

SIMONE DE BARROS TENORE

Efeitos imunológicos do uso de *Lactobacillus casei* Shirota em pessoas que vivem com o HIV em tratamento antirretroviral supressivo e com baixa recuperação de células T CD4+

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

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallas

SÃO PAULO
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Tenore, Simone de Barros
Efeitos imunológicos do uso de Lactobacillus
casei Shirota em pessoas que vivem com o HIV em
tratamento antirretroviral supressivo e com baixa
recuperação de células T CD4+ / Simone de Barros
Tenore. -- São Paulo, 2019.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Esper Georges Kallas.

Descritores: 1.HIV 2.Linfócito T CD4-positivo
3.Probióticos 4.Discordantes imunológicos
5.Lactobacillus 6.Lactobacillus casei Shirota

USP/FM/DBD-032/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Agradecimentos

Ao meu orientador Professor Dr. Esper Georges Kallas pela oportunidade, confiança e ensinamentos, que mesmo antes de eu ser sua orientanda, sempre acreditou no meu trabalho. Minha gratidão e admiração.

A Vivian Ida Avelino-Silva pela análise estatística mas especialmente por todo o apoio e atenção a mim dedicados. Sua paciência e tranquilidade foram fundamentais para o meu aprendizado.

A toda a equipe de pesquisa do estudo: Zelinda Nakagawa , Lilian Ferrari , Natália Cerqueira, Karine Milani, Denise Sales, Leandro Concolato Miranda, Charlene Rocha e Arlene Augusta dos Santos, pela grande ajuda e companheirismo durante o período de atendimento aos pacientes. Conduziram todos os processos com excelência e competência.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Clínica da FM USP por me acolherem com tanta atenção e pelo excelente trabalho realizado.

A Priscilla Ramos Costa, Lucas M. Franco, e Prof. Dra Ester Cerdeira Sabino pelas análises laboratoriais do estudo.

Ao Prof. Dr David Salomão Lewi pelos anos de aprendizado na disciplina de infectologia da Unifesp, pelo apoio à minha ida para fazer este doutorado na USP e principalmente por ser exemplo de profissional, caráter e competência.

Aos Professores e colegas da disciplina de Infectologia da Unifesp que fazem parte da minha jornada profissional.

Agradecimento especial aos pacientes do estudo, meu carinho e motivo de minha escolha profissional.

Agradecimentos Especiais

Ao meu marido Paulo Roberto Abrão Ferreira pelo constante estímulo à minha carreira e pelo apoio incondicional. Exemplo de pessoa, caráter, profissional, pai e amigo. A você todo o meu amor e admiração!

Aos meus filhos Lara, Júlia e Bruno, com vocês aprendi o verdadeiro sentido da palavra AMOR. Vocês são minha maior alegria ao acordar e ao me deitar todos os dias!

Às minhas irmãs Rosana e Monica, anjos colocados em minha vida para que ela fosse mais fácil, mais alegre e mais divertida. O apoio de vocês duas ao longo de toda a minha vida foram fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal.

À minha mãe Ignez (*in memorian*) pela vida, por todo o amor e por me ensinar a ser uma pessoa melhor. Saudades eternas!

Aos meus avós Luiz e Alcinira (*in memorian*) exemplos maiores de amor, humildade e dedicação à família!

Às minhas tias Ivette e Ivany que foram companheiras, incentivadoras e tanto nos ajudaram em todos estes anos.

A toda a minha família, por sempre acreditarem em mim, e pelo amor dedicado.

Normatização adotada

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	Imunidade inata e adaptativa na infecção pelo HIV.....	02
1.2	A infecção pelo HIV e o sistema gastrointestinal.....	08
1.3	Ativação imune e indivíduos não respondedores imunológicos.....	12
1.4	Microbioma e infecção pelo HIV	16
1.5	Uso de probióticos em pacientes vivendo com o HIV.....	20
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo geral.....	23
2.2	Objetivos específicos.....	23
3	MÉTODOS.....	24
3.1	Procedimentos do estudo.....	27
3.1.1	Randomização.....	27
3.1.2	Triagem e Inclusão.....	27
3.1.3	Avaliação de eficácia.....	29
3.1.4	Calendário da avaliação de eficácia.....	30
3.1.5	Avaliação de segurança.....	32
3.1.6	Vigilância e relato de eventos adversos.....	35
3.1.7	Período de avaliação de segurança.....	36
3.1.8	Questionário de Doença Inflamatória do Intestino (IBDQ).....	36
3.1.9	Critérios para a retirada do produto do estudo de um participante.....	36
3.1.10	Critério para descontinuação de um participante do estudo.....	37
3.1.11	Critério para suspensão ou término do estudo.....	37
3.1.12	Visita de seguimento 12 semanas após a retirada do produto do estudo.....	38
3.2	Fluxograma do Estudo.....	39
3.3	Produto do estudo.....	40
3.4	Considerações Éticas.....	41
3.4.1	Descrição de potenciais riscos físicos, sociais, psicológicos e métodos para minimizá-los.....	41
3.4.2	Consentimento informado e aspectos regulatórios.....	42
3.5	Financiamento.....	42
3.6	Estatística e manejo de dados.....	42
3.6.1	Plano de análise de dados, incluindo metodologia estatística,	

	tabelas planejadas e figuras.....	42
4.	RESULTADOS	44
5.	DISCUSSÃO	73
6.	CONCLUSÃO	81
7.	ANEXOS	83
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

Listas

Tabela 1	Guia para avaliação de severidade dos eventos adversos selecionados.....	25
Tabela 2	Fluxograma do estudo.....	40
Tabela 3	Características demográficas e clínicas basais de acordo com grupo de randomização.....	41
Tabela 4	Eventos adversos após randomização de acordo com o grupo de randomização.....	49
Tabela 5	Questionário de Doença Inflamatória Intestinal (IBDQ).....	51
Tabela 6	Efeito da intervenção do estudo nos níveis de LTCD4+ e relação CD4/CD8.....	53
Tabela 7	Efeito da intervenção do estudo na ativação celular em células T CD4 + e compartimentos de memória.....	57
Tabela 8	Efeito da intervenção do estudo na ativação celular em células T CD8 + e compartimentos de memória.....	60
Tabela 9	Níveis plasmáticos de CD14 solúvel (sCD14) em ambos os grupos.....	62
Tabela 10	Efeito da intervenção do estudo na diferenciação dos subconjuntos e na atividade das células NK.....	63
Tabela 11	Bactérias incluídas na análise para análise exploratória do efeito da intervenção no microbioma intestinal.....	72

Figura 1	Imunidade inata e adaptativa.....	03
Figura 2	Tipos de resposta immune adaptativa.....	06
Figura 3	Dano do HIV ao TGI.....	11
Figura 4	Ativação crônica do sistema imunológico.....	16
Figura 5	Triagem, inclusões e exclusões do estudo.....	45
Figura 6	Box plots comparando os grupos ativo e placebo quanto às contagens de LT-CD4 + (A) e relação CD4 / CD8 (B).....	55
Figura 7	Efeito da intervenção na contagem de LT CD4+ após o basal (V6, V12, V24) (3A) e relação CD4 / CD8 (V6, V12, V24) (3B).....	56
Figura 8	Composição do microbioma em nível de Filos, entre os grupos composto ativo e placebo.....	69
Figura 9	Alfa-diversidade nos grupos composto ativo e placebo no basal e V12.....	70

Resumo

Tenore SB. Efeitos imunológicos do uso de *Lactobacillus casei* Shirota em pessoas que vivem com o HIV em tratamento antirretroviral supressivo e com baixa recuperação de células T CD4+ [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: O tecido linfoide gastrointestinal é o principal reservatório de células T humanas e a depleção de células T CD4 + intestinais após a infecção pelo HIV leva a uma persistente disfunção da barreira mucosa, aumento da permeabilidade intestinal e translocação microbiana mesmo entre pacientes infectados pelo HIV em tratamento antirretroviral supressivo. Alguns estudos sugerem que os probióticos podem ajudar a restaurar a função intestinal.

Métodos: Estudo randomizado duplo-cego, controlado por placebo, em pacientes adultos vivendo com HIV em terapia supressora e com baixa recuperação de LTCD4 +, para abordar o efeito do uso diário de 12 semanas de *Lactobacillus casei* Shirota oral na contagem de células T CD4 +, relação CD4 / CD8, ativação imune e avaliação do microbioma em 6 e 12 semanas de uso do composto ativo, e 12 semanas após a interrupção. **Resultados:** De jan / 2015 a jul / 2016, 48 pacientes foram randomizados para intervenção ativa (n = 24) ou placebo (n = 24). Os grupos tinham características demográficas e clínicas comparáveis; apenas o nadir de células T CD4 + foi estatisticamente diferente entre os grupos. Usando modelos mistos não ajustados, a intervenção foi associada com aumento médio de 58,8 células / mL em células TCD4 + nas visitas 6, 12 e 24 (IC 95% -11 a 129, p = 0,099) e aumento de 0,18 na relação CD4 / CD8 (IC 95% 0,03 a 0,33, p = 0,020). No entanto, essa diferença foi perdida após o ajuste para o nadir de células T CD4 +. Na visita 12, não foram encontradas diferenças significativas nos marcadores de ativação imune nas subpopulações CD4 + e CD8 +, níveis de sCD14 ou células NK entre os grupos. A avaliação do microbioma demonstrou um aumento estatisticamente significativo na família *Bacteroidaceae* na semana 12 (média 12,52% IC95% 5,89-19,06) em comparação com o valor basal (média 6,99%, IC 1,84-12,13; p=0,0422) restrito ao grupo que recebeu o composto ativo. **Conclusão:** Não encontramos nenhum efeito estatisticamente significativo do uso de *Lactobacillus casei* Shirota na contagem de células

TCD4 + ou ativação imune entre pacientes vivendo com o HIV em terapia supressiva com baixa recuperação de LT CD4 +.

Descritores: HIV; linfócito T CD4-positivo; probióticos; discordantes imunológicos; Lactobacillus; *Lactobacillus casei* Shirota.

Abstract

Tenore SP. Immunological effects of oral *Lactobacillus casei* Shirota among HIV-infected patients on suppressive antiretroviral treatment with poor CD4+ T cell recovery [tesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019

Background: Gastrointestinal lymphoid tissue is the main human T-cell reservoir and depletion of intestinal CD4⁺ T cells following HIV infection leads to persisting mucosal barrier dysfunction, increased gut permeability and microbial translocation even among HIV-infected patients on suppressive antiretroviral treatment. Some suggest probiotics may help restore intestinal function.

Methods: In this double-blind, placebo-controlled trial, we enrolled adult HIV-infected patients on suppressive ART with poor CD4⁺ recovery to address the effect of a 12-week daily use of oral *Lactobacillus casei* Shirota on CD4+ T cell count, CD4/CD8 ratio, immune activation and microbiome analysis at 6 and 12 weeks on study product, and 12 weeks after interruption.

Results: From Jan/2015 to Jul/2016, 48 patients were randomized to active intervention (n=24) or placebo (n=24). Groups had comparable demographic and clinical characteristics; only CD4⁺ T cell nadir was statistically different between groups. All participants were virologically-suppressed under antiretroviral treatment. Using unadjusted mixed models, the intervention was associated with mean increase of 58.8 cells/mL in post-baseline CD4+ cells at visits 6, 12 and 24 (95%CI -11 to 129, p=0.099) and 0.18 increase in CD4/CD8 ratio (95%CI 0.03 to 0.33, p=0.020). However, this difference was lost following adjustment for CD4⁺ T cell nadir. At visit 12, no significant differences in immune activation markers on CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations, sCD14 levels or NK cells were found between groups. Microbiome analysis showed a statistically significant increase in the *Bacteroidaceae* family at week 12 (mean 12.52% CI 95% 5.89-19.06) compared to baseline (mean 6.99%, CI 1.84-12 , 13; p = 0.0422) restricted to the group that received the active compound

Conclusions: We found no statistically significant effect of *Lactobacillus casei* Shirota probiotic on CD4⁺ T cell counts or immune activation among HIV-infected patients on suppressive ART with poor CD4⁺ recovery.

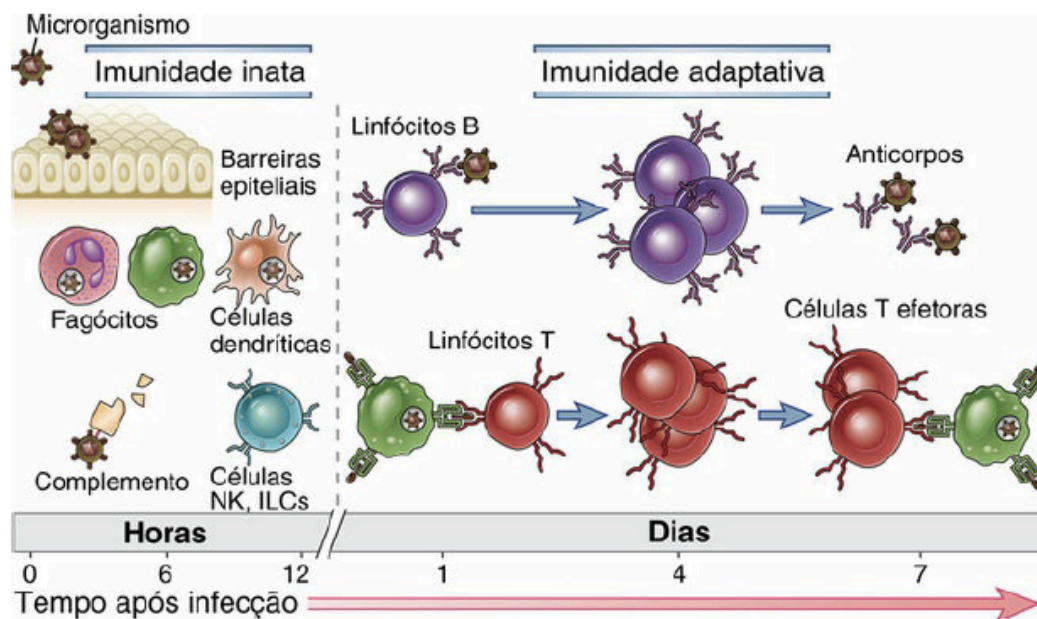
Descriptors: HIV; CD4-positive T Lymphocytes, probiotics; immune discordant; *Lactobacillus*; *Lactobacillus casei* Shirota.

1. Introdução

Na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), características da resposta imune influenciam a evolução da doença e a persistência de anormalidades mesmo após a introdução de terapia antirretroviral com supressão viral. Com efeito, em detrimento de importantes avanços no tratamento, pessoas que vivem com o vírus apresentam ainda maior morbidade e mortalidade quando comparadas a pessoas soronegativas.

1.1 Imunidade inata e adaptativa na infecção pelo HIV

O sistema imunológico inato representa a primeira linha de defesa contra organismos infecciosos, reagindo muito rapidamente à presença de patógenos. Por constituir a primeira reação imunológica à entrada de microrganismos, é o mais importante na prevenção da infecção pelo HIV (LEVY, 2010). A resposta imune inata fornece tempo, se necessário, para o subsequente desenvolvimento de respostas imunes adaptativas. Células dendríticas, macrófagos e algumas células T desempenham importante papel em ambos os sistemas imunitários e contribuem tanto para a resposta rápida (inata) como para a resposta adaptativa (figura 1).



ILC: célula linfoide inata. NK: célula *natural killer*

FONTE (ABUL K ABBAS; ANDREW H LICHTMAN; SHIV PILLAI, 2015), capítulo 1

Figura 1- Imunidade inata e adaptativa

Os componentes do sistema imune inato são divididos em componentes celulares (células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células *natural killer* (NK), células T gama delta ($\gamma\delta$), células produtoras de interferon, linfócitos T (LT) CD8+ com atividade antiviral não citotóxica e células B1, e componentes solúveis (citocinas, quimiocinas e complemento), todos com capacidade de resposta rápida contra patógenos.

Pertencem ao sistema imune adaptativo as células dendríticas, macrófagos, LT CD4+, LT CD8+ (com atividade citotóxica) e linfócitos B (SERRANO-VILLAR et al., 2018)(LEVY; SCOTT; MACKEWICZ, 2003).

Uma das principais funções do sistema imunológico inato é a sinalização intracelular ativada por receptores de reconhecimento de padrão de superfície presentes em uma variedade de células, sendo a maioria destas células

apresentadoras de antígenos (por exemplo, células dendríticas e macrófagos). Após interações com ligantes específicos, esses receptores (em inglês *toll-like receptors* -TLR) iniciam uma cascata de processos intracelulares que levam à ativação do NF- κ B, (em inglês *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), e estímulo à produção de citocinas (LEVY; SCOTT; MACKEWICZ, 2003). Essas citocinas induzem tanto resposta celular inata quanto adaptativa à infecção pelo HIV.

Componentes solúveis do sistema inato ligam-se ao HIV e estimulam a fagocitose viral por macrófagos ou lisam o vírus diretamente. Também provocam inativação viral por opsonização.

Quimiocinas recrutam células NK, LT e macrófagos para o sítio da infecção pelo HIV e aumentam a função citotóxica destas células. A produção de quimiocinas e, particularmente, a presença ou ausência de seus receptores podem influenciar a habilidade do HIV de infectar as células (LEVY, 2001).

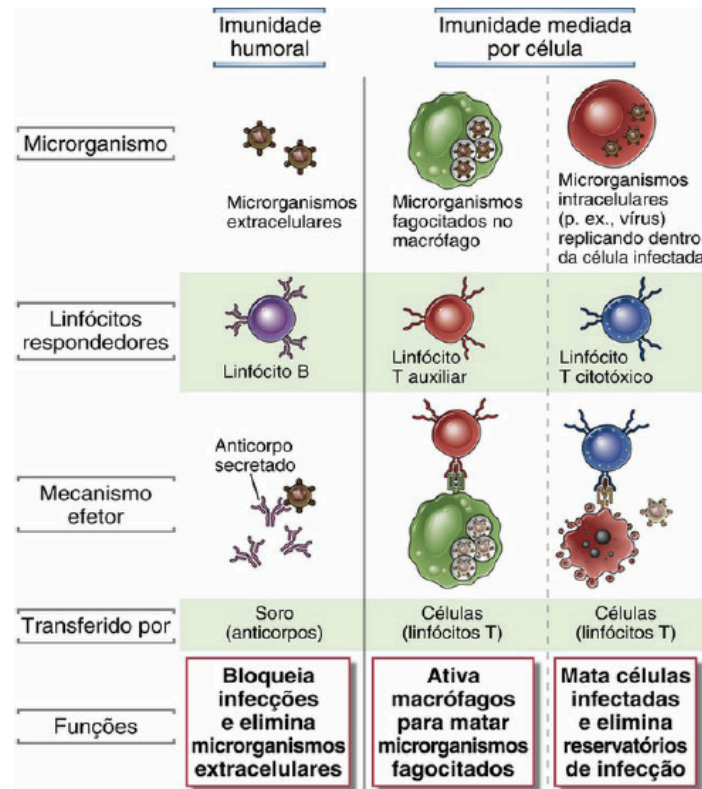
Componentes celulares do sistema inato possuem atividade fagocítica (neutrófilos e macrófagos) e liberam proteínas e citocinas inflamatórias que ajudam a controlar a infecção. As células dendríticas respondem a patógenos mediante produção de interferons tipo I, que interferem na replicação viral, aumentam a atividade antiviral das células NK, induzem respostas adaptativas das células T e B, aumentam a atividade das próprias células dendríticas como células apresentadoras de antígenos e aumentam a produção de interferon gama pelos L T CD4+. Entretanto, macrófagos, além de serem alvos da infecção pelo HIV, também tornam-se disfuncionais durante a infecção, com menor capacidade fagocítica de produtos bacterianos (LEVY, 2001).

Células NK têm a função de eliminar células infectadas por vírus e

células tumorais, produzir citocinas que colaboram para a atividade citotóxica das células T CD8+, e estimular a ativação de outras células efetoras do sistema imune. A infecção pelo HIV leva a uma diminuição em número e função das células NK, com menor produção de citocinas e aumento da citotoxicidade (KLATT; FUNDERBURG; BRENCHLEY, 2013; LEVY, 2010).

O complemento também desempenha importante papel na resposta antiviral. Sua ação ocorre pela lise de virions mediada por anticorpos ou destruição do vírus em células infectadas, por meio de ligação e ativação da via clássica ou alternativa. O complemento pode interagir com seus receptores nas células NK, causando lise direta das células infectadas e não infectadas. Essa proteína também pode aumentar o efeito antiviral dos anticorpos neutralizantes.

O sistema imune adaptativo utiliza duas principais estratégias para eliminação de patógenos: produção de anticorpos (imunidade humoral) e morte celular por linfócitos T citotóxicos (imunidade celular). (Figura 2)



FONTE (ABUL K ABBAS; ANDREW H LICHTMAN; SHIV PILLAI, 2015), capítulo 1

Figura 2- Tipos de resposta immune adaptativa

Na infecção pelo HIV os anticorpos surgem uma a duas semanas após a infecção aguda. A produção de anticorpos neutralizantes contra gp 120 e gp 41 faz parte do processo.

As células revestidas por complexos antígeno-anticorpo são reconhecidas pelas células NK, monócitos ou macrófagos e são destruídas através de um mecanismo citolítico (LEVY, 2010).

