9 (75)	1,00
Peso (g, mediana(IIQ))	12.426 (12.200 a 13.870)	11.200 (10.700 a 11.850)	0,15
Índice z de peso por idade (mediana, (IIQ))	0,50 (-0,04 a 1,44)	0,68 (-0,32 a 0,97)	0,79
Albumina (g/dL, mediana(IIQ))	4,15 (3,88 a 4,43)	4,10 (4,10 a 1,75)	0,93
Contagem de linfócitos			
TCD4⁺ (células/mm³, mediana(IIQ))	-	2.636 (2.212 a 3.016)	-
Contagem de linfócitos			
TCD8⁺ (células/mm³, mediana(IIQ))	-	1.000 (792,5 a 1.486,8)	-
Razão entre células			
CD4/CD8 (mediana(IIQ))	-	2,58 (2,14 a 3,13)	-
Células CD45⁺			
(células/mm³, mediana(IIQ))	-	5.614 (4.518 a 8.207)	-

IIQ = Intervalo Interquartil

Tabela 3: Características clínicas e demográficas de mães HIV positivas e HIV negativas em Florianópolis, SC, Brasil.

	HIV positiva	HIV negativa	p
Número de indivíduos	12	7	-
Idade (anos, mediana (IIQ))	34 (24 a 35)	29 (27 a 33)	1,00
IMC (kg/m², mediana(IIQ))	27,78 (22,44 a 36,91)	24,86 (22,07 a 32,27)	0,41
Cor da pele (%)			
Branca	7 (58,33)	3 (42,86)	
Negra	3 (25)	0	
Mulata/Parda	2 (16,67)	3 (42,86)	
Não declarado	0	1 (14,29)	
Contagem de linfócitos TCD4⁺ (células/mm³, mediana(IIQ))	749,5 (600,2 a 816,0)	-	
Contagem de linfócitos TCD8⁺ (células/mm³, mediana(IIQ))	792,0 (725,5 a 1.132,0)	-	
Razão entre células CD4/CD8 (mediana(IIQ))	0,65 (0,52 a 1,10)	-	
Células CD45⁺ (células/mm³, mediana(IIQ))	2.056 (1.750 a 2.664)	-	
Recebendo tratamento antirretroviral (%)	11 (91,67%)	-	

Carga viral detectável

(%)	1(8,33%)	-
-----	----------	---

IIQ = Intervalo Interquartil; IMC = Índice de Massa Corporal.

3.2 FREQUÊNCIA DE INFECÇÕES E CRESCIMENTO DE CRIANÇAS EXPOSTAS E NÃO EXPOSTAS AO HIV

Uma vez que crianças expostas e não expostas ao HIV podem frequentar diversas unidades de saúde ou hospitais em caso de necessidade de atendimento médico, não existindo ainda um sistema único de prontuário clínico individual em nosso país, a frequência de processos patológicos apresentados pelos dois grupos de crianças foi avaliada unicamente de acordo com as respostas das mães a perguntas do questionário. Ademais, crianças expostas e não expostas ao HIV são atendidas em setores distintos do Hospital Infantil e os registros em cada um desses setores apresentaram inconsistências entre si. Sendo assim, foram considerados como indicação de doenças sinais e sintomas comuns a diversos processos patológicos, frequentemente infecções, tais como febre, tosse, espirros e dor de garganta, percebidos pelas mães em seus filhos. De forma geral, mães de crianças expostas ao HIV reportaram uma maior frequência de apresentação de sinais de doença em seus filhos. Dentre as mães HIV positivas, 25% reportaram que seus filhos apresentam esses sinais pelo menos uma vez por mês e 58,3% a cada seis meses, enquanto apenas uma mãe HIV negativa reportou que sua criança apresenta sinais de doença todo mês e uma reportou sinais de doença a cada seis meses (Figura 1).

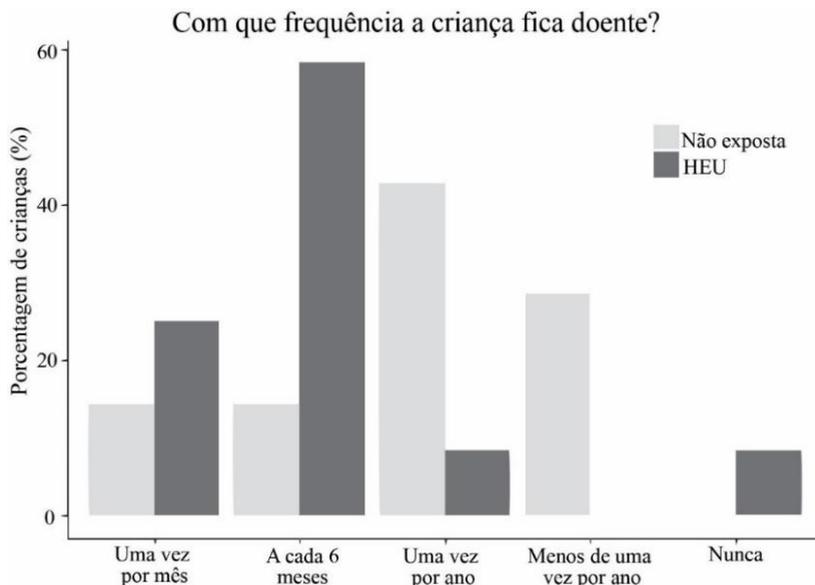


Figura 1: Frequência de sintomas de doenças em crianças expostas e não expostas ao HIV de acordo com respostas das mães à pergunta “Com que frequência a criança fica doente?”

Quando questionadas sobre a última vez que lembram de seu filho ter apresentado sinais de doenças, as respostas das mães não indicam tão claramente uma maior quantidade de infecções nas crianças expostas ao HIV. Entretanto, ainda assim 83,3% das mães HIV positivas reportaram que seus filhos apresentaram sinais de doenças pelo menos nos últimos seis meses, comparado a 57,1% das mães HIV negativas (Figura 2). Entretanto, devido ao baixo número de indivíduos em cada categoria, nenhuma dessas diferenças foi considerada estatisticamente significativa.

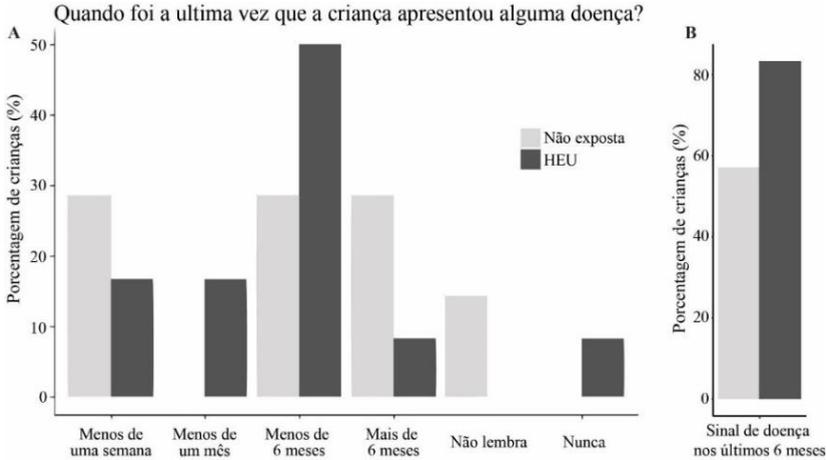


Figura 2: Frequência de infecções em crianças expostas e não expostas ao HIV de acordo com respostas das mães à pergunta “Quando foi a última vez que seu(sua) filho(a) apresentou alguma doença?” (A). Frequência de crianças que apresentaram sinais de doenças pelo menos nos últimos seis meses, de acordo com respostas das mães (B).

De acordo com análise dos dados dos prontuários das crianças, não foram encontradas diferenças quanto ao peso e escore z de peso para idade (Tabela 2). Quanto à presença de doenças crônicas, três crianças expostas apresentaram bronquite e uma criança não exposta possuía hipotireoidismo, de acordo com dados dos prontuários. Para avaliar o estado nutricional, foi possível acessar níveis de albumina sérica avaliados pelo Hospital Infantil para algumas crianças (6 expostas e 4 não expostas). Entretanto também não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos (Tabela 2).

3.3 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL

3.3.1 Diversidade e abundância

A composição da microbiota intestinal foi avaliada pelo sequenciamento do RNA ribossomal 16S a partir de DNA extraído de amostras de fezes. O sequenciamento de DNA gerou aproximadamente 14 milhões de leituras (do inglês, *reads*), com uma média de 375.182,7

leituras por amostra. Essas sequências foram então processadas e classificadas em um total de 1246 unidades taxonômicas operacionais (OTUs), que por sua vez foram classificadas em gêneros, famílias, ordens, filos, reinos e domínios (Figura 3).

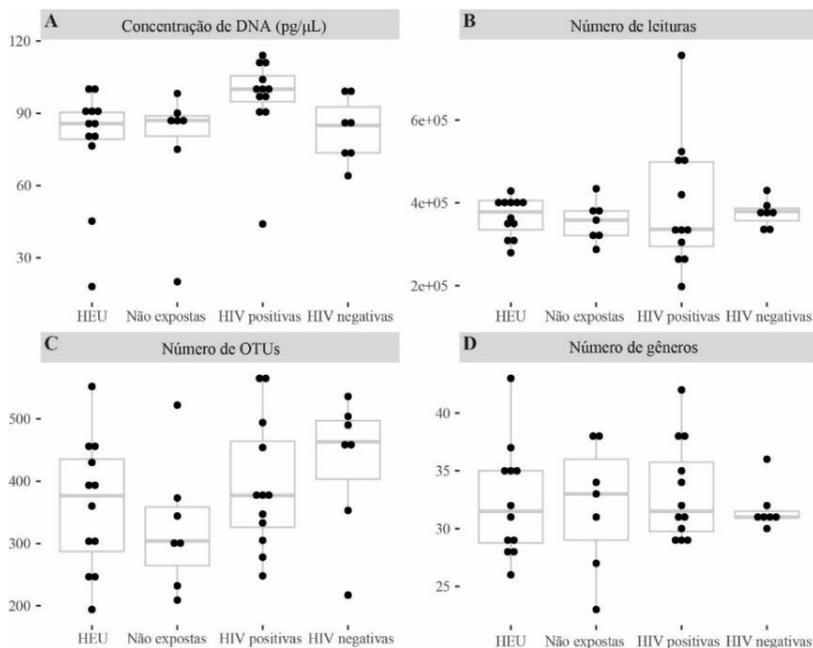


Figura 3: Concentração de DNA (A), Número de sequências geradas pelo sequenciamento (B), Número de OTUs (C) e Número de gêneros (D) identificados em cada grupo.

Para avaliar diferenças entre indivíduos foi utilizado o índice de diversidade de Bray Curtis, que mostrou uma diferença significativa na diversidade da microbiota entre os grupos de mães e crianças ($p < 0,01$). Entretanto, quando foram avaliadas as diferenças entre os dois grupos de crianças ou entre os dois grupos de mães, não foram encontradas diferenças significativas nem entre os índices de diversidade de Bray Curtis nem entre os índices de riqueza e diversidade beta avaliados (Chao1, Shannon e Simpson), indicando que não existe diferenças tanto entre a diversidade da microbiota de cada indivíduo quanto na diversidade entre indivíduos (Figuras 4 e 5).

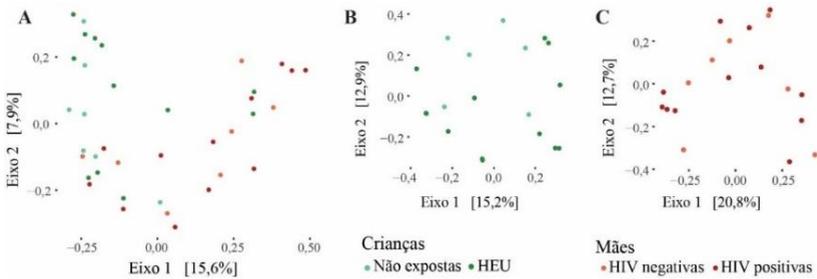


Figura 4: Análise de Coordenadas Principais dos índices de diversidade de Bray Curtis entre os grupos de mães e crianças (A), entre crianças expostas e não expostas ao HIV (B) e entre mães HIV positivas e HIV negativas (C).

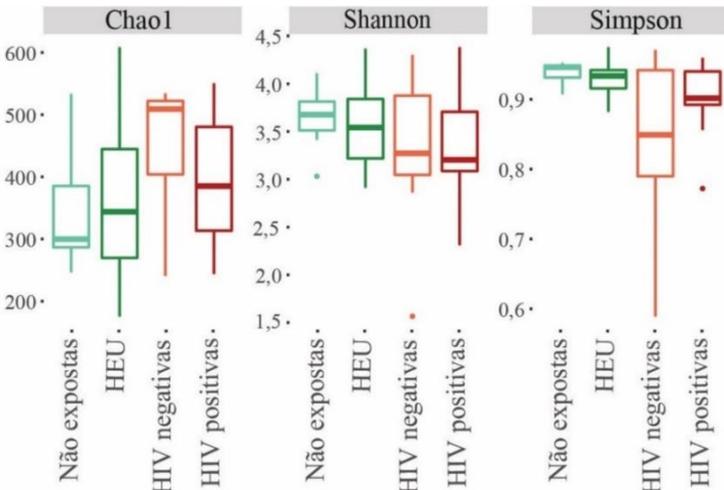


Figura 5: Índices de riqueza (Chao1) e diversidade alfa (diversidade da microbiota de cada indivíduo, Shannon e Simpson) para crianças expostas e não expostas ao HIV, mães HIV positivas e mães HIV negativas.

Quanto à composição da microbiota, as OTUs mais abundantes encontradas na microbiota de mães HIV negativas foram identificadas como pertencentes a família Ruminococcaceae (25,9%), enquanto que nas mães HIV positivas a família mais abundante foi Prevotellaceae

(37,4%). Quanto à abundância de famílias na microbiota das crianças, OTUs pertencentes a família Lachnospiraceae foram as mais encontradas tanto em crianças expostas como em não expostas (33,7% em crianças expostas e 26,7% em não expostas) (Figura 6). Quanto à abundância de gêneros, nos dois grupos de mães o gênero mais abundante foi *Prevotella* (49,5% em mães HIV positivas e 38,4% em HIV negativas), enquanto que nos dois grupos de crianças o gênero mais abundante foi *Bacteroides* (25,2% em crianças expostas e 48,4% em não expostas) (Figura 7). Foram avaliadas também a relação entre abundância e índices de diversidade da microbiota intestinal e peso, índice z de peso por idade e número de células TCD4⁺, TCD8⁺ e CD45⁺; entretanto, não foram encontradas correlações significativas ($p > 0,005$) para nenhuma dessas relações.

