



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA

ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA INTESTINAL
DE PACIENTES HIV POSITIVOS CONTROLADORES DE ELITE

Luisa Cruz Silveira

Florianópolis
2019

Luisa Cruz Silveira

**ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA
INTESTINAL DE PACIENTES HIV POSITIVOS
CONTROLADORES DE ELITE**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina para obtenção do Grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo
Roberto Pinto.

Coorientador: Msc. Aline Machiavelli.

Florianópolis
2019

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

A ficha de identificação é elaborada pelo próprio autor
Maiores informações em:
<http://portalbu.ufsc.br/ficha>

Luisa Cruz Silveira

**ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIOLÓGIA INTESTINAL
DE PACIENTES HIV POSITIVOS CONTROLADORES DE
ELITE**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para
obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas e aprovado
em sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas.

Florianópolis, xx de xxxxx de xxxx.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Erasmo Benício Santos Moraes Trindade
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus pais, que me ensinaram que nenhum obstáculo é grande demais para ser vencido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, professor Aguinaldo R. Pinto, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e por toda confiança.

À minha coorientadora, Aline Machiavelli, por toda paciência e dedicação. Agradeço pela sua forma tão leve de ensinar, que me fizeram não apenas aprender, mas me abriu portas para oportunidades que eu nunca imaginei que seriam possíveis. Todo meu carinho e admiração por você.

Ao Wellington, por ter me permitido participar desse projeto e por toda parceria em todas as dificuldades e nas longas horas de trabalho.

A todos os meus colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada, por me receberem tão bem desde o início.

Ao professor Glauber Wagner, pela ajuda com o acesso ao servidor da UFSC.

Aos professores Rubens Tadeu Duarte, Erasmo Benício Trindade e Andrea Marrero, por aceitarem compor a banca avaliadora e dedicarem tempo na avaliação e contribuição com este trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A todos os professores, técnicos e funcionários que fazem esta instituição pública gratuita e de qualidade, permitindo o acesso à educação e realização de um sonho para mim e para tantos outros.

Aos meus pais, agradeço profundamente por tudo, por todos os sacrifícios e todo o esforço para que eu pudesse realizar esse sonho de forma tão confortável, por todo o apoio mesmo com a distância. Amo vocês!

Ao Diego, por estar sempre ao meu lado, por me apoiar e acreditar em mim, bem mais do que eu mesma, e por toda ajuda em todos os momentos.

A todos os meus amigos e colegas do curso, em especial a Pâmela, Elisa, Débora e Nicolas, por todos esses anos de amizade, por toda companhia nos momentos de alegria e de desespero.

E por fim agradeço a todos os professores que passaram pela minha vida e me fizeram acreditar no poder da educação e a todos os meus mestres, por cada aprendizado que me tornaram o que sou hoje.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender”

(Marie Curie)

RESUMO

O HIV é o vírus causador da aids, síndrome caracterizada por uma redução sistêmica dos linfócitos T CD4⁺, tornando o hospedeiro suscetível a infecções oportunistas. Os pacientes soropositivos podem ser divididos em progressores rápidos, lentos e típicos, dependendo do tempo de evolução para aids. Dentro dos progressores lentos existem os controladores de elite, que apresentam nível indetectável de RNA viral no sangue (<50 cópias/ml) e níveis estáveis de linfócitos T CD4⁺. É sabido que pacientes soropositivos apresentam uma composição da microbiota intestinal diferente da de indivíduos soronegativos, sendo que os controladores de elite possuem microbiota diferenciada dos outros grupos HIV positivos, sendo mais semelhante à de indivíduos soronegativos. Assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar e comparar a microbiota intestinal em diferentes grupos soropositivos e em indivíduos soronegativos, com a hipótese de que a microbiota de progressores lentos seria mais semelhante à de indivíduos soropositivos do que a de progressores típicos. A avaliação da microbiota foi realizada em amostras de fezes através da análise bioinformática de sequências provenientes do sequenciamento da região do DNA correspondente ao RNA ribossomal 16S. A taxonomia foi realizada no programa Qiime utilizando o banco de dados SILVA. Foram feitas comparações entre a abundância relativa, a riqueza e a diversidade alfa e beta entre os grupos de soropositivos e entre HIV positivos e HIV negativos. Não foram encontradas diferenças significativas quanto à diversidade alfa e beta entre os grupos de pacientes HIV positivos, nem entre soropositivos e indivíduos HIV negativos. Quando analisada a abundância, foram encontrados táxons com diferenças significativas entre controladores de elite e não controladores HIV e entre pacientes HIV positivos e indivíduos HIV negativos. Este estudo representa a primeira caracterização da microbiota intestinal em pacientes HIV positivos controladores de elite no Brasil.

Palavras-chave: Microbiota intestinal. Aids. Metagenoma.

ABSTRACT

HIV is the virus that causes AIDS, syndrome characterized by a systemic reduction of CD4⁺ T lymphocytes, making the host susceptible to opportunistic infections. Seropositive patients can be divided into rapid progressors, chronic progressors, and long term progressors, depending on the time of evolution for AIDS. Within the long term progressors, there are elite controllers, who have undetectable levels of viral RNA in the blood (<50 copies/ml) and stable levels of CD4 + T lymphocytes. It is known that seropositive patients present a different intestinal microbiota composition from that of seronegative individuals, and elite controllers have a diverse microbiota from other HIV-positive groups, being more similar to HIV-negative. Thus, the aim of this work was to characterize and compare the intestinal microbiota in different seropositive groups and in seronegative individuals, with the hypothesis that the microbiota from the long term progressors would be more similar to that of seropositive individuals than that of chronic progressors. The evaluation of the microbiota was performed in feces samples through the bioinformatic analysis of sequences from the sequencing of the region of the DNA corresponding to ribosomal 16S RNA. The taxonomy was performed in the Qiime program using the SILVA database. Comparisons were made between relative abundance, richness, and alpha and beta diversity among HIV positive groups, and HIV positive and HIV negative. No significant differences were found regarding alpha and beta diversity between groups of HIV-positive patients, nor between HIV-positive and HIV-negative individuals. When the abundance was analysed, we found taxa with significant differences between elite and non-controlling HIV controllers and among HIV-positive patients and HIV-negative individuals. This study represents the first characterization of the intestinal microbiota in elite controllers in Brazil.

Keywords: Gut microbiota. Aids. Metagenome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).....	26
Figura 2 - Abundância relativa de filamentos de bactérias em indivíduos controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e HIV negativos.	47
Figura 3 - Abundância relativa de filamentos de bactérias em indivíduos HIV negativos e HIV positivos.	47
Figura 4 - Abundância relativa de classes de bactérias em indivíduos controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e HIV negativos.	48
Figura 5 - Abundância relativa de classes de bactérias em indivíduos HIV negativos e HIV positivos.	49
Figura 6 - Abundância relativa de ordens de bactérias em indivíduos controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e HIV negativos.	49
Figura 7 - Abundância relativa de ordens de bactérias em indivíduos HIV negativos e HIV positivos.	50
Figura 8 - Abundância relativa de famílias de bactérias em indivíduos controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e HIV negativos.	51
Figura 9 - Abundância relativa de famílias de bactérias em indivíduos HIV negativos HIV positivos.	51
Figura 10 - Abundância relativa de gêneros de bactérias em indivíduos controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e HIV negativos.	52
Figura 11 - Abundância relativa de gêneros de bactérias em indivíduos HIV negativos e HIV positivos.	52
Figura 12 - Índice de riqueza (Chao1) e diversidade alfa (diversidade em cada indivíduo, Shannon e Simpson) para indivíduos controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e HIV negativos.	53
Figura 13 - Índice de riqueza (Chao1) e diversidade alfa (diversidade em cada indivíduo, Shannon e Simpson) para indivíduos HIV negativos e HIV positivos.	54
Figura 14 - Diversidade beta (diversidade entre indivíduos, índice de dissimilaridade de Bray Curtis) para indivíduos controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e HIV negativos.....	55
Figura 15 - Diversidade beta (diversidade entre indivíduos, índice de dissimilaridade de Bray Curtis) para indivíduos HIV negativos e HIV positivos.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas dos indivíduos HIV negativos, controladores de elite, controladores de viremia e HIV não controladores.	43
Tabela 2 - Número de leituras resultantes do sequenciamento nas amostras de cada grupo	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos pacientes de acordo com a progressão para aids.	28
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ASV - Variantes de sequências de amplicon, do inglês “*Amplicon Sequence Variants*”
- CCR5 - Receptor de quimiocina C-C do tipo 5
- cDNA – DNA complementar
- CE – Controladores de elite
- CV – Controladores de viremia
- CXCR4 - Receptor de quimiocina C-X-C do tipo 4
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- HIN – HIV negativos
- HIP – HIV positivos
- HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês “*Human Immunodeficiency Virus*”
- NC – Não controladores HIV
- NK - do inglês, “*Natural killer*”
- OTU - Unidade Taxonômica Operacional, do inglês “*Operational Taxonomic Unit*”
- Qiime – do inglês, “*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*”
- qPCR - PCR quantitativa em tempo real
- RNA - Ácido ribonucleico
- TARV - terapia antirretroviral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA.....	25
1.2	PROGRESSÃO DA DOENÇA E OS PACIENTES HIV POSITIVOS CONTROLADORES DE ELITE	27
1.3	A MICROBIOTA E O HIV	29
1.4	A MICROBIOTA E OS PACIENTES HIV POSITIVOS CONTROLADORES DE ELITE.....	31
2	HIPÓTESE	35
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4.	METODOLOGIA	37
4.1	DADOS PRELIMINARES	37
4.1.1	Considerações éticas	37
4.1.2	Local	37
4.1.3	Crterios de inclusão e população de estudo	37
4.1.4	Coleta e processamento das amostras	38
4.2	PRÉ-PROCESSAMENTO DAS SEQUÊNCIAS	38
4.2.1	Controle de qualidade das leituras	38
4.2.3	Pareamento e remoção de sequências quiméricas	39
4.2	TAXONOMIA	39
4.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
5	RESULTADOS	43
5.1	ABUNDÂNCIA.....	46
5.2	RIQUEZA E DIVERSIDADE ALFA.....	53
5.3	DIVERSIDADE BETA	54
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	63
8	PERSPECTIVAS	63
9	REFERÊNCIAS	65