A infecção pelo HIV causa uma resposta defectiva das células B, incluindo sua hiperativação e desregulação, levando a alteração na produção de anticorpos.

Os LT citotóxicos são capazes de reconhecer e eliminar células infectadas por virus. Estas células são cruciais para o controle da replicação do

HIV, além de ter uma influência substancial na progressão da doença quando a infecção é estabelecida.

Os LT CD4+ e CD8+ podem ser agrupadas em subconjuntos, definidos por seu fenótipo, com base nas moléculas da superfície celular, nos índices de rotatividade, no repertório e produção de citocinas em resposta a antígenos. Os subconjuntos dividem-se em células T virgens, células T de memória central (latentes), células T de memória efetoras e células T efetoras terminais. As células de memória latentes passam a células de memória ativadas e em seguida, células efetoras. Quando ativadas, expressam CD38 e se tornam células efetoras, apresentando atividade citotóxica (LEVY, 2010)

Células T de memória central interagem com células dendríticas na circulação e no tecido linfóide e produzem interleucina-2 (IL-2). Células T de memória efetora interagem com monócitos, células NK, células B, mastócitos e eosinófilos, produzindo IL-2 e interferon gama (IF- γ) importantes na imunidade celular, e interleucinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13), que estimulam a produção de anticorpos. (APPAY; ROWLAND-JONES, 2004; SALLUSTO; GEGINAT; LANZAVECCHIA, 2004)

A infecção pelo HIV induz a uma importante diminuição do número de LT CD4+, menor proliferação em resposta a antígenos de memória, menor reação antígeno-específica, menor produção de IL-2 e outras citocinas, além de distúrbio no número e função de células de memória.

Grande destruição de LT CD4+ ocorre no intestino, onde se encontra a maior parte do tecido linfóide do organismo (*gut-associated lymphoid tissue-GALT*) (BRENCHLEY; DOUEK, 2008). A repercussão destas alterações será tratada nas sessões seguintes.

1.2 A infecção pelo HIV e o sistema gastrointestinal

O GALT é o principal reservatório de LT no corpo humano. Certas características do compartimento da mucosa o tornam extremamente permissivo à infecção pelo HIV-1, favorecendo a sua replicação. Em comparação com os linfócitos circulantes, uma maior percentagem dos LTCD4+ presentes no GALT expressam o coreceptor de quimiocina CCR5. Além disso, devido à sua proximidade com o ambiente externo e exposição constante a uma variedade de antígenos alimentares e microbianos, um número elevado de LT CD4 + da mucosa do trato gastrointestinal (TGI) é ativado, mantendo esta mucosa em um estado de inflamação fisiológica, caracterizada por altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-10 e IFN- γ), (MEHANDRU et al., 2004). Ao nível sistêmico, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias podem também diminuir a capacidade do sistema imunológico em manter níveis saudáveis de linfócitos que normalmente produzem citocinas efetoras homeostáticas, como IL-17 e IL-22. Essa redução de IL-17 e IL-22 possivelmente contribui para a ativação imunológica, em particular nos tecidos mucosos, uma vez que IL-17 e IL-22 são fundamentais para manter a integridade da barreira epitelial (KLATT; FUNDERBURG; BRENCHLEY, 2013). Por sua vez, o grau de inflamação no TGI correlaciona-se com maior infecção e replicação viral, já que o HIV prefere infectar LT CD4+ ativados, presentes em maiores níveis como consequência do aumento da inflamação local, proporcionando novos alvos para a infecção pelo HIV e aumentando sua replicação.

Estudos com imuno-histoquímica em indivíduos cronicamente

infectados pelo HIV evidenciaram que há depleção de LT CD4+ tanto no intestino delgado quanto intestino grosso (KOTLER; REKA; CLAYTON, 1993; ULLRICH; ZEITZ; RIECKEN, 1992). A infecção pelo HIV provoca uma diminuição significativa das células T CD4+, e a uma quebra no equilíbrio entre a flora intestinal e o sistema imunológico. Histologicamente, há um infiltrado inflamatório e dano à barreira epitelial, incluindo atrofia de vilosidades, hiperplasia das criptas, apoptose de enterócitos, redução de defensas luminiais, translocação bacteriana e aumento da permeabilidade mucosa (BRENCHLEY; DOUEK, 2008)

Como consequência, a translocação microbiana pode ocorrer, perpetuando uma ativação imune crônica e um recrutamento persistente das células T CD4+ (MARCHETTI et al., 2011; MASSANELLA et al., 2010).

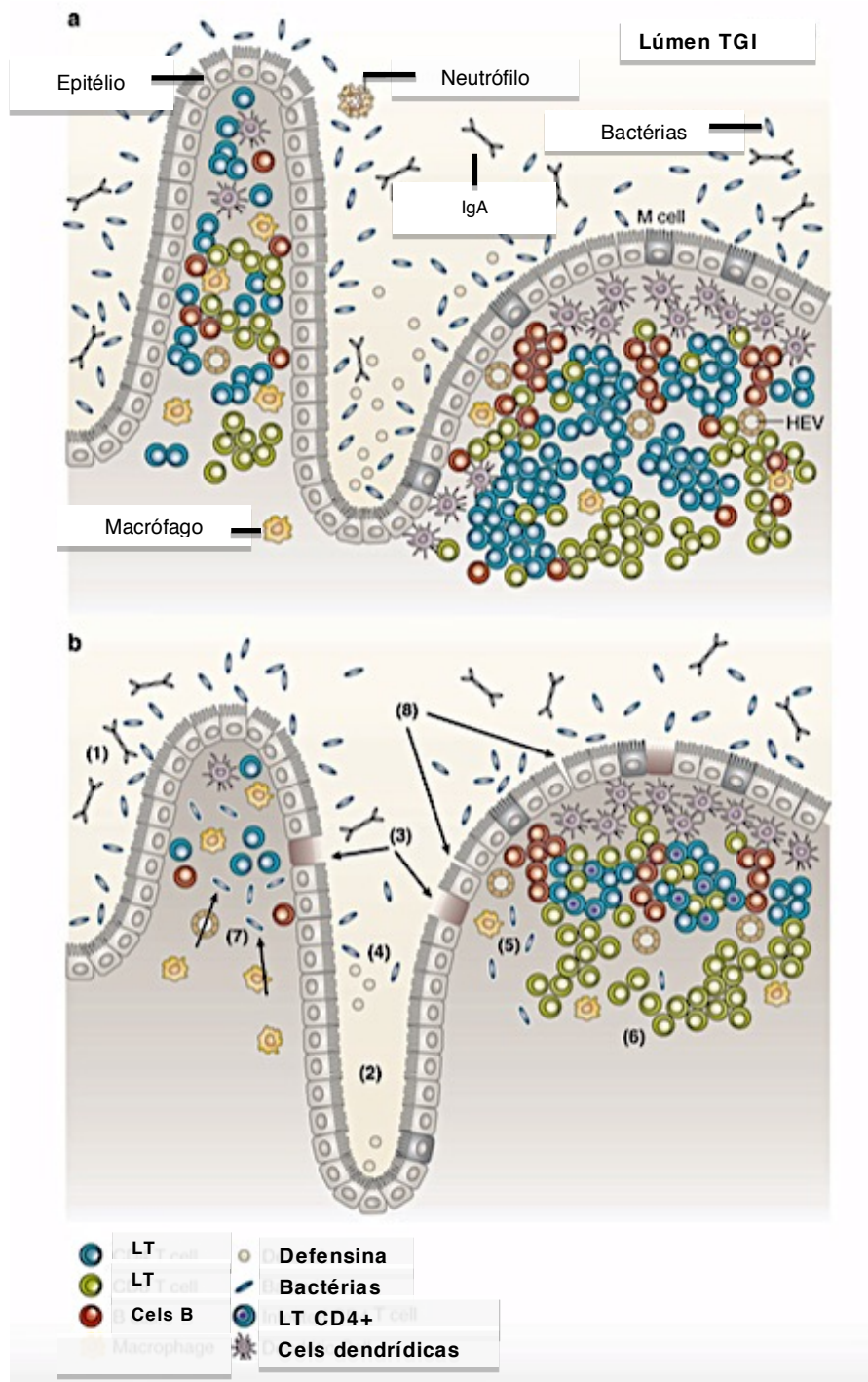
Estudos demonstraram uma associação inversa entre os marcadores da translocação microbiana, ou seja, os níveis de lipopolissacarídeo (LPS) plasmático e de CD14 solúvel, e prognóstico e recuperação numérica das células T CD4+ em pacientes vivendo com o HIV (MARCHETTI et al., 2011).

A translocação microbiana foi considerada um dos principais fatores de morbidade e mortalidade na infecção pelo HIV, provavelmente devido a inflamação persistente (ZEVIN et al., 2016). É importante ressaltar que associações entre translocação bacteriana e progressão da doença são independentes do tratamento antirretroviral altamente eficaz (TARV) e supressão da carga viral (CV).

Os LPS são produtos comumente identificados na translocação bacteriana, originados da superfície de bactérias Gram-negativas. Vários estudos demonstraram correlações diretas entre os níveis plasmáticos de LPS

em indivíduos vivendo com o HIV e viremia residual, ativação celular (incluindo CD38+ HLA-DR e LT CD8+), ativação de monócitos, citocinas pró-inflamatórias (interferon alfa (IFN- α), IL-6) e factor de necrose tumoral alfa (TNF- α) (ANCUTA et al., 2008; BRENCHLEY et al., 2006; KLATT; FUNDERBURG; BRENCHLEY, 2013).

Outra anormalidade imunológica observada durante a infecção pelo HIV é a redução nos níveis de imunoglobulina A (IgA) de mucosa. IgA são essenciais para a proteção contra a translocação microbiana, pois ligam-se diretamente às bactérias e evitam que estas se liguem ao epitélio, neutralizam a bioatividade dos produtos bacterianos, e transportam bactérias da lâmina própria de volta ao lúmen intestinal (MACPHERSON; GEUKING; MCCOY, 2012). A figura 3 ilustra as alterações encontradas no TGI de pessoas que vivem com HIV.



(a) TGI saudável com vilosidades, criptas, macrófagos, células dendríticas, manutenção da barreira epitelial, células T, células B e peptídeos de defensina luminal. (b) TGI cronicamente infectado pelo HIV com (1) vilosidades embotadas, (2) hiperplasia da cripta, (3) dano à barreira epitelial com apoptose de enterócitos, (4) diminuição da defensina luminal, (5) depleção massiva de células T CD4+, (6) grande número de células T CD4 infectadas com liberação de vírions, (7) translocação microbiana, e (8) permeabilidade aumentada. (adaptado de (BRENCHLEY; DOUEK, 2008)

Figura 3- Dano do HIV ao TGI

O dano epitelial, disfunção e ativação imune, translocação microbiana e replicação contínua do HIV levam a progressão da doença, com redução dos níveis de LT CD4+ e conseqüente desenvolvimento de infecções oportunistas, além de persistência de estado inflamatório por ativação imune, e maior risco de desenvolvimento de comorbidades não associadas a aids, como eventos cardiovasculares, doenças renal e hepática e doença neurológica.

1.3 Ativação imune e indivíduos não respondedores imunológicos

A introdução do TARV levou a uma redução na morbidade e mortalidade em pessoas vivendo com HIV/aids (PALELLA et al., 1998). Contudo, a despeito da supressão viral a recuperação imunológica é altamente variável, até 30% dos pacientes não atingem níveis de LT CD4+ superiores a 500 cels/mm³ a despeito de anos de supressão viral (KAUFMANN et al., 2005). Indivíduos que falham em atingir recuperação de níveis de LT CD4+ a despeito do tratamento antiviral eficaz são denominados não respondedores imunológicos.

Não há um consenso na definição de não respondedor imunológico. Alguns autores descrevem a condição como manutenção de LT CD4+ abaixo de um limiar entre 350-500 cels/mm³, após 4-7 anos de tratamento antirretroviral supressivo (BAKER et al., 2008; REEKIE et al., 2010). Outros autores consideram um período de tempo de tratamento menor, usualmente 6 a 12 meses, definindo como não respondedores imunológicos aqueles pacientes com aumento inferior a 30% de LT CD4+, ou níveis abaixo de 200 céls/mm³ (GAZZOLA et al., 2009).

Em alguns estudos foi demonstrado que os níveis de LT CD4+ atingem um *plateau* após dois a três anos de TARV (TARWATER et al., 2001; VALDEZ et al., 2002), enquanto em outra investigação foi observado um incremento modesto mesmo após três a quatro anos de terapia supressiva (HUNT et al., 2003b).

Os motivos de baixa recuperação imunológica não são ainda muito bem entendidos, e numerosos fatores foram associados a esta condição, tais como: idade mais avançada (AVELINO-SILVA et al., 2011; VIARD et al., 2001), alta carga viral pré-tratamento (KAUFMANN et al., 2005; MOORE; KERULY, 2007), níveis basais baixos de LT CD4+ (FALSTER et al., 2009; MOORE; KERULY, 2007; SMITH et al., 2004), disfunção da medula óssea e do timo (TEIXEIRA et al., 2001), ativação imune persistente, aumento nos níveis de lipopolisacáridos circulantes (BRENCHLEY et al., 2006; HUNT et al., 2003a; JIANG et al., 2009) e coinfeções virais (GREUB et al., 2000).

A patogênese da não resposta imunológica pode estar relacionada ao déficit na produção (medula óssea, timo) e/ou destruição excessiva de LT CD4+. Alguns estudos demonstraram que, mesmo após o início da TARV efetiva, a recuperação medular pode ser deficiente, pois as células estromais infectadas pelo HIV não conseguem fornecer a quantidade ideal de citocinas, proteínas de matriz extracelular e moléculas de adesão necessárias para o crescimento de colônias hematopoiéticas. Além disso, células da medula óssea infectadas secretam grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , que inibe a hematopoiese pela indução de apoptose (AIUTI; MEZZAROMA, 2006; ISGRÒ et al., 2008). Timopoiese também está reduzida e pode estar associada a menor resposta ao estímulo da interleucina-7 (IL-7).

Apesar de haver recuperação nos níveis de IL-7 após o tratamento antirretroviral, parece ocorrer redução na expressão do receptor de IL-7 em subpopulações de LT, limitando o efeito compensatório de seus níveis mais elevados após o controle da viremia (RAJASURIAR et al., 2010).

A destruição excessiva de LT CD4+ parece estar associada a três fatores: hiperativação dos LT CD4+, replicação viral residual (que por si representa um gatilho para ativação imune) e estímulo antigênico persistente (GAZZOLA et al., 2009).

A ativação imune é considerada fator determinante na inibição da recuperação de LT CD4+. Níveis elevados de CD38, um marcador de ativação de células T, foi observado nos primeiros relatos de pacientes com imunodeficiência e pneumocistose, mesmo antes da descoberta do HIV (GOTTLIEB et al., 1981). O CD38 é uma ectoenzima multifuncional envolvida na regulação de cálcio intracelular, e sua diminuição estaria relacionada a respostas inflamatórias deficientes e distúrbios metabólicos. O aumento de sua expressão na superfície celular é descrito como um marcador de ativação celular, não apenas relacionado ao HIV, mas também neoplasias de células B, tumores sólidos e diabetes mellitus tipo 2 (CHOU et al., 2013). A ativação crônica não específica inclui uma hiper-regulação de marcadores de ativação, como o CD38 e o HLA-DR, em linfócitos T CD8⁺, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias e as alterações histológicas nos nódulos linfóides. Essa ativação persistente irá prejudicar de forma progressiva a organização funcional do sistema imune, reduzindo sua capacidade regenerativa e favorecendo a evolução viral (BARTOVSKÁ et al., 2011). O aumento da expressão das moléculas CD38 e HLA-DR em linfócitos T CD4+ e T CD8+ foi

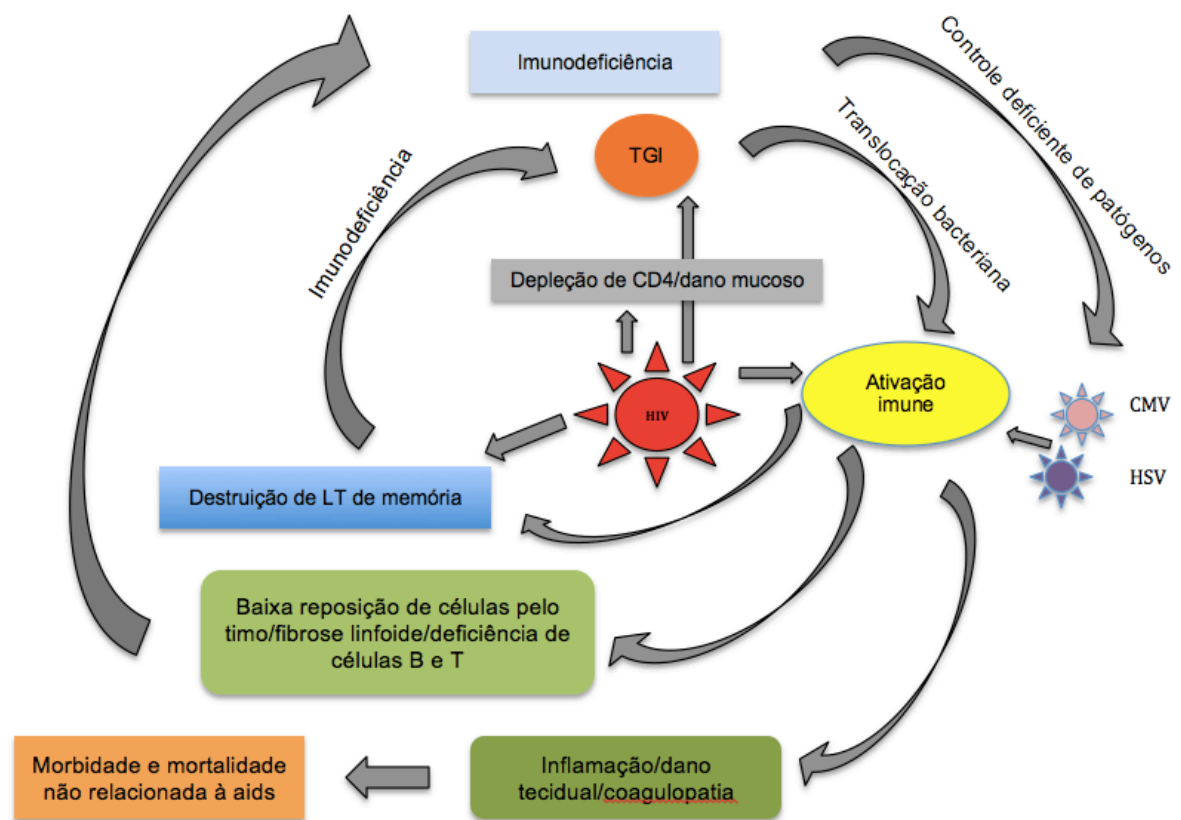
associado a maior risco de progresso para aids (BARTOVSKÁ et al., 2011; KARIM et al., 2013).

O sistema imunológico do paciente vivendo com o HIV tem que lidar com apoptose massiva de células T, que parece estar associada a estímulo inflamatório contínuo de citocinas pró-inflamatórias e antígenos virais. Brenchley e colaboradores (BRENCHLEY et al., 2006) demonstraram que altos níveis plasmáticos de LPS em indivíduos com infecção pelo HIV-1 correlacionam-se com hiperativação imune. A translocação bacteriana perpetua a ativação dos LT CD4+ e dificulta a sua recuperação.

A depleção de LT CD4+ no tecido linfóide intestinal leva a ruptura da barreira mucosa, aumentando assim a translocação de produtos microbianos, com persistência de estímulo antigênico (BRENCHLEY; DOUEK, 2008; JIANG et al., 2009).

Viremia residual ainda é alvo de controvérsias na literatura como determinante de ativação imune e falha na recuperação de LT CD4+. Embora um estudo tenha sugerido uma correlação positiva (MAVIGNER et al., 2009), estudos de intensificação de tratamento não encontraram associação (CHUN et al., 2011; GANDHI et al., 2010; HATANO et al., 2011). Estas observações sugerem que é improvável que a viremia residual seja um fator determinante na ativação de células T e recuperação imunológica.

A figura 4 resume os fatores relacionados a ativação imunológica e baixa recuperação de LT CD4+



Ativação celular resultando em dano direto aos tecidos linfóides, que por sua vez contribui para a falha na regeneração das células T e disfunção do sistema imune inato e adaptativo. A imunodeficiência resultante acarreta baixo controle de patógenos como resultado, ainda mais ativação imune. CMV: citomegalovírus; HSV: herpes vírus; LT: linfócito T
Adaptado de(KLATT et al., 2013)

Figura 4- Ativação crônica do sistema imunológico

1.4 Microbioma e infecção pelo HIV

Os microrganismos presentes no lúmen e mucosa gastrointestinal não são apenas bactérias, mas também incluem Archaea, fungos, outros eucariotas tais como helmintos e vírus, muitos dos quais são bacteriófagos. Quatro filos bacterianos principais compõem a microbiota humana: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacterias e Proteobacterias. Fatores sócio-econômicos, idade, dieta, região geográfica, prática de exercícios e atividade sexual anal

podem levar a relativa abundância de um filo em detrimento a outro (RIBEIRO; HEIMESAAT; BERESWILL, 2017; YU et al., 2014). Tornou-se extremamente claro que os microrganismos gastrointestinais residentes e seus metabólitos são necessários para adequado funcionamento do sistema imunológico (THAISS et al., 2014). Perturbações destas comunidades microbianas podem ter repercussões sobre a saúde do indivíduo. Estudos recentes demonstraram que alteração na composição e na função do microbioma gastrointestinal estão associados a muitas doenças, incluindo a infecção pelo HIV (LOZUPONE et al., 2013, 2014).