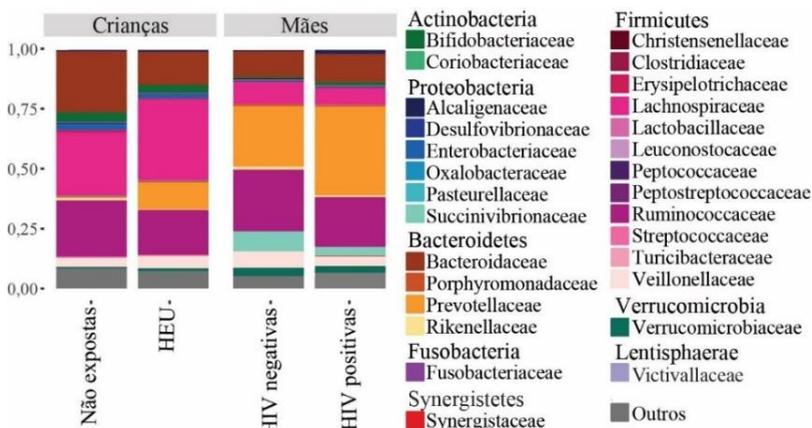


Figura 6: Abundância relativa de famílias de bactérias em crianças expostas e não expostas ao HIV e em mães HIV positivas e HIV negativas.

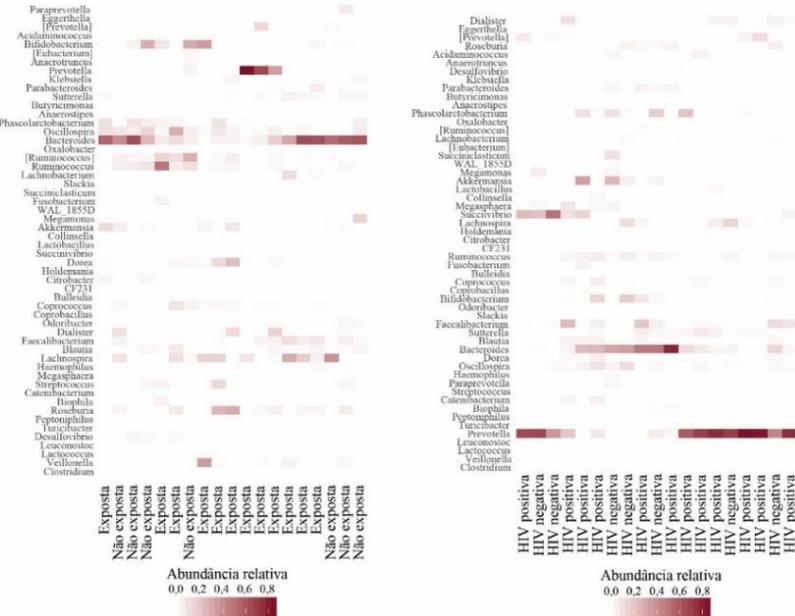


Figura 7: Mapa de calor (“heat map”) com a abundância relativa de cada gênero encontrado em crianças expostas e não expostas ao HIV (A) e mães HIV positivas e HIV negativas (B).

Para avaliar diferenças estatisticamente significativas na abundância de OTUs entre os diferentes grupos foi utilizado o pacote DESeq2 no programa R. Foi possível identificar 35 OTUs com abundância significativamente diferente entre crianças expostas e não expostas ao HIV (valor de p corrigido $< 0,05$). Três dessas OTUs foram identificadas a nível de espécie, correspondendo a *Bacteroides uniformis*, que foi encontrada em proporções aumentadas em crianças não expostas ao HIV, *Faecalibacterium praeunizii* e *Prevotella copri*, que foram encontradas em maior proporção em crianças expostas ao HIV. As demais OTUs que foram consideradas significativamente diferentes entre os dois grupos de crianças foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Bacteroides*, *Dialister*, *Dorea*, *Klebsiella*, *Lachnobacterium*, *Lactococcus*, *Phascolarctobacterium* e *Roseburia*, além de 18 OTUs que foram identificadas apenas a nível de família (1 Clostridiaceae, 2 Enterobacteriaceae, 1 Erysipelotrichaceae, 13 Lachnospiraceae e 1 Ruminococcaceae) e 2 apenas a nível de ordem (Clostridiales) (Figura 8).

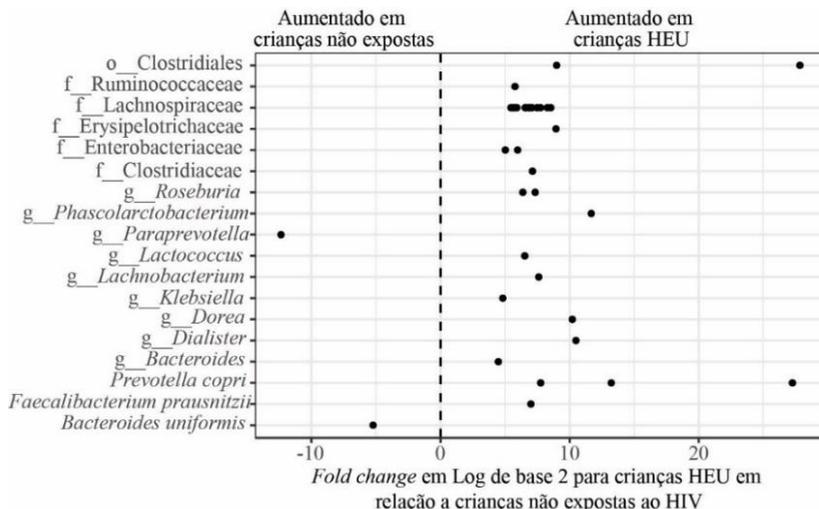


Figura 8: OTUs consideradas significativamente diferentes entre crianças expostas e não expostas ao HIV de acordo com a classificação taxonômica. Cada OTU é representada por um ponto. “o” = Ordem; “f” = Família; “g” = Gênero.

Para estudar possíveis relações entre a microbiota intestinal e a saúde geral das crianças, foram avaliadas correlações entre índices de riqueza e diversidade da microbiota, abundância de famílias e OTUs e peso, índice z de peso por idade, número de células TCD4+, TCD8+, e CD45+, níveis de albumina no soro e frequência anual de doenças das crianças. Entretanto, não foram obtidas correlações significativas ($p > 0,05$) para nenhum desses fatores.

Quanto as diferenças entre mães HIV positivas e HIV negativas, foi possível identificar 16 OTUs que diferiram significativamente (valor de p ajustado $< 0,05$). Mães HIV positivas apresentaram uma maior proporção de *Prevotella copri* e *Prevotella stercorea* em relação a mães HIV negativas, além de OTUs não identificadas a nível de espécie, porém pertencentes aos gêneros *Prevotella* e *Dialister*, à família Ruminococcaceae e à ordem Bacteroidales. Por outro lado, mães HIV negativas apresentaram uma maior proporção de OTUs pertencentes aos gêneros *Bacteroides*, *Lachnospira*, *Oscillospira* e OTUs não identificadas

a nível de gênero, porém pertencentes às famílias Lachnospiraceae e Rikenellaceae e à ordem Clostridiales (Figura 9).

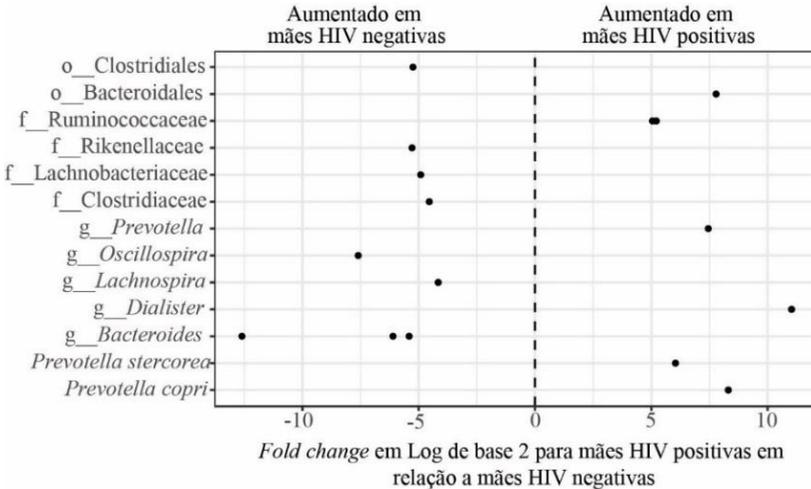


Figura 9: OTUs consideradas significativamente diferentes entre mães HIV positivas e HIV negativas de acordo com a classificação taxonômica. Cada OTU é representada por um ponto. “o” = Ordem; “f” = Família; “g” = Gênero.

3.3.2 Predição do conteúdo funcional

Para melhor caracterizar diferenças da microbiota entre os grupos, foi realizada também a predição do conteúdo funcional a partir das sequências do gene codificante para o RNA ribossomal 16S, utilizando a ferramenta PICRUSt, que classifica os genes preditos de acordo com a enciclopédia de Genes e Genomas Kyoto (KEGG, do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Dentro da KEGG funções são armazenadas como ortólogos KEGG (KO, do inglês *KEGG Orthologs*), que por sua vez são classificados em vias ou “*KEGG pathways*” (KANEHISA; GOTO, 2000). Foi possível identificar 9 KOs que diferiram significativamente entre crianças expostas e não expostas ao HIV (valor de p ajustado < 0,05). Como um único KO pode ser relacionado a mais de uma via, foi também utilizada a ferramenta PICRUSt para prever as vias a partir dos KOs identificados. Entretanto,

quando foram analisadas apenas as vias, não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos. Dessa forma, foi realizada uma busca na KEGG para determinar as funções relacionadas as KOs que foram identificadas como significativamente diferentes. Sendo assim, foi determinado que essas KOs então relacionadas ao metabolismo de nucleotídeos, metabolismo de aminoácidos, separação de cromossomos, transporte de membrana, metabolismo de cofatores e vitaminas e sistemas de defesa bacteriano (Quadro 1). Todas essas KOs foram encontradas em uma maior proporção em crianças expostas ao HIV, em relação às crianças não expostas.

Quadro 1: Descrição dos ortólogos KEGG diferencialmente abundantes em crianças expostas em relação a crianças não expostas ao HIV e suas vias relacionadas de acordo com a enciclopédia de Genes e Genomas Kyoto (KEGG).

Ortólogo KEGG	Definição	Vias relacionadas	<i>Fold-change</i> em log de base 2
K00839	<i>(S)-ureidoglycine--glyoxylate transaminase</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo: Metabolismo de nucleotídeos: Metabolismo de Purinas • Enzimas: Transferases: Transfere grupos nitrogenados: Transaminases • Enzimas relacionadas a aminoácidos: Aminotransferase (transaminase): Classe V 	2,11047447
K09935	Proteína não caracterizada	-	1,50355964 3
K01941	<i>Urea carboxylase</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo: Metabolismo de aminoácidos: Biossíntese de Arginina • Metabolismo: Biodegradação e 	2,18604509 3

		<p>metabolismo de xenobióticos: Degradação de Atrazina</p> <ul style="list-style-type: none"> • Enzimas: Ligases: Formação de ligação carbono-nitrogênio: Outras ligases carbono-nitrogênio 	
K04095	<i>Cell filamentation protein</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Cromossomo: Tipo procarioto: Proteínas de particionamento de cromossomos: Outras proteínas de particionamento de cromossomos 	1,95244097 4
K03299	<i>Gluconate :H⁺ symporter , GntP family</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Transportadores: Outros transportadores: Transportadores eletroquímicos dependentes de potencial 	1,78839195 6
K03752	<i>Molybdenum cofactor guanylyltransferase</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo: Metabolismo de cofatores e vitaminas: Biossíntese de folato • Enzimas: Transferases: Transferidor de grupos contendo fosfato: Nucleotidiltransferases 	1,69967445 1
K09697	<i>Sodium transport system ATP-binding protein</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Processamento de informações ambientais: Transporte de membrana: Transportadores ABC • Processamento de informações ambientais: Transdução de sinal: Sistema de dois componentes • Complexo estrutural: Processamento de informações ambientais: Sistemas de transporte tipo 	2,23050354 4

		<p>ABC-2 e outros: Sistemas de transporte de sódio</p> <ul style="list-style-type: none"> • Enzimas: Hidrolases: Atuantes em anidridos de ácido: Atuantes em anidridos de ácido para catalisar movimento transmembrana de substancias: ATPase exportadora de Na+ • Transportadores: Transportadores ABC, tipo procarioto: Transportadores do tipo ABC-2 e outros: Transportadores de sódio 	
K09696	<i>Sodium transport system permease protein</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Processamento de informações ambientais: Transporte de membrana: Transportadores ABC • Processamento de informações ambientais: Transdução de sinais: Sistema de dois componentes • Complexo estrutural: Processamento de informações ambientais: Transportadores do tipo ABC-2 e outros: Sistema de transporte de Sódio • Transportadores: Transportadores ABC, tipo procarioto: Transportadores de Sódio 	2,23050354 4
K07016	<i>CRISPR-associated protein Csm1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Sistema de defesa procarioto: Sistema CRISPR-Cas: Sistema CRISPR-Cas tipo III: Proteínas cas tipo III 	2,24951062 2

Quanto às mães, foi possível identificar 13 ortólogos KEGG que diferiram entre mães HIV positivas e HIV negativas. Mães infectadas por HIV apresentaram uma maior abundância de ortólogos relacionados ao metabolismo do propanoato e redução de nitrito enquanto mães HIV negativas apresentaram maior abundância de ortólogos KEGG relacionados a reparo e replicação do DNA, metabolismo de carboidratos, metabolismo de cofatores e vitaminas, lipopolissacarídeos, metabolismo microbiano entre outros. Os ortólogos KEGG considerados significativamente diferentes entre mães HIV positivas e HIV negativas e suas respectivas vias relacionadas estão descritos no quadro 2.

Quadro 2: Descrição dos ortólogos KEGG diferencialmente abundantes em mães HIV positivas em relação a mães HIV negativas e suas vias relacionadas de acordo com a enciclopédia de Genes e Genomas Kyoto (KEGG).