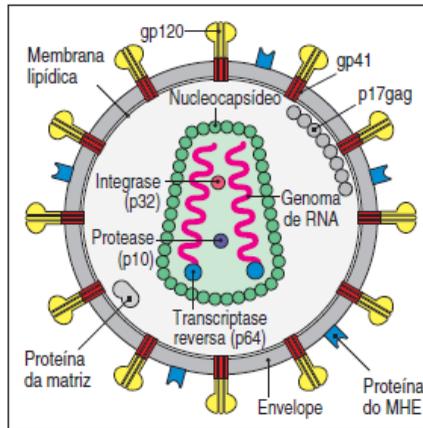
1 INTRODUÇÃO

1.1 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é caracterizada por uma redução sistêmica no número de linfócitos T CD4⁺ e consequente redução na resposta imunológica, tornando o organismo do hospedeiro suscetível a infecções oportunistas. A transmissão do vírus se dá por contato sexual, por contato com sangue contaminado e por transmissão vertical (da mãe para o filho durante o parto ou a amamentação), sendo o contato sexual a principal via de transmissão (LUCAS; NELSON, 2015). O HIV é um retrovírus pertencente ao gênero lentivírus e o causador da aids, síndrome da imunodeficiência adquirida (BARRÉ-SINOUSSE, 1996).

Como característica de todos os retrovírus, o HIV contém um capsídeo constituído por uma proteína principal, a proteína do nucleocapsídeo, genoma RNA fita simples e três enzimas virais, transcriptase reversa, integrase e protease. O vírus é envolvido por um envelope constituído por uma bicamada lipídica proveniente da célula hospedeira, com as proteínas gp120 e gp41 inseridas, responsáveis pela entrada do vírus na célula (BARRÉ-SINOUSSE, 1996) (Figura 1). A proteína gp120 se liga a molécula CD4 presente na superfície celular das células do sistema imune e também aos co-receptores CCR5 (receptor de quimiocina C-C do tipo 5) ou CXCR4 (receptor de quimiocina C-X-C do tipo 4) presentes na superfície da célula alvo; após essas ligações acontecerem a gp41 faz a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula, ocorrendo a entrada do material genético do vírus no citoplasma celular (GUERRERO-BELTRAN *et al.*, 2018). Após a entrada do material genético do vírus na célula hospedeira, a transcriptase reversa converte o RNA viral em cDNA, que será integrado ao genoma do hospedeiro pela integrase e servirá como molde para a RNA polimerase dependente de DNA gerar novos genomas RNA e RNAs mensageiros, que serão traduzidos nas proteínas virais (BARRÉ-SINOUSSE, 1996).

Figura 1 - Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).



Representação da estrutura do vírus HIV mostrando as proteínas do envelope e enzimas. Fonte: (KENNETH MURPHY, PAUL TRAVERS, 2010).

O HIV continua sendo um problema de saúde pública no mundo todo (GUERRERO-BELTRAN *et al.*, 2018). No ano de 2017 havia 36,9 milhões de pessoas vivendo com HIV no mundo, sendo 18,2 milhões mulheres e 1,8 milhões crianças com menos de quinze anos (UNAIDS, 2018). Neste mesmo ano foram relatadas 1,8 milhões de novas infecções e 940 mil mortes relacionadas à Aids (UNAIDS, 2018). No Brasil, a epidemia de HIV iniciou-se na região Sudeste, que apresenta hoje as maiores taxas de incidência do país, tendo sido os dois primeiros casos notificados na cidade de São Paulo, em 1982. No início dos anos 90 observa-se uma maior incidência de casos em regiões afastadas do Sudeste, portanto a epidemia se difunde para o país (BASTOS; BARCELLOS, 1995). Do ano de 1980 a junho de 2018 foram registrados 926.742 casos de Aids, com 37.791 novos casos apenas no ano de 2017. Com relação aos óbitos relacionados à aids, de 1980 até 31 de dezembro de 2017 foram 327.655 mortes. A maior proporção dos óbitos ocorreu nas regiões Sudeste (58,9%) e Sul 17,7% (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2018).

Anualmente são registrados em média 40 mil infecções por HIV no país, mas esse número vem diminuindo desde 2013, quando atingiu 43.269 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2018). Entre os anos de 2014 e 2015 houve a implantação da política de tratamento para todos, resultando em uma redução no número de casos e uma diminuição de 7,2% das mortes, passando de 5,7 para 5,3 por 100.000 habitantes

(MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2017). Entre os anos de 2007 a 2017 foi registrada uma queda de 9,4% na taxa de detecção de aids, com uma taxa de 20,2 casos por 100 mil habitantes em 2007, e em 2017 de 18,3 casos a cada 100 mil habitantes.

Quanto à distribuição dos casos de infecção pelo HIV no Brasil, há uma grande concentração de casos nas regiões Sul e Sudeste, sendo que a região Sudeste abriga 51,8% do total de casos, seguida da região Sul, com 20,0%. A região Nordeste abriga 15,8%, a região Norte 6,4% e a região Centro-Oeste 6,1% do total de casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2018). Entre os anos de 2013 a 2017 a região Sudeste apresentou uma média de 16,1 mil novas infecções ao ano, a região Sul 8,2 mil, a região Nordeste 9 mil, a região Norte 4,4 mil e a região Centro-oeste 2,9 mil. A cidade de Florianópolis, onde este estudo foi realizado, notificou 55,7 casos de aids a cada 100.000 habitantes em 2017, sendo a segunda capital com maior taxa de detecção de casos de aids, ficando abaixo apenas de Porto Alegre (60,8/100.00 Hab.) (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2018).

1.2 PROGRESSÃO DA DOENÇA E OS PACIENTES HIV POSITIVOS CONTROLADORES DE ELITE

A infecção pelo HIV é caracterizada pela progressão ao quadro de aids, sendo os pacientes divididos em grupos com base no tempo entre a soroconversão e o desenvolvimento da doença. A maioria dos portadores de HIV, quando não recebem a terapia antirretroviral (TARV), desenvolvem o quadro de aids de 8 a 10 anos após a soroconversão (SAKSENA *et al.*, 2007), sendo chamados progressores típicos. Alguns pacientes desenvolvem a doença em até três anos após a soroconversão, os chamados progressores rápidos. Existem ainda os progressores lentos, que são aqueles que permanecem assintomáticos por mais de 10 anos após a soroconversão (CASADO *et al.*, 2010). As definições dessas categorias são variadas na literatura (OKULICZ *et al.*, 2009), não estando bem estabelecidos os fatores que determinam esse tempo de progressão, sendo que vários fatores genéticos e imunes do hospedeiro foram associados a esta progressão lenta (CASADO *et al.*, 2010). Neste trabalho foi usada a definição proposta em 2010 por Casado e colaboradores e está representada no quadro 1.

Quadro 1 - Classificação dos pacientes de acordo com a progressão para aids.

	Progressão para aids	Características
Controladores	Não controladores de viremia	- Assintomáticos por mais de 10 anos após a soroconversão; - Apresentam carga viral acima de 2000 cópias de RNA viral/ml em mais de 50% das avaliações.
	Controladores de viremia	- Assintomáticos por mais de 10 anos após a soroconversão; - Apresentam carga viral igual ou abaixo de 2000 cópias de RNA viral/ml, sem TARV.
	Controladores de elite	- Assintomáticos por mais de 10 anos após a soroconversão; - Apresentam carga viral indetectável, abaixo de 50 cópias de RNA viral/ml, sem TARV.
Não controladores	Progressores típicos	- Infecção sintomática após 10 anos da soroconversão; - Mínimo de 3 avaliações com carga viral acima de 200 cópias de RNA viral/ml.
	Progressores rápidos	- Progressão para aids ou óbito até 3 anos após soroconversão; - Mínimo de 2 avaliações de linfócitos TCD4 ⁺ com menos de 350 céls/mm ³ até 3 anos após a soroconvesão.

Fonte: adaptado de (CASADO et al., 2010).

Os controladores de elite correspondem a menos de 1% da população HIV positiva (SAKSENA *et al.*, 2007). Apesar de apresentarem um nível normal de linfócitos T CD4⁺, em alguns casos foi descrito um lento declínio no número dessas células, sendo a progressão para aids nesse grupo associada a complicações como candidíase, esofagite, sarcoma de Kaposi e tuberculose pulmonar (CROWELL;

HATANO, 2015). Portanto os controladores de elite não são um grupo homogêneo, uma vez que alguns indivíduos mantêm o número de linfócitos T CD4⁺ elevado, enquanto outros apresentam uma queda ao longo do tempo (BANSAL *et al.*, 2015).

Os mecanismos que propiciam a proteção natural dos controladores de elite ainda não são bem conhecidos. Alguns alelos do HLA (Antígeno Leucocitário Humano), como o HLA-B57 e HLA-B27, aparecem com uma frequência aumentada nos controladores de elite, sendo estes alelos associados com a proteção à progressão da doença (BANSAL *et al.*, 2015). Além disso, esses indivíduos apresentam populações de linfócitos T CD8⁺ polifuncionais e mais potentes, células *natural killer* com genótipo associado a fortes respostas contra o HIV e altos níveis de linfócitos T específicos contra o HIV. No entanto, nem todos os controladores de elite apresentam estes mecanismos. (CROWELL; HATANO, 2015). Portanto, os controladores de elite podem apresentar não um, mas múltiplos mecanismos potenciais de controle da infecção e assim fornecem uma oportunidade única para entender a persistência viral e o controle do hospedeiro (COCKERHAM; HATANO, 2015).