Disbiose é o termo utilizado para descrever a alteração no microbioma, que pode estar associada a vários processos patológicos, como já descrito na doença inflamatória intestinal, obesidade, diabetes mellitus tipo I, doenças reumatológicas e aterosclerose. Numerosos estudos sugerem que a infecção pelo HIV está associada a mudanças na microbiota intestinal levando a disbiose. Por outro lado, esta disbiose desempenha um importante papel na alteração da homeostase intestinal, contribuindo ainda mais para a ativação imune associada ao HIV (DILLON; FRANK; WILSON, 2016). Alterações induzidas pelo HIV na microbiota intestinal são mais comumente caracterizadas por redução na diversidade (alfa diversidade), com diminuição de bactérias do gênero *Bacteroides* e aumento de bactérias do gênero *Prevotella*. Estes dois gêneros são conhecidos como importantes condutores da ecologia e da função intestinal. Assim, alterações na quantidade dessas bactérias podem ter consequências para o microbioma intestinal e para o hospedeiro (ZEVIN et al., 2016). Estudos também demonstraram um aumento das Proteobacterias em indivíduos vivendo com o HIV, dentre elas *Shigella*, *Salmonella*, *Helicobacter*,

Pseudomonas. Estes agentes estão associados a vários processos patogênicos, como redução da produção de muco, recrutamento de neutrófilos com dano tissular inflamatório e produção de toxinas (GOOTENBERG et al., 2017).

A família *Bacteroidaceae* (mais representada pelo gênero *Bacteroides*) é considerada por desempenhar papel anti-inflamatório, com a espécie *Bacteroides fragilis* responsável pela regulação da diferenciação de células T e produção de IL-10 (GOOTENBERG et al., 2017).

Em primatas agudamente infectados pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV), a disbiose inicial causa um menor reconhecimento de receptores de expressão celular, aumento da expressão da via da indoleamina 2,3 diidroxigenase (IDO), resultando em aumento da relação kynureína/tryptofano (K/T), com perda de linfócitos Th 17 no intestino, importantes para preservação da imunidade mucosa (WILLIAMS; LANDAY; PRESTI, 2016). A alteração na imunidade mucosa resulta em diminuição da função da barreira epitelial, aumento da permeabilidade intestinal e translocação de produtos bacterianos para a circulação sanguínea. Esses produtos podem desencadear um estado persistente de ativação imune, levando a exaustão clonal e diminuição progressiva de células T, que, em última instância, pode levar à progressão da doença (GOOTENBERG et al., 2017).

Outros gêneros bacterianos que estão reduzidos na infecção pelo HIV são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Coprococcus*, *Eubacterium*, *Blautia* e *Ruminococcus*.

Lactobacillus spp. e *Bifidobacterium* spp. são geralmente consideradas benéficas, especialmente no contexto da imunidade mucosa (DILLON; FRANK;

WILSON, 2016; VÁZQUEZ-CASTELLANOS et al., 2015). Um estudo em pacientes com infecção recente pelo HIV demonstrou que maiores proporções de *Lactobacillales* no intestino distal foram associadas a menores níveis de marcadores de translocação microbiana, maior porcentagem de LTCD4+ e menores valores de carga viral antes do início do TARV. Da mesma forma, durante o TARV, maiores proporções de *Lactobacillales* foram associadas a maior percentual de LTCD4+, menor translocação bacteriana, menor ativação imune sistêmica, menor proliferação de LT no intestino e maior porcentagem de LTCD4+ no intestino (PÉREZ-SANTIAGO et al., 2013).

O uso de probióticos, prebióticos e simbióticos pode ajudar a modular a composição do microbioma intestinal. Enquanto probióticos são constituídos de microorganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do indivíduo

(FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006), prebióticos são ingredientes nutricionais não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro estimulando seletivamente o crescimento e atividade de uma ou mais bactérias benéficas do cólon (GIBSON; ROBERFROID, 1995); simbióticos, por sua vez, são constituídos da associação entre um probiótico e um prebiótico. Estudos já realizados demonstraram resultados conflitantes em relação a potencial benefício na redução de inflamação, ativação celular e recuperação imunológica (BANDERA et al., 2018).

1.5 Uso de probióticos em pacientes vivendo com o HIV

Alimentos funcionais, sejam prebióticos ou probióticos, podem ajudar a restabelecer uma relação natural de hospedeiro-microrganismo no TGI através da inibição de bactérias potencialmente prejudiciais, particularmente as espécies Gram-negativas. Este efeito benéfico tem sido observado em outras patologias, como sepsis e bacteremia pós-operatória, com probióticos contendo *Lactobacilli*. Além disso, os efeitos adversos dos alimentos funcionais são raros e autolimitados (BOYLE; ROBINS-BROWNE; TANG, 2006). Assim, alimentos funcionais vêm ganhando destaque como um método seguro para modelar a resposta imunológica em pacientes vivendo com o HIV. Vários estudos já foram realizados com o uso de probióticos, prebióticos ou associação de ambos para diversas finalidades, incluindo o tratamento de diarreia (IRVINE; HUMMELEN; HEKMAT, 2011), recuperação de LT CD4+ e redução de biomarcadores de atividade inflamatória e de translocação microbiana (CARTER et al., 2016; IRVINE et al., 2010; SERRANO-VILLAR et al., 2018; VILLAR-GARCÍA et al., 2015).

Em relação à recuperação de LT CD4+, dentre quatro estudos incluindo pacientes virgens de tratamento com antirretrovirais (ARV), apenas dois (ANUKAM et al., 2008; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ et al., 2012) demonstraram benefício, enquanto os demais não demonstraram (GORI et al., 2011; HUMMELEN et al., 2011a). Entre 7 estudos em pacientes com infecção pelo HIV em uso de ARV, em 4 foi observado benefício desta estratégia. Dois estudos com populações mistas (com e sem ARV), sendo um em população pediátrica, mostraram um aumento modesto em LT CD4+ (GAUTAM et al.,

2014; IRVINE et al., 2010). A maioria desses estudos incluiu um número relativamente pequeno de pacientes, com uso de diferentes tipos e quantidades de probióticos ou prebióticos.

Estudos que avaliaram translocação bacteriana e marcadores de atividade inflamatória também apresentam resultados conflitantes, sendo que os simbióticos parecem ter um impacto melhor nestes marcadores, quando comparados com estudos que utilizaram probióticos apenas (D'ETTORRE et al., 2015; FALASCA et al., 2015; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ et al., 2012; GORI et al., 2011; HUMMELEN et al., 2011b; SCHUNTER et al., 2012; VILLAR-GARCÍA et al., 2015).

Intervenções outras que medicamentos ARV, para regular o estado imunológico do TGI de pacientes vivendo com o HIV, parecem promissoras, especialmente levando-se em consideração a importância do GALT na patogênese da doença. Este estudo avaliou prospectivamente o efeito de uma formulação probiótica sobre parâmetros do sistema imunológico de indivíduos com infecção pelo HIV não respondedores imunológicos. A identificação de probióticos benéficos para esta população poderia constituir um tratamento nutricional auxiliar, seguro e de baixo custo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar se o uso continuado de *Lactobacillus casei* Shirota por 12 semanas pode afetar os parâmetros imunológicos em pacientes vivendo com o HIV, em tratamento antirretroviral supressivo com baixa recuperação do número de células T CD4+.

2.2 Objetivos específicos

- a) Comparar os seguintes parâmetros antes e depois da ingestão diária de *Lactobacillus casei* Shirota e do placebo, durante 12 semanas:
 - números de células T CD4+
 - valores de carga viral do HIV-1
 - atividade citotóxica de células NK contra as células K562
 - magnitude de ativação celular, mensurado pelos marcadores Ki67 e CD38+/HLA-DR+ nas subpopulações das células T CD8+ e T CD4+ e pelo CD14 solúvel plasmático
- b) Avaliar a taxa de eventos adversos em relação causal razoável com o produto
- c) Explorar alterações na microbiota intestinal relacionadas ao uso do produto

3. Métodos

Desenho do estudo: trata-se de um ensaio clínico randomizado, duplo cego, controlado com placebo. Foi estabelecida uma amostra de conveniência de 48 pacientes.

População do estudo: pacientes vivendo com HIV em tratamento antirretroviral supressivo e com baixa recuperação de LT CD4+. Os participantes foram selecionados entre os pacientes que recebem cuidados médicos no Serviço de Extensão ao Atendimento a pacientes com HIV/aids (SEAP) e de outros serviços de atendimento especializado através de encaminhamento dos seus médicos. Definições:

- Pacientes vivendo com o HIV-1: uma pessoa com diagnóstico de infecção pelo HIV-1 confirmado, de acordo com as Diretrizes Nacionais do Brasil de HIV para o diagnóstico de HIV.
- Pacientes em tratamento antirretroviral supressivo: um paciente vivendo com o HIV-1, em uso continuado de tratamento antirretroviral, com carga viral de HIV-1 indetectável em dois ou mais testes nos últimos seis meses. Carga viral indetectável foi definida como inferior a 40 cópias/ml. Dois dos testes deveriam ter um intervalo de tempo de doze semanas ou mais.
- Pacientes com baixa recuperação do número de células T CD4+: um paciente infectado pelo HIV-1 em tratamento antirretroviral supressivo, com número das células T CD4+ abaixo de 500 células/mm³, e sem aumento de 50 células CD4+ ou mais, em dois ou mais testes, nos últimos seis meses. Dois dos testes deveriam ter um intervalo de tempo de 12 semanas ou mais.

Critérios de Inclusão

- Homens ou mulheres vivendo com o HIV-1, com idades compreendidas entre os 18 e 60 anos.
- Pacientes em tratamento antirretroviral supressivo com baixa recuperação do número das células T CD4+.
- Pacientes sem alteração na terapia antirretroviral nos últimos seis meses ou sem intenção de alteração nas próximas 12 semanas.
- Disponibilidade para os procedimentos do estudo durante o seu período de acompanhamento.
- O participante do estudo deve ter assinado o termo de consentimento livre e esclarecido, antes de qualquer procedimento.

Critérios de Exclusão

- Diagnóstico de qualquer infecção concomitante ou de doença que possa afetar a imunidade, ou história natural da infecção pelo HIV-1 incluindo, infecção ativa, hepatite B, hepatite C, diabetes mellitus, neoplasias e doenças autoimunes.
- Uso de tratamentos que pudessem afetar a imunidade nas quatro semanas anteriores à triagem, incluindo imunomoduladores, corticosteróides (apenas se o uso fosse sistemático por duas semanas ou mais), ou agentes antineoplásicos.
- Histórico de intolerância ou alergia a leite de vaca ou outro qualquer componente do produto do estudo, incluindo intolerância à lactose e alergia à caseína.

- Gravidez, aleitamento ou intenção de engravidar durante o período do estudo (apenas participantes do sexo feminino).
- Impossibilidade de armazenar em casa, com segurança, produto do estudo de acordo com as recomendações do fabricante.
- Qualquer outra condição que pudesse interferir com os procedimentos do estudo, de acordo com os investigadores.

3.1 Procedimentos do estudo

3.1.1 Randomização

Os participantes foram alocados aleatoriamente, por blocos, em dois grupos (placebo ou composto ativo) na proporção de 1:1. A lista de randomização foi gerada por uma pessoa independente dos centros do estudo e enviada para a área de manufatura, no sentido de garantir a rotulagem correta do produto do estudo.

Os produtos foram codificados sequencialmente e atribuídos na ordem rigorosa de inclusão.

3.1.2 Triagem e Inclusão

Na visita de triagem foi verificado o histórico médico e os registros hospitalares para avaliar os critérios de inclusão. Todos os potenciais participantes, não excluídos por outras razões, fizeram uma nova análise da carga viral do HIV e quantificação das células T CD4+, independentemente da data do último teste realizado. Na presença de qualquer doença temporária que pudesse interferir com estes testes, ou seja, síndrome gripal, diarreia leve, entre outras, os participantes em potencial foram solicitados a comparecer a

uma nova visita de triagem ao término do quadro agudo, dentro de quatro semanas, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Foram também realizados testes para detecção da infecção por vírus da hepatite B e hepatite C. Coletado amostra de urina para verificar a glicosúria, no sentido de detectar casos de diabetes mellitus não diagnosticados, e testes de gravidez para os voluntários do sexo feminino. Foi permitido apenas um reteste caso fosse detectado alguma inelegibilidade por testes laboratoriais.

A inclusão ocorreu em qualquer momento, dentro dos 28 dias seguintes ao dia de coleta das amostras da visita de triagem. Qualquer paciente com falha na inclusão neste período de 28 dias deveria recomeçar o processo de triagem, com assinatura de novo termo de consentimento livre e esclarecido. Um voluntário poderia ser triado apenas duas vezes para este estudo.

Após a randomização, cada participante recebeu uma embalagem com 20 frascos, cada uma contendo 80g do produto ativo (40 bilhões de *Lactobacillus casei* Shitora) ou placebo. Os participantes foram instruídos a tomar 1 frasco ao dia por 12 semanas. Uma nova caixa foi fornecida ao participante aproximadamente a cada duas semanas em sua residência ou na visita de estudo.

A adesão ao produto do estudo foi avaliada em cada visita, com base no uso relatado e através da contagem de garrafas vazias. Visitas de acompanhamento com avaliação clínica e laboratorial ocorreram em 6 e 12 semanas após a inclusão, e uma visita final do estudo foi realizada 12 semanas após a interrupção do produto do estudo.

Os voluntários foram intensivamente orientados, em todas as visitas, a não usar qualquer outro probiótico.

Os participantes do estudo receberam um folheto com instruções de uso, armazenamento, descarte em recipiente próprio para retorno ao centro para contabilidade, além de telefones de contato da equipe caso apresentasse algum evento adverso ou dúvida em relação aos procedimentos do estudo.

Caso o paciente apresentasse algum evento adverso, uma visita de avaliação seria realizada.

Os procedimentos de triagem, inclusão, randomização e visitas do estudo foram realizados no Centro de Pesquisas Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1.3 Avaliação de eficácia:

O principal parâmetro de eficácia foi o incremento do número de células T CD4+ após 6 semanas e 12 semanas de uso continuado do composto ativo, comparado com placebo.

Os parâmetros secundários foram as modificações nos níveis de ativação celular e de atividade citotóxica de células NK contra as células K562 após 6 e 12 semanas de uso continuado do produto comparado com placebo.

As principais avaliações de eficácia para este estudo, foram baseadas na análise por intenção de tratamento.

3.1.4 Calendário da avaliação de eficácia

As avaliações imunológicas foram conduzidas à inclusão, após 6 semanas e após 12 semanas de uso continuado do produto contendo *Lactobacillus casei* Shirota ou placebo, e 12 semanas após suspensão do produto.

A contagem de células T CD4+ poderia ser adiada em caso de doença temporária que pudesse interferir com este teste, por exemplo, síndrome gripal, diarreia aguda, ou outra doença infecciosa aguda. Este adiamento não poderia ser prolongado por mais de uma semana da visita planejada.

A quantificação de linfócitos, ativação celular, fenotipagem das células NK foram realizadas utilizando o Tru eCount e o Tri Test Kit em um citômetro de fluxo FACSCanto, de acordo com as instruções do fabricante.

A ativação celular foi avaliada por ensaios em um citômetro de fluxo FACSCanto, usando os seguintes anticorpos monoclonais: CD3, CD4, CD8, CD38, CCR5, CD69, anti-HLA-DR.

A fenotipagem das células NK e suas funções foram avaliadas de acordo com Long et. Al. (LONG et al., 2010), onde subpopulações de células NK foram analisadas pela expressão de CD56, moléculas CD16 nas populações das células mononucleares CD3-CD14-CD20. A produção de IFN γ e proteínas CD103a foi avaliada por citometria de fluxo em células mononucleares estimuladas K562.

Os níveis de CD14 foram medidos utilizando kits disponíveis comercialmente.

Os exames para detecção quantitativa do RNA do HIV-1 (carga viral HIV-1) foram processados pela metodologia de PCR em Tempo Real (limite mínimo de detecção do teste de 40 cópias/mL (1,60 log cópias/mL) e limite máximo de quantificação de 10.000.000 cópias/mL (7,0 log cópias/mL).

Análise do microbioma:

Avaliação da microbiota foi realizada em 28 participantes do estudo, que tinham amostras pareadas do basal e semana 12.

Os dados de sequenciamento do microbioma foram gerados no sequenciador Illumina Miseq. Os arquivos foram demultiplexados (separados por amostra), e para cada amostra dois arquivos foram gerados no sistema operacional Linux. As amostras foram transformadas de par final para final único e foram filtradas para a remoção de leituras de baixa qualidade. Posteriormente, as amostras, identificadas por nome, foram agrupadas em um único arquivo. Após a geração das unidades taxonômicas operacionais (OTU), esses dados foram comparados nos *greengenes*, um banco de dados de identificação de bactérias. Árvores filogenéticas foram montadas e os arquivos finais foram normalizados com base na amostra com o menor número de leituras. Com as amostras normalizadas, os histogramas da população bacteriana de cada amostra foram gerados. A quantificação bacteriana foi normalizada e categorizada em unidades taxonômica.

3.1.5 Avaliação de segurança

Parâmetros de segurança

O parâmetro principal de segurança foi a taxa e a gravidade de cada evento adverso com possível relação causal com o produto do estudo. Todos os sujeitos que receberam pelo menos uma dose do produto do estudo foram considerados para análise de segurança.

Calendário e metodologia para avaliação dos parâmetros de segurança

A abordagem inicial para avaliar os eventos adversos foi através dos relatos espontâneos do voluntário, em cada uma das avaliações de segurança a cada quatro semanas, durante o período do estudo. Após o relato espontâneo, um membro da equipe conduziu uma entrevista estruturada para avaliar a presença ou ausência dos seguintes eventos adversos durante o período do estudo:

- Dor de estômago
- Flatulência
- Diarreia
- Náusea
- Vômitos
- Obstipação

Além disso, a descontinuação dos produtos de investigação (ativo ou placebo) devido a intolerância foi avaliada continuamente durante todo o período do estudo.

Todos os eventos adversos foram registrados com data de início e fim, gravidade, e tratamento concomitante. A relação causal do evento foi avaliada pelo médico do estudo, no sentido de determinar qualquer associação possível com o produto do estudo. A classificação da gravidade desses eventos seguiu a seguinte tabela:

Tabela 1- Guia para avaliação de severidade dos eventos a diversos selecionados

Parâmetro	Grau 1 Leve	Grau 2 Moderado	Grau 3 Severo	Grau 4 Perigo de vida
Dor abdominal	Dor leve	Dor moderada; limitação de atividades diárias	Dor severa; limitação de atividades diárias de autocuidado	Não se aplica
Obstipação	Não se aplica	Obstipação persistente que requer o uso de modificação dietética, laxante ou enemas	Obstipação com indicação para evacuação manual	Consequência perigo de vida (por exemplo, obstrução)
Diarreia	Episódios transitórios ou intermitentes de fezes não formadas ou aumento de ≤ 3 evacuações do obtido na visita da triagem, num período de 24 horas	Episódios persistentes de fezes não formadas para líquidas ou aumentos de 4 – 6 evacuações do obtido na visita da triagem, num período de 24 horas	Diarreia com sangue ou aumento de ≥ 7 evacuações num período de 24h ou reposição de fluidos por via intravenosa	Consequência perigo de vida (por exemplo, choque hipotensivo)
Flatulência	Sintomas leves; intervenção não indicada	Moderado; persistente; sequelas psicossociais	Não se aplica	Não se aplica
Náusea	Transitória (< 24 horas) ou náusea intermitente sem ou com mínima interferência da ingestão oral	Náusea persistente resultando numa diminuição de ingestão oral por 24 – 48 horas	Náusea persistente resultando em ingestão oral mínima por > 48 horas ou indicação para reidratação agressiva (por exemplo, reposição de fluidos por via intravenosa)	Consequência perigo de vida (por exemplo, choque hipotensivo)
Vômitos	Vômitos transitórios ou intermitentes com nenhuma ou mínima interferência da ingestão oral	Episódios frequentes de vômitos com ou moderada desidratação	Vômitos persistentes resultando em hipotensão ortostática ou reidratação agressiva (por exemplo, reposição de fluidos por via intravenosa)	Consequência perigo de vida (por exemplo, choque hipotensivo)

Baseada na Tabela de Classificação de Gravidade dos Eventos Adversos em Adultos e Pediátricos Versão 1.0 - dezembro 2004 - Emenda datada de agosto 2009 - Divisão de AIDS do *National Institute of Allergies and Infectious Diseases and the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)* Versão 4.03 – 14 junho 2010- do *National Cancer Institute of the U.S. National Institutes of Health*.