Ortólogo KEGG	Definição	Vias relacionadas	<i>Fold-change</i> em log de base 2
K13920	<i>Propanediol dehydratase small subunit</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo: Metabolismo de carboidratos • Enzimas: Liases: Liases carbono-oxigênio: Hidroliases: Propanediol desidratase 	4,090586245
K00752	<i>Hyaluronan synthase</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Enzimas: Transferases: Glicosiltransferases: Hexosiltransferases: Hyaluronan sintase • Glicosiltransferases: Extensão de glicana: O-glicana • Transportadores: Outros transportadores: Outros 	- 1,550189092
K01865	<i>(hydroxymethyl)benzoylserine thioesterase</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo: Biodegradação de xenobióticos e metabolismo: 	- 1,459444613

		<p>Degradação de aminobenzoato</p> <ul style="list-style-type: none"> Enzimas: Isomerases: Transferases intramoleculares: Transferidor de grupos hidroxil: (hydroxyamino)benzeno mutase 	
K13688	<i>Cyclic beta-1,2-glucan synthetase</i>	<ul style="list-style-type: none"> Enzimas: Transferases: Glicosiltransferases: Hexosiltransferases Glicosiltransferases: Polissacarídeos: Polissacarídeo bacteriano 	- 3,709011593
K01922	<i>Phosphopantothenate-cysteine ligase (ATP)</i>	<ul style="list-style-type: none"> Metabolismo: Metabolismo de cofatores e vitaminas: Biossíntese de pantotenato e CoA Metabolismo de nucleotídeos e aminoácidos: Biossíntese de cofatores e vitaminas: Biossíntese de Coenzima A, pantotenato => CoA Enzimas: Ligases: Formadores de ligação carbono-nitrogênio: Ligases Acid-D-amino-acid (peptídeo sintases): Fosfopantotenato-cisteína ligase (ATP) 	- 3,771983767
K04015	<i>Protein NrfD</i>	-	1,715840233
K00183	<i>Prokaryotic molybdopterins-containing</i>	-	1,908849983

	<i>oxidoreductase family, molybdopterin binding subunit</i>		
K12452	<i>CDP-4-dehydro-6-deoxyglucose reductase, E1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo: Metabolismo de carboidratos: Metabolismo de nucleotídeos e amino açúcares • Enzimas: Oxidoredutases: Atuantes em grupos CH ou CH2: Com aceptores NAD⁺ ou NADP⁺ 	- 1,635926689
K13919	<i>Propanediol dehydratase medium subunit</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo: Metabolismo de carboidratos: Metabolismo de propanoato • Enzimas: Liases: Liases carbono-oxigênio: Hidroliases: Propanediol desidratase 	4,167483482
K07081	<i>Putative periplasmic solute-binding protein</i>	-	- 3,170595575
K01971	<i>Bifunctional non-homologous end joining protein LigD</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Processamento de informação genética: Replicação e reparo: Junção de pontas não homólogas • Enzimas: Ligases: Formador de ligação 	- 2,674019213

		fosfórica-éster: DNA ligases (ATP) <ul style="list-style-type: none"> • Reparo de DNA e proteínas de recombinação: Tipo procarioto: Reparo de quebra de dupla fita: Junção de pontas não homólogas: Complexo de reparo de DNA de dois componentes 	
K10979	<i>DNA end-binding protein Ku</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Processamento de informação genética: Replicação e reparo: Junção de pontas não homólogas • Reparo de DNA e proteínas de recombinação: Tipo procarioto: Reparo de quebra de dupla fita: Junção de pontas não homólogas: Complexo de reparo de DNA de dois componentes 	- 2,468229456
K07482	<i>Transposase, IS30 family</i>	-	- 1,556077031

3.3.3 Influência da dieta na microbiota intestinal

Diferenças quanto ao consumo de alimentos entre os grupos foram avaliadas de acordo com as repostas ao questionário de frequência alimentar. O padrão de consumo alimentar se mostrou bastante similar tanto entre mães HIV positivas e negativas, bem como entre crianças expostas e não expostas ao HIV. A única diferença considerada estatisticamente significativa foi referente ao consumo de álcool (excluindo-se vinho e cerveja) pelas mães ($p = 0,035$), que se mostrou aumentado em mães HIV positivas (Figura 10).

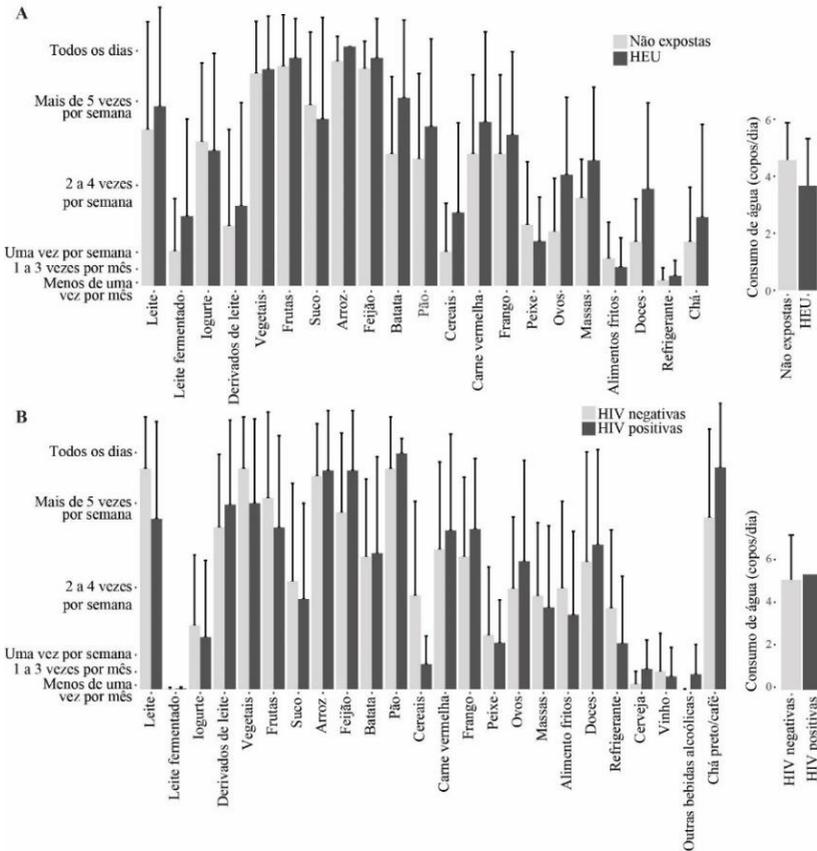


Figura 10: Frequência de consumo semanal de alimentos e água para crianças (A) e mães (B).

Para avaliar o impacto da dieta na microbiota intestinal dos grupos estudados, foi utilizada a correlação entre os índices de diversidade alfa e de riqueza e a frequência de consumo de cada alimento. Entretanto, não foi encontrada nenhuma correlação estatisticamente significativa nem para crianças nem para mães (valor de p ajustado $> 0,1$). Para analisar o impacto do padrão de alimentação na variação interindividual da microbiota intestinal, foi utilizado o valor de R^2 do índice de Bray Curtis para a variação interindividual e a frequência de consumo de cada alimento. De acordo com essa análise, os alimentos que apresentaram

maior associação com a variação interindividual da microbiota intestinal foram iogurte, no caso das crianças, e leite, no caso das mães (Figura 11).

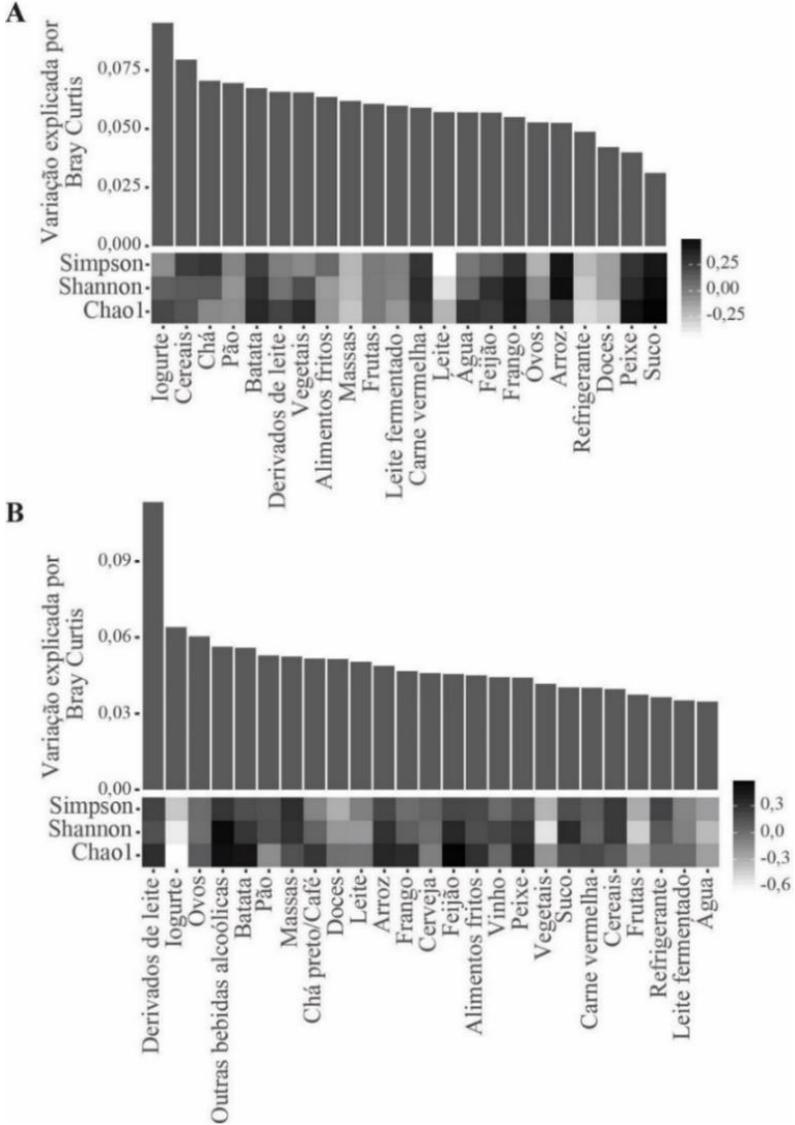


Figura 11: Gráfico de barras com o valor de R² da explicação de variação interindividual para cada alimento de acordo com o índice de diversidade

beta Bray Curtis e mapa de calor representando a correlação entre a frequência de consumo de cada alimento e os índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon e Simpson) para crianças (A) e mães (B).

3.4 MARCADORES DE TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA E INFLAMAÇÃO

Considerando que alterações na microbiota intestinal são relacionadas a translocação microbiana e ativação imune, foram também analisados marcadores de translocação microbiana e inflamação no plasma de mães e crianças. Quanto à translocação microbiana, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre crianças expostas e não expostas ao HIV. Quanto a citocinas inflamatórias, apesar de crianças expostas ao HIV apresentarem maiores concentrações plasmáticas de IL-6, IL-8, e IL-10, essas diferenças também não foram consideradas significativas ($p > 0,05$). Para algumas crianças (7 expostas e 4 não expostas ao HIV) foi possível avaliar níveis de proteína C reativa circulante, que foram mensurados pelo laboratório do Hospital Infantil. Novamente, apesar de crianças HEU apresentarem níveis maiores de proteína C reativa quando comparadas a crianças não expostas ao HIV, essas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p = 0,08$) (Figura 12).

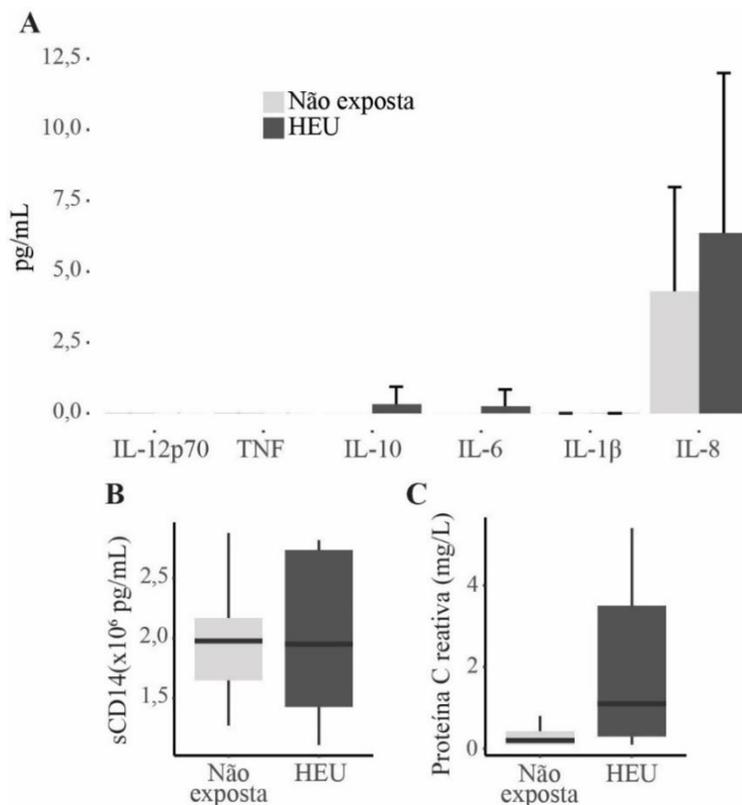


Figura 12: Citocinas inflamatórias IL-12p70, TNF α , IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8 (A); CD14 solúvel (B) e Proteína C reativa (C) no plasma de crianças expostas e não expostas ao HIV.

Mães HIV positivas e HIV negativas também não apresentaram diferenças significativas na concentração plasmática de citocinas inflamatórias (Figura 13 A). Entretanto, mães HIV positivas apresentaram aumento na concentração plasmática do marcador de ativação de monócitos CD14 solúvel, quando comparadas a mães HIV negativas ($p = 0,02$) (Figura 13 B).

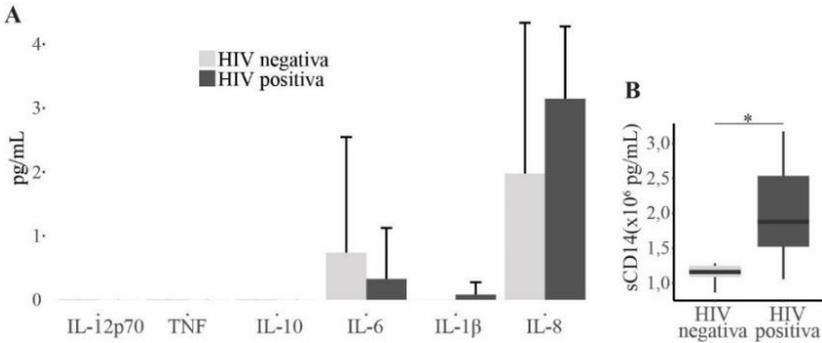


Figura 13: Citocinas inflamatórias IL-12p70, TNF α , IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8 (A) e CD14 solúvel (B) no plasma de mães HIV positivas e HIV negativas. * $p < 0,05$.