1.3 A MICROBIOTA E O HIV

A entrada de antígenos no corpo acontece, em sua maioria, pelas mucosas e devido a isso o aparelho imunológico nessas áreas é complexo e funcionalmente distinto (MOWAT; VINEY, 1997). Uma das principais mucosas, o sistema gastrointestinal, possui cerca de oito metros de comprimento e abriga de 40% a 65% do total de células do sistema imune do corpo (SHU *et al.*, 2013), ocupando uma área de superfície de 30 a 40 m² em um ser humano adulto (HELANDER; FÄNDRIKS, 2014). Também é no trato intestinal em que a maior quantidade e diversidade da microbiota humana está localizada, com cerca de um trilhão de microrganismos; esses microrganismos tem sido associados ao metabolismo local e sistêmico, na maturação e função imunológica, no comportamento animal e nas doenças desses diferentes sistemas (PATRICK, 2015).

A microbiota intestinal é conhecida por influenciar o desenvolvimento e o equilíbrio do sistema imunológico do hospedeiro e tem sido implicada na prevenção de danos induzidos por microrganismos oportunistas, na reparação de danos na barreira mucosa e na influência de doenças autoimunes sistêmicas (IVAYLO I. *et al.*, 2009). Estudos publicados têm confirmado o papel da microbiota intestinal na

estimulação da diferenciação de células do sistema imune, como os linfócitos T *helper* 17 (Th17) (GABORIAU-ROUTHIAU *et al.*, 2009; IVAYLO I. *et al.*, 2009).

A maior parte da depleção de linfócitos T CD4⁺ que ocorre na infecção pelo HIV acontece no trato gastrointestinal logo no início da infecção (BRECHLEY *et al.*, 2004), levando a danos no sistema imune da mucosa (BRECHLEY *et al.*, 2006). Essa lesão no sistema imune pode resultar no aumento da translocação microbiana, que é a passagem das bactérias do trato gastrointestinal para a corrente sanguínea, levando a uma ativação imune na fase crônica da infecção do HIV, ajudando a determinar a taxa de evolução para o quadro de aids (BRECHLEY *et al.*, 2006). Na infecção pelo HIV também ocorre uma redução no número de linfócitos Th17 no trato gastrointestinal, sendo que estas células desempenham um importante papel antimicrobiano por induzirem defensas e recrutarem neutrófilos. Sendo assim, a redução destas células pode tornar o indivíduo vulnerável à translocação microbiana (BRECHLEY *et al.*, 2008).

Quanto ao impacto do HIV na microbiota intestinal, estudos têm demonstrado uma diferença na composição de micro-organismos entre indivíduos HIV positivos e indivíduos soronegativos (ELLIS *et al.*, 2011). A diversidade está associada à quantidade de linfócitos T CD4⁺, sugerindo que as alterações na microbiota intestinal estão relacionadas à translocação microbiana e à alteração imune durante a progressão da infecção pelo HIV (NOWAK *et al.*, 2015).

As alterações na microbiota intestinal induzidas pelo HIV são caracterizadas por uma diminuição geral da diversidade (ZEVIN *et al.*, 2016). Noguera-Julian e colaboradores (2016) encontraram uma redução de 15 a 30% na riqueza bacteriana em indivíduos soropositivos em relação a indivíduos HIV negativos. Dubourg e colaboradores (2016) encontraram uma redução significativa na diversidade α em pacientes HIV positivos, que apresentaram um menor índice de Shannon, quando comparados aos HIV negativos. Outro estudo, realizado por Dillon e colaboradores (2014), encontrou um aumento de Proteobacteria em indivíduos infectados pelo HIV e uma diminuição de Firmicutes, incluindo a classe Clostridia, além de uma significativa depleção em *Bacteroides* e *Alistipes* no tecido mucoso do cólon de indivíduos HIV positivos não tratados.

Pacientes soropositivos apresentam uma redução do gênero *Bacteroides* e aumento da abundância do gênero *Prevotella*, sendo essas bactérias conhecidas por serem importantes para a manutenção da diversidade e função intestinal (ZEVIN *et al.*, 2016). Com relação à

diminuição da diversidade, a perda de bactérias do intestino pode reduzir a capacidade dos pacientes infectados de controlar a infecção gastrointestinal, podendo resultar em subconjuntos de células T alterados. Outros gêneros reduzidos durante a infecção pelo HIV são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Coprococcus*, *Eubacterium*, *Blautia* e *Ruminococcus*, sendo os *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. considerados benéficos no contexto de doenças do trato gastrointestinal e inflamação. Outros gêneros sofrem um aumento, como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Escherichia* e *Desulfovibrio* (ZEVIN *et al.*, 2016).

Com relação ao tratamento antirretroviral, apesar de possibilitar um controle da replicação viral, a ativação imune ainda persiste, podendo estar associada a complicações não infecciosas que venham a acometer pacientes em uso de TARV. Complicações como diabetes, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica e obesidade estão sendo documentadas em maior frequência nestes pacientes. Estas complicações foram atribuídas à ativação imunológica causada pela translocação microbiana (DINH *et al.*, 2015). Estudos sobre o impacto de curto e longo prazo do tratamento com TARV na microbiota intestinal demonstraram que o medicamento é incapaz de restaurar seguramente a saúde intestinal ((PINTO-CARDOSO; KLATT; REYES-TERÁN, 2018; DINH, D. M. *et al.*, 2015). A microbiota intestinal dos pacientes tratados mostra uma diferença em relação aos não tratados, porém ainda apresentam diferenças em relação aos indivíduos não infectados pelo HIV. Em geral, pacientes HIV positivos não tratados apresentam um enriquecimento no gênero *Prevotella* e da família Enterobacteriaceae, sendo essas bactérias associadas à translocação microbiana (PINTO-CARDOSO; KLATT; REYES-TERÁN, 2018).

1.4 A MICROBIOTA E OS PACIENTES HIV POSITIVOS CONTROLADORES DE ELITE

A microbiota intestinal dos controladores de elite ainda não foi bem descrita, com poucos estudos investigando sua composição, sendo que nenhum ainda foi realizado no Brasil. Nowak e colaboradores (2015) descreveram a composição microbiológica intestinal de pacientes controladores de elite e pacientes virêmicos (pacientes que apresentavam carga viral detectável), utilizando análise metagenômica. Nos três grupos os filos Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria foram os mais encontrados (94-95% do total). Quando comparados os grupos entre si, os controladores de elite apresentaram maior abundância relativa de Bacteroidetes, enquanto pacientes virêmicos possuíam uma maior

abundância de Actinobacterias. De acordo com os autores, a microbiota de controladores de elite apresentou diferenças em relação a microbiota de pacientes viremicos e semelhança em relação a de indivíduos soronegativos. Porém devido ao baixo número amostral, nenhuma conclusão definitiva pode ser tomada diante deste dado.

Em outro estudo, utilizando metagenômica, Vesterbacka e colaboradores (2017) também observaram uma microbiota mais diversa em controladores de elite e mais semelhante à microbiota de soronegativos. O estudo comparou a composição da microbiota intestinal de pacientes controladores de elite a de pacientes HIV positivos sem terapia antirretroviral e encontrou uma maior abundância de bactérias do gênero *Succinivibrio*, *Sutterella*, *Rhizobium*, *Delftia*, *Anaerofilum* e *Oscillospira* em controladores de elite, enquanto *Blautia* e *Anaerostipes* diminuíram drasticamente. A família Succinivibrionaceae, a qual pertence o gênero *Succinivibrio*, está associada com a capacidade anti-inflamatória, apresentando aglomeração de moléculas envolvidas na redução de infecções virais e inflamação (SERRANO-VILLAR *et al.*, 2016).

Um estudo realizado por Vujkovic-Cvijin e colaboradores (2013) avaliou a relação das alterações da microbiota intestinal e a progressão para a doença em pacientes infectados pelo HIV. Nos pacientes HIV positivos foi encontrada uma maior abundância de Proteobactérias e uma diminuição em Bacteroidia, que foram associados a marcadores disfunção imune da mucosa, ativação de células T e inflamação crônica em indivíduos infectados pelo HIV. Este estudo contou com um paciente controlador de viremia que apresentou uma microbiota intestinal mais semelhante à de indivíduos HIV negativos do que a de pacientes não controladores HIV, sugerindo que a não progressão da doença pode estar ligada à homeostase microbioma-hospedeiro.

Os controladores de elite apresentam uma proteção natural contra o vírus e assim, representam um modelo de controle espontâneo da infecção *in vivo*, sendo dessa forma importantes para o entendimento dos mecanismos responsáveis por essa proteção. Mudanças na composição da microbiota interferem no curso da infecção por HIV e dessa forma, estudar a composição da microbiota e as diferenças entre os grupos que apresentam resistência ao vírus e os que não apresentam pode ser um caminho para evidenciar um mecanismo que contribui para a proteção. Juntando-se a isso, além da escassez de estudos sobre a composição da microbiota intestinal de controladores de elite, até o momento nenhum foi realizado no Brasil e como já é conhecido que a microbiota tende a mudar

em diferentes regiões, estudos em várias áreas são pertinentes para confirmar e consolidar os resultados.

2 HIPÓTESE

A composição da microbiota intestinal de pacientes controladores de elite e controladores de viremia difere da composição da microbiota dos pacientes não controladores HIV, sendo mais semelhante à microbiota de indivíduos HIV negativos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever e comparar a diversidade da microbiota intestinal entre os diferentes grupos de pacientes HIV positivos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Descrever e comparar a abundância em diferentes níveis taxonômicos entre pacientes controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e indivíduos HIV negativos;
- b) Descrever e comparar a abundância em diferentes níveis taxonômicos entre pacientes HIV positivos e indivíduos HIV negativos;
- c) Avaliar a riqueza e a diversidade alfa entre os pacientes controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e indivíduos HIV negativos;
- d) Avaliar a riqueza e a diversidade alfa entre pacientes HIV positivos e indivíduos HIV negativos;
- e) Avaliar a diversidade beta entre os pacientes controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e indivíduos HIV negativos;
- f) Avaliar a diversidade beta entre pacientes HIV positivos e indivíduos HIV negativos;

4. METODOLOGIA

4.1 DADOS PRELIMINARES

Este trabalho foi realizado utilizando dados previamente coletados de acordo com o descrito a seguir:

4.1.1 Considerações éticas

Os pacientes foram previamente recrutados para participação em dois projetos, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Joana de Gusmão (parecer número 1.622.458 e 2.022.007 respectivamente). A participação dos pacientes foi feita de forma voluntária por intermédio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no momento do recrutamento.