No sentido de relatar a gravidade de outros eventos adversos não descritos na tabela acima, a Tabela Classificação de Severidade dos Eventos Adversos em Adultos e Pediátricos Versão 1.0 - dezembro 2004 (Esclarecimento datado agosto 2009) da Divisão de AIDS do *National Institute of Allergies and Infectious Diseases and the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Versão 4.03* – 14 junho 2010- do *National Cancer Institute of the U.S. National Institutes of Health*, foi também utilizada como guia

3.1.6 Vigilância e relato de eventos adversos

Os eventos adversos foram registrados no prontuário dos participantes desde a ingestão da primeira dose do produto do estudo. Todos os participantes foram encorajados a contatar a equipe do estudo em caso de eventos adversos. A cada quatro semanas, os participantes foram contatados para uma vigilância ativa dos eventos adversos, através de uma entrevista estruturada, conduzida por telefone ou pessoalmente.

Apenas as repostas da entrevista de segurança estruturada e os eventos adversos com possível associação causal ao produto do estudo foram reportados rotineiramente ao patrocinador através dos formulários de registro de casos. Os eventos notificados foram acompanhados até a sua resolução (cura, estabilização, sequela, ou morte).

Eventos adversos graves foram definidos como qualquer ocorrência médica inesperada em qualquer dose que: a) conduziu à morte; b) ocasionou perigo de vida; c) necessitou hospitalização ou prolongamento de

hospitalização existente; d) resultou em invalidez/incapacidade persistente ou significativa; ou e) anomalia congênita/defeito de nascença.

3.1.7 Período de avaliação de segurança

O período para a avaliação de segurança neste estudo começou logo após a ingestão da primeira dose e terminou na visita de seguimento de 12 semanas após a interrupção de uso do produto do estudo. Acontecimentos em curso até o fim do período de avaliação de segurança foram acompanhados, no sentido de determinar uma relação causal e a recuperação.

Qualquer participante do sexo feminino que ficasse grávida durante o período do estudo seria acompanhada até o término da gravidez, a fim de verificar uma potencial anomalia congênita ou defeito de nascença com possível relação causal do produto do estudo.

3.1.8 Questionário de Doença Inflamatória do Intestino (em inglês: *Inflammatory Bowel Disease Questionnaire - IBDQ*)

O questionário de Doença Inflamatória do Intestino (IBDQ) em Português do Brasil, validado por Pontes (PONTES et al., 2004), foi utilizado para avaliar a percepção subjetiva de como os sintomas intestinais durante o período do estudo poderiam afetar a qualidade de vida dos participantes.

3.1.9 Critérios para a retirada do produto do estudo de um participante

O produto do estudo poderia ser retirado de um participante do estudo se ele ou ela:

- Necessitasse usar medicação proibida (quimioterápicos,

imunossupressores, corticosteróides);

- Engravidasse (participantes do sexo feminino);
- Não cumprisse o uso continuado do produto, ou seja, tiver tomado 3 dias ou menos em uma semana, durante duas semanas ou mais;
- Pedisse a retirada do produto do estudo ou retirasse o termo de consentimento livre e esclarecido.

O médico do estudo também poderia retirar o produto do participante no caso de eventos adversos moderados, graves ou perigo de vida com possível relação causal, ou no caso de qualquer ocorrência não resolvida que pudesse interferir com os procedimentos do estudo.

No caso de retirada do produto, foi solicitado ao participante para devolver todos os frascos (vazios ou cheios).

Adicionalmente, foi realizada uma visita de descontinuação. Nessa visita, o participante foi avaliado pelo médico de forma a obter um histórico médico, exame físico e avaliação de segurança. Também realizado a coleta de amostras biológicas para número das células T CD4+, carga viral de HIV e um teste de gravidez. A avaliação do período de segurança foi respeitada conforme descrito anteriormente.

3.1.10 Critério para descontinuação de um participante do estudo

Todos os sujeitos em que o produto do estudo foi suspenso, também foram descontinuados do estudo, assim que o período de avaliação de segurança terminou.

3.1.11 Critério para suspensão ou término do estudo

O estudo poderia ser suspenso caso, pelo menos, ocorresse 5 eventos adversos moderados ou dois eventos adversos graves/perigo de vida com possível relação causal ao produto do estudo. Neste caso, um comitê *ad-hoc*, independente da equipe poderia ser chamado para orientar quanto ao término ou manutenção do protocolo.

O estudo também poderia ser suspenso ou terminado a pedido das autoridades regulatórias ou éticas, ou se o patrocinador decidisse fazê-lo, com base em nova informação científica.

3.1.12 Visita de seguimento 12 semanas após a retirada do produto do estudo

Os voluntários deveriam retornar para uma visita 12 semanas após a retirada do produto do estudo para a avaliação da história médica, exame físico, coleta de sangue para hemograma, bioquímica, número de LT CD4+, armazenamento de amostra e avaliação da resolução, estabilização ou desenvolvimento de qualquer evento adverso.

3.2 Fluxograma do Estudo

Tabela 2- Fluxograma do estudo

	Triagem	Inclusão Dia 0 [¶]	Sem. 2 14±3d	Sem. 4 28±3d	Sem. 6 42±3d	Sem. 8 56±3d	Sem.10 70±3d	Sem. 12 84±7d	Retirada	Seguimento 12 semanas após desc.
Procedimento Termo de consentimento livre e esclarecido	X									
Histórico Médico	X							X	X	X
Exame Físico	X							X	X	X
Avaliação de Segurança				X [§]		X [§]		X	X	
Fornecimento do produto do estudo		X	X*	X*	X*	X*	X*			
Retirada do produto do estudo			X*	X*	X*	X*	X*	X	X	
Hemograma	X				X			X		X
TGO/TGP	X				X			X		X
Contagem células T CD4+	X				X			X	X	X
Carga viral HIV	X				X			X	X	X
Sorologia HBV	X									
Sorologia HCV	X									
Testes de ativação celular/fenotipagem células NK/níveis de CD14 solúvel	X				X			X		
Teste glicosúria (glicose na urina)	X									
Teste de gravidez (participante sexo feminino)	X							X	X	
IBQD	X							X	X	X
Amostras de fezes	X							X		

[¶] Dentro de 28 dias da avaliação de células T CD4+ de base

[§] Poderia ser realizada entrevista por telefone

- Poderia ser concretizado no centro de pesquisa ou na casa dos participante

3.3 Produto do estudo

O produto do estudo foi aprovado para venda no Brasil e em outros países como Yakult 40[®]. As características do produto estão detalhadas abaixo.

Porção: 80 g (1 unidade)

Quantidade por porção		% Valores Diários*
Valor energético	59 kcal	3
Carboidratos	13 g	4
Proteínas	1.6 g	2
Cálcio	69 mg	7
Sódio	30 mg	1

* Não contém quantidades significativas de Gorduras Totais, Gorduras Saturadas, Gorduras Trans. e Fibra Alimentar

Ingredientes: Leite desnatado e/ou leite desnatado reconstituído, açúcar, Glicose, Fermento Lácteo (*Lactobacillus casei* Shirota) 40 bilhões em 80g.

O placebo foi um produto análogo sem o Fermento Lácteo (*Lactobacillus casei* Shirota) apresentado no mesmo frasco e com aroma semelhante.

Ambos, composto ativo e placebo deveriam ser armazenados sob refrigeração entre 1° e 10°C.

3.4 Considerações Éticas

3.4.1 Descrição de potenciais riscos físicos, sociais, psicológicos e métodos para minimizá-los

Os produtos do estudo, que contém *Lactobacillus casei* Shirota e o placebo, são produtos diários muito semelhantes entre si no mercado regular de alimentação. Neste sentido, os riscos associados a produtos diários podem também ser associados ao uso no estudo, ou seja, a intolerância à lactose, alergias às proteínas do leite, danos causados por condições de armazenamento inadequadas. Potenciais participantes com diagnóstico de intolerância ou alergia aos componentes dos produtos do estudo foram excluídos, e sintomas gastrointestinais associados a essas condições foram avaliados durante todo o período. Os participantes foram instruídos a manter as condições apropriadas para armazenamento dos produtos e poderiam pedir produtos adicionais a qualquer momento, caso tivessem ocorrido problemas com as condições de armazenamento na sua casa.

Os materiais do estudo poderiam acidentalmente divulgar a condição de infecção pelo HIV para uma pessoa que lesse essa documentação. Os participantes foram aconselhados a manter os documentos seguros com o título do estudo completo, ou seja, o termo de consentimento livre e esclarecido. O rótulo do produto do estudo não continha o título completo, mas um título curto e um código do estudo sem mencionar as palavras “HIV” ou “antirretroviral”. A equipe que forneceu o produto do estudo ou contactou o participante não poderia revelar a condição de infecção pelo HIV do participante sem a sua autorização.

3.4.2. Consentimento informado e aspectos regulatórios

Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes de qualquer procedimento do estudo.

O Estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP, sob o número 492.507.

3.5 Financiamento

O estudo foi financiado de forma irrestrita pela Yakult Honsha co. Ltda com análise dos dados realizada de forma independente ao patrocínio.

3.6 Estatística e manejo de dados

3.6.1 Plano de análise de dados, incluindo metodologia estatística, tabelas planejadas e figuras

Participantes alocados para receber o produto contendo *Lactobacillus casei* Shirota ou placebo foram comparados em relação à contagem de células T CD4+ e outros parâmetros imunológicos após 6 e 12 semanas de uso continuado (em relação aos valores à inclusão), e após 12 semanas da interrupção do uso do produto, usando o teste Qui-Quadrado, Wilcoxon-Mann-Whitney ou teste T de Student, de acordo com a natureza das variáveis. Além disso, utilizamos modelos mistos para avaliar simultaneamente a associação entre o produto utilizado e o incremento na contagem de LT CD4+ ou relação CD4/CD8 nas múltiplas visitas de avaliação imune do estudo, realizadas 6 e 12

semanas após início do estudo e após 12 semanas da interrupção do uso do produto. O modelo foi analisado sem ajuste estatístico e também com ajuste para variáveis potencialmente confundidoras com diferença estatisticamente significativa entre os grupos à inclusão.

Para os parâmetros de eficácia, a principal análise foi por intenção de tratamento incluindo todos os voluntários de acordo com a alocação randômica.

A taxa dos eventos adversos com possível relação causal com o produto do estudo foi descrita e comparada entre ambos os grupos, ativo e placebo, usando o teste Qui-Quadrado ou exato de Fisher.

Para todos os testes estatísticos, o valor de p menor que 0.05 foi considerado como significativo, com poder de 80%. O pacote estatístico Stata versão 15.1 foi utilizado em todas as análises (StataCorp. College Station, TX: StataCorp LP).

4. Resultados

De janeiro de 2015 a julho de 2016, 88 pacientes foram selecionados para triagem para o estudo e 48 incluídos para receber o composto ativo ou placebo.

As razões para não inclusão de 40 pacientes foram: contagem de LT CD4+ acima de 500 células/mm³, HIV RNA detectável, hepatite B crônica, hepatite C crônica, diabetes mellitus, cirurgia TGI prévia, recusa em participar do estudo após o rastreamento, por questões pessoais e um paciente não incluído por já termos completado o número proposto de inclusões (figura 5).

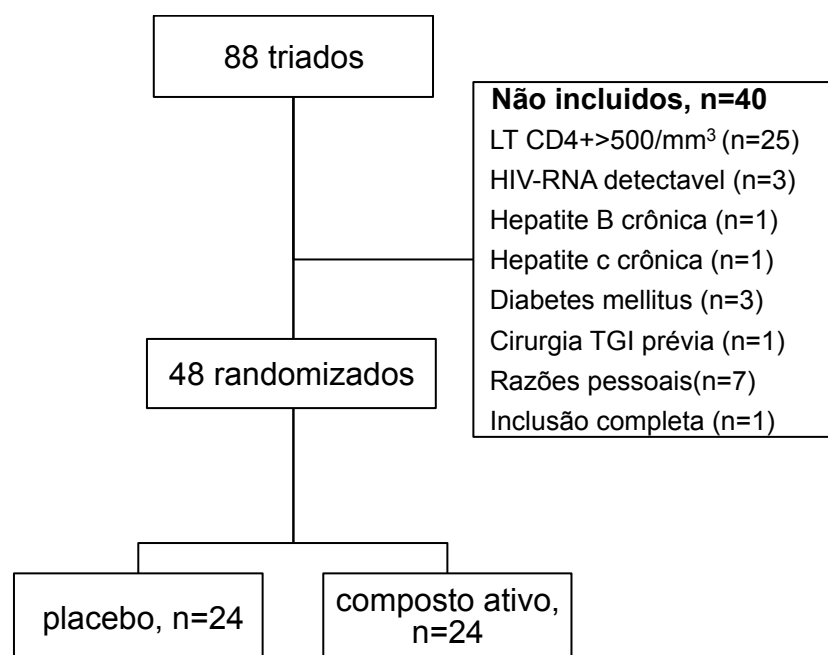


Figura 5- Triagem, inclusões e exclusões do estudo

Entre os 48 participantes incluídos, 24 foram randomizados para receber o composto ativo e 24 receberam placebo. Após a randomização, houve três perdas de seguimento: dois voluntários pararam de usar o produto do estudo por motivo de viagens e um retirou-se por motivos pessoais,

resultando em uma taxa de retenção de 93,3% no período de acompanhamento.

As características demográficas e clínicas basais dos participantes do estudo estão descritas na Tabela 3. Os grupos foram comparáveis quanto ao gênero, idade, cor da pele, escolaridade, presença de comorbidades, tempo decorrido desde o diagnóstico e seguimento do HIV, níveis de células T CD4 + e CD8 + (número e porcentagem), relação CD4 / CD8 e sintomas intestinais avaliados pelo questionário inflamatório de doença intestinal (IBDQ) à inclusão. Valores de nadir de LT CD4+ foram mais baixos no grupo placebo quando comparados ao grupo que recebeu o composto ativo (mediana 70 vs.141 células/mm³, p=0,019).

Tabela 3- Características demográficas e clínicas basais de acordo com grupo de randomização

	Composto ativo N=24	Placebo N=24	<i>p</i>
Idade	42,5 (29,5-47,0)	46,5 (35,5-51,5)	0,154
Sexo masculino (%)	22 (92)	21 (88)	1,000
Cor da pele			
Branco	15 (63)	17 (71)	0,522
Negros	1 (4)	0 (0)	
Pardos	6 (25)	7 (29)	
Amarelos	2 (8)	0 (0)	
Escolaridade			
Ensino fundamental	3 (13)	6 (25)	0,824
Ensino médio	5 (21)	7 (29)	
Universitários	16 (67)	11 (46)	
Comorbidades (n=40)	18 (100)	18 (83)	0,114
Coinfecção HBV/HCV	1 (4)	0 (0)	1,000
Tempo desde o diagnóstico em anos (n=47)	4,5 (2,0-10,2)	4,7 (2,1-11,8)	0,766
Tempo de seguimento em anos (n=43)	4,4 (1,6-10,2)	3,3 (2,1-6,6)	1,000
Tempo de tratamento em anos	4,2 (1,6-7,2)	4,1 (2,1-7,8)	0,775
CD4+ nadir (cels/mL) (n=41)	141 (85-204)	70 (26-139)	0,019
Tempo em anos desde o nadir (n=39)	2,2 (0,9-5,5)	2,9 (1,7-4,7)	0,474
Nível de LT CD4+(cels/mL)	358 (249-429)	297 (264-395)	0,427
Porcentagem de LT CD4+	23 (21-28)	20 (16-24)	0,094
Nível de LT CD8+(cels/mL)	673 (452-838)	786 (522-1041)	0,333
Porcentagem de LT CD8+	41 (36-50)	48 (43-54)	0,058
Relação CD4+/CD8+	0,6 (0,4-0,7)	0,4 (0,3-0,6)	0,073
PCR HIV indetectável	24 (100)	24 (100)	-
Escore IBDQ total	204 (195-216)	211 (202-215)	0,353

Variáveis contínuas são apresentadas como medianas e intervalos interquartis. Comparações realizadas usando um teste de soma de postos de Wilcoxon-Mann Whitney para variáveis contínuas e qui-quadrado ou teste exato de Fisher conforme apropriado para variáveis categóricas

Os eventos adversos (EA) após a randomização também foram semelhantes entre os grupos placebo e intervenção (composto ativo). Não foram observados EA de grau 3 e 4, EA sérios ou eventos que levaram à descontinuação da intervenção durante o acompanhamento. Entre os EA que foram considerados de especial interesse no estudo (dor epigástrica, flatulência, diarreia, náusea, vômito e obstipação), não houve diferença significativa entre o placebo e o composto ativo. Diarreia e flatulência foram os eventos mais frequentes em ambos os grupos conforme demonstrado na tabela 4

Tabela 4- Eventos adversos após randomização de acordo com o grupo de randomização

	Composto ativo N=24	Placebo N=24	p
Reportado pelo menos um EA (%)	11 (45)	4 (17)	0,060
Reportado ≥ 2 EA (%)	6 (25)	4 (17)	0,724
Qualquer EA relacionado com produto do estudo (%)	4 (17)	2 (8)	0,666
Qualquer EA graus ≥ 3 ou EA grave (%)	0 (0)	0 (0)	-
Interrupção do produto do estudo por EA (%)	0 (0)	0 (0)	-
EA de interesse especial			
Dor epigástrica (%)			
V1 – V12	0 (0)	0 (0)	-
Flatulência (%)			
V1 – V4	0 (0)	0 (0)	-
V6	1 (9)	1 (4)	1,000
V8	0	1 (5)	0,487
V10	0	0 (0)	-
V12	1 (5)	0 (0)	1,000
Diarreia (%)			
V1	0 (0)	1 (4)	1,000
V4	1 (4)	0 (0)	1,000
V6	1 (4)	2 (9)	1,000
V8	0 (0)	0 (0)	-
V10	1 (4)	1 (4)	1,000
V12	2 (9)	0 (0)	0,488
Náusea (%)			
V1 – V10	0 (0)	0 (0)	-
V12	1 (5)	0 (0)	1,000
Vômito (%)			
V1 – V12	0 (0)	0 (0)	-
Constipação (%)			
V1	1 (4)	0 (0)	1,000
V4 – V12	0 (0)	0 (0)	-

Variáveis contínuas são apresentadas como medianas e intervalos interquartis. Comparações realizadas usando um teste de soma de postos de Wilcoxon para variáveis contínuas e qui-quadrado ou teste exato de Fisher, conforme apropriado para variáveis categóricas

Legenda: V (visita); EA (evento adverso)

Nenhuma diferença foi notada nos resultados obtidos no Questionário de Doença Inflamatória Intestinal (IBDQ)(PONTES et al., 2004). Como mostrado na Tabela 5, embora tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas para sintomas intestinais (visitas 0 e 12), sintomas sistêmicos (visita 12) e escore total do IBDQ (visita 12), as diferenças foram pequenas demais para serem consideradas clinicamente significativas. Além disso, a alteração pós-intervenção na pontuação dos sintomas intestinais (Visita 12 menos a linha de base e Visita 24 menos os valores basais) não foram significativamente diferentes entre os grupos.

Tabela 5- Questionário de Doença Inflamatória Intestinal (IBDQ)

	Composto ativo (N=24)	Placebo (N=24)	<i>p</i>
Sintomas intestinais			
V0	69 (65-70)	70 (70-70)	0,009
V12 (N=43)	68 (67-70)	70 (69-70)	0,011
V24 (N=34)	70 (67-70)	70 (69-70)	0,401
Mudança em sintomas intestinais			
V12-V0 (N=43)	0 (-2 to 2)	0 (0 to 0)	0,949
V24-V0 (N=34)	0 (-2 to 1)	0 (-1 to 0)	0,2425
Sintomas sistêmicos			
V0	31 (28-34)	32 (28-33)	0,934
V12	31 (29-33)	34 (33-34)	0,0003
V24	33 (30-34)	33 (32-34)	0,255
Aspectos sociais			
V0	35 (35-35)	35 (35-35)	0,494
V12	35 (35-35)	35 (35-35)	0,374
V24	35 (35-35)	35 (35-35)	0,296
Aspectos emocionais			
V0	72 (67-77)	75 (70-77)	0,301
V12	72 (68-76)	76 (68-78)	0,113
V24	74 (69-75)	77 (72-78)	0,131
Escore IBDQ total			
V0	204 (195-216)	211 (202-215)	0,353
V12	205 (199-212)	215 (203-217)	0,0067
V24	208 (203-213)	213 (210-216)	0,2141
Escore categorizado para qualidade de vida V0 (N=46)			
Pobre	0 (0)	0 (0)	0,284
Boa	7 (30)	3 (13)	
Excelente	16 (70)	20 (87)	
Escore categorizado para qualidade de vida V12 (N=42)			
Pobre	0 (0)	0 (0)	0,083
Boa	8 (35)	2 (11)	
Excelente	15 (65)	17 (89)	
Escore categorizado para qualidade de vida V24 (N=34)			
Pobre	0 (0)	0 (0)	0,487
Boa	4 (19)	2 (15)	
Excelente	17 (81)	11 (85)	

Doze semanas após o início do tratamento, os níveis medianos de células T CD4 + aumentou de 358 para 380 no grupo que recebeu o composto ativo, enquanto no grupo placebo aumentou de 297 para 322 células / mL ($p = 0,495$). A relação CD4/CD8 foi significativamente maior no grupo que utilizou o composto ativo nas semanas 12 ($p = 0,027$) e 24 ($p = 0,002$) em comparação com o placebo. Aumento mediano na relação CD4 / CD8 foi maior no grupo de intervenção em comparação com os usuários de placebo (respectivamente 0,07 e 0,01), mas essa diferença não alcançou significância estatística ($p = 0,171$). Doze semanas após a interrupção do tratamento, um aumento na relação CD4 / CD8 em comparação com os valores basais ainda estava presente, embora não atingindo significância estatística (0,06 no grupo de intervenção e 0,02 no grupo placebo, $p = 0,056$). Usando modelos mistos não ajustados, o uso do composto ativo foi associado com um aumento médio de 58,8 células / mL na contagem de células CD4 + pós-baseline nas visitas 6, 12 e 24 (IC 95% -11 a 129, $p = 0,099$) e aumento de 0,18 na relação CD4 / CD8 (IC 95% 0.03 a 0.33, $p = 0.020$), como mostrado na Tabela 6 e figuras 6 e 7. Entretanto, essa diferença foi perdida quando o modelo foi ajustado para os valores de nadir de LT CD4+.