Para avaliar possíveis relações entre a composição da microbiota intestinal e marcadores de translocação microbiana e inflamação, foi realizado um teste de correlação de Spearman entre índices de diversidade da microbiota e abundância de táxons e a concentração dos marcadores no plasma. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) para índices de diversidade e riqueza, abundância de OTUs ou abundância de famílias.

4 DISCUSSÃO

Com os grandes avanços no tratamento da infecção por HIV e prevenção da transmissão vertical, o número de crianças expostas ao HIV que se tornam HIV positivas tem sido cada vez menor. Como resultado, o número de crianças HEU vem crescendo a cada ano. No presente estudo, foram avaliados a composição da microbiota intestinal, a alimentação e marcadores de translocação microbiana e inflamação em crianças HEU e suas mães HIV positivas comparando-as a crianças não expostas ao HIV e suas mães HIV negativas. Apesar de não terem sido encontradas diferenças em relação à diversidade alfa e beta ou marcadores de translocação microbiana e inflamação, foi possível identificar diversas OTUs com abundância diferenciada entre os grupos. Ademais, a predição de conteúdo funcional utilizando a ferramenta PICRUSt revelou ortólogos KEGG que diferiram entre os grupos, indicando alterações na microbiota intestinal dos grupos avaliados não só composicionais, mas também funcionais.

Diversos estudos reportam uma maior frequência de infecções e internações em hospitais em crianças HEU, comparadas a crianças não expostas ao HIV (LE ROUX *et al.*, 2016; RUPÉREZ *et al.*, 2017; SLOGROVE *et al.*, 2016). Neste estudo, o número de infecções foi avaliado através das respostas das mães aos questionários, considerando i) a frequência com que a criança fica doente e ii) o tempo desde a última vez que a criança apresentou algum sinal de doença. Apesar de esta ser uma forma simplista de avaliar a frequência de infecções, devido a possibilidade de mães possuírem diferentes percepções, os resultados dessa avaliação indicam uma maior frequência de infecções em crianças HEU, o que corrobora com o descrito na literatura. Os dados de prontuários e registros de atendimentos no hospital e internações não puderam ser considerados na avaliação de frequência de infecções das crianças devido a inconsistências nos registros entre diferentes setores do hospital, uma vez que crianças expostas e não expostas ao HIV são atendidas de forma diferente. Ademais, muitas vezes as mães dirigem-se a postos de saúde quando a criança apresenta algum sinal de doença e não diretamente ao hospital, fazendo com que o rastreamento dessas informações se torne difícil, uma vez que cada mãe pode visitar um posto de saúde diferente e não há um sistema de registro que integre os dados dos diversos serviços públicos de saúde em relação a cada cidadão.

Ainda de acordo com as respostas das mães ao questionário, uma maior proporção de crianças HEU apresentou bronquite, quando

comparado a crianças não expostas, corroborando os resultados observados por Mussi-Pinhata e colaboradores (MUSSI-PINHATA *et al.*, 2010), que descreveram uma maior incidência de bronquite e bronquiolite em crianças HEU na América Latina. Quanto ao peso e índice z de peso pela idade, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre crianças HEU e crianças não expostas ao HIV. Embora alguns estudos reportem menor peso e índices z de peso por idade em crianças HEU (FILTEAU *et al.*, 2011; MUHANGI *et al.*, 2013; ROSALA-HALLAS; BARTLETT; FILTEAU, 2017), ainda não está totalmente determinado se esses resultados estão realmente relacionados à exposição ao HIV ou a outras causas, como fatores socioeconômicos e comportamentais (LE ROUX *et al.*, 2016; MUHANGI *et al.*, 2013).

A análise da composição da microbiota intestinal revelou que a família mais abundante em crianças, independente de exposição ao HIV, foi Lachnospiraceae, enquanto o gênero mais abundante foi *Bacteroides*, resultados que se assemelham a dados previamente publicados sobre a microbiota intestinal infantil (LIM *et al.*, 2015). Não foi possível identificar diferenças quanto à diversidade alfa e beta entre crianças expostas ao HIV e não expostas. Em um estudo realizado no Haiti em que a microbiota intestinal de 25 crianças HEU foi avaliada e comparada a microbiota de 25 crianças não expostas ao HIV também não foram encontradas diferenças significativas quanto a diversidade beta porém, crianças expostas ao HIV apresentaram menor diversidade alfa na microbiota de fezes (BENDER *et al.*, 2016).

Entretanto, na avaliação de OTUs diferencialmente abundantes, foi possível identificar, no estudo aqui descrito, uma maior proporção de OTUs pertencentes às famílias Lachnospiraceae, Prevotellaceae, Ruminococcaceae, Enterobacteriaceae, Veillonellaceae, Clostridiaceae, Streptococaceae e Erysipelotrichaceae em crianças HEU, sendo a maior quantidade de OTUs com abundância diferente pertencentes à família Lachnospiraceae. Uma menor proporção de Lachnospiraceae em indivíduos HIV positivos comparados a indivíduos HIV negativos foi reportada em alguns estudos (DILLON *et al.*, 2014; MUTLU *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2016), entretanto, uma quantidade aumentada de bactérias pertencentes à Lachnospiraceae foi descrita por Bender *et al.* (2016) em crianças HEU, comparadas a crianças não expostas ao HIV, embora essa diferença não tenha sido considerada estatisticamente significativa. Recentemente uma abundância significativamente maior de Lachnospiraceae também foi descrita em adultos HIV positivos, comparados a HIV negativos, na Colômbia (SAN-JUAN-VERGARA *et*

al., 2018). Existem evidências de que diversos membros da família Lachnospiraceae são capazes de produzir ácidos graxos de cadeia curta (SCFA, do inglês, *short chain fat acids*), especialmente ácido butírico (MEEHAN; BEIKO, 2014), que tem grande importância na manutenção da barreira epitelial e está relacionado à modulação da resposta imune, contribuindo para a homeostase da microbiota intestinal (THAISS *et al.*, 2016). O butirato, base conjugada do ácido butírico, pode modular respostas de macrófagos intestinais pela inibição de histona deacetilases, levando a redução da produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-6 e IL-12 por macrófagos (CHANG *et al.*, 2014). Também existem evidências de que o butirato produzido pela microbiota pode induzir a diferenciação de células T regulatórias, via regulação epigenética do gene do fator de transcrição Foxp3 (FURUSAWA *et al.*, 2013). Outras bactérias encontradas em maiores quantidades em crianças HEU quando comparadas a crianças não expostas ao HIV e que também tem a capacidade de fermentar glicose em SCFAs são *Faecalibacterium prausnitzii* e *Roseburia* spp., as quais são consideradas importantes produtoras de butirato no intestino humano (FERREIRA-HALDER; FARIA; ANDRADE, 2017; RIVIÈRE *et al.*, 2016).

Assim, uma maior proporção de OTUs pertencentes a bactérias produtoras de SCFAs pode ser uma indicação de que, apesar de crianças HEU apresentarem alterações na microbiota intestinal, essas crianças ainda apresentam uma microbiota saudável. Ademais, devido a seu impacto na regulação da inflamação, é possível que a ausência de alterações nos marcadores de inflamação e translocação microbiana observados nas crianças HEU seja relacionada a grande quantidade de bactérias produtoras de ácido butírico na microbiota intestinal. Entretanto, não se descarta também a possibilidade de que a presença aumentada de ácidos graxos de cadeia curta produzidos pela microbiota intestinal leve a um desequilíbrio da resposta imune. Um aumento no número de linfócitos T regulatórios devido ao estímulo por butirato, por exemplo, poderia levar a inibição da resposta imune mediada por linfócitos Th1, a qual é de grande importância no intestino e necessária contra diversos tipos de infecções. Ademais, foi demonstrado em modelo animal que SCFAs podem alterar a resposta de neutrófilos, reduzindo sua produção de citocinas em resposta a bactérias e sua capacidade fagocitária e, portanto, comprometendo a resposta imune contra bactérias (CORRÊA *et al.*, 2017). Sendo assim, é possível também que esse efeito de repressão da função efetora de neutrófilos devido à exposição a SCFAs esteja relacionado a maior frequência de infecções observada nessas crianças.

Dentre os demais gêneros encontrados em quantidade aumentada na microbiota intestinal de crianças HEU, os gêneros *Roseburia* e *Dialister* foram também previamente descritos em quantidades aumentadas em pacientes com colite ulcerativa (LOPETUSO *et al.*, 2017), indicando uma possível relação desses gêneros com o desenvolvimento de doenças inflamatórias gastrointestinais. O gênero *Diallister* é também conhecido por possuir espécies consideradas patobiontes, organismos que em baixas concentrações são simbiotes, porém quando encontrados em maiores concentrações são relacionados a processos patológicos. (CHOW; TANG; MAZMANIAN, 2011; MAFFEIS *et al.*, 2016). *Klebsiella* também é um gênero conhecido por compreender espécies consideradas patobiontes. Já os gêneros *Ruminococcus*, *Dorea* e *Roseburia* também foram previamente encontrados em quantidades aumentadas em pacientes HIV positivos, quando comparados a HIV negativos (SAN-JUAN-VERGARA *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2018). Sendo assim, grande parte das OTUs encontradas em quantidade aumentada em crianças HEU pertencem a bactérias que já foram associadas a doenças, podendo, portanto, caracterizar disbiose. São exceções *F. prausnitzii*, a qual foi descrita em menores proporções na microbiota intestinal em diversos tipos de doenças e é relacionada a menores níveis de inflamação (FERREIRA-HALDER; VALERIA DE SOUSA FARIA; SIQUEIRA ANDRADE, 2017), além do gênero *Lactococcus*, o qual é largamente utilizado como probiótico. Entretanto, o fato de existirem evidências que sugerem a utilização de *Lactococcus* como probiótico no combate a alergias pode também significar que bactérias pertencentes a esse gênero tenham a capacidade de suprimir a resposta imune, o que poderia estar relacionado a algumas das alterações do sistema imune observadas em crianças HEU (KIM *et al.*, 2015; SHIN *et al.*, 2018).

Quanto a *Prevotella copri*, o gênero *Prevotella* tem sido apontado como o equivalente humano as bactérias filamentosas segmentadas (SFB) (LARSEN, 2017), as quais já possuem um papel bem descrito da sua influência no desenvolvimento de linfócitos Th17 em modelo murino (IVANOV *et al.*, 2009). Considerando que *Prevotella* tenha o mesmo impacto em humanos, é possível supor que um aumento na quantidade de bactérias pertencentes a esse gênero leve a um aumento da resposta Th17 em crianças HEU, que poderia contribuir para as alterações na resposta mediada por linfócitos T observada nessas crianças (ABU-RAYA *et al.*, 2016). Em modelo murino foi demonstrados que em alguns casos SFBs podem ter um papel patogênico na microbiota

intestinal, como por exemplo, aumentar a susceptibilidade a artrite reumatoide e esclerose múltipla (CHOW; TANG; MAZMANIAN, 2011).

Em relação às bactérias encontradas em menor proporção em crianças HEU comparadas a crianças não expostas ao HIV, *Bacteroides uniformis* foi previamente descrita em menores quantidades em crianças com fibrose cística (BRUZZESE *et al.*, 2014), crianças com doença de Chron (CONTE *et al.*, 2006) e em pacientes com colite ulcerativa e síndrome do intestino irritado, sendo também relacionadas a menor inflamação intestinal (NOOR *et al.*, 2010). *B. uniformis* também tem sido utilizada como probiótico com resultados promissores (NEEF; SANZ, 2013) e portanto, uma menor quantidade dessa espécie em crianças HEU também poderia indicar disbiose. Entretanto, *B. uniformis* é também descrita como sendo mais prevalente em recém nascidos que são amamentados (SÁNCHEZ *et al.*, 2011). Sendo assim, a maior quantidade de *B. fragilis* observada em crianças não expostas ao HIV poderia ser reflexo de uma maior colonização por essa bactéria no início da vida, uma vez que crianças não expostas ao HIV foram amamentadas no início da vida e crianças HEU não foram. Em contrapartida, OTUs identificadas como pertencentes ao gênero *Bacteroides*, porém não identificada a nível de espécie foram também encontradas em maior proporção em crianças HEU.

Diferenças na abundância de táxons específicos da microbiota intestinal entre os grupos de estudo foram avaliadas utilizando o pacote DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) na plataforma R (R CORE TEAM, 2017). Inicialmente desenvolvido para trabalhar com dados de sequenciamento de RNA, o DESeq2 tem sido também utilizado para análise de dados de sequenciamento de genes da região do RNA ribossomal 16S de diversas fontes, apresentando resultados bastante satisfatórios (KARSTENS *et al.*, 2016; NOGUERA-JULIAN *et al.*, 2017; SANMIGUEL *et al.*, 2017). O DESeq2 é especialmente indicado em casos de estudos com um baixo n amostral ($n < 20$ amostras por grupo), apresentando nesses casos uma sensibilidade maior que os testes estatísticos não paramétricos convencionais como Wilcoxon rank-sum e Kruskal-Wallis (WEISS *et al.*, 2017). Sendo assim, considerando o número de participantes desse estudo, o DESeq2 representa uma opção mais eficiente do que os métodos estatísticos convencionais para identificar táxons com abundância diferenciada entre os grupos.

Em sua comparação da microbiota intestinal entre crianças HEU e crianças não expostas ao HIV, Bender *et al.* (2016) reporta maiores proporções de Pseudomonadaceae e Thermaceae, aliado a uma

diminuição em Prevotellaceae, Desulfovibrionaceae e Alcaligenaceae em crianças HEU, resultados esses que diferem drasticamente dos aqui apresentados. Entretanto, Bender e colaboradores associam as alterações na microbiota intestinal encontradas em seu estudo à presença de alterações na composição de oligossacarídeos do leite materno (HMOs, do inglês, *Human Milk Oligosaccharides*) em mães HIV positivas. No Brasil, a recomendação do Ministério da Saúde é de que crianças expostas ao HIV não sejam amamentadas (DEPARTAMENTO DE DST AIDS E HEPATITES VIRAIS, 2017). Nos resultados aqui apresentados, todas as crianças HEU não foram amamentadas e receberam fórmula infantil para substituir o leite materno e, portanto, não receberam a influência dos HMOs do leite materno. Esse fato pode explicar a obtenção de resultados diferentes, uma vez que a amamentação é reconhecidamente um fator de grande impacto no desenvolvimento da microbiota do recém-nascido, seja pela transferência de micro-organismos ou de metabólitos utilizados pela microbiota que sejam preferencialmente utilizados por determinados micro-organismos (BÄCKHED *et al.*, 2015; PANNARAJ *et al.*, 2017).