4.1.2 Local

Os pacientes HIV positivos foram recrutados no Hospital Regional de Homero de Miranda Gomes e no Hospital Nereu Ramos, ambos localizados na Grande Florianópolis, SC. Para integrar o grupo de indivíduos HIV negativos foram recrutados voluntários na UFSC, além de utilizadas amostras provenientes de mulheres recrutadas no Hospital Infantil Joana de Gusmão (dados descritos em MACHIAVELLI *et al.*, 2019).

4.1.3 Critérios de inclusão e população de estudo

Foram incluídos neste projeto pacientes registrados com infecção por HIV do tipo 1 há mais de cinco anos e que, sem tratamento antirretroviral, mantiveram a contagem de células T CD4⁺ superior a 500 células/mm³ e a carga viral inferior à 20.000 cópias de RNA viral/mL. Também foram incluídos indivíduos HIV negativos (HIN). Os pacientes HIV positivos foram classificados em três grupos, (1) controladores de elite (CE) (2) controladores de viremia (CV) e (3) HIV não controladores (NC). O grupo dos controladores de elite incluiu pacientes que na maioria (>70%) das avaliações apresentaram carga viral indetectável (< 50 cópias de RNA viral/mL). Os controladores de viremia foram aqueles que na

maioria (>70%) das avaliações apresentaram carga viral de 50 a 2.000 cópias de RNA viral/mL. Os HIV não controladores foram aqueles que na maioria (>70%) das avaliações apresentaram carga viral entre 2.000 e 20.000 cópias de RNA viral/mL.

4.1.4 Coleta e processamento das amostras

Foi coletada uma amostra de fezes de cada voluntário(a) e estas amostras tiveram o DNA bacteriano extraído utilizando o *kit* QIAamp DNA Stool Mini Kit (Quiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração o DNA foi armazenado a uma temperatura de -20°C. O DNA extraído das amostras foi quantificado com o uso do *kit* comercial Qubit dsDNA HS (Thermo Fisher) e amplificado. A amplificação das regiões V3 e V4 do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal (RNAr 16S) foi feita pela técnica de PCR com os iniciadores Bakt_341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') e Bakt_805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'), ambos descritos em Herlemann e colaboradores (2011) e avaliados quanto à especificidade para o Domínio Bacteria por Klindworth e colaboradores (2013). Os adaptadores Illumina Forward overhang (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3') e Reverse overhang (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3') foram adicionados aos iniciadores antes da amplificação por PCR. A amplificação por PCR foi feita em fragmento de DNA com tamanho de 500 pares de bases, e o produto da amplificação foi purificado com *beads* magnéticas utilizando AMPure XP e quantificado por qPCR com o *kit* KAPA Library Quantification Kit Universal para plataforma Illumina (Kapa Biosystems). O sequenciamento do DNA foi realizado utilizando o *kit* de reagentes padrão 2x250 *paired-end* na plataforma MiSeq (Illumina).

4.2 PRÉ-PROCESSAMENTO DAS SEQUÊNCIAS

4.2.1 Controle de qualidade das leituras

As sequências resultantes, em arquivos FastQ, tiveram a qualidade analisada com a utilização do programa FastQC (ANDREWS, 2010). As sequências de baixa qualidade foram filtradas utilizando a ferramenta Trimmomatic versão 0.38 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) de acordo com o tamanho e o valor de *phred score* para cada base. Todas as sequências tiveram os três nucleotídeos do início filtrados, pois

exibiam qualidade abaixo de 20, sendo assim considerados de baixa qualidade. Sequências com comprimento inferior a 200 e superior a 259 nucleotídeos foram excluídas, para não haver sequências de tamanho muito reduzido ou fora da média de tamanho.

4.2.3 Pareamento e remoção de sequências quiméricas

No programa Qiime2, versão 2018.8 (CAPORASO, *et al.* 2010), foi realizado o pareamento das sequências, a determinação de variantes de sequências (ASV, do inglês “*amplicon sequence variants*”), a remoção de sequências quiméricas e a determinação taxonômica, de acordo com o descrito por COMEAU; DOUGLAS; LANGILLE, 2017. O pareamento dos dois fragmentos resultantes do sequenciamento *pair-end*, uma segunda filtragem baseada na qualidade e taxa de erros do sequenciamento (*denoising*), a determinação de ASVs e a remoção de quimeras foram realizados utilizando a pipeline DADA2. Não foi realizado nenhuma remoção de nucleotídeos de acordo com qualidade, nem nenhum corte das sequências de acordo com tamanho. Foram removidas apenas sequências com um valor de erro esperado maior que 2.0, de acordo com o *default* do DADA2.

As sequências quiméricas foram identificadas em cada amostra, e sequências marcadas como quiméricas em uma grande quantidade de amostras foram removidas. A remoção das sequências quiméricas foi feita pelo método *isBimeraDenovo*; foram identificadas sequências quiméricas biparentais de sequências de saída mais abundantes, executando um alinhamento global de Needleman-Wunsch. Em seguida, sequências que diferem das sequências marcadas como quiméricas em um único nucleotídeo ou indel foram também marcadas como quiméricas e removidas (CALLAHAN *et al.*, 2016). A abundância mínima de potenciais progenitores de uma sequência testada como quimérica foi 1, expressa como uma alteração dobrada *versus* a abundância da sequência a ser testada (os pais devem ser mais abundantes do que a sequência que está sendo testada). O número de sequências a serem usadas ao treinar o modelo de erro foi 1000000 e foram realizados um número de 2 encadeamentos de execução no processamento. Depois da pipeline do DADA2, as ASVs resultantes foram novamente filtradas para remoção de ASVs raras (aquelas que aparecem em menos de 2 amostras, o que inclui os singletons).

4.2 TAXONOMIA

A determinação taxonômica foi realizada utilizando o banco de dados SILVA, versão 132 (QUAST et al., 2013) com 97% de identidade, valor tradicionalmente considerado como correspondente a espécies em sequências de RNA ribossomal 16S (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). Foram importadas sequências de referência e as classificações taxonômicas correspondentes do SILVA para o programa QIIME2. Em seguida foram extraídas leituras do banco de dados com base em correspondências para o par de primers utilizados (16S_F 5'CCTACGGGNGGCWGCAG-3' e 16S_R 5'GACTACHVGGGTATCTAATCC3'), sem os adaptadores (KLINDWORTH, A. *et al.*, 2013) A determinação taxonômica foi realizada utilizando a ferramenta VSEARCH (ROGNES et al., 2016) disponibilizada pelo QIIME2.

Para realizar a determinação taxonômica foi realizado um alinhamento entre as sequências a serem classificadas e as sequências de referência do banco de dados e atribuída uma taxonomia de consenso. As sequências foram alinhadas em ambas as direções e a taxonomia atribuída foi considerada de consenso quando no mínimo 10 sequências iguais foram alinhadas da mesma forma (ROGNES *et al.*, 2016).

4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O arquivo resultante da classificação foi transformado em um arquivo BIOM e importado para o programa R para as análises estatísticas (R Core Team 2019) utilizando o pacote Phyloseq (MCMURDIE; HOLMES, 2013). Foram avaliadas a abundância em diferentes níveis taxonômicos, a riqueza e as diversidades alfa e beta. As diferenças na abundância de táxons entre os grupos foram primeiramente analisadas de forma descritiva, pela avaliação das porcentagens de diferentes filos, classes, ordens, famílias e gêneros.

A identificação das diferenças na abundância foi realizada utilizando o pacote DESeq2 (LOVE; ANDERS; HUBER, 2014), através de uma análise diferencial baseada em distribuição binomial negativa. Foram removidas sequências com zero em mais de 80% das amostras. Para serem consideradas como significativamente diferentes as ASVs deviam apresentar um valor de p corrigido menor que 0,05 de acordo com o teste binomial de Wald com correção para falsos positivos de Benjamini-Hochberg.

A diversidade alfa (diversidade em cada indivíduo) foi avaliada utilizando os índices de diversidade de Shannon e Simpson e a riqueza foi

avaliada utilizando o índice Chao1, utilizando *cutoff* 97%. As diferenças entre os grupos para os índices de riqueza e diversidade alfa foram avaliados usando Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Tukley. A diversidade beta (diversidade entre indivíduos) foi avaliada utilizando o índice de dissimilaridade de Bray Curtis. Para determinar diferenças significativas entre os grupos foi utilizado PERMANOVA.

5 RESULTADOS

Foram analisadas amostras de 24 indivíduos, sendo 15 provenientes de pacientes HIV positivos (controladores de elite = 6, controladores de viremia = 2, HIV não controladores = 7) e 9 indivíduos HIV negativos. Todos os pacientes diagnosticados com infecção por HIV 1 há mais de 5 anos e que nunca receberam tratamento antirretroviral. As características clínicas dos voluntários deste estudo estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Características clínicas dos indivíduos HIV negativos, controladores de elite, controladores de viremia e HIV não controladores.

	Participante	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (cm)	IMC (kg/m ²)
HIV	1	F	26	90	161	34,7
	2	F	31	70	168	24,8
	3	F	42	55	167	19,7
	4	F	29	95	165	34,9
	5	F	28	59	167	21,2
	6	F	26	72	170	24,9
	7	M	54	78	184	23
	8	M	30	83	184	24,5
	9	M	34	91	185	26,6
CV	10	F	51	100	179	31,2
	11	F	68	66	154	27,8

CE	12	F	36	74	169	25,9
	13	F	47	70	156	28,8
	14	F	46	68	155	28,3
	15	M	37	89	187	25,5
	16	M	36	85	184	25,1
	17	F	65	68	155	28,3
NC	18	M	36	68	168	24,1
	19	M	28	87	185	25,4
	20	F	54	53	160	20,7
	21	M	37	72	173	24,1
	22	F	32	63	155	26,2
	23	M	31	70	173	23,4
	24	M	60	56	170	19,4

IMC = Índice de Massa Corporal. F = feminino, M = masculino. Indivíduos HIV negativos (HIN), Controladores de viremia (CV), Controladores de elite (CE), HIN não controladores (NC).