Tabela 6- Efeito da intervenção do estudo nos níveis de LTCD4+ e relação CD4/CD8

	Composto ativo (N=24)	Placebo (N=24)	p
Nível de CD4, cels/mL			
V0	358 (249-429)	297 (264-395)	0,427
V6 (N=46)	388 (256-463)	306 (212-393)	0,141
V12 (N=45)	380 (278-445)	322 (256-376)	0,158
V24 (N=33)	443 (332-498)	328 (211-405)	0,071
Mudança no CD4, cels/mL			
V6-V0 (N=43)	17 (-33 - 74)	4 (-43 a 51)	0,291
V12-V0 (N=34)	8 (-30 - 70)	10 (-50 a 33)	0,495
V24-V0 (N=33)	58 (-20 - 116)	49 (5 a 101)	0,74
Nível de CD8, cels/mL			
V0	673 (452-838)	784 (522-1040)	0,333
V6 (N=46)	644 (498-932)	769 (556-1051)	0,391
V12 (N=45)	652 (412-944)	845 (681-992)	0,065
V24 (N=33)	673 (370-941)	978 (767-1075)	0,051
Mudança no CD8, cels/mL			
V6-V0 (N=46)	30 (-78 - 106)	24 (-132 - 179)	0,767
V12-V0 (N=45)	-4,5 (-120 - 81)	25 (-37 - 95)	0,495
V24-V0 (N=33)	-19 (-83 - 103)	134 (-27 - 247)	0,105
Relação CD4/CD8			
V0	0,57 (0,38-0,68)	0,43 (0,28-0,63)	0,121
V6 (N=45)	0,50 (0,36-0,80)	0,33 (0,28-0,61)	0,078
V12 (N=43)	0,57 (0,37-0,88)	0,37 (0,31-0,57)	0,027
V24 (N=33)	0,67 (0,52-0,93)	0,35 (0,28-0,49)	0,002
Mudança na relação CD4/CD8			
V6-V0 (N=43)	0 (-0,04 - 0,05)	-0,01 (-0,06 - 0,03)	0,671
V12-V0 (N=34)	0,07 (-0,02 - 0,11)	0,01 (-0,04 - 0,04)	0,171
V24-V0	0,06 (0,01 - 0,12)	0,02 (-0,06 - 0,05)	0,056

Continuação

Tabela 6- Efeito da intervenção do estudo nos níveis de LTCD4+ e relação CD4/CD8 (Continua)

	Composto ativo (N=24)	Placebo (N=24)	<i>p</i>
Modelos Mistos			
Efeito da intervenção no CD4 pós-basal (V6, V12)			
Não ajustado		55,7 (-14 - 126)	0,12
Ajustado pelo nadir de CD4		50,7 (-34 - 135)	0,238
Efeito da intervenção no CD4 pós-basal (V6, V12, V24)			
Não ajustado		58,8 (-11 - 129)	0,099
Ajustado pelo nadir de CD4		55,2 (-29 - 139)	0,196
Efeito da intervenção no CD8 pós-basal (V6, V12)			
Não ajustado		-127,2 (-320 - 65)	0,195
Ajustado pelo nadir de CD4		-94,6 (-327 - 138)	0,425
Efeito da intervenção no CD8 pós-basal (V6, V12, V24)			
Não ajustado		-159,4 (-353 - 35)	0,107
Ajustado pelo nadir de CD4		-112,0 (-344 - 120)	0,344
Efeito da intervenção na relação CD4/CD8 pós-basal (V6, V12)			
Não ajustado		0,16 (0,01 - 0,31)	0,033
Ajustado pelo nadir de CD4		0,09 (-0,08 - 0,26)	0,298
Efeito da intervenção na relação CD4/CD8 pós-basal (V6, V12, V24)			
Não ajustado		0,18 (0,03 - 0,33)	0,02
Ajustado pelo nadir de CD4		0,09 (-0,08 - 0,27)	0,29

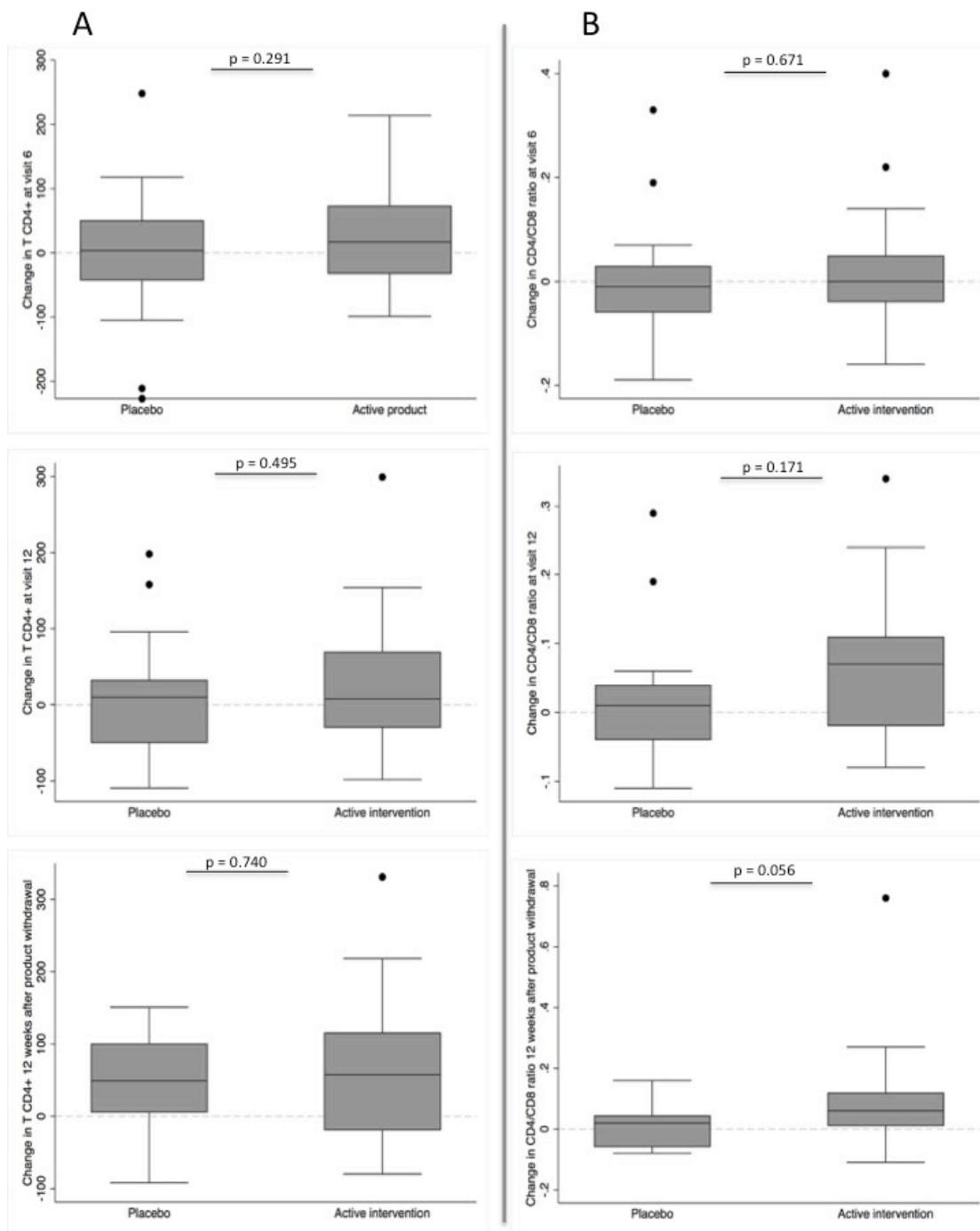
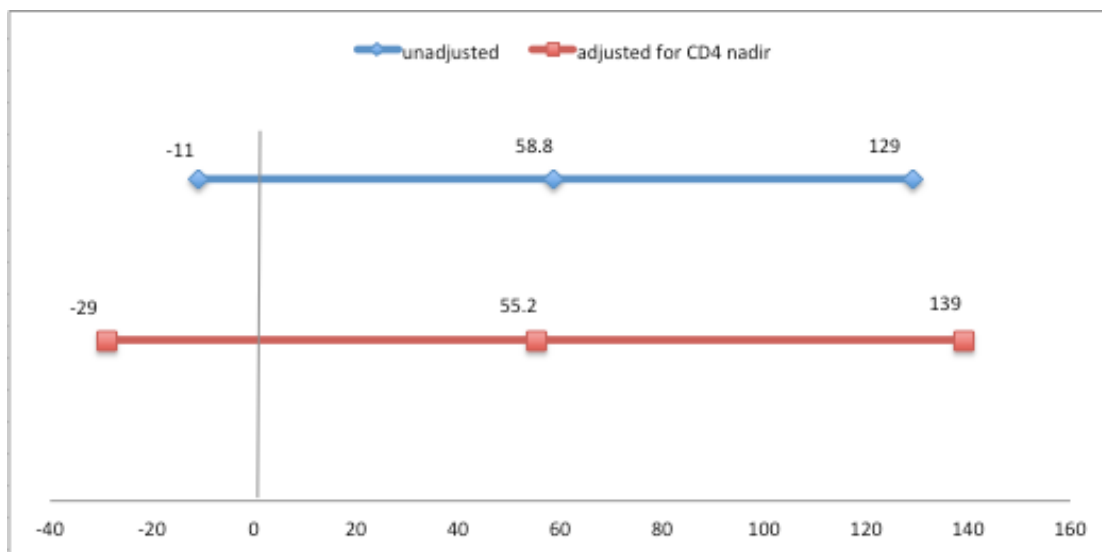


Figura 6- Box plots comparando os grupos ativo e placebo quanto às contagens de T-CD4 + (A) e relação CD4 / CD8 (B)

A



B

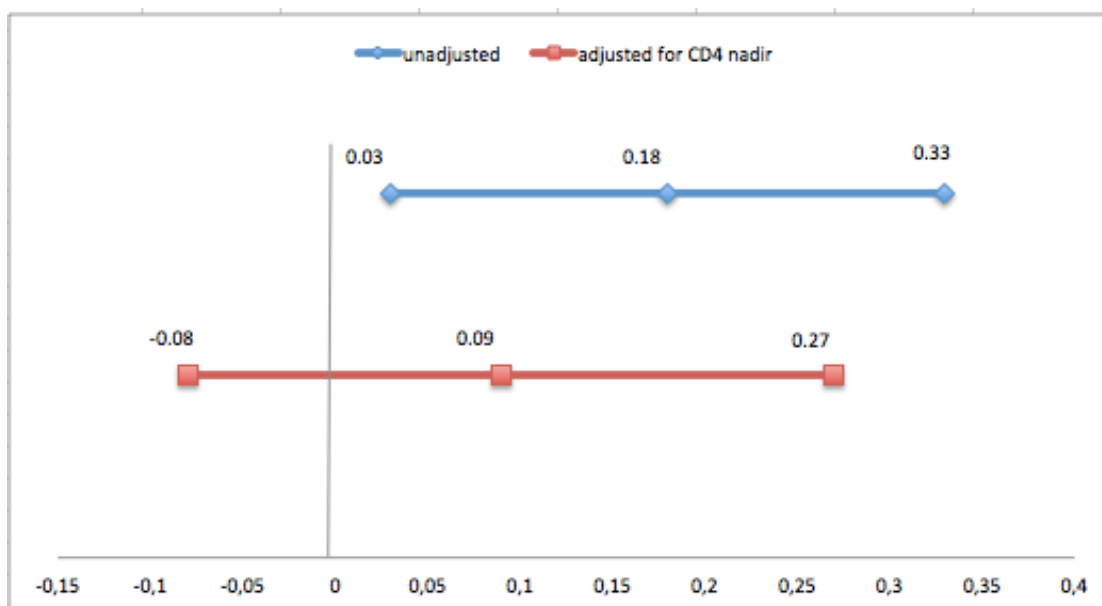


Figura 7- Efeito da intervenção na contagem de LT CD4+ após o basal (V6, V12, V24) (3A) e relação CD4 / CD8 (V6, V12, V24) (3B)

A ativação das células T foi medida pela presença de CD38 + / HLA-DR + nas subpopulações de células T CD4 + (Tabela 7) e CD8 + (Tabela 8) e

pelos níveis de CD14 solúveis no plasma (Tabela 9). Os grupos foram comparáveis em relação aos marcadores de ativação celular no início do estudo para a maioria dos marcadores (diferenças encontradas no início não são consistentes em todas as subpopulações) e no final de 12 semanas não foram encontradas diferenças significativas nestes níveis, com o uso do produto contendo *Lactobacillus casei* Shirota, como mostrado nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7- Efeito da intervenção do estudo na ativação celular em células T CD4 + e compartimentos de memória

	Composto ativo N=24	Placebo N=24	p
% CD4+ total (V0)			
CD38+HLA-DR+	1,9 (1,2 - 4,6)	1,8 (1,3 - 2,2)	0,558
CD38+CCR5+	26,0 (18,1 - 29,4,0)	21,9 (14,2 - 27,1)	0,137
CD38+CCR5+HLA-DR+	1,2 (0,8 - 3,0)	1,1 (0,9 - 1,6)	0,592
Mudança no CD4 total (V12-V0)			
CD38+HLA-DR+	0,0 (-0,5 - 0,6)	0,2 (0,0 - 0,4)	0,578
CD38+CCR5+	-0,7 (-3,0 - 3,1)	0,9 (-0,2 - 5,2)	0,297
CD38+CCR5+HLA-DR+1	0,0 (-0,3 - 0,4)	0,1 (-0,3 - 0,3)	0,694
% CD4 naive (V0)			
CD38+HLA-DR+	0,9 (0,4 - 1,1)	0,9 (0,7 - 1,2)	0,342
CD38+CCR5+	43,9 (36,1 - 56,2)	47,9 (37,5 - 59,5)	0,661
CD38+CCR5+HLA-DR+1	0,7 (0,3 - 1,0)	0,8 (0,6 - 0,9)	0,435
Mudança no CD4 naive (V12-V0)			
CD38+HLA-DR+	0,0 (-0,2 - 0,2)	0,2 (-0,1 - 0,4)	0,284
CD38+CCR5+	-1,9 (-5,8 - 5,6)	-0,1 (-2,9 - 2,4)	0,597
CD38+CCR5+HLA-DR+1	0,0 (-0,2 - 0,2)	0,1 (-0,1 - 0,3)	0,222

(Continuação)

Tabela 7- Efeito da intervenção do estudo na ativação celular em células T CD4 + e compartimentos de memória (Continua)

	Composto ativo N=24	Placebo N=24	p
% CD4 memória central (V0)			
CD38+HLA-DR+	1,1 (0,8 - 2,2)	1,0 (0,9 - 1,5)	0,855
CD38+CCR5+	22,9 (17,5 - 28,6)	18,2 (13,1 - 21,7)	0,032
CD38+CCR5+HLA-DR+1	0,9 (0,6 - 1,4)	0,7(0,6 - 1,1)	0,714
Mudança no CD4 memória central (V12-V0)			
CD38+HLA-DR+	0,0 (-0,4 - 0,0)	-0,1 (-0,2 - 0,3)	0,416
CD38+CCR5+	0,1 (-2,7 - 1,7)	0,6 (-0,7 - 2,2)	0,542
CD38+CCR5+HLA-DR+1	-0,1 (-0,5 - 0,1)	-0,1 (-0,2 - 0,2)	0,506
% CD4 memória transitória (V0)			
CD38+HLA-DR+	4,2 (2,9 - 5,6)	3,1 (2,0 - 4,3)	0,095
CD38+CCR5+	5,5 (3,9 - 7,3)	4,5 (2,9 - 5,5)	0,11
CD38+CCR5+HLA-DR+1	2,6 (1,7 - 3,3)	1,8 (1,1 - 2,5)	0,125
Mudança no CD4 memória transitória (V12-V0)			
CD38+HLA-DR+	0,3 (-1,6 - 1,0)	1,0 (-0,1 - 1,1)	0,188
CD38+CCR5+	0,4 (-2,2 - 2,5)	0,0 (-0,4 - 0,5)	0,776
CD38+CCR5+HLA-DR+1	0,1 (-1,2 - 1,1)	0,4 (0,2 - 1,0)	0,481
% CD4 memória intermediária (V0)			
CD38+HLA-DR+	14,7 (7,7 - 25,4)	20,0 (15,5 - 26,6)	0,06
CD38+CCR5+	16,9 (8,7 - 20,5)	17,4 (13,5 - 23,8)	0,312
CD38+CCR5+HLA-DR+1	10,4 (4,2 - 14,8)	16,5 (9,8 - 20,3)	0,033
Mudança no CD4 memória intermediária (V12-V0)			
CD38+HLA-DR+	4,3 (-2,9 - 16,4)	1,5 (-2,6 - 9,2)	0,329
CD38+CCR5+	3,1 (-2,6 - 12,8)	5,0 (-3,2 - 7,8)	0,796
CD38+CCR5+HLA-DR+1	2,6 (-1,5 - 13,0)	1,4 (-3,7 - 8,4)	0,322

(Continuação)

Tabela 7- Efeito da intervenção do estudo na ativação celular em células T CD4 + e compartimentos de memória (Continua)

	Composto ativo N=24	Placebo N=24	p
% CD4 memória efetora (V0)			
CD38+HLA-DR+	4,1 (2,6 - 8,2)	2,8 (1,6 - 3,6)	0,02
CD38+CCR5+	4,9 (3,2 - 7,4)	3,4 (2,1 - 4,7)	0,04
CD38+CCR5+HLA-DR+1	2,2 (1,3 - 3,6)	2,0 (1,0 - 2,4)	0,154
Mudança no CD4 memória efetora (V12-V0)			
CD38+HLA-DR+	0,1 (-1,9 - 2,1)	0,4 (-0,6 - 2,2)	0,408
CD38+CCR5+	1,1 (-2,2 - 3,0)	0,7 (-0,8 - 1,6)	0,734
CD38+CCR5+HLA-DR+1	0,1 (-1,5 - 1,1)	0,2 (-0,5 - 1,1)	0,56
% CD4 efetor terminal (V0)			
CD38+HLA-DR+	11,5 (4,1 - 17,1)	11,5 (6,4 - 15,7)	0,609
CD38+CCR5+	10,7 (4,8 - 15,9)	9,1 (7,0 - 12,3)	0,826
CD38+CCR5+HLA-DR+1	5,9 (2,8 - 11,6)	8,0 (4,2 - 11,6)	0,472
Mudança no CD4 efetor terminal (V12-V0)			
CD38+HLA-DR+	-1,1 (-2,9 - 9,7)	3,7 (-0,9 - 8,3)	0,472
CD38+CCR5+	1,1 (-2,9 - 10,0)	3,7 (0,7 - 7,1)	0,967
CD38+CCR5+HLA-DR+1	-0,5 (-3,7 - 6,5)	4,1 (0,8 - 5,6)	0,261

Tabela 8- Efeito da intervenção do estudo na ativação celular em células T CD8 + e compartimentos de memória

	Composto ativo N=24	Placebo N=24	p
% CD8 total (V0)			
CD38+HLA-DR+	12,0 (7,7 - 16,7)	8,3 (4,5 - 9,2)	0,004
CD38+CCR5+	31,1 (23,6 - 43,7)	24,2 (17,8 - 28,0)	0,007
CD38+CCR5+HLA-DR+	9,6 (6,5 - 13,4)	16,0 (3,5 - 7,5)	0,003
Mudança no CD8 total (V12-V0)			
CD38+HLA-DR+	0,8 (-3,1 - 2,8)	0,7 (-1,1 - 3,4)	0,560
CD38+CCR5+	-1,0 (-7,8 - 7,6)	1,2 (-4,7 - 7,2)	0,408
CD38+CCR5+HLA-DR+	0,0 (-3,0 - 2,0)	0,6 (0,2 - 2,8)	0,464
% CD8 naive (V0)			
CD38+HLA-DR+	2,4 (1,0 - 3,2)	1,0 (0,7 - 1,7)	0,019
CD38+CCR5+	48,8 (36,5 - 61,8)	41,4 (32,5 - 47,8)	0,045
CD38+CCR5+HLA-DR+	2,1 (0,9 - 3,2)	0,9 (0,6 - 1,2)	0,025
Mudança CD8 naive (V12-V0)			
CD38+HLA-DR+	0,0 (-0,7 - 0,8)	-0,1 (-0,2 - 0,2)	0,635
CD38+CCR5+	-1,7 (-8,6 - 1,3)	-1,3 (-6,2 - 1,5)	0,456
CD38+CCR5+HLA-DR+	-0,1 (-0,8 - 1,0)	-0,1 (-0,1 - 0,2)	0,989
% CD8 memória central (V0)			
CD38+HLA-DR+	11,8 (7,4 - 15,1)	6,8 (5,1 - 10,3)	0,013
CD38+CCR5+	36,9 (26,9 - 40,5)	28,6 (18,3 - 31,7)	0,004
CD38+CCR5+HLA-DR+1	11,0 (6,2 - 12,3)	6,0 (4,4 - 8,8)	0,007
Mudança no CD8 memória central (V12-V0)			
CD38+HLA-DR+	-0,3 (-2,9 - 2,3)	-0,4 (-1,6 - 0,6)	0,860
CD38+CCR5+	-3,3 (-8,0 - 2,4)	-0,8 (-5,1 - 0,7)	0,472
CD38+CCR5+HLA-DR+1	-0,8 (-1,8 - 1,7)	0,2 (-1,5 - 1,2)	0,755
% CD8 memória transitória (V0)			
CD38+HLA-DR+	11,3 (7,0 - 15,5)	7,6 (5,7 - 10,4)	0,013
CD38+CCR5+	20,9 (15,9 - 26,7)	12,9 (8,8 - 16,2)	0,000
CD38+CCR5+HLA-DR+1	9,7 (6,1 - 14,1)	6,1 (3,3 - 8,4)	0,010