É também importante destacar que as crianças nesse estudo não foram amamentadas e ainda assim apresentaram algumas alterações na microbiota intestinal, indicando que a exposição a uma composição alterada de HMOs no leite materno não é o único fator responsável pelas alterações na microbiota intestinal. Sendo assim, outros fatores podem estar envolvidos, incluindo a própria influência da microbiota alterada das mães HIV positivas, uma vez que é reconhecido o fato de que indivíduos que convivem em proximidade apresentam uma microbiota semelhante entre si (ROTHSCHILD *et al.*, 2018). O fato de não terem sido encontradas diferenças quanto a alimentação entre os dois grupos de crianças e de não ter sido observado um grande impacto da alimentação na composição da microbiota também corrobora essa hipótese.

Quanto à comparação da composição da microbiota intestinal entre os dois grupos de mães, não foram observadas diferenças em relação a riqueza, diversidade alfa e diversidade beta entre os dois grupos, tratando-se de um resultado inesperado, uma vez que alterações na riqueza e diversidade da microbiota de indivíduos infectados por HIV foram previamente descritas em diversas ocasiões (MUTLU *et al.*, 2014; NOWAK *et al.*, 2015; VÁZQUEZ-CASTELLANOS *et al.*, 2014). Entretanto, ainda não está claro o impacto da terapia antirretroviral na composição da microbiota intestinal, e dentre as doze mães soropositivas que participaram desse estudo onze faziam tratamento antirretroviral no momento da coleta. Alguns estudos reportam que, apesar de tratamento

com antirretrovirais restaurar parcialmente a diversidade da microbiota, indivíduos HIV positivos tratados ainda apresentam diferenças na diversidade alfa e beta quando comparados a indivíduos HIV negativos (LOZUPONE *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2018). Entretanto, existem também resultados que indicam que a terapia antirretroviral pode reverter alterações na diversidade ao ponto que indivíduos HIV positivos e HIV negativos apresentem índices de diversidade bastante semelhantes (MCHARDY *et al.*, 2013). Sendo assim, é possível que a ausência de diferença significativa nos índices de diversidade avaliados entre os dois grupos de mães seja explicada pelo período prolongado de terapia antirretroviral e baixa carga viral que essas mães apresentaram.

Foram observadas diferenças na abundância de diversas OTUs presentes na microbiota intestinal entre mães HIV positivas e HIV negativas. As OTUs diferencialmente abundantes entre os dois grupos de mães foram classificadas como pertencentes às famílias Rickenellaceae, Lachnospiraceae, Clostridiaceae e Bacteroidaceae, encontradas em quantidade aumentada em mães HIV negativas, além de Prevotellaceae e Paraprevotellaceae, encontradas em quantidade aumentada em mães HIV positivas. Ademais, a família mais abundante foi diferente em cada grupo de mães, sendo Ruminococcaceae em HIV negativas e Prevotellaceae em HIV positivas. Uma quantidade aumentada de bactérias pertencentes a família Prevotellaceae foi descrita diversas vezes em indivíduos HIV positivos (DILLON *et al.*, 2014; PAQUIN-PROULX *et al.*, 2016; VÁZQUEZ-CASTELLANOS *et al.*, 2014). Ainda dentro da família Prevotellaceae, foi observada também uma maior proporção de *Prevotella copri* tanto em mães HIV positivas quanto em crianças HEU, em relação a mães HIV negativas e crianças não expostas ao HIV, respectivamente. A presença de *P. copri* em quantidade aumentada nesses dois grupos pode indicar que a microbiota materna tem uma influência na microbiota das crianças HEU, ou que crianças HEU também estão sujeitas a alguns dos fatores que levam a alterações da microbiota em pacientes HIV positivos.

A análise da predição de conteúdo funcional da microbiota também revelou diferenças entre crianças não expostas ao HIV e crianças HEU, com o último grupo apresentando quantidades aumentadas de ortólogos KEGG relacionados ao metabolismo de nucleotídeos, metabolismo de aminoácidos, divisão de cromossomos, transporte de membrana, metabolismo de cofatores e vitaminas e mecanismos de defesa bacteriano. Bender *et al.* (2016) também reportaram aumento no metabolismo de cofatores e vitaminas em crianças HEU, o que poderia indicar alterações na disponibilidade de vitaminas para essas crianças.

Ademais, a presença de uma maior quantidade de genes relacionados a mecanismos de defesa bacteriano como genes relacionados ao sistema CRISPR-Cas pode indicar que essas crianças apresentem não só alterações na comunidade bacteriana, mas também no viroma intestinal, dado que uma maior frequência desses genes pode indicar que as bactérias da microbiota estão mais sujeitas a infecções virais.

Mães HIV positivas também apresentaram alterações no conteúdo funcional predito da microbiota quando comparadas a mães HIV negativas, com um aumento em ortólogos KEGG relacionados a metabolismo do propanoato e redução de nitrito, enquanto mães HIV negativas apresentaram proporções aumentadas de ortólogos KEGG relacionados a replicação e reparo de DNA, transposases, lipopolissacarídeo bacteriano, síntese de ácido hialurônico, metabolismo de carboidratos e metabolismo de cofatores e vitaminas. Uma menor quantidade de genes relacionados a processos energéticos também foi previamente descrita em indivíduos HIV positivos (VÁZQUEZ-CASTELLANOS *et al.*, 2014) e pode indicar um desbalanço em processos energéticos na microbiota, com possíveis implicações para o hospedeiro. Entretanto, é importante destacar que esses resultados representam uma predição baseada na taxonomia gerada pelo sequenciamento de um único gene (RNA ribossomal 16S) e, portanto, deve ser interpretada apenas como indicação e não como alteração real. Estudos avaliando o metagenoma, ou seja, o conteúdo genético total da microbiota, ou conteúdo de RNA (sequenciamento em massa de RNA) ou mesmo de proteínas (proteômica) da microbiota intestinal seriam mais indicados para avaliar essas alterações.

Quanto à alimentação, também não pode ser observado um impacto significativo na microbiota intestinal dos indivíduos avaliados no presente estudo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quanto a alimentação entre os dois grupos de crianças e poucas diferenças foram observadas nos dois grupos de mães. Foi também avaliado o impacto da alimentação na composição da microbiota dos grupos, revelando um baixo impacto dos alimentos analisados nos índices de riqueza, diversidade alfa e diversidade beta. Apesar de alimentação ser um fator conhecido por modular a composição da microbiota intestinal (DAVID *et al.*, 2014), o fato de não ter sido observado um grande impacto da alimentação na microbiota pode ser explicado devido à baixa variabilidade da alimentação entre indivíduos de cada grupo e a homogeneidade desses indivíduos quanto a origem e perfil socioeconômico, bem como uma limitação metodológica na avaliação da

alimentação dos participantes, uma vez que com o objetivo de se evitar um questionário muito desgastante para as voluntárias do estudo, alguns itens específicos foram escolhidos e é possível que esse nível de análise não tenha sido suficiente para detectar relações entre alimentação e composição a microbiota.

Apesar de alguns estudos terem reportado alterações na resposta imune de crianças HEU (ABU-RAYA *et al.*, 2016; AFRAN *et al.*, 2014), os resultados aqui apresentados não revelam diferenças significativas na concentração de marcadores plasmáticos de translocação microbiana e inflamação entre crianças HEU e crianças não expostas ao HIV. Um estudo prévio descreveu uma maior concentração de LPS, sCD14 e LBP e EndoCAB em crianças HIV positivas em relação a crianças HEU; entretanto esse estudo não avaliou crianças não expostas ao HIV como comparação (PAPASAVVAS *et al.*, 2011). Kourtis *et al.* (2015) avaliaram níveis de LPS no plasma e marcadores de ativação imune em crianças expostas ao HIV em um estudo longitudinal e observaram que altos níveis de LPS plasmático em crianças expostas estavam correlacionados a uma maior probabilidade dessa criança se tornar HIV positiva por exposição através da amamentação. Ademais, os autores reportam um aumento nos níveis de LPS nas crianças após cessar a amamentação e nas crianças que realizaram tratamento profilático com antibióticos (KOURTIS *et al.*, 2013). Em um estudo mais recente realizado por Myiamoto e colaboradores (MIYAMOTO *et al.*, 2017), no qual foram avaliados diversos marcadores de inflamação, ativação imune e translocação microbiana em crianças brasileiras, também não foram observadas alterações nos marcadores de translocação microbiana e inflamação em crianças HEU quando comparadas a crianças não expostas ao HIV. Em indivíduos infectados por HIV alterações na microbiota intestinal são frequentemente associadas a maior translocação microbiana (ZEVIN *et al.*, 2016), entretanto, nas crianças avaliadas no presente estudo, alterações na microbiota intestinal parecem ocorrer de forma independente à translocação microbiana, uma vez que não foram encontradas diferenças entre os grupos quanto ao marcador de translocação microbiana avaliado, nem correlações significativas entre sua concentração e indicadores de abundância, riqueza e diversidade da microbiota.

Também não foram encontradas diferenças significativas entre mães HIV positivas e HIV negativas quanto à concentração plasmática de citocinas inflamatórias. O aumento na ativação imune é uma característica da infecção por HIV, entretanto, o uso prolongado de antirretrovirais, que

leva à supressão da carga viral, pode reverter parcialmente, ou mesmo completamente, o estado pró inflamatório nesses indivíduos (DEEKS; TRACY; DOUEK, 2013). Todas as mulheres que participaram desse estudo apresentaram características de indivíduos saudáveis, incluindo as HIV positivas, que em sua grande maioria estavam em tratamento antirretroviral e apresentaram carga viral indetectável e níveis de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ relativamente elevados. Essas características das mães HIV positivas podem explicar a ausência maiores concentrações de marcadores de inflamação, assim como da ausência de diferenças alfa e beta na composição da microbiota antes apontada. Entretanto, a ativação imune não foi totalmente suprimida pela terapia antirretroviral nessas mulheres, uma vez que mães HIV positivas apresentaram maiores concentrações de CD14 solúvel no plasma. Resultados semelhantes a esses são reportados por Villanueva-Millan e colaboradores (VILLANUEVA-MILLÁN *et al.*, 2017), que descreveram um grupo de pacientes HIV positivos em tratamento antirretroviral e com carga viral indetectável no qual também foram observados níveis elevados de sCD14 apesar dos níveis de linfócitos T normais. Villanueva-Millan *et al.* (2017) também descreveram que indivíduos HIV positivos podem apresentar níveis mais elevados de IL-6 ou não em relação a indivíduos não infectados, dependendo do tipo de tratamento antirretroviral recebido. Entretanto, no presente estudo não foi possível obter informações sobre o tipo de tratamento antirretroviral utilizado pelas participantes, uma vez que tivemos acesso apenas as informações disponíveis no Hospital Infantil, o que não inclui informações sobre o tratamento das mães.

É importante reconhecer que o estudo aqui apresentado apresenta algumas limitações. Este foi um estudo transversal, com um baixo número de participantes, recrutados em apenas um único local. Ademais, algumas características importantes como idade em meses e amamentação apresentaram distribuição diferente entre os grupos. A amamentação possui um impacto muito positivo na saúde das crianças e, portanto, é extremamente recomendada, pelo menos durante os primeiros seis meses da criança. Sendo assim a amamentação é, em muitos países, recomendada também para mães HIV positivas. Entretanto, de acordo com a disponibilidade e qualidade de acesso a serviços públicos de saúde e opções de alimentação que substitua a amamentação, além de características socioeconômicas e culturais, alguns países optam por recomendar que mães HIV positivas não amamentem seus filhos, com o objetivo de evitar a transmissão do vírus através do leite materno (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b; WORLD HEALTH

ORGANIZATION, 2016). No Brasil, portanto, a recomendação do Ministério da Saúde é que crianças expostas ao HIV não sejam amamentadas, e que recebam fórmula infantil disponibilizada gratuitamente até os 6 meses de idade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b). Sendo assim, todas as crianças HEU que participaram desse estudo não foram amamentadas. Apesar dos esforços para recrutar crianças não expostas ao HIV que também nunca tivessem sido amamentadas, devido a importância da amamentação para a saúde da criança, não foi possível recrutar um número suficiente de crianças não expostas ao HIV que não fossem amamentadas. Como resultado, no grupo de crianças não expostas ao HIV estão incluídas também crianças que foram amamentadas durante os primeiros meses de vida, sendo possível que a amamentação, mesmo que por um curto período de tempo, tenha um impacto duradouro na microbiota dessas crianças.

Embora existam estudos publicados anteriormente que também avaliam a microbiota intestinal de crianças HEU, comparando-as a crianças não expostas ao HIV (BENDER *et al.*, 2016; GONZÁLEZ *et al.*, 2013), nesses estudos todas as crianças, incluindo as expostas ao HIV, foram amamentadas. Dessa forma, o presente estudo representa a primeira caracterização da microbiota intestinal em crianças HEU que não foram amamentadas. Esses resultados são relevantes pois mostram que mesmo em regiões onde a amamentação não é recomendada para crianças expostas ao HIV, essas crianças ainda podem apresentar alterações na microbiota intestinal, sendo, portanto, essas alterações independentes da influência de compostos presentes no leite materno. Sendo assim, os resultados aqui apresentados podem subsidiar discussões a respeito do planejamento da introdução de probióticos ou prebióticos como suplemento na fórmula infantil distribuída para crianças HEU, uma vez que o uso de probióticos já foi demonstrado ser seguro em crianças expostas ao HIV (COOPER *et al.*, 2016). Uma melhor compreensão da estrutura da comunidade bacteriana da microbiota intestinal dessas crianças pode apontar novas bactérias candidatas a utilização como suplemento, com o objetivo de melhorar a saúde de crianças HEU.