A microbiota intestinal foi descrita pelo sequenciamento do RNA ribossomal 16S proveniente do DNA extraído das amostras de fezes. O sequenciamento resultou em 11.972.622 leituras, com 498.859,25 leituras por amostra, em média (Tabela 1). As sequências foram processadas e classificadas em 291566 variantes de sequências, que foram classificadas em 1 reino, 15 filos, 23 classes, 33 ordens, 58 famílias e 189 gêneros. Todas as ASVs foram classificadas no Domínio Bactéria e não foi feita a classificação a nível de espécie.

Tabela 2 - Número de leituras resultantes do sequenciamento nas amostras de cada grupo.

	Participante	Nº de leituras
HIN	1	330438
	2	372944
	3	393352
	4	380134
	5	378956
	6	341444
	7	1158952
	8	447622
	9	337424
CV	10	338074
	11	228966
CE	12	381018
	13	485782
	14	306072
	15	292270
	16	327676
	17	348086
	18	1293318
19	1155398	

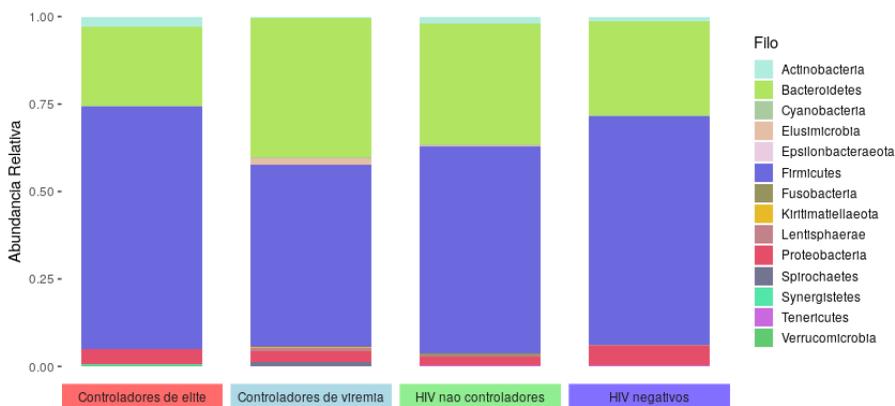
NC	20	1204896
	21	405998
	22	282336
	23	502372
	24	279094
Total		11972622

Indivíduos HIV negativos (HIN), Controladores de viremia (CV), Controladores de elite (CE), HIN não controladores (NC).

5.1 ABUNDÂNCIA

A abundância dos taxa foi analisada primeiramente de forma descritiva, pela avaliação da porcentagem dos taxa em cada grupo. Foi feita uma análise entre os grupos controladores de elite (CE), controladores de viremia (CV), HIV não controladores (NC) e HIV negativos (HIN), sendo que posteriormente foi feita uma segunda análise entre HIV negativos e HIV positivos (HIP). Quanto à composição da microbiota a nível de filo, todos os grupos apresentaram o filo Firmicutes (CE 69,9%, HIN 67,7%, NC 62,9%, CV 51,6%), sendo o filo Bacteroidetes (CV 40%, NC 31%, HIV- 23,5%, CE 22%) o mais abundante. Controladores de elite, controladores de viremia e HIV negativos apresentaram porcentagens um pouco maiores de Proteobacteria (4%, 3,3%, 6% respectivamente) comparado aos HIV não controladores (2%) (Figura 2).

Figura 2 - Abundância relativa de filios de bactérias em indivíduos controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e HIV negativos.



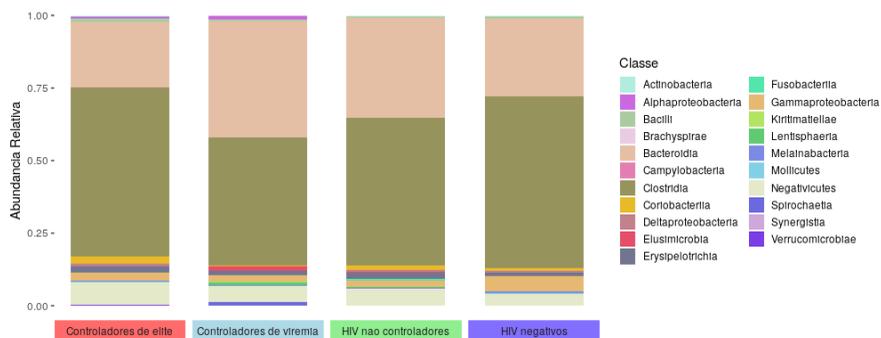
Quando comparados indivíduos HIV negativos e HIV positivos, os filios Firmicutes (67,7% e 64,5% respectivamente), Bacteroidetes (23,5% e 28,6% respectivamente) e Proteobactéria (6%, 3%, respectivamente) também foram os mais abundantes. (Figura 3).

Figura 3 - Abundância relativa de filios de bactérias em indivíduos HIV negativos e HIV positivos.



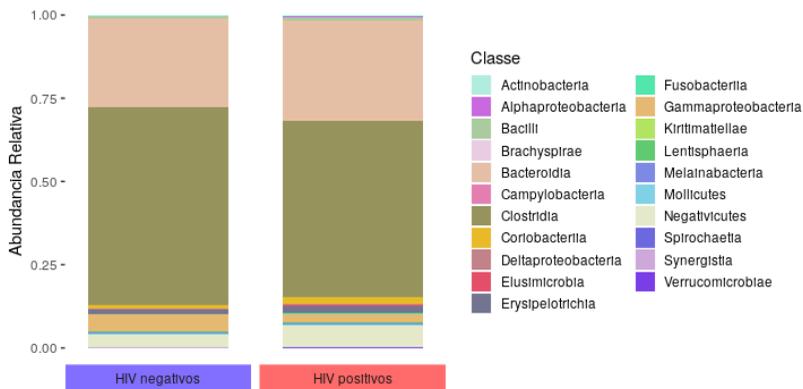
Quanto às classes, Clostridia (HIN 62,6%, CE 60,2%, NC 53%, CV 43,5%) e Bacteroidia (CV 40%, NC 31%, HIV 23,5%, CE 22%) foram as mais abundantes. Controladores de elite e controladores de viremia apresentaram uma pequena quantidade de Alphaproteobacteria, enquanto HIV não controladores e HIV negativos não apresentaram nenhum integrante dessa ordem (Figura 4).

Figura 4 - Abundância relativa de classes de bactérias em indivíduos controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e HIV negativos.



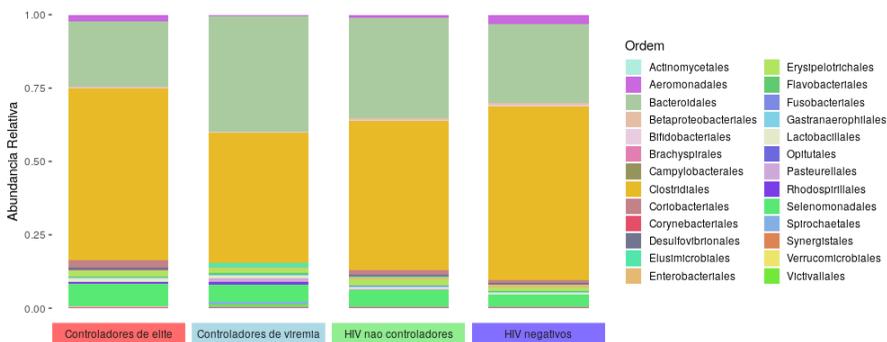
Entre os grupos HIV positivos e HIV negativos, Clostridia (55,5% e 62,6%) e Bacteroidia (28,6% e 23,5%) também foram os mais abundantes. Indivíduos HIV positivos apresentaram maior abundância de Negativicutes (6%) comparado a HIV negativos (3%), enquanto indivíduos HIV negativos apresentaram abundância maior de Gammaproteobacteria (5,6% contra 1,9% em HIN) (Figura 5).

Figura 5 - Abundância relativa de classes de bactérias em indivíduos HIV negativos e HIV positivos.



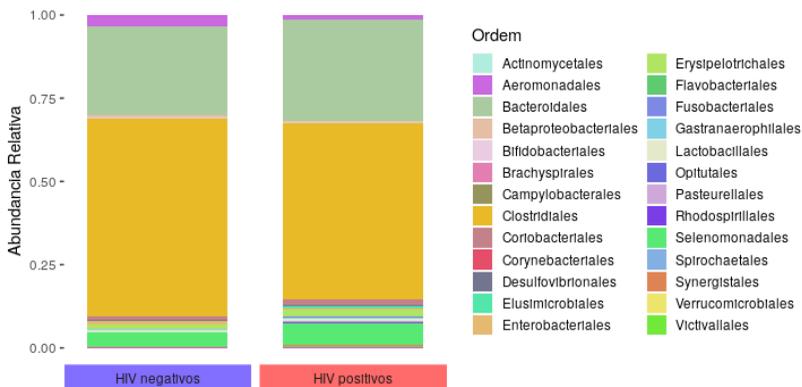
Em relação às ordens, Clostridiales (HIN 62,6%, CE 60,2%, NC 53,7%, CV 43,5%) e Bacteroidales (CV 39,5%, NC 31%, HIN 23,4%, CE 22%) foram as mais abundantes. Controladores de elite e controladores de viremia apresentaram pequena abundância de Rhodospirillales, enquanto HIV negativos e HIV não controladores não apresentaram nenhum integrante dessa ordem. Indivíduos HIV negativos e controladores de elite apresentaram uma quantidade um pouco maior de Aeromonadales (4% e 2%), enquanto controladores de viremia e HIV não controladores tiveram menos de 1%. (Figura 6).

Figura 6 - Abundância relativa de ordens de bactérias em indivíduos controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e HIV negativos.