(Continuação)

Tabela 8- Efeito da intervenção do estudo na ativação celular em células T CD8 + e compartimentos de memória (Continua)

	Composto ativo N=24	Placebo N=24	p
% CD8 memória intermediária (V0)			
CD38+HLA-DR+	13,8 (10,6 - 22,7)	8,8 (6,4 - 13,3)	0,002
CD38+CCR5+	26,1 (16,3 - 34,0)	14,6 (10,2 - 20,9)	0,003
CD38+CCR5+HLA-DR+1	11,4 (8,8 - 17,0)	6,5 (5,0 - 9,1)	0,001
Mudança no CD8 memória intermediária (V12-V0)			
CD38+HLA-DR+	1,1 (-2,8 - 5,4)	2,5 (-1,3 - 6,2)	0,542
CD38+CCR5+	2,2 (-7,6 - 9,5)	3,7 (-1,5 - 7,4)	0,378
CD38+CCR5+HLA-DR+1	0,2 (-3,2 - 3,9)	2,4 (-0,8 - 3,6)	0,350
% CD8 memória efetora (V0)			
CD38+HLA-DR+	7,4 (5,6 - 13,1)	5,8 (4,5 - 7,4)	0,023
CD38+CCR5+	15,1 (11,7 - 24,5)	10,6 (6,9 - 13,3)	0,001
CD38+CCR5+HLA-DR+1	6,0 (4,1 - 10,3)	4,8 (3,7 - 5,7)	0,100
Mudança no CD8 memória efetora (V12-V0)			
CD38+HLA-DR+	0,7 (-1,9 - 4,1)	0,4 (-1,5 - 2,7)	0,796
CD38+CCR5+	3,7 (-3,5 - 9,9)	4,8 (-0,7 - 7,0)	0,796
CD38+CCR5+HLA-DR+1	1,2 (-1,7 - 3,8)	0,2 (-0,9 - 2,4)	0,674
% CD8 efetor terminal (V0)			
CD38+HLA-DR+	12,5 (10,3 - 20,2)	9,5 (5,4 - 14,4)	0,014
CD38+CCR5+	28,7 (16,6 - 42,4)	16,2 (10,1 - 23,6)	0,003
CD38+CCR5+HLA-DR+1	10,0 (6,4 - 16,5)	6,6 (4,6 - 9,3)	0,013
Mudança no CD8 efetor terminal (V12-V0)			
CD38+HLA-DR+	-0,5 (-3,6 - 4,8)	1,1 (-1,3 - 4,4)	0,489
CD38+CCR5+	3,2 (-6,9 - 10,2)	2,0 (0,1 - 9,5)	0,860
CD38+CCR5+HLA-DR+1	0,5 (-2,9 - 4,0)	0,7 (-1,1 - 3,0)	0,616

Tabela 9- Níveis plasmáticos de CD14 solúvel (sCD14) em ambos os grupos

	Composto ativo N=24	Placebo N=24	p
sCD14 linear, pg/ml			
V0 (N=43)	2472800 (2042800-3030200)	2541700 (2030000-2743800)	0,874
V6 (N=43)	2369200 (2215200-2651600)	2244300 (2065800-2611000)	0,480
V12 (N=43)	2374200 (2104200-2633200)	2393800 (2052000-2533500)	0,827
sCD14 não- linear, pg/ml			
V0 (N=43)	1441904 (1258215-1927948))	1448911 (1142250-1601556)	0,253
V6 (N=43)	1441479 (1213915-1730648)	1363840 (1126552-1502304)	0,158
V12 (N=43)	1373820 (1169413-1753723)	1378672 (1156892-1535341)	0,644

Células NK

Avaliamos células NK, caracterizadas por CD3-, CD16 + e CD56 + ou CD56- no início, 6 e 12 semanas após a inclusão. Diferenças estatisticamente significativas na porcentagem de células NK entre os grupos no início, V6 ou V12 foram observadas em uma frequência menor que a esperada pelo acaso, considerando comparações múltiplas, e não foram confirmadas na comparação das células NK alteradas na semana 6 (V6 - basal) ou semana 12 (V12 – basal) entre os grupos. Da mesma forma, na condição de estímulo *in vitro* usando células K562, diferenças na porcentagem de células NK entre os grupos no início, V6 ou V12 foram observadas em uma frequência menor que a esperada pelo acaso, considerando comparações múltiplas entre os grupos ativos. Os grupos de intervenção e placebo para células NK mudam em V6 ou V12, como mostrado na Tabela 10.

Tabela 10- Efeito da intervenção do estudo na diferenciação dos subconjuntos e na atividade das células NK

	Composto ativo N=24	Placebo N=24	p
Condição Não estimulada			
V0			
%Células NK(CD56++ CD16-)	2,7 (1,6 - 4,2)	1,3 (0,8 - 4,3)	0,580
%Células NK(CD56+ CD16+)	43,8 (26,3 - 54,6)	42,9 (29,4 - 53,7)	0,832
%Células NK (CD56+ CD16-)	23,9 (19,9 - 33,6)	20,2 (12,3 - 26,7)	0,074
%Células NK(CD56- CD16+)	6,8 (4,0 - 16,2)	10,3 (7,0 - 17,6)	0,080
%Células NK(CD56- CD16-)	16,2 (11,5 - 21,6)	14,3 (10,4 - 20,0)	0,733
%Células NK (total)	82,8 (76,7 - 87,9)	85,3 (79,6 - 89,6)	0,437
% CD107a+IFN γ +(total)	1,1 (0,5 - 1,8)	0,9 (0,3 - 1,4)	0,525
% CD107a+(total)	7,8 (4,7 - 9,7)	8,1 (5,5 - 9,2)	0,850
% IFN γ +(total)	1,8 (1,1 - 3,3)	1,4 (0,6 - 2,3)	0,431
%Células NK na pop. linfocitária (total)	7,6 (4,6 - 16,8)	9,7 (4,7 - 17,7)	0,503
V6			
%Células NK(CD56++ CD16-)	2,6 (1,0 - 4,9)	1,5 (0,9 - 3,3)	0,346
%Células NK(CD56+ CD16+)	44,5 (28,2 - 50,6)	38,9 (29,2 - 58,8)	0,875
%Células NK(CD56+ CD16-)	28,8 (20,8 - 35,4)	22,9 (12,1 - 33,6)	0,116
%Células NK(CD56- CD16+)	6,6 (3,1 - 12,4)	9,6 (6,5 - 16,2)	0,110
%Células NK(CD56- CD16-)	15,0 (10,7 - 16,9)	16,3 (9,5 - 21,0)	0,937
%Células NK(total)	84,6 (82,9 - 88,8)	83,3 (77,4 - 90,5)	0,968
%CD107a+IFN γ +(total)	1,9 (0,9 - 3,5)	1,2 (0,5 - 3,1)	0,367
%CD107a+(total)	10,6 (7,3 - 12,3)	9,0 (6,2 - 12,7)	0,513
%IFN γ +(total)	2,9 (1,6 - 5,0)	1,8 (1,2 - 5,4)	0,583
%Células NK na pop. Linfocitária (total)	9,6 (7,4 a 19,1)	11,3 (4,3 a 17,9)	0,814
V12			
%Células NK(CD56++ CD16-)	2,8 (1,5 - 5,6)	1,9 (0,7 - 3,7)	0,118
%Células NK(CD56+ CD16+)	39,7 (30,6 - 45,4)	42,7 (28,6 - 57,2)	0,391
%Células NK(CD56+ CD16-)	31,5 (25,6 - 34,9)	20,2 (15,5 - 29,0)	0,013
%Células NK(CD56- CD16+)	5,4 (3,5 - 12,5)	9,1 (5,5 - 16,2)	0,130
%Células NK(CD56- CD16-)	17,8 (13,9 - 22,9)	15,1 (10,9 - 21,6)	0,677
%Células NK(total)	81,9 (77,1 - 86,1)	83,3 (78,4 - 89,3)	0,632
% CD107a+IFN γ +(total)	1,9 (0,9 - 3,3)	1,2 (0,5 - 4,0)	0,969
% CD107a+(total)	8,9 (7,7 - 14,5)	9,0 (5,8 - 12,1)	0,488
% IFN γ +(total)	3,1 (1,5 - 5,1)	2,0 (1,1 - 6,0)	0,743
%Células NK na pop. linfocitária (total)	8,3 (5,2 - 16,1)	9,7 (4,3 - 12,4)	0,929

Continuação

Tabela 10- Efeito da intervenção do estudo na diferenciação dos subconjuntos e na atividade das células NK (Continua)

	Composto ativo N=24	Placebo N=24	p
V6-V0			
%Células NK (CD56++ CD16-)	0,1 (-1,1 - 1,2)	-0,2 (-1,3 - 0,3)	0,314
% Células NK(CD56+ CD16+)	-1,5 (-10,0 - 2,8)	-1,4 (-6,5 - 7,3)	0,446
% Células NK(CD56+ CD16-)	4,7 (-3,8 - 12,0)	2,9 (-4,0 - 8,5)	0,653
% Células NK(CD56- CD16+)	-0,6 (-2,5 - 0,4)	-1,1 (-2,1 - 1,2)	0,958
% Células NK(CD56- CD16-)	0,1 (-1,8 - 1,7)	-0,8 (-2,9 - 2,0)	0,504
%Células NK(total)	0,1 (-1,3 - 4,3)	0,3 (-3,4 - 4,2)	0,546
% CD107a+IFN γ +(total)	0,7 (0,3 - 1,1)	0,3 (-0,2 - 1,3)	0,417
% CD107a+(total)	2,8 (-0,2 - 4,7)	1,7 (-0,3 - 5,4)	0,547
% IFN γ +(total)	0,9 (0,4 - 2,4)	0,7 (-0,2 - 2,1)	0,610
% Células NKna pop. linfocitária (total)	1,2 (0,2 - 2,8)	1,7 (-0,4 - 2,7)	0,530
V12-V0			
% Células NK(CD56++ CD16-)	0,4 (-0,7 - 1,7)	-0,1 (-1,0 - 0,4)	0,151
% Células NK(CD56+ CD16+)	-5,1 (-14,4 - 2,6)	1,6 (-5,4 - 8,2)	0,094
% Células NK(CD56+ CD16-)	8,5 (-3,2 - 14,4)	1,6 (-1,9 - 6,0)	0,096
% Células NK(CD56- CD16+)	-0,9 (-2,2 - 0,5)	-1,5 (-3,3 - 0,6)	0,301
% Células NK(CD56- CD16-)	0,7 (-1,7 - 6,0)	0,6 (-1,5 - 3,1)	0,675
% Células NK(total)	-0,2 (-1,5 - 3,8)	-1,8 (-4,0 - 0,2)	0,118
% CD107a+IFN γ +(total)	0,7 (-0,1 - 1,7)	0,4 (0,0 - 2,1)	0,959
% CD107a+(total)	2,6 (0,4 - 6,5)	1,7 (0,5 - 4,0)	0,596
% IFN γ +(total)	1,1 (0,3 - 2,8)	0,8 (0,1 - 3,1)	0,687
%Células NKna pop. linfocitária (total)	0,5 (-0,2 - 1,7)	-0,1 (-2,8 - 1,3)	0,413
Condição estimulada com linhagem de células K562			
V0			
% Células NK(CD56++ CD16-)	3,3 (1,7 - 6,1)	2,0 (0,8 - 5,6)	0,254
% Células NK(CD56+ CD16+)	36,4 (23,1 - 45,3)	35,5 (21,2 - 53,7)	0,655
% Células NK(CD56+ CD16-)	29,4 (24,5 - 34,9)	19,4 (17,4 - 27,9)	0,003
% Células NK(CD56- CD16+)	6,1 (3,4 - 14,4)	8,4 (7,5 - 16,8)	0,107
% Células NK(CD56- CD16-)	20,1 (14,2 - 24,0)	19,2 (17,6 - 26,0)	0,990
% Células NK(total)	79,1 (76,4 - 86,0)	80,5 (74,0 - 82,8)	0,990
% CD107a+IFN γ +(total)	3,7 (2,3 - 7,8)	2,7 (1,8 - 5,6)	0,129
% CD107a+(total)	13,3 (10,8 - 20,9)	11,5 (8,3 - 14,9)	0,076
% IFN γ +(total)	6,3 (3,9 - 12,7)	4,3 (2,7 - 9,0)	0,142
%Células NK na pop. linfocitária (total)	8,1 (5,8 - 15,6)	9,3 (5,0 - 17,3)	0,715

Continuação

Tabela 10- Efeito da intervenção do estudo na diferenciação dos subconjuntos e na atividade das células NK (Continua)

	Composto ativo N=24	Placebo N=24	p
V6			
% Células NK(CD56++ CD16-)	3,1 (1,1 - 7,3)	1,5 (0,7 - 4,7)	0,374
% Células NK(CD56+ CD16+)	32,3 (23,1 - 44,7)	32,1 (23,4 - 51,0)	0,793
% Células NK(CD56+ CD16-)	35,9 (24,6 - 40,9)	24,6 (15,8 - 34,6)	0,033
% Células NK(CD56- CD16+)	6,7 (3,1 - 11,0)	9,6 (6,5 - 15,8)	0,022
% Células NK(CD56- CD16-)	19,1 (13,8 - 25,2)	23,2 (15,1 - 26,9)	0,733
% Células NK(total)	80,7 (74,2 - 86,4)	76,5 (73,2 - 84,4)	0,714
CD107a+IFN γ +(total)	6,4 (4,9 - 9,6)	5,2 (2,7 - 7,9)	0,186
CD107a+(total)	16,0 (12,6 - 23,1)	12,2 (9,5 - 20,0)	0,122
IFN γ +(total)	9,5 (5,5 - 13,1)	7,6 (4,1 - 13,9)	0,272
% Células NK na pop. linfocitária (total)	9,1 (7,3 - 18,6)	11,3 (4,3 - 15,5)	0,916
V12			
% Células NK(CD56++ CD16-)	4,5 (1,9 - 5,7)	2,3 (0,9 - 4,3)	0,091
% Células NK(CD56+ CD16+)	28,4 (22,8 - 36,6)	37,9 (25,2 - 48,7)	0,173
% Células NK(CD56+ CD16-)	37,0 (29,3 - 39,2)	24,5 (17,5 - 31,1)	0,004
% Células NK(CD56- CD16+)	4,7 (2,6 - 10,5)	10,0 (5,6 - 14,5)	0,027
% Células NK(CD56- CD16-)	21,7 (17,1 - 25,8)	23,0 (15,6 - 27,1)	0,990
% Células NK(total)	78,6 (74,3 - 83,4)	77,2 (72,6 - 84,6)	0,990
% CD107a+IFN γ +(total)	6,5 (3,9 - 10,5)	4,7 (2,5 - 7,9)	0,104
% CD107a+(total)	18,6 (14,1 - 25,2)	15,1 (11,0 - 18,6)	0,023
% IFN γ +(total)	9,0 (6,6 - 13,7)	6,8 (3,5 - 12,1)	0,091
% Células NK na pop. linfocitária (total)	8,4 (5,5 - 16,5)	9,5 (4,4 - 14,4)	0,979
V6-V0			
% Células NK(CD56++ CD16-)	-0,1 (-1,0 - 0,3)	-0,3 (-0,6 - 0,4)	0,574
% Células NK(CD56+ CD16+)	-1,5 (-8,7 - 4,1)	-5,0 (-10,2 - 6,8)	0,849
% Células NK(CD56+ CD16-)	1,8 (-3,0 - 7,5)	3,3 (-3,2 - 9,2)	0,704
% Células NK(CD56- CD16-)	0,6 (-1,9 - 3,3)	-0,7 (-4,6 - 3,8)	0,656
% Células NK(total)	0,1 (-2,8 - 2,5)	-0,1 (-4,7 - 5,0)	0,735
% CD107a+IFN γ +(total)	2,6 (0,1 - 4,2)	1,5 (-0,3 - 3,9)	0,556
% CD107a+(total)	4,0 (-1,8 - 7,6)	2,0 (-0,7 - 5,8)	0,875
% IFN γ +(total)	2,8 (-0,1 - 5,0)	1,5 (-0,6 - 3,9)	0,656
% Células NK na pop. linfocitária (total)	1,0 (-0,3 - 2,4)	0,8 (-0,7 - 3,2)	0,694

Continuação

Tabela 10- Efeito da intervenção do estudo na diferenciação dos subconjuntos e na atividade das células NK (Continua)

	Composto ativo N=24	Placebo N=24	p
V12-V0			
% Células NK(CD56++ CD16-)	-0,1 (-1,0 - 1,0)	-0,2 (-0,9 - 0,6)	0,650
% Células NK(CD56+ CD16+)	-5,0 (-11,6 - 1,6)	1,6 (-9,6 - 8,6)	0,229
% Células NK(CD56+ CD16-)	1,6 (-3,5 - 11,2)	3,5 (-1,7 - 5,0)	0,881
% Células NK(CD56- CD16+)	-0,8 (-1,9 - 1,1)	-1,4 (-4,0 - 1,0)	0,840
% Células NK(CD56- CD16-)	2,2 (-3,3 - 5,2)	1,2 (-3,9 - 3,4)	0,488
% Células NK(total)	-3,3 (-5,3 - 2,8)	0,4 (-2,8 - 3,5)	0,547
% CD107a+IFN γ +(total)	1,9 (-0,1 - 5,8)	1,1 (-0,1 - 2,9)	0,545
% CD107a+(total)	4,8 (-2,6 - 9,4)	1,8 (-0,1 - 6,1)	0,632
% IFN γ +(total)	3,5 (0,8 - 6,1)	1,3 (-0,3 - 3,7)	0,217
% Células NK na pop. linfocitária (total)	0,3 (-0,5 - 2,3)	-0,2 (-2,0 - 1,3)	0,378
Diferença entre condição estimulada (linhagem celular K562) e condição não estimulada			
V0			
% Células NK(CD56++ CD16-)	0,5 (0,0 - 1,2)	0,1 (-0,1 - 0,7)	0,445
% Células NK (CD56+ CD16+)	-5,2 (-10,1 - -3,2)	-5,3 (-6,0 - -1,5)	0,258
% Células NK (CD56+ CD16-)	2,4 (-0,8 - 8,0)	0,1 (-1,1 - 3,3)	0,317
% Células NK (CD56- CD16+)	-0,9 (-1,6 - 0,1)	-1,1 (-2,9 - 0,1)	0,533
% Células NK (CD56- CD16-)	5,0 (2,4 - 7,0)	4,9 (2,4 - 7,3)	0,962
% Células NK (total)	-3,1 (-6,7 - -2,0)	-4,5 (-8,3 - -1,5)	0,543
% CD107a+IFN γ +(total)	2,2 (1,3 - 4,6)	1,5 (0,9 - 3,5)	0,129
% CD107a+(total)	4,9 (3,0 - 13,3)	4,4 (1,6 - 6,9)	0,254
% IFN γ +(total)	4,3 (2,2 - 7,6)	2,9 (1,6 - 7,3)	0,244
%Células NK na pop. linfocitária (total)	-0,2 (-1,0 - 0,4)	-0,3 (-0,6 - 0,1)	0,805
V6			
% Células NK(CD56++ CD16-)	0,2 (0,0 - 1,6)	0,1 (-0,1 - 2,2)	0,763
% Células NK (CD56+ CD16+)	-5,4 (-10,8 - -2,4)	-5,9 (-14,9 - -1,2)	0,811
% Células NK (CD56+ CD16-)	1,9 (-0,1 - 5,0)	0,9 (-0,1 - 5,6)	0,885
% Células NK (CD56- CD16+)	-0,5 (-1,8 - -0,1)	-0,4 (-2,6 - 0,3)	0,694
%Células NK(CD56- CD16-)	4,9 (2,3 - 6,6)	5,3 (2,7 - 8,3)	0,724
% Células NK(total)	-4,5 (-8,8 - -1,8)	-4,5 (-8,4 - -0,6)	0,897
% CD107a+IFN γ +(total)	4,7 (2,4 - 6,5)	2,3 (1,1 - 6,2)	0,260
% CD107a+(total)	7,7 (5,3 - 9,3)	4,4 (1,5 - 8,9)	0,099
% IFN γ +(total)	5,9 (3,2 - 8,1)	4,6 (2,1 - 8,8)	0,480
% Células NK na pop. linfocitária (total)	-0,5 (-1,0 - 0,1)	-0,3 (-0,8 - 0,0)	0,666