5 SUMÁRIO DE RESULTADOS

No estudo aqui descrito, foram demonstradas alterações significativas na abundância de diversas OTUs na microbiota intestinal de crianças expostas ao HIV, mas não infectadas, quando comparadas a crianças não expostas ao HIV, além de alterações no conteúdo funcional predito utilizando a ferramenta PICRUSt. Foi também descrito que mães HIV positivas percebem uma maior frequência de doenças em suas crianças, quando comparadas a mães HIV negativas. Entretanto, não foram observadas diferenças quanto à riqueza e diversidade da microbiota intestinal, nem quanto à presença de marcadores de translocação microbiana e inflamação, alimentação, peso e índice z de peso por idade. Também não foram encontradas correlações significativas entre alimentação, peso, índice z de peso por idade, frequência anual de doenças, níveis de albumina sérica e marcadores de translocação microbiana e inflamação e riqueza, abundância e diversidade alfa e beta da microbiota intestinal das crianças. Também foi avaliada a composição da microbiota intestinal e presença de marcadores de translocação microbiana e inflamação nas mães das crianças participantes do estudo. Foram descritas OTUs que se mostraram em abundância significativamente diferente em mães HIV positivas e HIV negativas, além de ortólogos KEGG que foram encontrados em proporção diferente entre os dois grupos e mães. Mães HIV positivas também apresentaram maiores concentrações de CD14 solúvel no plasma. Entretanto, não foram observadas diferenças quanto a riqueza e diversidade da microbiota intestinal, alimentação, ou marcadores de inflamação entre mães HIV positivas e HIV negativas.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados aqui expostos, pode-se concluir que crianças HEU apresentam uma microbiota intestinal ligeiramente distinta da microbiota de crianças não expostas ao HIV, com alguns sinais de disbiose, uma vez que crianças HEU apresentam maiores quantidades de bactérias relacionadas a processos patológicos e bactérias consideradas patobiontes. Entretanto, não se pode ainda afirmar que essa disbiose esteja relacionada ao maior número de doenças e problemas de crescimento reportados nessas crianças, uma vez que não foram encontradas correlações significativas entre a abundância de OTUs da microbiota e peso, frequência de doenças, ou marcadores plasmáticos de inflamação.

7 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados aqui obtidos novos estudos podem ser desenvolvidos, os quais avaliem mais profundamente relações entre o desenvolvimento do sistema imune e bactérias específicas presentes em abundância diferente em crianças HEU e crianças não expostas ao HIV, como por exemplo bactérias do gênero *Prevotella*; estudos que confirmem os resultados obtidos através da predição de conteúdo funcional *in silico* utilizando outras técnicas de sequenciamento de nova geração, como sequenciamento em massa de RNA e proteômica; além do desenvolvimento e uso de probióticos ou prebióticos para crianças HEU.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSSON, Thomas R.; WU, Richard Y.; SHERMAN, Philip M. Microbiota in functional gastrointestinal disorders in infancy: Implications for management. **Nestle Nutrition Institute Workshop Series**, v. 88, p. 107–115, 2017.
- ABU-RAYA, Bahaa *et al.* The immune system of HIV-exposed uninfected infants. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 1–10, 2016.
- ADLER, Catherine *et al.* Severe infections in HIV-exposed uninfected infants born in a european country. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–14, 2015.
- AFRAN, L. *et al.* HIV-exposed uninfected children: A growing population with a vulnerable immune system? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 176, n. 1, p. 11-22, 2014.
- ALKANANI, Aimon K. *et al.* Alterations in intestinal microbiota correlate with susceptibility to type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 64, 3510-3520, 2015.
- ANUKAM, Kingsley C. *et al.* Yogurt containing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 helps resolve moderate diarrhea and increases CD4 count in HIV/AIDS patients. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, n. 3, p. 239–243, 2008.
- ARRIETA, Marie-Claire *et al.* The intestinal microbiome in early life: health and disease. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1-18, 2014.
- ATARASHI, Koji *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. **Science**, v. 331, n. 6015, p. 337–341, 2011.
- AVERSHINA, E. *et al.* Transition from infant to adult like gut microbiota. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 7, p. 2226-2236 2016.
- AZAD, M. B. *et al.* Infant antibiotic exposure and the development of childhood overweight and central adiposity. **International Journal of Obesity**, v. 38, n. 10, p. 1290–1298, 2014.
- BÄCKHED, Fredrik *et al.* Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. **Cell Host and Microbe**, v. 17, n. 5, p. 690–703, 2015.
- BAUER, Heinz *et al.* The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. **the American Journal of Pathology**, v. 42, n. 4, p. 471–483, 1963.
- BENDER, Jeffrey M. *et al.* Maternal HIV infection influences the microbiome of HIV-uninfected infants. **Science Translational**

Medicine, v. 8, n. 349, p.1-12, 2016.

BARRE-SINOUSI, Françoise. HIV as the cause of aids. **The Lancet**, v. 348, n. 9019, p.31-35, 1996.

BERGSTRÖM, Anders *et al.* Establishment of intestinal microbiota during early life: A longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 9, p. 2889–2900, 2014.

BLUMENTHAL, Robert; DURELL, Stewart; VIARD, Mathias. HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion. **Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 49, p. 40841–40849, 2012

BOLGER, Anthony M.; LOHSE, Marc; USADEL, Bjoern. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BORGES-ALMEIDA, Eliane *et al.* The impact of maternal HIV infection on cord blood lymphocyte subsets and cytokine profile in exposed non-infected newborns. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 38, 2011.

BRAHMBHATT, Heena *et al.* Mortality in HIV-infected and uninfected children of HIV-infected and uninfected mothers in rural Uganda. **Journal of Acquired Immunodeficiency Syndrome**, v. 41, n. 4, p. 504–508, 2006.

BRENCHLEY, Jason M. *et al.* CD4 + T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 6, p. 749–759, 2004.

BRENCHLEY, Jason M. *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. **Nature Medicine**, v. 12, n. 12, p. 1365–1371, 2006.

BRENCHLEY, Jason M. *et al.* Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. **Blood**, v. 112, n. 7, p. 2826–2835, 2008.

BRITANOVA, Liudmila; DIEFENBACH, Andreas. Interplay of innate lymphoid cells and the microbiota. **Immunological Reviews**, v. 279, n. 1, p. 36–51, 2017.

BRUZZESE, Eugenia *et al.* Disrupted intestinal microbiota and intestinal inflammation in children with cystic fibrosis and its restoration with *Lactobacillus* GG: A randomised clinical trial. **PLoS One**, v. 9, n. 2, 2014.

BUNDERS, Madeleine J. *et al.* Fetal exposure to HIV-1 alters chemokine receptor expression by CD4+T cells and increases susceptibility to HIV-1. **Scientific Reports**, v. 4, n. 6690, 2014.

CAPORASO, J.Gregory *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.

CHANG, Pamela V *et al.* The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 6, p. 2247-2252, 2014.

CHENG, Jing *et al.* Discordant temporal development of bacterial phyla and the emergence of core in the fecal microbiota of young children. **The ISME Journal**, v. 10, n. 4, p. 1002-1014, 2015.

CHOW, Janet; TANG, Haiqing; MAZMANIAN, Sarkis K. Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 4, p. 473-480, 2011.

CLERICI, Mario *et al.* T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV. **Blood**, v. 96, n. 12, p. 3866-3871, 2000.

COMEAU, André M.; DOUGLAS, Gavin M.; LANGILLE, Morgan G. I. Microbiome helper: A custom and streamlined workflow for microbiome research. **mSystems**, v. 2, n. 1, 2017.

CONTE, M. P. *et al.* Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 55, p. 1760-1767, 2006.

COOPER, Peter *et al.* Early benefits of a starter formula enriched in prebiotics and probiotics on the gut microbiota of healthy infants born to HIV+ mothers: A randomized double-blind controlled trial. **Clinical Medicine Insights: Pediatrics**, v. 10, p. 119-130, 2016.

CORRÉA, Renan O. *et al.* Bacterial short-chain fatty acid metabolites modulate the inflammatory response against infectious bacteria. **Cell microbiology**, v. 19, n. 7, p. 1-47, 2017.

DAVID, Lawrence A. *et al.* Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 559-563, 2014.

DEEKS, Steven G.; TRACY, Russel; DOUEK, Daniel C. Systemic Effects of inflammation on health during chronic HIV infection. **Immunity**, v. 39, n. 4, p. 633-645, 2013.

DEPARTAMENTO DE DST AIDS E HEPATITES VIRAIS. **Relatório de Monitoramento Clínico do HIV**. Brasília, DF: Ministério da Saude, 2017, 94p.

DILLON, S. M. *et al.* An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 4, p. 983-

994, 2014.

DINH, Duy M. *et al.* Intestinal Microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 1, p. 19–27, 2015.

DOMINGUEZ-BELLO, Maria G. *et al.* Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 26, p. 11971–5, 2010.

DUBOURG, Grégory *et al.* Gut microbiota associated with HIV infection is significantly enriched in bacteria tolerant to oxygen. **BMJ Open Gastroenterology**, v.3, n.1, p. 1–9, 2016.

ELLIS, Collin L. *et al.* Molecular characterization of stool microbiota in HIV-infected subjects by panbacterial and order-level 16S ribosomal DNA (rDNA) quantification and correlations with immune activation. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 57, n. 5, p. 363–370, 2011.

ELSE, Laura J. *et al.* Pharmacokinetics of antiretroviral drugs in anatomical sanctuary sites: The fetal compartment (placenta and amniotic fluid). **Antiviral Therapy**, v. 16, n. 8, p. 1139-1147, 2011.

EPALZA, Authors Cristina; GOETGHEBUER, Tessa. High incidence of invasive group B streptococcal infections in HIV-exposed uninfected infants. **Pediatrics**, v. 126, n. 3, p. 1-10, 2010.

EVANS, Ceri; JONES, Christine E.; PRENDERGAST, Andrew J. HIV-exposed , uninfected infants : new global challenges in the era of paediatric HIV elimination. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3099, n. 16, p. 1-16, 2016.

FERREIRA-HALDER, Carmen Veríssima; FARIA, Alessandra V. S.; ANDRADE, Sheila S.. Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 31, p. 643–648, 2017.

FILTEAU, Suzanne *et al.* Provision of micronutrient-fortified food from 6 months of age does not permit HIV-exposed uninfected zambian children to catch up in growth to HIV-unexposed children: A randomized controlled trial. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 56, n. 2, p. 166–175, 2011.

FURUSAWA, Yukihiko *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. **Nature**, v. 504, n. 7480, p. 446–450, 2013.

GENSOLLEN, Thomas *et al.* How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. **Science**, v. 352, n. 6285, p. 539–

544, 2016.

GOLDBERG, Brittany E. *et al.* The oral bacterial communities of children with well-controlled HIV infection and without HIV infection. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–19, 2015.

GONZÁLEZ, Raquel *et al.* Breast milk and gut microbiota in African mothers and infants from an area of high HIV prevalence. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–9, 2013.

GORI, A. *et al.* Early impairment of gut function and gut flora supporting a role for alteration of gastrointestinal mucosa in human immunodeficiency virus pathogenesis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 757–758, 2008.

HOFER, Cristina Barroso *et al.* In utero exposure to antiretroviral drugs. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 35, n. 1, p. 71–77, 2015.

HOFER, Cristina Barroso *et al.* The cascade of care to prevent mother-to-child transmission in Rio de Janeiro, Brazil, 1996–2013: improving but still some way to go. **Tropical Medicine and International Health**, v. 22, n. 10, p. 1266–1274, 2017.

HUTTENHOWER, Curtis *et al.* Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207–214, 2012.

IVANOV, Ivaylo I. *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 485–498, 2009.

JALLOW, Sabelle *et al.* Maternal HIV infection associated with reduced transplacental transfer of measles antibodies and increased susceptibility to disease. **Journal of Clinical Virology**, v. 94, p. 50–56, 2017.

JONES, Christine E. *et al.* Maternal HIV infection and antibody responses against vaccine-preventable diseases in uninfected infants. **Journal of the American Medical Association**, v. 305, n. 19, p. 1964–1965, 2011.

JUDE, Brooke A. *et al.* Subversion of the innate immune system by a retrovirus. **Nature Immunology**, v. 4, n. 6, p. 573–578, 2003.

KANEHISA, Minoru; GOTO, Susumu. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000.

KARSTENS, Lisa *et al.* Does the Urinary microbiome play a role in urgency urinary incontinence and its severity? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, p. 1–13, 2016.

KIDZERU, Elvis B. *et al.* In-utero exposure to maternal HIV

infection alters T-cell immune responses to vaccination in HIV-uninfected infants. **AIDS**, v. 28, n. 10, p. 1421–1430, 2014.

KIM, H. K. *et al.* Probiotic supplementation influences faecal short chain fatty acids in infants at high risk for eczema. **Beneficial Microbes**, v. 6, n. 6, p. 783–790, 2015.

KLATT, Nichole R.; FUNDERBURG, Nicholas T.; BRENCHLEY, Jason M. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. **Trends in microbiology**, v. 21, n. 1, p. 6–13, 2013.

KOPYLOVA, Evguenia; NOÉ, Laurent; LÈ NE TOUZET, Hé. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 24, p. 3211–3217, 2012.

KOURTIS, Athena P. *et al.* Role of intestinal mucosal integrity in HIV transmission to infants through breast-feeding: The BAN study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 4, p. 653–661, 2013.

KOYANAGI, Ai *et al.* Morbidity among human immunodeficiency virus-exposed but uninfected, human immunodeficiency virus-infected, and human immunodeficiency virus-unexposed infants in Zimbabwe before availability of highly active antiretroviral therapy. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30, n. 1, p. 45–51, 2011.

LANGILLE, Mgi *et al.* Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 814–21, 2013.

LARSEN, Jeppe Madura. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. **Immunology**, v. 151, n. 4, p. 363–374, 2017.

LAURSEN, Martin F. *et al.* First foods and gut microbes. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–8, 2017.

LE ROUX, Stanzi M. *et al.* Clinical outcomes of HIV-exposed, HIV-uninfected children in sub-Saharan Africa. **Tropical Medicine and International Health**, v. 21, n. 7, p. 829–845, 2016.

LIM, Efram S. *et al.* Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. **Nature Medicine**, v. 21, n. 10, p. 1228–34, 2015.

LIU, Jun *et al.* IL-10-Producing B cells are induced early in HIV-1 infection and suppress HIV-1-specific T cell responses. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–13, 2014.

LOPETUSO, Loris Riccardo *et al.* Gut microbiota in health, diverticular disease, irritable bowel syndrome, and inflammatory bowel

diseases: Time for microbial marker of gastrointestinal disorders. **Digestive Diseases**, v. 36, n. 1, p. 56–65, 2017.