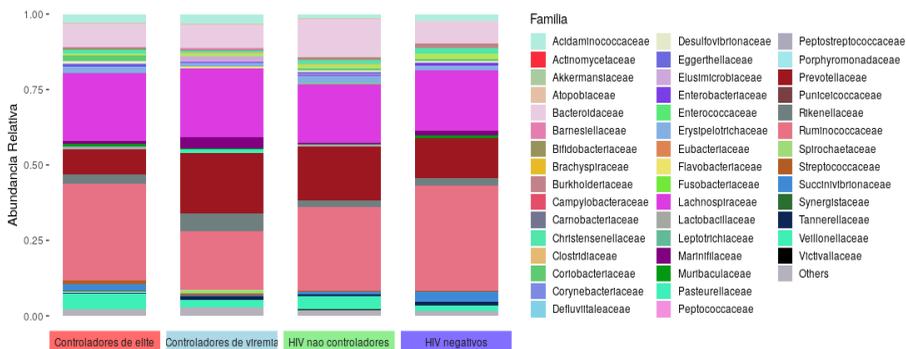
Em HIV negativos e HIV positivos, Clostridiales (62,2% e 55,2%) e Bacteroidales (23,4% e 28,5%) também foram as ordens que mais apareceram. Em indivíduos HIV negativos foi encontrada uma maior quantidade de Aeromonadales (4%) do que HIV positivos (1%) (Figura 7).

Figura 7 - Abundância relativa de ordens de bactérias em indivíduos HIV negativos e HIV positivos.



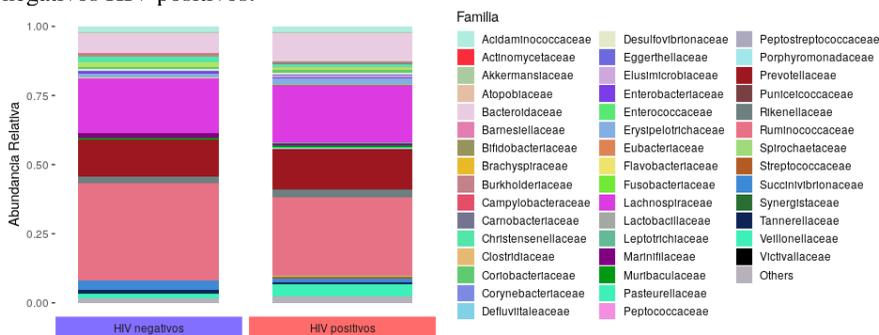
A família Ruminococcaceae foi a mais abundante nos grupos HIV negativos (37,9%), controladores de elite (32,8%) e HIV não controladores (29,6%), enquanto a família Lachnospiraceae foi a mais abundante nos controladores de viremia (22,2%). Os controladores de viremia apresentaram maior quantidade de Prevotellaceae (21%) quando comparados aos outros grupos, que apresentaram menos de 15% dessa família (Figura 8).

Figura 8 - Abundância relativa de famílias de bactérias em indivíduos controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e HIV negativos.



Em relação a comparação entre HIV negativos e HIV positivos, as famílias Ruminococcaceae (HIN 38% e HIP 30%) e Lachnospiraceae (HIP 21% e HIN 19,8%) foram as mais abundantes em ambos os grupos. Pacientes HIV positivos apresentaram maior abundância de Prevotellaceae (12,1%), Bacteroidaceae (11,2%) e Veillonellaceae (4%) do que HIV negativos (9,5%, 7,5%, 1,2% respectivamente) (Figura 9).

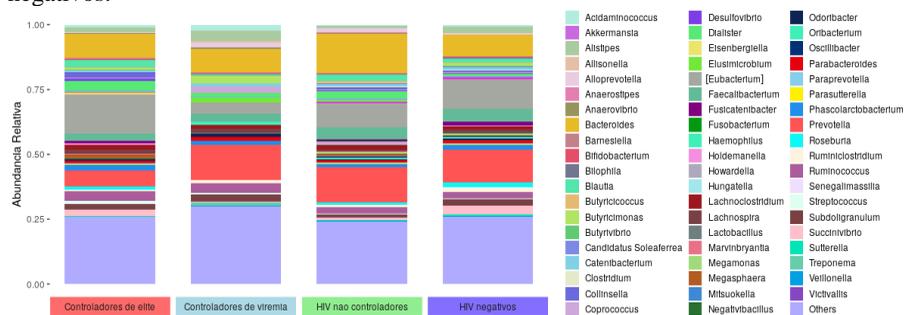
Figura 9 - Abundância relativa de famílias de bactérias em indivíduos HIV negativos HIV positivos.



Os gêneros *Bacteroides*, *Prevotella* e *Eubacterium* foram os mais abundantes. Nos controladores de elite e HIV negativos o mais abundante foi o *Eubacterium* (13% e 12,5%), nos pacientes HIV não controladores e controladores de viremia o mais abundante foi o *Bacteroides*. Para a representação gráfica foram excluídos os gêneros que

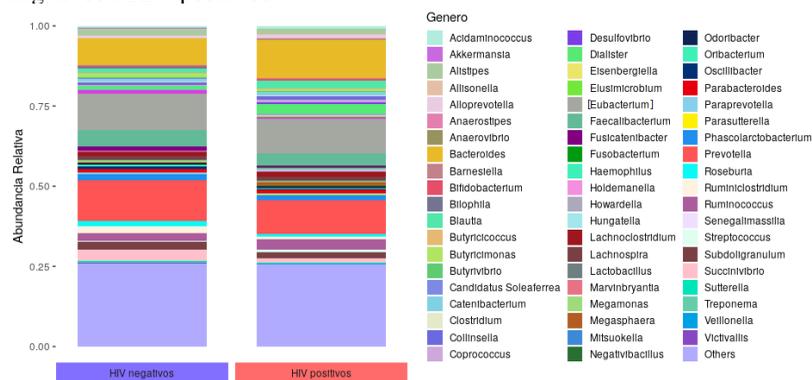
faziam parte dos 20% menos abundantes para uma melhor visualização. O gênero *Eubacterium* aparece entre colchetes “[*Eubacterium*]” pois a classificação pode ser contestada (Figura 10).

Figura 10 - Abundância relativa de gêneros de bactérias em indivíduos controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e HIV negativos.



Pacientes HIV positivos apresentaram maior abundância do gênero *Bacteroides* (12,3% contra 8% em negativos). Indivíduos HIV negativos apresentaram maior abundância do gênero *Eubacterium* (Figura 11).

Figura 11 - Abundância relativa de gêneros de bactérias em indivíduos HIV negativos e HIV positivos.



Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (p ajustado $< 0,05$) em duas ASVs entre os indivíduos controladores de elite e os HIV não controladores no gênero *Bacteroides*, com uma quantidade aumentada nos pacientes HIV não controladores. Já entre HIV não

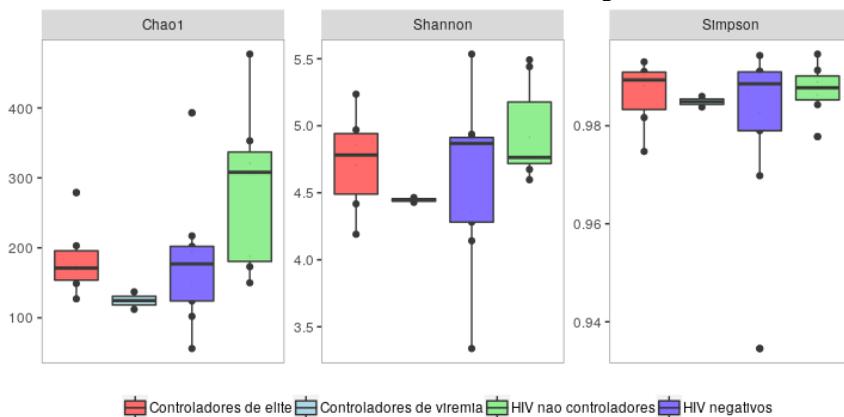
controladores e indivíduos HIV negativos, não foi encontrada nenhuma diferença significativa. Foram encontradas diferenças entre os controladores de viremia e os outros grupos, porém como esse grupo conta com apenas dois indivíduos essas diferenças não foram consideradas confiáveis. Essas diferenças incluem 10 ASVs entre controladores de viremia e controladores de elite, 33 entre controladores de viremia e HIV negativos e 41 entre controladores de viremia e HIV não controladores.

Entre os indivíduos HIV negativos e HIV positivos foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (p ajustado $< 0,05$) nos gêneros *Alloprevotella* (Prevotellaceae) e *Megasphaera* (Veillonellaceae), que estavam em maior quantidade em pacientes HIV positivos.

5.2 RIQUEZA E DIVERSIDADE ALFA

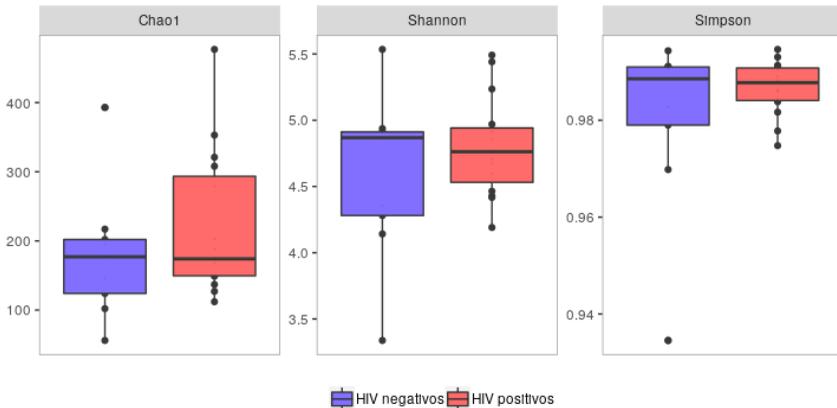
A riqueza foi avaliada utilizando o índice Chao1 e a diversidade alfa utilizando os índices de Shannon e Simpson. As diferenças entre os grupos foram avaliadas usando Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Tukley. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os grupos controladores de elite, controladores de viremia, HIV negativos e HIV não controladores (Figura 12).

Figura 12 - Índice de riqueza (Chao1) e diversidade alfa (diversidade em cada indivíduo, Shannon e Simpson) para indivíduos controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e HIV negativos.