Continuação

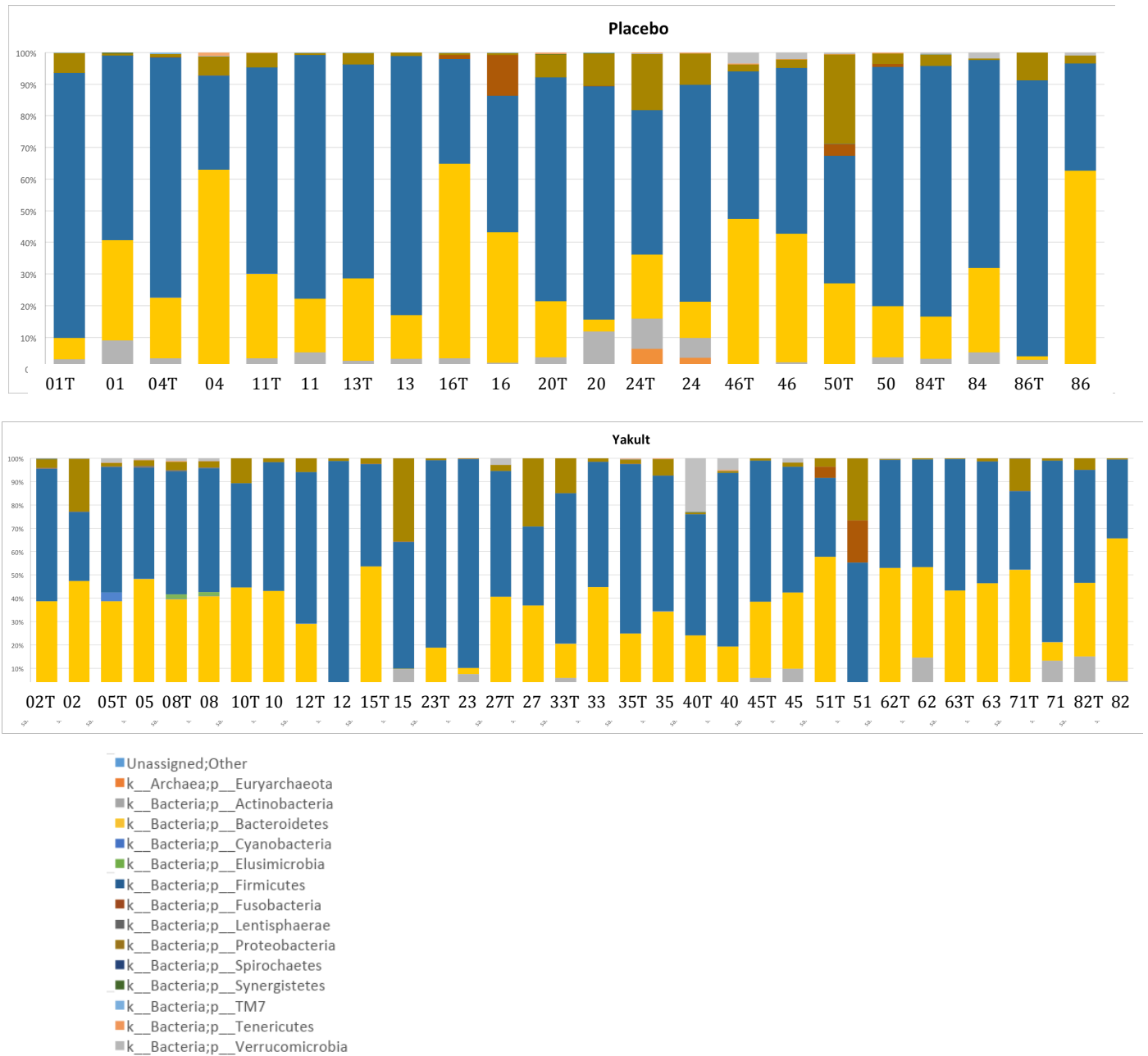
Tabela 10- Efeito da intervenção do estudo na diferenciação dos subconjuntos e na atividade das células NK (Continua)

	Composto ativo N=24	Placebo N=24	p
V12			
%Células NK (CD56++ CD16-)	0,5 (0,2 - 0,9)	0,3 (-0,1 - 0,9)	0,371
% Células NK (CD56+ CD16+)	-6,7 (-11,1 - -3,4)	-4,2 (-9,1 - -1,9)	0,212
% Células NK (CD56+ CD16-)	3,6 (-0,6 - 6,3)	1,5 (-1,7 - 4,5)	0,384
% Células NK (CD56- CD16+)	-1,0 (-2,0 - -0,5)	-0,6 (-2,3 - 0,2)	0,378
% Células NK (CD56- CD16-)	4,3 (2,8 - 6,0)	3,4 (1,8 - 6,7)	0,830
% Células NK (total)	-4,0 (-6,0 - -2,5)	-2,3 (-6,2 - -1,3)	0,723
% CD107a+IFN γ +(total)	9,5 (6,5 - 13,5)	4,8 (3,5 - 7,7)	0,016
% CD107a+(total)	6,6 (5,7 - 8,7)	3,5 (2,1 - 6,8)	0,007
% IFN γ +(total)	-0,1 (-0,6 - 0,4)	-0,1 (-0,5 - 0,1)	0,889
%Células NK na pop. linfocitária (total)	-0,3 (-0,8 - 0,3)	0,0 (-0,1 - 0,6)	0,105
V6-V0			
%Células NK (CD56++ CD16-)	-0,1 (-0,6 - 0,6)	0,2 (-0,3 - 0,4)	0,105
Diferença entre condição estimulada (linhagem celular K562) e condição não estimulada			
	Composto ativo N=24	Placebo N=24	p
% Células NK (CD56+ CD16-)	-2,0 (-4,2 - 2,3)	-0,1 (-1,8 - 2,3)	0,214
% Células NK (CD56- CD16+)	0,4 (-0,6 - 0,9)	0,8 (-0,4 - 1,6)	0,326
% Células NK (CD56- CD16-)	-0,7 (-1,2 - 5,1)	0,7 (-1,3 - 2,7)	0,542
% Células NK (total)	0,5 (-5,0 - 0,8)	0,1 (-2,0 - 4,0)	0,641
% CD107a+IFN γ +(total)	1,3 (-0,2 - 2,6)	0,6 (-0,2 - 4,2)	0,834
% CD107a+(total)	0,8 (-4,5 - 3,1)	0,3 (-1,4 - 3,8)	0,601
% IFN γ +(total)	0,8 (-0,8 - 2,2)	0,9 (-0,6 - 3,4)	0,753
% Células NK na pop. linfocitária (total)	-0,2 (-0,8 - 0,6)	0,0 (-0,5 - 0,4)	0,656
V12-V0			
% Células NK(CD56++ CD16-)	-0,1 (-0,6 - 0,6)	0,2 (-0,3 - 0,4)	0,570
% Células NK (CD56+ CD16+)	-0,8 (-3,3 - 1,5)	-1,0 (-5,0 - 2,5)	0,866
% Células NK (CD56+ CD16-)	-0,8 (-3,9 - 4,2)	0,9 (-2,7 - 3,7)	0,217
% Células NK (CD56- CD16+)	-0,2 (-1,3 - 0,8)	0,5 (-0,3 - 2,2)	0,054
% Células NK (CD56- CD16-)	-1,1 (-2,6 - 2,1)	-0,3 (-3,2 - 0,9)	0,979
% Células NK (total)	0,9 (-4,3 - 1,2)	0,1 (-0,7 - 0,9)	0,985
% CD107a+IFN γ +(total)	2,0 (0,1 - 4,8)	0,7 (-0,1 - 2,9)	0,420
% CD107a+(total)	2,2 (-2,6 - 5,4)	0,6 (-0,4 - 3,5)	0,705
% IFN γ +(total)	2,5 (0,5 - 4,1)	0,7 (-0,6 - 2,9)	0,332
Células NK na pop. linfocitária (total)	0,0 (-0,3 - 0,8)	0,1 (-0,3 - 0,5)	0,810

Análise do microbioma em amostra de fezes

As amostras de fezes foram obtidas a partir de 11 participantes do grupo placebo e 17 do grupo composto ativo. Coletado amostras no basal e na visita 12 para a análise do proteoma microbiano.

A figura 8 mostra a composição do microbioma em nível de Filo, entre os grupos composto ativo e placebo.



A primeira barra representa amostra da tragem (T) e a segunda amostra da semana 12

Figura 8- Composição do microbioma em nível de Filos, entre os grupos composto ativo e placebo

Não encontramos diferença significativa na alfa-diversidade (número de diferentes espécies bacterianas) comparando os grupos no início do estudo e na V12, como demonstrado na Figura 9.

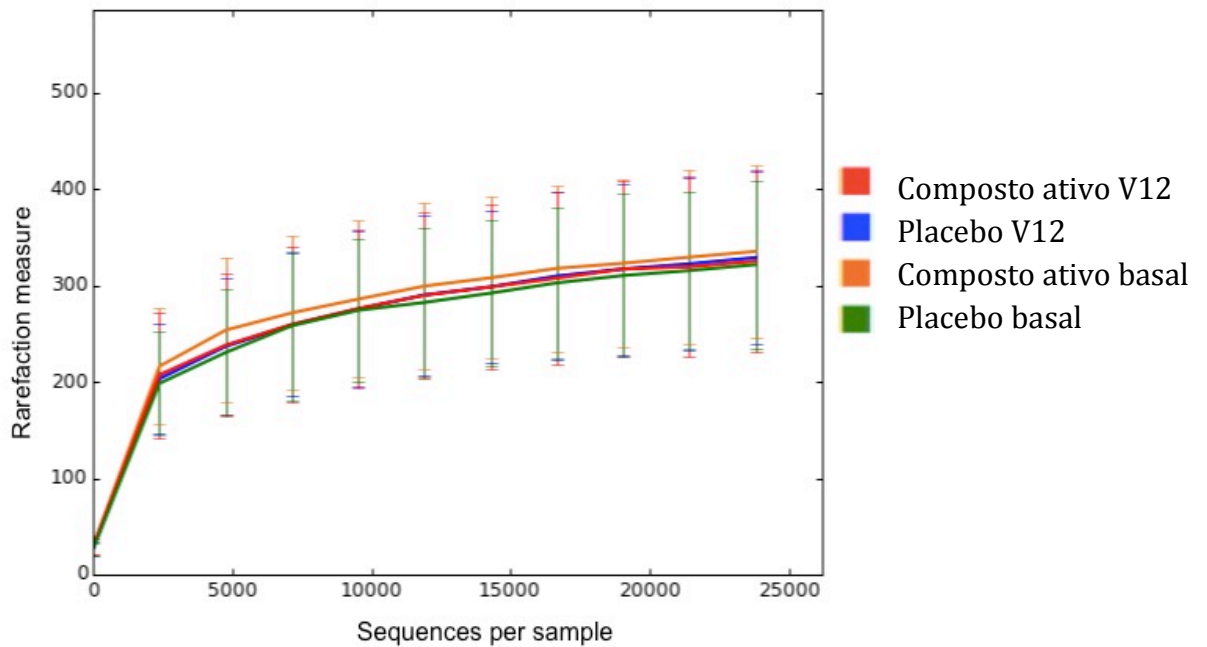


Figura 9- Alfa-diversidade nos grupos composto ativo e placebo no basal e V12

Comparamos grupos de intervenção ativa e placebo, bem como grupo de intervenção ativa no início do estudo *versus* V12 para a composição do microbioma entérico com foco em táxons que foram previamente descritos como aumentados ou depletados em pacientes infectados pelo HIV (Tabela 11)(DILLON; FRANK; WILSON, 2016; GOOTENBERG et al., 2017). Observamos um aumento estatisticamente significativo apenas na família *Bacteroidaceae* na V12 (média 12,52%, IC 95% 5,98-19,06) em comparação com o valor basal (média de 6,99%, IC 95% 1,84 a 12,13; $p = 0,0422$) restrito ao grupo de intervenção ativa.

Tabela 11- Bactérias incluídas na análise para análise exploratória do efeito da intervenção no microbioma intestinal

Filo	Classe	Ordem	Familia	Efeito HIV	Efeito intervenção
<i>Firmicutes</i>				↓	NS
<i>Fusobacteria</i>				↑	NS
<i>Proteobacteria</i>				↑	NS
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>			↓	NS
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>		↓	NS
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	↓	↑
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	↓	NS
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Rikenellaceae</i>	↓	NS
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	↓	NS
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	↓	NS
<i>Firmicutes</i>	<i>Erysipelotrichi</i>	<i>Erysipelotrichales</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i>	↑	NS
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteo-bacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	↑	NS

NS=não estatisticamente significativa

ND=não descrito

5. Discussão

Neste estudo não demonstramos benefício do uso de *Lactobacillus casei* Shirota na recuperação imunológica, bem como na redução nos níveis de marcadores de ativação celular, em pessoas vivendo com HIV.

No entanto, observamos que a relação CD4/CD8 foi significativamente maior naqueles que receberam o composto ativo nas semanas 12 e 24 em comparação com o placebo ($p = 0,027$ e $p = 0,002$); o aumento médio da taxa de CD4 / CD8 foi maior no grupo de intervenção em comparação com usuários de placebo (respectivamente 0,07 e 0,01), mas essa diferença não atingiu significância estatística ($p = 0,171$). Em indivíduos sem infecção pelo HIV uma relação CD4/CD8 inferior a 1 está relacionado à imunosenescência e maior morbimortalidade (MULLER et al., 2015). Serrano-Villar demonstrou que a relação CD4 / CD8 é inversamente correlacionada com LT CD4 + ativados (HLADR + CD38 +) e células T CD8 + (HLADR +) em pacientes com infecção pelo HIV (SERRANO-VILLAR et al., 2014). Estes autores estudaram 132 indivíduos infectados pelo HIV com supressão viral em longo prazo e LTCD4+ superior 350 células, e demonstraram que baixa relação CD4 / CD8 foi encontrada em pacientes com marcadores de doença associada à idade (maior espessura da camada íntima-média, rigidez arterial mais elevada, e menor taxa estimada de filtração glomerular).

Uma redução na relação CD4 / CD8 também foi associada à menor persistência de anticorpos contra a febre amarela entre os indivíduos vacinados com HIV (AVELINO-SILVA et al., 2016). Intervenções para reduzir a ativação imune residual, representada pela relação CD4 / CD8, provavelmente melhorarão os desfechos clínicos em indivíduos infectados pelo HIV em tratamento antirretroviral.

Estudos recentes demonstraram uma associação entre os marcadores da translocação bacteriana, ou seja, os níveis de lipopolissacarídeo (LPS) plasmático e de sCD14, com prognóstico e recuperação dos níveis de células T CD4+ em pacientes infectados pelo HIV (MARCHETTI et al., 2011).

Villar-Garcia (VILLAR-GARCÍA et al., 2015) demonstrou em 44 pacientes com infecção pelo HIV, randomizados para receberem probióticos contendo *Saccharomyces boulardii* ou placebo, uma redução nos níveis de proteína ligadora de lipopolissarídeos (LPB) e de interleucina 6, evidenciando redução na translocação bacteriana e inflamação respectivamente. Um outro estudo randomizado, porém em pacientes virêmicos, evidenciou redução nos níveis de sCD14 e aumento nos níveis de células NK (GORI et al., 2011).

Alguns estudos randomizados que incluíram aumento de LTCD4+ como desfecho principal evidenciaram benefício desta forma terapêutica. Anukam et al. avaliaram mulheres na Nigéria, com CD4 inferior a 200 células e virgens de ARV. Foram randomizadas para receberem iogurte ou iogurte com adição de probióticos (*L. Rhamnosus* e *L. Reuteri*) por 30 dias (n=24). O grupo de que recebeu somente iogurte apresentou um decréscimo de 2,2 cels T CD4+ e o grupo que recebeu iogurte mais probióticos apresentou um aumento de 6,7 cels T CD4+ (p=0,02) (ANUKAM et al., 2008). Outro estudo também em pacientes virgens de tratamento ARV evidenciou benefício em relação a aumento de CD4 com uso de uma fórmula nutricional imunomodulatória, com incremento de 28 células /mm³ no grupo intervenção comparado com redução de 68 células/mm³ no grupo placebo (p=0,03). Importante ressaltar que neste estudo pacientes tinham níveis de CD4 mais elevados (média 425/mm³)(CAHN et al., 2013).

Alguns estudos observacionais também demonstraram benefício desta estratégia. Um estudo foi conduzido em crianças brasileiras (2-12 anos) com uma fórmula que contém *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus thermophilus*. Foi demonstrado um aumento significativo da contagem das células T CD4+ após dois meses de consumo da fórmula, comparando com uma fórmula padrão. No entanto, os resultados deste estudo são limitados devido à elevada heterogeneidade da população com pacientes em tratamento antirretroviral supressivo e não supressivo (TROIS; CARDOSO; MIURA, 2008). Outro estudo decorreu na Tanzânia com o consumo do iogurte *Lactobacillus rhamnosus* GR-1. Este estudo foi observacional e retrospectivo, com inclusão de pacientes com e sem tratamento antirretroviral, com ingestão do iogurte em curto prazo (70 dias). Quando comparado, os consumidores do iogurte tiveram um aumento significativo da contagem das células T CD4+, comparando com aqueles não consumidores (IRVINE et al., 2010).

Alguns autores também não encontraram diferenças significativas em relação à recuperação imunológica, translocação bacteriana ou ativação celular com o uso de diferentes probióticos (FALASCA et al., 2015; HEISER et al., 2004; HEMSWORTH; HEKMAT; REID, 2012; HUMMELEN et al., 2011a). Diferentes concentrações e cepas de probióticos podem não desencadear o mesmo efeito imunoestimulatório (GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ et al., 2012)

Apesar da randomização, nosso estudo apresenta limitações pois os grupos foram desequilibrados em relação aos níveis de nadir de L T CD4 +. O grupo placebo apresentou menor nadir mediano de LTCD4+ do que o grupo de intervenção (70 células / mm³ versus 141 células / mm³, respectivamente, p = 0,019). Não detectamos falhas no processo de randomização do estudo que

poderiam justificar essa diferença nas distribuições de nadir de LTCD4+ entre os grupos. Portanto, assumimos que essa diferença ocorreu por acaso, como é frequentemente observado em estudos com tamanho de amostra limitado. Destaca-se que tínhamos 7 indivíduos sem dados de nadir de LTCD4 +, 3 no grupo de intervenção ativa e 4 no grupo placebo.

Avaliamos que é possível que a população de pacientes selecionada tenha comprometimento das respostas imunes para se beneficiar do uso do produto. Por outro lado consideramos também que uma população com níveis menores de LT CD4+ (i.e indivíduos com CD4 inferior a 200 cels/mm³) poderia ter algum efeito benéfico do uso da estratégia. Neste estudo a média de CD4 no basal foi de 358 cels/mm³. Outro fator a ser considerado é o pequeno tamanho da amostra que pode não ter sido suficiente para detectar qualquer efeito benéfico do uso de probiótico contendo *Lactobacillus casei* Shirota nesta população específica.

A avaliação de adesão ao uso do probiotico ou placebo foi veriificada com a contagem de frascos retornados bem como descrição diária de ingesta pelos participantes. É possível que a ingestão de produtos possa não ter sido reportada adequadamente, porém acreditamos que o uso indevido de probiótico para explicar os resultados é improvável, considerando o desenho do estudo duplo-cego e os métodos para detectar a ingestão de produtos.

Em relação a análise do microbioma de uma parte dos indivíduos do estudo, pudemos observar um aumento estatisticamente significativo na abundância de *Bacteroidaceae* em 12 semanas após o uso do composto ativo. Esta família é geralmente considerada por ter um papel antiinflamatório, e como demonstrado por Gootenberg e colaboradores (2017), está diminuída

nos pacientes com infecção pelo HIV-1 (GOOTENBERG et al., 2017).

Estudos recentes demonstraram que alteração na composição e na função do microbioma gastrointestinal estão associadas a muitas doenças incluindo a infecção pelo HIV (LOZUPONE et al., 2013).

Alterações induzidas pelo HIV na microbiota intestinal são mais comumente caracterizadas por redução na diversidade, com redução de bactérias do gênero *Bacteroides* e aumento de bactérias do genero *Prevotella*. Estes dois gêneros são conhecidos como importantes condutores da ecologia intestinal e da função. Assim, alterações na quantidade dessas bactérias podem ter consequências para o microbioma intestinal e para o hospedeiro (ZEVIN et al., 2016).

Outros géneros bacterianos que estão reduzidos na infecção pelo HIV são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Coprococcus*, *Eubacterium*, *Blautia* e *Ruminococcus*. Por outro lado há um aumento de microorganismos patogênicos como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Escherichia* e *Desulfovibrio*. *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. são geralmente consideradas benéficas, especialmente no contexto da imunidade mucosa (DILLON; FRANK; WILSON, 2016; VÁZQUEZ-CASTELLANOS et al., 2015, 2018).