LOVE, Michael I.; HUBER, Wolfgang; ANDERS, Simon. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 1-21, 2014.

LOZUPONE, Catherine a *et al.* Alterations in the gut microbiota associated with HIV-1 infection. **Cell Host & Microbe**, v. 14, n. 3, p. 329–339, 2013.

MAARTENS, Gary; CELUM, Connie; LEWIN, Sharon R. HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. **The Lancet**, v. 384, n. 9939, p. 258–271, 2014.

MACNAUGHTAN, Jane; JALAN, Rajiv. Clinical and pathophysiological consequences of alterations in the microbiome in cirrhosis. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 110, n. 10, p. 1399–1411, 2015.

MAFFEIS, Claudio *et al.* Association between intestinal permeability and faecal microbiota composition in Italian children with beta cell autoimmunity at risk for type 1 diabetes. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 32, n. 7, p. 700–709, 2016.

MARINDA, Edmore *et al.* Child mortality according to maternal and infant HIV status in Zimbabwe. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 26, n. 6, p. 519–526, 2007.

MARKHUS, Maria W. *et al.* Establishment of a seafood index to assess the seafood consumption in pregnant women. **Food and Nutrition Research**, v. 57, p. 1-11, 2013.

MAZMANIAN, Sarkis K. *et al.* An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 107–118, 2005.

MAZMANIAN, Sarkis K.; ROUND, June L.; KASPER, Dennis L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. **Nature**, v. 453, n. 7195, p. 620–625, 2008.

MCDONALD, Daniel *et al.* An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **The ISME Journal**, v. 6, n. 10, p. 610–618, 2011.

MCHARDY, Ian H. *et al.* HIV Infection is associated with compositional and functional shifts in the rectal mucosal microbiota. **Microbiome**, v. 1, n. 1, p. 1:12, 2013.

MCMURDIE, Paul J.; HOLMES, Susan. Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1-8, 2013.

MEEHAN, Conor J.; BEIKO, Robert G. A phylogenomic view of ecological specialization in the lachnospiraceae, a family of digestive tract-associated bacteria. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 3, p. 703–713, 2014.

MERCIER, C. *et al.* SUMATRA and SUMACLUST: fast and exact comparison and clustering of sequences, 2013. Disponível em <http://metabarcoding.org/sumatra>.

MINISTÉRIO DA SAÚDEa. **Boletim Epidemiológico: HIV AIDS**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017, 60p.

MINISTÉRIO DA SAÚDEb. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes**. 1. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017, 216p.

MIYAMOTO, Maristela *et al.* Immune development in HIV-exposed uninfected children born to HIV-infected women Maristela. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, n. 30, p. 1–9, 2017.

MONACO, Cynthia L. *et al.* Altered virome and bacterial microbiome in human immunodeficiency virus-associated acquired immunodeficiency syndrome. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 3, p. 311–322, 2016.

MONDOT, Stanislas *et al.* The human gut microbiome and its dysfunctions. **Digestive Diseases**, v. 31, n. 3–4, p. 278–285, 2013.

MOSEHOLM, Ellen *et al.* Hospital admission among HIV-exposed uninfected children compared with HIV-unexposed children. **AIDS**, v. 30, n. 17, p. 2697–2706, 2016.

MUHANGI, Lawrence *et al.* Maternal HIV infection and other factors associated with growth outcomes of HIV-uninfected infants in Entebbe, Uganda. **Public Health Nutrition**, v. 16, n. 9, p. 1548–1557, 2013.

MUSSI-PINHATA, Marisa M. *et al.* Lower respiratory tract infections among human immunodeficiency virus-exposed, uninfected infants. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14 Suppl 3, n. 14, p. 1-17, 2010.

MUTLU, Ece a *et al.* A compositional look at the human gastrointestinal microbiome and immune activation parameters in HIV infected subjects. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 2, p. 1-18, 2014.

NAZLI, Aisha *et al.* Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. 1-20, 2010.

NEEF, Alexander; SANZ, Yolanda. Future for probiotic science in

functional food and dietary supplement development. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 16, n. 6, p. 679–687, 2013.

NIELSEN, Susanne D. *et al.* Impaired progenitor cell function in HIV-negative infants of HIV-positive mothers results in decreased thymic output and low CD4 counts. **Blood**, v. 98, n. 2, p. 398–404, 2001.

NOGUERA-JULIAN, Marc *et al.* Gut microbiota linked to sexual preference and HIV infection. **EBioMedicine**, v. 5, p. 135–146, 2016.

NOGUERA-JULIAN, Marc *et al.* Oral microbiome in HIV-associated periodontitis. **Medicine**, v. 96, n. 12, p. 1-9, 2017.

NOOR, Samah O. *et al.* Ulcerative colitis and irritable bowel patients exhibit distinct abnormalities of the gut microbiota. **BMC Gastroenterology**, v. 10, v. 134, p. 1-9, 2010.

NOVATI, S. *et al.* General issues on microbial translocation in HIV-infected patients. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 5, p. 866–878, 2015.

NOWAK, Piotr *et al.* Gut microbiota diversity predicts immune status in HIV-1 infection. **Aids**, v. 29, n. 18, p. 2409-2418, 2015.

NOWAK, Rebecca G. *et al.* Rectal microbiota among HIV-uninfected, untreated HIV, and treated HIV-infected in Nigeria. **AIDS**, v. 31, n. 6, p. 857–862, 2017.

NYLUND, L. *et al.* Severity of atopic disease inversely correlates with intestinal microbiota diversity and butyrate-producing bacteria. **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 70, n. 2, p. 241–244, 2015.

PANNARAJ, Pia S. *et al.* Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. **JAMA Pediatrics**, v. 171, n. 7, p. 647–654, 2017.

PAPASAVVAS, Emmanouil *et al.* Increased microbial translocation in ≤ 180 days old perinatally human immunodeficiency virus-positive infants as compared with human immunodeficiency virus-exposed uninfected infants of similar age. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 30, n. 10, p. 877–82, 2011.

PAQUIN-PROULX, D. *et al.* Bacteroides are associated with GALT iNKT cell function and reduction of microbial translocation in HIV-1 infection. **Polymer Journal**, v. 10, n. 1, p. 69–78, 2016.

PÉREZ-SANTIAGO, Josué *et al.* Gut Lactobacillales are associated with higher CD4 and less microbial translocation during HIV infection. **AIDS**, v. 27, n. 12, p. 1921–1931, 2013.

PIERRE, Russell B. *et al.* Infectious disease morbidity and growth among young HIV-exposed uninfected children in Jamaica. **Revista**

Panamericana de Salud Pública, v. 40, n. 6, p. 401–409, 2016.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Roundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2017.

REIKIE, B. A. *et al.* Altered innate immune development in HIV-exposed uninfected infants. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 66, n. 3, p. 245–255, 2014.

RIVIÈRE, Audrey *et al.* Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. **Frontiers in Microbiology**, v.7 , p. 1-21, 2016.

ROGNES, Torbjørn *et al.* VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 4, p. 1-22, 2016.

ROMANO-KEELER, Joann; WEITKAMP, Jörn Hendrik. Maternal influences on fetal microbial colonization and immune development. **Pediatric Research**, v. 77, p. 189-195, 2015.

ROSALA-HALLAS, Anna; BARTLETT, Jonathan W.; FILTEAU, Suzanne. Growth of HIV-exposed uninfected, compared with HIV-unexposed, Zambian children: a longitudinal analysis from infancy to school age. **BMC Pediatrics**, v. 17, n. 1, p. 80, 2017.

ROTHSCHILD, Daphna *et al.* Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. **Nature**, v. 555, n. 7695, p. 210–215, 2018.

RUPÉREZ, María *et al.* Maternal HIV infection is an important health determinant in non-HIV-infected infants. **AIDS**, v. 31, n. 11, p. 1545–1553, 2017.

SAMBLEBEN, Camilla *et al.* Increased proportions of B cells with spontaneous production of interleukin-10 in HIV-infected individuals are normalized during combination antiretroviral therapy: a longitudinal study. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 126, n. 2, p. 143–151, 2018.

SAN-JUAN-VERGARA, Homero *et al.* A Lachnospiraceae-dominated bacterial signature in the fecal microbiota of HIV-infected individuals from Colombia, South America. **Scientific Reports**, v. 8, n. 4479, p. 1-13, 2018.

SÁNCHEZ, Ester *et al.* Influence of environmental and genetic factors linked to celiac disease risk on infant gut colonization by *Bacteroides* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5316–5323, 2011.

SANDLER, Netanya G.; DOUEK, Daniel C. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment

opportunities. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 655–666, 2012.

SANMIGUEL, Claudia P. *et al.* Surgically induced changes in gut microbiome and hedonic eating as related to weight loss: Preliminary findings in obese women Undergoing Bariatric Surgery. **Psychosomatic Medicine**, v. 79, n. 8, p. 880–887, 2017.

SHIN, Hee Soon *et al.* Preventive effects of a probiotic mixture in an ovalbumin-induced food allergy model. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 65–76, 2018.

SHU, Zhanjun *et al.* How intestinal bacteria can promote HIV replication. **AIDS reviews**, v. 15, n. 1, p. 32–7, 2013.

SIEWE, B. *et al.* Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8+ T cell function in vitro. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 5, p. 811–818, 2013.

SLOGROVE, Amy *et al.* HIV-exposed uninfected infants are at increased risk for severe infections in the first year of life. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 58, n. 6, p. 505–508, 2012.

SLOGROVE, Amy L. *et al.* Pattern of infectious morbidity in HIV-exposed uninfected infants and children. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 1–8, 2016.

SMITH, Christiana *et al.* Altered natural killer cell function in HIV-exposed uninfected infants. **Frontiers in immunology**, v. 8, n. 470, p. 1–13, 2017.

SODERBORG, Taylor K. *et al.* Microbial transmission from mothers with obesity or diabetes to infants : an innovative opportunity to interrupt a vicious cycle. **Diabetologia**, v. 59, n. 5, p. 895–906, 2016.

SON, Joshua S. *et al.* Comparison of fecal microbiota in children with autism spectrum disorders and neurotypical siblings in the simons simplex collection. **Plos One**, v. 10, n. 10, p. 1–19, 2015.

SUN, Yang *et al.* Fecal bacterial microbiome diversity in chronic HIV-infected patients in China. **Emerging Microbes & Infections**, v. 5, n. 4, p. e31, 2016.

SUNDQUIST, Wesley I.; KRÄUSSLICH, Hans-Georg. HIV-1 assembly, budding, and maturation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 7, p.1–24, 2012

THAISS, Christoph A. *et al.* The microbiome and innate immunity. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 65–74, 2016.

THORBECKE, G. J. Some histological and functional aspects of lymphoid tissue in germfree animals. **Annals of the New York Academy**

of Sciences, v. 78, p. 237–246, 1959.

TREMLET, Helen; WAUBANT, Emmanuelle. Gut microbiome and pediatric multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 24, n. 1, p. 64–68, 2018.

TROIS, Livia; CARDOSO, Edmundo Machado; MIURA, Ernani. Use of probiotics in HIV-infected children: A randomized double-blind controlled study. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 54, n. 1, p. 19–24, 2008.

UNAIDS. **How Aids changed everything**. UNAIDS: Geneva, Switzerland, 2015, 543p.

UNAIDSa. **UNAIDS Data 2017**. UNAIDS: Geneva, Switzerland, 2017, 248p.

UNAIDSb. **When women lead, change happens**. UNAIDS: Geneva, Switzerland, 2017, 31p.

VÁZQUEZ-CASTELLANOS, J. F. *et al.* Altered metabolism of gut microbiota contributes to chronic immune activation in HIV-infected individuals. **Mucosal immunology**, v. 8, n. 4, p. 760–772, 2014.

VILLANUEVA-MILLÁN, María J. *et al.* Differential effects of antiretrovirals on microbial translocation and gut microbiota composition of HIV-infected patients. **Journal of the International AIDS Society**, v. 20, n. 21526, p. 1-13, 2017.

VILLAR-GARCÍA, Judit *et al.* Effect of probiotics (*Saccharomyces boulardii*) on microbial translocation and inflammation in HIV-treated patients: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 68, n. 3, p. 256–63, 2015.

VUJKOVIC-CVIJIN, Ivan *et al.* Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 193, 2013.

WEISS, Sophie *et al.* Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. **Microbiome**, v. 5, n. 27, p. 1-18, 2017.

WILLIAMS, B.; LANDAY, A.; PRESTI, RM. Microbiome alterations in HIV infection a review. **Cellular Microbiology**, v. 18, p. 645–651, 2016.

WONG-STAAAL, Flossie. The aids virus: What we know and what we can do about it. **Biomedical science**, v. 155, n. 5, p.481-487, 1991.

WOOLEY, John C.; YE, Yuzhen. Metagenomics: Facts and artifacts, and computational challenges. **Journal of Computer Science and Technology**, v. 25, n. 1, p. 71–81, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Child growth standards R igrowup package. p. 1–12, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guideline: updates on HIV and infant feeding: duration of breastfeeding, and support from health services to improve feeding practices among mothers living with HIV**. WHO Publications: Geneva, Switzerland, 2016, 59p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Preventing HIV during pregnancy and breastfeeding in the context of PrEP**. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2017, 11p.

YAMASHITA, Tomoya *et al.* Intestinal immunity and gut microbiota as therapeutic targets for preventing atherosclerotic cardiovascular diseases. **Circulation Journal**, v. 79, n. 9, p. 1882–1890, 2015.

YANG, Liying *et al.* HIV-induced immunosuppression is associated with colonization of the proximal gut by environmental bacteria. **AIDS**, v. 30, n. 1, p. 19–29, 2016.

YATSUNENKO, T. *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 222–227, 2012.

ZEVIN, Alexander S. *et al.* Microbial translocation and microbiome dysbiosis in HIV-associated immune activation. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 11, n. 2, p. 182–190, 2016.

ZHANG, Jiajie *et al.* PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR., **Genome Analysis**, v. 30, n. 5, p. 614–620, 2014. Disponível em: <<http://www.exelixis-lab.>>. Acesso em: 4 jan. 2018.

ZHERNAKOVA, Alexandra *et al.* Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. **Science**, v. 352, n. 6285, p. 565–569, 2016.

ZHOU, Youlian *et al.* Alterations in the gut microbiota of patients with acquired immune deficiency syndrome. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 4, p. 2263–2271, 2018.

APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO SOBRE HÁBITOS DE VIDA E ALIMENTAÇÃO DAS MÃES



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA**
Laboratório de Imunologia Aplicada
Departamento de Microbiologia,
Imunologia e Parasitologia
Centro de Ciências Biológicas
Florianópolis, SC, 88049-900, Brasil



Título do projeto: Caracterização da microbiota intestinal e avaliação da presença de marcadores de translocação microbiana em crianças filhas de mulheres infectadas pelo HIV

Data: __/__/__ Horário: _____ Local: _____
Entrevistador(a): _____

QUESTIONÁRIO 1 – DADOS DA MÃE

DADOS SOCIOEPIDEMIOLÓGICOS

Data de nascimento: __/__/____ **Idade:** _____

Peso: ____ kg **Altura:** _____ m

Status da infecção pelo HIV: _____

TCD4+: _____ **TCD8+:** _____

Carga viral: _____

Escolaridade: () fundamental incompleto () fundamental completo
() médio incompleto () médio completo () superior incompleto () superior completo

Estado Civil: () em união estável () casada () divorciada () viúva
() solteira

Renda Familiar (Salário Mínimo = R\$ 880,00): () até 1 salário mínimo () de 1 a 3 salários mínimos () de 4 a 6 salários mínimos () de 7 a 9 salários mínimos () de 10 a 12 salários mínimos () mais de 13 salários mínimos

Situação Profissional: () do lar () sem ocupação () emprego fixo () autônoma Ocupação: _____

Etnia: () Euro descendente () Afro descendente () Asiático descendente () Indígena descendente () Não sei/Prefiro não responder

Cor da pele: () Negra () Mulata () Amarela () Branca ()
 Não sei/Prefiro não responder

QUANTO A SEUS HÁBITOS DE VIDA E ALIMENTAÇÃO:

1. Você costuma viajar com frequência?
 - () Sim, viajo semanalmente
 - () Sim, pelo menos uma vez por mês
 - () Não viajo com frequência
2. Você viajou nos últimos três meses?
 - () Sim, viajei para uma cidade no mesmo estado
 - () Sim, viajei para outro estado.
 - Qual?

 - () Sim, viajei para outro país
 - () Não viajei nos últimos três meses
3. Você pratica atividade física?
 - () Regularmente, pelo menos uma vez por dia
 - () Regularmente, 5 ou mais vezes por semana
 - () Regularmente, 2 a 4 vezes por semana
 - () Regularmente, 1 vez por semana
 - () 1 a 3 vezes por mês
 - () Raramente, menos de uma vez por mês
 - () Nunca

Por favor, na tabela a seguir, estime a frequência média com que você consome cada um dos alimentos listados na primeira coluna:

FREQUÊNCIA DE CONSUMO NO ÚLTIMO ANO:

ALIMENTO	Mais frequente ← → Menos frequente						
	Todos os dias, pelo menos uma vez por dia	5 ou mais vezes por semana	2 a 4 vezes por semana	1 vez por semana	1 a 3 vezes por mês	Menos de uma vez por mês	Nunca
LEITE DE VACA							
LEITE FERMENTADO (YAKULT, CHAMITO, ETC)							
IOGURTE							
DERIVADOS DE LEITE (QUEIJOS, CREME DE LEITE, MANTEIGA, REQUEIJÃO, LEITE CONDENSADO, ETC)							
LEGUMES E VERDURAS							
FRUTAS							
SUCO NATURAL							
ARROZ							
FEIJÃO							
BATATA							
PÃO							
CEREAIS (SUCRILHOS,							

**GRANOLA, AVEIA,
ETC)**

**CARNE VERMELHA
(GADO E/OU PORCO)**

FRANGO

PEIXE

OVOS

**MASSAS
(MACARRÃO,
LASANHA, PIZZA,
ETC)**

**ALIMENTOS FRITOS
(FRITURA)**

**DOCES
(CHOCOLATE,
BOLOS, SORVETE,
BALAS, ETC)**

REFRIGERANTE

**REFRIGERANTE
ZERO, LIGHT OU
DIET**

CERVEJA

VINHO

**OUTRAS BEBIDAS
ALCOÓLICAS**

**CAFÉ E/OU CHÁ
PRETO**

Outros (opcional): _____

4. Você costuma tirar a gordura aparente das carnes e a pele do frango ou outro tipo de ave?
- Sim
 Não
 Não como carne vermelha ou frango

5. Qual tipo de gordura é mais usado na sua casa para cozinhar os alimentos?
- Banha animal ou manteiga
 Óleo vegetal como: soja, girassol, milho, algodão ou canola
 Margarina ou gordura vegetal

6. Quantos copos de água você bebe por dia?
- Menos de 4 copos
 4 a 5 copos
 6 a 8 copos
 8 copos ou mais
7. Você tomou antibióticos recentemente?
- Sim, nos últimos dias
 Sim, nas últimas semanas
 Sim, nos últimos três meses
 Não consumi nenhum antibiótico recentemente
- Se sim, qual(is)?
-

8. Você consumiu algum probiótico recentemente?
- Sim, nos últimos dias
 Sim, nas últimas semanas
 Sim, nos últimos três meses
 Não consumi nenhum probiótico recentemente
- Se sim, qual(is)?
-

9. Você está utilizando terapia antirretroviral atualmente?
- Sim
 Não
- Se sim, qual(is):
-

10. Você consumiu algum outro tipo de medicamento recentemente?
- Sim, nos últimos dias
 Sim, nas últimas semanas
 Sim, nos últimos três meses
 Não consumi nenhum medicamento recentemente
- Se sim, qual(is)?
-

11. Você teve alguma disfunção intestinal recentemente?
- Sim, nos últimos dias
 Sim, nas últimas semanas
 Sim, nos últimos três meses
 Não
- Se sim, qual?
-

12. Você possui algum problema intestinal crônico?

Sim

Não

Se sim, qual(is)?

13. Você possui alguma outra doença?

Sim

Não

Se sim, qual(is)?

14. Como é seu sono?

Sempre durmo menos do que considero necessário.

Na maioria das vezes durmo menos do que considero necessário.

Raramente durmo menos do que considero necessário

Durmo sempre o que considero necessário.

15. Você fuma?

Sim

Não

16. Fumou durante a gravidez?

Sim

Não

APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO SOBRE HÁBITOS DE VIDA E ALIMENTAÇÃO DAS CRIANÇAS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA**
Laboratório de Imunologia Aplicada
Departamento de Microbiologia,
Imunologia e Parasitologia
Centro de Ciências Biológicas
Florianópolis, SC, 88049-900, Brasil



Título do projeto: Caracterização da microbiota intestinal e avaliação da presença de marcadores de translocação microbiana em crianças filhas de mulheres infectadas pelo HIV

Data: __/__/__ Horário: _____ Local: _____
Entrevistador(a): _____

QUESTIONÁRIO 2 – DADOS DA CRIANÇA

Sexo: () M () F **Data de nascimento:** __/__/__

Idade: _____ **Peso:** _____kg **Altura:** _____cm

Idade gestacional no momento do parto: _____ semanas

Status da infecção pelo HIV: _____

TCD4+: _____ **TCD8+:** _____

Carga viral: _____

Etnia: () Euro descendente () Afro descendente () Asiático descendente () Indígena descendente () Não sei/Prefiro não responder

Cor da pele: () Negra () Mulata () Amarela () Branca () Não sei/Prefiro não responder

1. A criança tomou antibióticos recentemente?

- Sim, nos últimos dias
 Sim, nas últimas semanas
 Sim, nos últimos três meses
 Meu(minha) filho(a) não consumiu nenhum antibiótico recentemente

Se sim, qual(is)? _____

2. A criança está recebendo tratamento antirretroviral atualmente?

- Sim
 Não

Se sim, qual(is): _____

3. A criança consumiu algum outro tipo de medicamento recentemente?

- Sim, nos últimos dias
 Sim, nas últimas semanas
 Sim, nos últimos três meses
 Meu(minha) filho(a) não consumiu nenhum medicamento recentemente

Se sim, qual(is)? _____

4. A criança teve alguma disfunção intestinal recentemente?

- Sim, nos últimos dias
 Sim, nas últimas semanas
 Sim, nos últimos três meses
 Não

Se sim, qual?

5. A criança possui algum problema intestinal crônico?

- Sim
 Não

Se sim, qual(is)?

6. A criança possui alguma outra doença crônica?

- Sim
 Não

Se sim, qual(is)?

7. Com que frequência a criança fica doente?

- Constantemente, pelo menos uma vez por mês
 Constantemente, em média a cada seis meses
 Raramente, em média uma vez por ano
 Raramente, menos de uma vez por ano
 Meu(minha) filho(a) nunca fica doente

8. Quando foi a última vez que seu(sua) filho(a) apresentou alguma doença?

- Menos de 1 semana
 Menos de 1 mês
 Menos de 6 meses
 Mais de 6 meses
 Não lembro
 Meu(minha) filho(a) nunca fica doente

Por favor, na tabela a seguir, estime a frequência média com que seu(sua) filho(a) consome cada um dos alimentos listados na primeira coluna:

FREQUÊNCIA DE CONSUMO NO ÚLTIMO ANO:

ALIMENTO	Mais frequente ←-----→ Menos frequente						
	Todos os dias, pelo menos uma vez por dia	5 ou mais vezes por semana	2 a 4 vezes por semana	1 vez por semana	1 a 3 vezes por mês	Menos de uma vez por mês	Nunca
LEITE DE VACA							
LEITE FERMENTADO (YAKULT, CHAMITO, ETC)							
IOGURTE							
DERIVADOS DE LEITE (QUEIJOS, CREME DE LEITE, MANTEIGA, REQUEIJÃO, LEITE CONDENSADO, ETC)							
LEGUMES E VERDURAS							
FRUTAS							
SUCO NATURAL							
ARROZ							
FEIJÃO							
BATATA							
PÃO							

**CEREAIS
(SUCRILHOS,
GRANOLA, AVEIA,
ETC)**

**CARNE
VERMELHA
(GADO E/OU
PORCO)**

FRANGO

PEIXE

OVOS

**MASSAS
(MACARRÃO,
LASANHA, PIZZA,
ETC)**

**ALIMENTOS
FRITOS (FRITURA)**

**DOCES
(CHOCOLATE,
BOLOS, SORVETE,
BALAS, ETC)**

REFRIGERANTE

**REFRIGERANTE
ZERO, LIGHT OU
DIET**

CHÁ

Outros (opcional):

9. A criança consumiu algum probiótico recentemente?
- Sim, nos últimos dias
- Sim, nas últimas semanas
- Sim, nos últimos três meses
- Meu(minha) filho(a) não consumiu nenhum probiótico recentemente
- Se sim, qual(is)?
-

10. A criança utiliza formula infantil?
- Sim
- Não
- Se sim, qual marca?
-

E como é preparada?

11. Quantos copos de água a criança bebe por dia?
- Menos de 4 copos
- 4 a 5 copos
- 6 a 8 copos
- 8 copos ou mais

12. A criança passa alguma parte do tempo com outras pessoas? (Na creche, com familiares, etc.)
- Sim, diariamente
- Sim, somente nos fins de semana
- Raramente
- Não
- Se sim, com quem?
-

29. A criança tem contato com animais domésticos?
- Diariamente, possuímos animais domésticos em casa
- Raramente
- Não
- Se sim, qual(is)?
-

ANEXO A –Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu....., RG:.....de nacionalidade:....., RG:.....de profissão:....., pai (), ou mãe () ou responsável legal (), endereço.....,

neste ato representando que está sendo convidado a participar de um estudo denominado “Qualidade de Vida e Saúde em Crianças e Adolescentes com Doença Crônica ou Risco de Doença Crônica”, cujos objetivos e justificativas são avaliar sinais de alerta para doenças crônicas, prevenir, orientar e tratar quando necessário.

A participação no referido estudo será no sentido do participante ser submetido à coleta de sangue, à coleta de fezes, e avaliação do estado nutricional e composição corporal.

Sua participação nesse estudo será a partir da doação de um pequeno volume de plasma da criança (que será obtido do sangue já retirado durante exames de sangue de rotina e da doação de uma amostra de **suas** fezes e uma amostra de fezes de seu (sua) filho (a).

Também será solicitado a você que responda a dois questionários, um sobre seus hábitos de vida e alimentação e outro sobre a alimentação e saúde de seu (sua) filho (a).

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, é possível esperar alguns benefícios para o meu representado, tais como identificar precocemente problemas que possam evoluir e comprometer a saúde e a qualidade de vida do participante deste estudo e que possam ser adequadamente tratados.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização.

Assim, a coleta sanguínea, pode trazer algum leve desconforto ou dor, mas que serão diminuídos ao máximo devido à experiência dos coletadores ou examinadores e a coleta se dará dentro da rotina do que já é feita para seguimento do seu filho.

Estou ciente de que a sua privacidade será respeitada, ou seja, seu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, o (a) identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que pode haver recusa à participação no estudo, bem como pode ser retirado o consentimento a qualquer momento, sem

precisar haver justificativa, e de que, ao sair da pesquisa, não haverá qualquer prejuízo à assistência que vem recebendo.

É assegurada a assistência do meu representado durante toda a pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois de sua participação.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do estudo, autorizo a participação de.....

nesta pesquisa, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor financeiro a receber ou a pagar, pela participação.

No entanto, caso haja qualquer despesa decorrente de seu deslocamento para a participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma de pagamento de passagens de ônibus caso a consulta e os exames não sejam realizados na data previamente prevista para o controle de rotina no Ambulatório de Infectologia e no Ambulatório de Puericultura.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma via será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você.

Florianópolis,....de ... de 20.....

Nome e assinatura *

Nome, assinatura e RG do (a) pesquisador(a)

*Anexar documento que comprove parentesco/tutela/curatela

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:

Pesquisadores Responsáveis:

Maria Marlene de Souza Pires (48-84113444)

Sonia Maria de Faria (48-99802866)

Paola Marian Bridi (48- 96245671)

Aguinaldo Roberto Pinto ((48 - 3711 5206)

Aline Machiavelli (48 - 9822 7619)

ou 48-3251-9000 (HIJG) para ambos, em horário administrativo.

Endereço: Rua Rui Barbosa, 152 Agrônômica

Florianópolis – SC CEP: 88025-301

Qualquer situação que seja considerada inadequada ou não prevista neste termo pode ser relatada ao próprio comitê de ética em pesquisa do HIJG, pelo telefone 3251-9092.