Quando analisadas a riqueza e a diversidade alfa entre indivíduos HIV negativos e HIV positivos também não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Figura 13).

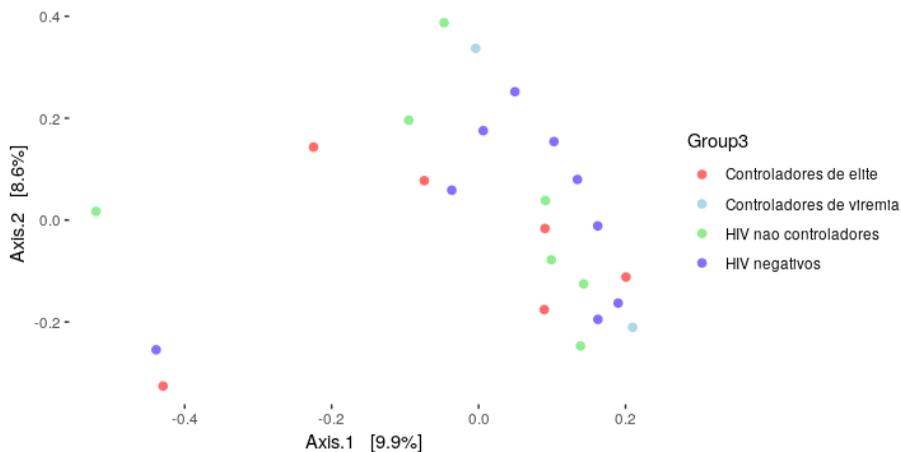
Figura 13 - Índice de riqueza (Chao1) e diversidade alfa (diversidade em cada indivíduo, Shannon e Simpson) para indivíduos HIV negativos e HIV positivos.



5.3 DIVERSIDADE BETA

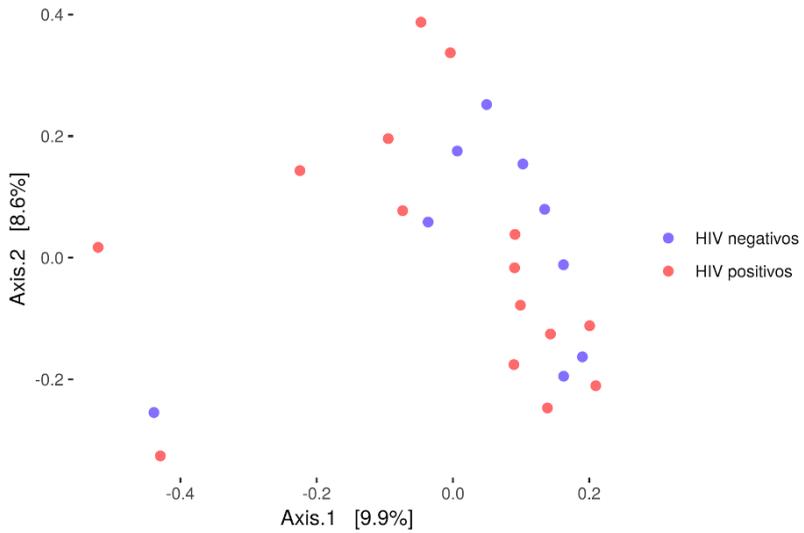
As diferenças na composição da microbiota intestinal entre os indivíduos (diversidade beta) foram avaliadas utilizando o índice de dissimilaridade de Bray Curtis. Não foram encontradas diferenças significativas entre controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e indivíduos HIV negativos (Figura 14).

Figura 14 - Diversidade beta (diversidade entre indivíduos, índice de dissimilaridade de Bray Curtis) para indivíduos controladores de elite, controladores de viremia, HIV não controladores e HIV negativos.



Entre os indivíduos HIV negativos e HIV positivos também não foram encontradas diferenças significativas na diversidade beta (Figura 15).

Figura 15 - Diversidade beta (diversidade entre indivíduos, índice de dissimilaridade de Bray Curtis) para indivíduos HIV negativos e HIV positivos.



6 DISCUSSÃO

A microbiota intestinal tem um papel importante no desenvolvimento do sistema imune e a disbiose tem sido associada ao desenvolvimento de doenças autoimunes (CERF-BENSUSSAN; GABORIAU-ROUTHIAU, 2010). Dados presentes na literatura confirmam que a microbiota intestinal possui papel importante na estimulação da diferenciação de células do sistema imune, como os linfócitos T *helper* 17 (Th17) (GABORIAU-ROUTHIAU et al., 2009). Quanto à associação com o HIV, logo no início da infecção o vírus inicia um ataque maciço à mucosa do intestino, causando uma depleção significativa de linfócitos T CD4⁺. Essa depleção é seguida por uma ruptura no epitélio intestinal, que pode não ser totalmente restaurada mesmo com o início do tratamento antirretroviral logo no início da infecção. A ruptura no epitélio intestinal leva a um desequilíbrio da composição da microbiota intestinal (disbiose) e à liberação de produtos bacterianos na circulação (translocação microbiana), que induzem ativação crônica do sistema imune (ZICARI et al., 2019).

Diante disso vários estudos têm demonstrado que a microbiota intestinal de pacientes HIV positivos difere da de indivíduos HIV negativos, sendo essas alterações associadas a translocação microbiana e ativação imune (DILLON et al., 2014; HUNG et al., 2016; GOOTENBERG et al., 2016; LOZUPONE et al., 2014). No presente estudo foram descritas a microbiota intestinal de subgrupos de pacientes HIV positivos classificados de acordo com a carga viral plasmática, sendo então comparadas a de indivíduos HIV negativos. Os pacientes HIV positivos foram classificados em subgrupos de acordo com a carga viral, contagem de células T CD4⁺ e o tempo de evolução para a doença, seguindo o descrito por Casado e colaboradores (CASADO et al., 2010). Sendo assim, foram classificados em controladores de elite, controladores de viremia e HIV não controladores. A composição da microbiota intestinal foi comparada primeiramente entre os diferentes subgrupos de pacientes HIV positivos (controladores de elite, controladores de viremia e HIV não controladores) e indivíduos HIV negativos. Em seguida, a microbiota foi comparada entre todos os pacientes HIV positivos e indivíduos HIV negativos. Apesar de não terem sido encontradas diferenças em relação à diversidade alfa e beta, foi possível identificar algumas ASVs com abundância diferenciada entre os grupos e foi feita uma descrição da composição da microbiota de pacientes controladores de elite.

A análise da composição da microbiota demonstrou que em todos os grupos os filos mais abundantes foram Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria, como observado em outros estudos (DILLON et al., 2014; HUNG et al., 2016). No presente trabalho não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação a abundância desses filos, mas outros estudos relatam uma maior abundância de Proteobactérias em indivíduos infectados pelo HIV (LOZUPONE et al., 2014; GOOTENBERG et al., 2016). O filo Proteobactéria inclui vários patógenos, como *Shigella*, *Salmonella* e *Helicobacter* e muitos desses gêneros capazes de atividades potencialmente patogênicas são enriquecidos em indivíduos infectados pelo HIV (GOOTENBERG et al., 2016).

Na classificação à nível de classes, Clostridia e Bacteroidia foram as mais abundantes em todos os grupos e a nível de ordem as mais abundantes foram Clostridiales e Bacteroidales, como observado previamente (MCHARDY I. H et al., 2013; GOOTENBERG et al., 2016). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na abundância dos taxa entre grupos. Vujkovic-Cvijin e colaboradores (2013) encontraram uma redução significativa na abundância relativa de membros de Clostridia e Bacteroidia em pacientes HIV positivos que não receberam tratamento. A ordem Bacteroidales foi associada positivamente com ativação de células T CD8⁺ (GOOTENBERG et al., 2016) e já foi relatada uma diminuição de Clostridiales em pacientes infectados pelo HIV sem tratamento (MCHARDY I. H et al., 2013).

Em relação à abundância das famílias, Ruminococcaceae foi a mais encontrada em controladores de elite, HIV negativos e HIV não controladores, enquanto em controladores de viremia Lachnospiraceae foi a mais abundante. Quando avaliada a abundância nos pacientes HIV positivos e comparada a indivíduos HIV negativos, as famílias Ruminococcaceae e Lachnospiraceae também foram as mais abundantes. Um estudo realizado por Dillon e colaboradores (2014) mostrou uma redução dessas duas famílias em pacientes HIV positivos, sendo muitas espécies dessas famílias de bactérias conhecidas por serem produtoras de butirato. O butirato é um ácido graxo de cadeia curta que é uma importante fonte de energia para o epitélio do cólon, dessa forma a abundância reduzida de bactérias produtoras desse ácido pode perpetuar a ruptura da barreira epitelial observada em indivíduos infectados pelo HIV (DILLON et al., 2014). Dessa forma, a não redução dessas famílias nos voluntários deste estudo pode ter relação ao fato deles manterem um número alto de linfócitos T CD4⁺ e permanecerem assintomáticos.

Para a análise de abundância dos gêneros foram eliminados os gêneros que faziam parte dos 20% menos abundantes, para que os mais relevantes pudessem ser melhor avaliados. Os gêneros *Bacteroides*, *Prevotella* e *Eubacterium* foram os mais encontrados, sendo *Eubacterium* mais abundante em controladores de elite e HIV negativos e *Bacteroides* em controladores de viremia e HIV não controladores. Quando todos os pacientes HIV positivos foram comparados com indivíduos HIV negativos, *Eubacterium* continuou sendo o gênero mais abundante em HIV negativos e *Bacteroides* em HIV positivos. Um estudo realizado por Mchardy e colaboradores (2013) mostrou uma diminuição do gênero *Eubacterium* em pacientes HIV positivos que não receberam terapia antirretroviral. Outro estudo, realizado por Nowak e colaboradores (2015), não encontrou diferenças estatisticamente significativas na abundância dos gêneros, mas observou uma diminuição de *Prevotella* em pacientes que receberam terapia antirretroviral, sugerindo um envolvimento na direção da infecção pelo HIV. A redução da abundância no gênero *Bacteroides* e aumento da em *Prevotella* é uma característica das alterações observadas na microbiota intestinal durante a infecção pelo HIV. As bactérias destes dois gêneros são conhecidas por serem importantes impulsionadoras da ecologia e função intestinal e alterações na abundância foram implicadas em vários estados de doença, como as doenças inflamatórias intestinais (ZEVIN et al., 2016).