Mutlu e colaboradores (2014) mostrou que níveis plasmáticos de IL-6 estavam inversamente relacionados com abundância de *Bacteroides*, o que seria consistente com uma propriedade antiinflamatória de algumas espécies deste gênero (MUTLU et al., 2014). Outros autores também evidenciaram aumento de marcadores de translocação bacteriana (LPS e sCD14), correlacionados com incremento de *Lachnospira* e *Roseburia* em pacientes

vivendo com HIV (DILLON; FRANK; WILSON, 2016; WILLIAMS; LANDAY; PRESTI, 2016).

Villar-Garcia (2017) demonstrou uma alteração na composição do microbioma intestinal após tratamento com probiótico (*S. boulardii*) por 12 semanas em 44 pacientes com infecção pelo HIV-1, com uma diminuição em algumas espécies que estão diretamente correlacionadas com níveis sistêmicos de translocação microbiana e inflamação (VILLAR-GARCÍA et al., 2017).

Não foi demonstrado ainda associação entre a composição da microbiota e níveis de L TCD4+ (LOZUPONE et al., 2014).

As conseqüências imunológicas de longo prazo de um baixo nadir de LTCD4 + poderiam ofuscar o sucesso das intervenções imunomoduladoras, ou os efeitos da TARV na restauração imunológica são tão grandes que ofuscam quaisquer efeitos menores que possam ser observados com a imunonutrição (SERRANO-VILLAR et al., 2018).

Podemos observar na literatura que não há concordância, ainda, se o uso de alimentos funcionais pode realmente melhorar a inflamação e recuperação imunológica nesta população. Diferentes estudos, com formulação de diferentes espécies de probióticos e tempo de uso também bastante diverso, assim como população estudada (virgens de tratamento, virêmicos e avirêmicos) ainda não permitem uma conclusão clara sobre o assunto. Os dados gerais publicados sobre este tópico ainda são limitados e mais pesquisas são necessárias para melhor elucidar os possíveis mecanismos de ação dos probióticos, bem como seu papel na regulação da reconstituição

imunológica e outros benefícios à saúde da população vivendo com HIV com supressão virológica.

6. Conclusão

Neste estudo não encontramos nenhum efeito significativo com o uso de probiótico contendo *Lactobacillus casei* Shirota no número de LT CD4 + ou na ativação imune entre pacientes vivendo com HIV, em TARV supressiva, com baixa recuperação de LTCD4+.

Um aumento estatisticamente significativo na abundância de *Bacteroidaceae* em foi observado para os participantes alocados no grupo intervenção.

7. Anexo

Anexo 1 – Parecer Consubstanciado do CEP



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: EFEITOS IMUNOLÓGICOS NO USO CONTINUADO DE LACTOBACILLUS CASEI SHIROTA, UMA VEZ AO DIA, EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV, EM TRATAMENTO ANTIRRETROVIRAL SUPRESSIVO, COM BAIXA RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS T CD4+. VERSÃO: 1.0 DE 01 DE MAIO DE 2013

Pesquisador Responsável: Esper Georges Kallás

Versão: 2

Pesquisador Executante: Esper Georges Kallás

CAAE: 20126613.9.0000.0068

Instituição: HCFMUSP

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 11156

Número do Parecer: 492.507

Data da Relatoria: 11/12/13

Apresentação do Projeto: Neste estudo, os pacientes com baixa recuperação de células T CD4+ e um controle viral bem sucedido depois de um tratamento antirretroviral, serão incluídos para receberem diariamente Lactobacillus casei Shirota ou um placebo, num estudo duplo-cego, de forma randomizada. O objetivo principal consiste em investigar se o uso continuado, uma vez ao dia, durante 12 semanas do produto Yakult, que contém Lactobacillus casei Shirota, pode afetar os parâmetros imunológicos em pacientes com infecção pelo HIV, em tratamento antirretroviral supressivo, com baixa recuperação de células T CD4+. Um total de 48 voluntários será acompanhado durante 12 semanas após o início do uso diário de Lactobacillus casei Shirota ou do placebo, randomizado numa proporção de 1:1. Nossa hipótese define que o uso do produto Yakult que inclui Lactobacillus casei Shirota após 12 semanas de uso continuado irá aumentar o nível das células T CD4+, ao menos em 50 células/mm³. Também serão pesquisados diversos marcadores de resposta imunológica, incluindo a ativação das células T, o funcionamento das células NK e alterações na microbiota intestinal.

Objetivo da Pesquisa: Pesquisar se o uso continuado, uma vez ao dia, durante 12 semanas do produto Yakult, que contém Lactobacillus casei Shirota, pode afetar os parâmetros imunológicos em pacientes infectados pelo HIV, em tratamento antirretroviral supressivo com baixa recuperação de células T CD4+.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os produtos do estudo, que contém Lactobacillus casei Shirota, e o placebo têm um valor nutricional importante, tal como qualquer produto diário. Adicionalmente, os produtos que contém Lactobacillus casei Shirota são bastante reconhecidos como alimento funcional que pode ajudar no funcionamento regular do trato

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

gastrointestinal. O uso de intervenções outras que medicamentos, para regular o estado imunológico, parece ser uma intervenção custo-efetiva para pacientes infectados pelo HIV, por retardar o início da terapia antirretroviral. Entre estas intervenções, as intervenções baseadas na alimentação com probióticos surgiram como as mais promissoras levando-se em consideração a importância do tecido linfóide associado à mucosa ao longo do intestino.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Pesquisa com delineamento e justificativa adequados. O aumento da contagem das células T CD4+ é o parâmetro mais significativo para medir o efeito imunológico nesta população e se os probióticos se apresentarem como benéficos para esta população, eles podem constituir um tratamento nutricional auxiliar, seguro e de baixo custo para pacientes infectados pelo HIV.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: As recomendações/sugestões relacionadas aos termos obrigatórios foram atendidas/corrigidas, não restando outras sugestões ou correções a serem feitas.

Recomendações: Nada a acrescentar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Correções propostas foram realizadas e não há outras pendências.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 13 de Dezembro de 2013

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Vice-Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

8. Referências Bibliográficas

ABUL K ABBAS; ANDREW H LICHTMAN; SHIV PILLAI. **Imunologia Celular e Moleculular**. 8ª edição ed. [s.l.] Elsevier, 2015.

AIUTI, F.; MEZZAROMA, I. Failure to reconstitute CD4+ T-cells despite suppression of HIV replication under HAART. **AIDS reviews**, v. 8, n. 2, p. 88–97, jun. 2006.

ANCUTA, P. et al. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. **PloS One**, v. 3, n. 6, p. e2516, 25 jun. 2008.

ANUKAM, K. 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, mar. 2008.

APPAY, V.; ROWLAND-JONES, S. L. Lessons from the study of T-cell differentiation in persistent human virus infection. **Seminars in Immunology**, v. 16, n. 3, p. 205–212, jun. 2004.

AVELINO-SILVA, V. I. et al. Aging and HIV infection. **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 163–172, jan. 2011.

AVELINO-SILVA, V. I. et al. CD4/CD8 Ratio Predicts Yellow Fever Vaccine-Induced Antibody Titers in Virologically Suppressed HIV-Infected Patients. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)**, v. 71, n. 2, p. 189–195, 1 fev. 2016.

BAKER, J. V. et al. Poor initial CD4+ recovery with antiretroviral therapy prolongs immune depletion and increases risk for AIDS and non-AIDS diseases. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)**, v. 48, n. 5, p. 541–546, 15 ago. 2008.

BANDERA, A. et al. Altered gut microbiome composition in HIV infection: causes, effects and potential intervention. **Current opinion in HIV and AIDS**, v. 13, n. 1, p. 73–80, jan. 2018.

BARTOVSKÁ, Z. et al. Antiretroviral treatment of HIV infection does not influence HIV-specific immunity but has an impact on non-specific immune activation. **Current HIV research**, v. 9, n. 2, p. 88–94, mar. 2011.

BOYLE, R. J.; ROBINS-BROWNE, R. M.; TANG, M. L. K. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1256–1264; quiz 1446–1447, jun. 2006.

BRENCHLEY, J. 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, dez. 2006.

BRENCHLEY, J. M.; DOUEK, D. C. HIV infection and the gastrointestinal immune system. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 1, p. 23–30, jan. 2008.

CAHN, P. et al. The immunomodulatory nutritional intervention NR100157 reduced CD4+ T-cell decline and immune activation: a 1-year multicenter randomized controlled double-blind trial in HIV-infected persons not receiving antiretroviral therapy (The BITE Study). **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 57, n. 1, p. 139–146, jul. 2013.

CARTER, G. M. et al. Probiotics in Human Immunodeficiency Virus Infection: A Systematic Review and Evidence Synthesis of Benefits and Risks. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. ofw164, out. 2016.

CHOU, J. P. et al. Accelerated aging in HIV/AIDS: novel biomarkers of senescent human CD8+ T cells. **PloS One**, v. 8, n. 5, p. e64702, 2013.

CHUN, T.-W. et al. Relationship between residual plasma viremia and the size of HIV proviral DNA reservoirs in infected individuals receiving effective antiretroviral therapy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 1, p. 135–138, 1 jul. 2011.

D'ETTORRE, G. et al. Probiotics Reduce Inflammation in Antiretroviral Treated, HIV-Infected Individuals: Results of the “Probio-HIV” Clinical Trial. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0137200, 16 set. 2015.

DILLON, S. M.; FRANK, D. N.; WILSON, C. C. The gut microbiome and HIV-1 pathogenesis: a two-way street. **AIDS (London, England)**, v. 30, n. 18, p. 2737–2751, 28 2016.

FALASCA, K. et al. Effect of Probiotic Supplement on Cytokine Levels in HIV-Infected Individuals: A Preliminary Study. **Nutrients**, v. 7, n. 10, p. 8335–8347, 28 set. 2015.

FALSTER, K. et al. Poor baseline immune function predicts an incomplete immune response to combination antiretroviral treatment despite sustained viral suppression. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)**, v. 50, n. 3, p. 307–313, 1 mar. 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION (EDS.). **Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations: World Health Organization, 2006.

GANDHI, R. T. et al. The effect of raltegravir intensification on low-level residual viremia in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: a randomized controlled trial. **PLoS medicine**, v. 7, n. 8, 10 ago. 2010.

GAUTAM, N. et al. Role of multivitamins, micronutrients and probiotics supplementation in management of HIV infected children. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 81, n. 12, p. 1315–1320, dez. 2014.

GAZZOLA, L. et al. The absence of CD4+ T cell count recovery despite receipt of virologically suppressive highly active antiretroviral therapy: clinical risk, immunological gaps, and therapeutic options. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 48, n. 3, p. 328–337, 1 fev. 2009.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401–1412, jun. 1995.

GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, L. A. et al. Synbiotic therapy decreases microbial translocation and inflammation and improves immunological status in HIV-infected patients: a double-blind randomized controlled pilot trial. **Nutrition Journal**, v. 11, p. 90, 29 out. 2012.

GOOTENBERG, D. B. et al. HIV-associated changes in the enteric microbial community: potential role in loss of homeostasis and development of systemic inflammation. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 31–43, fev. 2017.

GORI, A. et al. Specific prebiotics modulate gut microbiota and immune activation in HAART-naive HIV-infected adults: results of the “COPA” pilot randomized trial. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 5, p. 554–563, set. 2011.

GOTTLIEB, M. S. et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. **The New England Journal of Medicine**, v. 305, n. 24, p. 1425–1431, 10 dez. 1981.

GREUB, G. et al. Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. **Lancet (London, England)**, v. 356, n. 9244, p. 1800–1805, 25 nov. 2000.

HATANO, H. et al. A randomized, controlled trial of raltegravir intensification in antiretroviral-treated, HIV-infected patients with a suboptimal CD4+ T cell response. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 7, p. 960–968, 1 abr. 2011.

HEISER, C. R. et al. Probiotics, soluble fiber, and L-Glutamine (GLN) reduce nelfinavir (NFV)- or lopinavir/ritonavir (LPV/r)-related diarrhea. **Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care (Chicago, Ill.: 2002)**, v. 3, n. 4, p. 121–129, dez. 2004.

HEMSWORTH, J. C.; HEKMAT, S.; REID, G. Micronutrient supplemented probiotic yogurt for HIV-infected adults taking HAART in London, Canada. **Gut Microbes**, v. 3, n. 5, p. 414–419, out. 2012.

HUMMELEN, R. et al. Effect of micronutrient and probiotic fortified yogurt on immune-function of anti-retroviral therapy naive HIV patients. **Nutrients**, v. 3, n. 10, p. 897–909, 2011a.

HUMMELEN, R. et al. Effect of 25 weeks probiotic supplementation on immune function of HIV patients. **Gut Microbes**, v. 2, n. 2, p. 80–85, abr. 2011b.

HUNT, P. W. et al. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 10, p. 1534–1543, 15 maio 2003a.

HUNT, P. W. et al. Continued CD4 cell count increases in HIV-infected adults experiencing 4 years of viral suppression on antiretroviral therapy. **AIDS (London, England)**, v. 17, n. 13, p. 1907–1915, 5 set. 2003b.

IRVINE, S. L. et al. Probiotic yogurt consumption is associated with an increase of CD4 count among people living with HIV/AIDS. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 44, n. 9, p. e201-205, out. 2010.

IRVINE, S. L.; HUMMELEN, R.; HEKMAT, S. Probiotic yogurt consumption may improve gastrointestinal symptoms, productivity, and nutritional intake of people living with human immunodeficiency virus in Mwanza, Tanzania. **Nutrition Research (New York, N.Y.)**, v. 31, n. 12, p. 875–881, dez. 2011.

ISGRÒ, A. et al. Altered clonogenic capability and stromal cell function characterize bone marrow of HIV-infected subjects with low CD4+ T cell counts despite viral suppression during HAART. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 46, n. 12, p. 1902–1910, 15 jun. 2008.

JIANG, W. et al. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 8, p. 1177–1185, 15 abr. 2009.

KARIM, R. et al. Association of HIV clinical disease progression with profiles of early immune activation: results from a cluster analysis approach. **AIDS (London, England)**, v. 27, n. 9, p. 1473–1481, 1 jun. 2013.

KAUFMANN, G. R. et al. Characteristics, determinants, and clinical relevance of CD4 T cell recovery to <500 cells/microL in HIV type 1-infected individuals receiving potent antiretroviral therapy. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 41, n. 3, p. 361–372, 1 ago. 2005.

KHALESİ, S. et al. A review of probiotic supplementation in healthy adults: helpful or hype? **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 1, p. 24–37, jan. 2019.

KLATT, N. R. et al. Immune activation and HIV persistence: Implications for curative approaches to HIV infection. **Immunological reviews**, v. 254, n. 1, p. 326–342, jul. 2013.

- KLATT, N. R.; FUNDERBURG, N. T.; BRECHLEY, J. M. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 6–13, jan. 2013.
- KOTLER, D. P.; REKA, S.; CLAYTON, F. Intestinal mucosal inflammation associated with human immunodeficiency virus infection. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 38, n. 6, p. 1119–1127, jun. 1993.
- LEVY, J. A. The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 6, p. 312–316, jun. 2001.
- LEVY, J. A. **HIV e a patogénia da AIDS**. 1. ed. [s.l.] Editora Unifesp, 2010.
- LEVY, J. A.; SCOTT, I.; MACKEWICZ, C. Protection from HIV/AIDS: the importance of innate immunity. **Clinical Immunology (Orlando, Fla.)**, v. 108, n. 3, p. 167–174, set. 2003.
- LONG, B. R. et al. Increased number and function of natural killer cells in human immunodeficiency virus 1-positive subjects co-infected with herpes simplex virus 2. **Immunology**, v. 129, n. 2, p. 186–196, fev. 2010.
- LOZUPONE, C. A. et al. Alterations in the gut microbiota associated with HIV-1 infection. **Cell Host & Microbe**, v. 14, n. 3, p. 329–339, 11 set. 2013.
- LOZUPONE, C. A. et al. HIV-induced alteration in gut microbiota: driving factors, consequences, and effects of antiretroviral therapy. **Gut Microbes**, v. 5, n. 4, p. 562–570, 1 jul. 2014.
- MACPHERSON, A. J.; GEUKING, M. B.; MCCOY, K. D. Homeland security: IgA immunity at the frontiers of the body. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 4, p. 160–167, abr. 2012.
- MARCHETTI, G. et al. Microbial translocation predicts disease progression of HIV-infected antiretroviral-naive patients with high CD4+ cell count. **AIDS (London, England)**, v. 25, n. 11, p. 1385–1394, 17 jul. 2011.
- MASSANELLA, M. et al. CD4 T-cell hyperactivation and susceptibility to cell death determine poor CD4 T-cell recovery during suppressive HAART. **AIDS (London, England)**, v. 24, n. 7, p. 959–968, 24 abr. 2010.
- MAVIGNER, M. et al. HIV-1 residual viremia correlates with persistent T-cell activation in poor immunological responders to combination antiretroviral therapy. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7658, 30 out. 2009.
- MEHANDRU, S. et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 6, p. 761–770, 20 set. 2004.
- MOORE, R. D.; KERULY, J. C. CD4+ cell count 6 years after commencement of highly active antiretroviral therapy in persons with sustained virologic

suppression. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 44, n. 3, p. 441–446, 1 fev. 2007.

MULLER, G. C. et al. The inverted CD4:CD8 ratio is associated with gender-related changes in oxidative stress during aging. **Cellular Immunology**, v. 296, n. 2, p. 149–154, ago. 2015.

MUTLU, E. 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. e1003829, fev. 2014.

PALELLA, F. J. et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 13, p. 853–860, 26 mar. 1998.

PÉREZ-SANTIAGO, J. et al. Gut Lactobacillales are associated with higher CD4 and less microbial translocation during HIV infection. **AIDS (London, England)**, v. 27, n. 12, p. 1921–1931, 31 jul. 2013.

PONTES, R. M. A. et al. [Quality of life in patients with inflammatory bowel diseases: translation to Portuguese language and validation of the “Inflammatory Bowel Disease Questionnaire” (IBDQ)]. **Arquivos De Gastroenterologia**, v. 41, n. 2, p. 137–143, jun. 2004.

RAJASURIAR, R. et al. Biological determinants of immune reconstitution in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: the role of interleukin 7 and interleukin 7 receptor α and microbial translocation. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 8, p. 1254–1264, 15 out. 2010.

REEKIE, J. et al. Relationship between current level of immunodeficiency and non-acquired immunodeficiency syndrome-defining malignancies. **Cancer**, v. 116, n. 22, p. 5306–5315, 15 nov. 2010.

SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 745–763, 2004.

SCHUNTER, M. et al. Randomized pilot trial of a synbiotic dietary supplement in chronic HIV-1 infection. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, p. 84, 29 jun. 2012.

SERRANO-VILLAR, S. et al. HIV-infected individuals with low CD4/CD8 ratio despite effective antiretroviral therapy exhibit altered T cell subsets, heightened CD8+ T cell activation, and increased risk of non-AIDS morbidity and mortality. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004078, maio 2014.

SERRANO-VILLAR, S. et al. Effects of Immunonutrition in Advanced HIV Disease: a Randomized Placebo Controlled Clinical Trial (Promaltia Study). **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, 16 maio 2018.

SMITH, C. J. et al. Factors influencing increases in CD4 cell counts of HIV-positive persons receiving long-term highly active antiretroviral therapy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 10, p. 1860–1868, 15 nov. 2004.

TARWATER, P. M. et al. Increase and plateau of CD4 T-cell counts in the 3(1/2) years after initiation of potent antiretroviral therapy. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)**, v. 27, n. 2, p. 168–175, 1 jun. 2001.

TEIXEIRA, L. et al. Poor CD4 T cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function. **AIDS (London, England)**, v. 15, n. 14, p. 1749–1756, 28 set. 2001.

THAISS, C. A. et al. The interplay between the innate immune system and the microbiota. **Current Opinion in Immunology**, v. 26, p. 41–48, fev. 2014.

TROIS, L.; CARDOSO, E. M.; MIURA, E. Use of probiotics in HIV-infected children: a randomized double-blind controlled study. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 54, n. 1, p. 19–24, fev. 2008.

ULLRICH, R.; ZEITZ, M.; RIECKEN, E. O. Enteric immunologic abnormalities in human immunodeficiency virus infection. **Seminars in Liver Disease**, v. 12, n. 2, p. 167–174, maio 1992.

VALDEZ, H. et al. Limited immune restoration after 3 years' suppression of HIV-1 replication in patients with moderately advanced disease. **AIDS (London, England)**, v. 16, n. 14, p. 1859–1866, 27 set. 2002.

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, jul. 2015.

VÁZQUEZ-CASTELLANOS, J. F. et al. Interplay between gut microbiota metabolism and inflammation in HIV infection. **The ISME Journal**, v. 12, n. 8, p. 1964–1976, ago. 2018.

VIARD, J. P. et al. Influence of age on CD4 cell recovery in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy: evidence from the EuroSIDA study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 8, p. 1290–1294, 15 abr. 2001.

VILLAR-GARCÍA, J. 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 (1999)**, v. 68, n. 3, p. 256–263, 1 mar. 2015.

VILLAR-GARCÍA, J. et al. Impact of probiotic *Saccharomyces boulardii* on the gut microbiome composition in HIV-treated patients: A double-blind, randomised, placebo-controlled trial. **PloS One**, v. 12, n. 4, p. e0173802, 2017.

WILLIAMS, B.; LANDAY, A.; PRESTI, R. M. Microbiome alterations in HIV infection a review. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 645–651, maio 2016.

ZEVIN, A. 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, mar. 2016.