Para analisar as diferenças na abundância entre os grupos foi utilizado o pacote DESeq2 (LOVE; ANDERS; HUBER, 2014) na plataforma R (R CORE TEAM, 2019). Esse pacote é indicado para análises com um baixo n amostral, uma vez que fornece maior sensibilidade em conjuntos de dados menores (<20 amostras por grupo) em comparação com testes estatísticos não paramétricos convencionais como Wilcoxon rank-sum e Kruskal-Wallis (WEISS et al., 2017). Sendo assim, o DESeq2 representa a melhor opção para este estudo, considerando o número reduzido de participantes.

Foram analisadas as diferenças na abundância dos taxa entre os subgrupos de pacientes HIV positivos e foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (p ajustado <0,05) em apenas duas ASVs entre os grupos controladores de elite e HIV não controladores. O gênero *Bacteroides* foi encontrado com uma abundância aumentada em HIV não controladores. Esse resultado difere do encontrado em outros estudos envolvendo a comparação da microbiota intestinal de controladores de elite e HIV não controladores, onde o gênero *Bacteroides* apareceu com abundância aumentada nos controladores de elite (PAQUIN-PROULX et al., 2017; NOWAK et al., 2015). Um estudo realizado por Paquin-Proulx

e colaboradores (2017) mostrou uma associação entre o enriquecimento de *Bacteroides* na microbiota intestinal e a frequência das células *natural killer* (NK) no tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal (GALT). As células NK foram encontradas com maior frequência no GALT nos controladores de elite, sendo a capacidade das células NK de produzir interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) associada com menor ativação imunológica e menores marcadores de translocação microbiana, mostrando que certas espécies bacterianas podem ter um papel fundamental na regulação da ativação imune durante a infecção pelo HIV.

Quando controladores de elite foram comparados a indivíduos HIV negativos não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Já a comparação entre os controladores de viremia e os outros grupos HIV positivos e os indivíduos HIV negativos apontou 84 ASVs que apresentaram diferenças significativas. Entretanto, como o grupo de pacientes controladores de viremia possui apenas dois pacientes, essas diferenças não foram consideradas confiáveis.

Quando indivíduos HIV negativos foram comparados a todos os pacientes HIV positivos (independente do subgrupo) foi encontrada diferença estatística nos gêneros *Alloprevotella*, da família Prevotellaceae e *Megasphaera*, da família Veillonellaceae, que estavam em maior quantidade em pacientes HIV positivos. Uma quantidade aumentada da família Prevotellaceae é uma característica comum em pacientes HIV positivos e já foi descrita em vários estudos (MACHIAVELLI et al., 2019; DILLON et al., 2014; LOZUPONE et al., 2014). Quantidades aumentadas da família Veillonellaceae em pacientes HIV positivos também já foram relatadas na literatura (SERRANO-VILLAR et al., 2017).

As diferenças entre a riqueza, diversidade alfa e diversidade beta foram avaliadas usando Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Tukley, mas não foram observadas diferenças na comparação de nenhum dos grupos. Vesterbacka e colaboradores (2017) encontraram uma microbiota mais diversa em controladores de elite quando comparada aos não controladores e mais similar à de indivíduos HIV negativos. Nowak e colaboradores (2015) encontraram uma menor diversidade nos pacientes infectados pelo HIV-1 em comparação com os HIV negativos, independentemente do número de sequências de bactérias analisadas por amostra ou se os controladores de elite foram incluídos ou não. Os indivíduos com menor quantidade de linfócitos T CD4⁺ tiveram a menor diversidade alfa. Além disso, estratificando-se os pacientes pelo índice de Shannon foi observado que pacientes com menor diversidade tiveram uma contagem de linfócitos T CD4⁺ significativamente menor em

comparação com os pacientes com maior diversidade alfa. Esses resultados podem sugerir que as diferenças na composição da microbiota podem estar mais relacionadas com o número de linfócitos T CD4⁺ do que com a carga viral.

Diante das diferenças encontradas entre estudos anteriores e o presente estudo é importante destacar que esse foi realizado utilizando o método de ASVs enquanto os outros foram realizados utilizando a construção habitual de unidades taxonômicas operacionais (OTUs, do inglês “*operational taxonomic unit*”). As OTUs são construídas por meio de leituras de sequenciamento em cluster que são suficientemente semelhantes umas às outras. Como resultado, as OTUs definidas em dois conjuntos de dados diferentes não podem ser comparadas e a variação biológica que não é representada no banco de dados de referência é necessariamente perdida durante a atribuição de OTUs (CALLAHAN et al., 2016).

As ASVs são inferidas por um processo no qual as sequências biológicas são diferenciadas dos erros com base na premissa de que sequências biológicas sejam mais provavelmente observadas repetidamente do que sequências contendo erros. Dessa forma representam uma realidade biológica que existe fora dos dados analisados. Sendo assim as ASVs são reutilizáveis em todos os estudos, reproduzíveis em conjuntos de dados futuros e não são limitadas por bancos de dados de referência incompletos (CALLAHAN et al., 2016), justificando a escolha desse método para as análises realizadas neste trabalho.

Ademais, os pacientes HIV positivos recrutados para participar desse estudo nunca receberam terapia antirretroviral, uma vez que mantém a contagem de linfócitos T CD4⁺ superior a 500 células/mm³, carga viral inferior a 20.000 cópias de RNA viral/ml e permanecem assintomáticos. Nowak e colaboradores (2015) mostraram que quando comparados pacientes HIV positivos sem tratamento e assintomáticos a indivíduos HIV negativos não houve grande variação na composição da microbiota intestinal, corroborando os resultados encontrados no presente estudo. Diante disso, é possível sugerir que as alterações no número de linfócitos T CD4⁺ podem ter mais impacto na composição da microbiota intestinal do que a carga viral (NOWAK et al., 2015).

É importante ressaltar que o presente estudo possui limitações como o baixo número amostral de pacientes. Entretanto, embora existam outros estudos que avaliam a microbiota intestinal de pacientes controladores de elite, nenhum deles foi conduzido no Brasil, sendo sabido que a microbiota pode mudar de região para região. Ademais,

nenhum dos estudos foi realizado utilizando o método de variantes da sequência de amplicon (ASVs), que apresenta a vantagem de ser reproduzível e não limitado por bancos de dados de referência. Dessa forma, o presente estudo representa a primeira caracterização da microbiota intestinal em indivíduos controladores de elite no Brasil.

7 CONCLUSÃO

Os resultados aqui expostos indicam ausência de diferenças significativas na composição da microbiota intestinal entre os indivíduos que possuem uma proteção natural contra o desenvolvimento da aids e os que não possuem. Sendo assim, a hipótese deste trabalho, que consistia em a microbiota intestinal dos pacientes controladores de elite ser diferente da microbiota dos outros grupos de pacientes HIV positivos e mais semelhante à de indivíduos HIV negativos, não foi aceita. Entretanto, todos os voluntários recrutados apresentavam altas taxas de linfócitos T CD4⁺ (superior a 500 células/mm), o que pode sugerir que a contagem de linfócitos T CD4⁺ pode ter um impacto maior nas alterações da composição da microbiota intestinal comparado a carga viral. Ademais, este trabalho utilizou o método ASVs, sendo esse método ainda pouco utilizado e diferente do método usado pelos outros estudos aqui citados. Portanto, novos estudos que usem o mesmo método poderão observar se os resultados se repetem.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho sugerem que a quantidade de linfócitos T CD4⁺ pode ter um impacto maior nas alterações da microbiota intestinal em pacientes HIV positivos do que a carga viral. Dessa forma, a partir destes resultados, novos trabalhos podem avaliar as diferenças na microbiota intestinal em indivíduos com diferentes níveis de linfócitos T CD4⁺ ou comparar a microbiota de pacientes controladores de elite com pacientes HIV positivos sintomáticos, investigando assim mais profundamente essa relação.

9 REFERÊNCIAS

ANDREWS S. FastQC: a quality-control tool for high-throughput sequence data. Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom, 2010. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em 02 jun. 2019.

BANSAL, A. et al. Normal T-cell activation in elite controllers with preserved CD4 + T-cell counts. **Aids**, v. 29, n. 17, p. 2245–2254, 2015.

BARRÉ-SINOUSSE, F. HIV as the cause of AIDS. **Lancet**, v. 348, n. 9019, p. 31–35, 1996.

BASTOS, F. I.; BARCELLOS, C. Geografia social da AIDS no Brasil. The social geography of AIDS in Brazil. **Revista Saúde Pública**, v. 29, n. 1, p. 52–62, 1995.

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

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

BRENCHLEY, 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, 2006.

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

CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.

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

1–12, 2010.

CASADO, C. et al. Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. 2–7, 2010.

CERF-BENSUSSAN, N.; GABORIAU-ROUTHIAU, V. The immune system and the gut microbiota: Friends or foes? **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 10, p. 735–744, 2010.

COCKERHAM, L. R.; HATANO, H. Elite control of HIV: Is this the right model for a functional cure? **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 71–75, 2015.

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

CROWELL, T. A.; HATANO, H. Clinical outcomes and antiretroviral therapy in “elite” controllers: a review of the literature. **Journal of Virus Eradication**, v. 1, n. 2, p. 72–77, 2015.

DILLON, S. M. et al. An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 4, p. 983–994, 2014.

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

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

ELLIS, C. L. et al. (rDNA) Quantification and correlations with immune activation. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 57, n. 5, p. 363–370, 2011.

GABORIAU-ROUTHIAU, V. et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell

responses. **Immunity**, v. 31, n. 4, p. 677–689, 2009.

GOOTENBERG, D. B. et al. HIV-associated changes in the enteric microbial community. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 0, p. 1, 2016.

GUERRERO-BELTRAN, C. et al. Anionic carbosilane dendrimers destabilize the GP120-CD4 complex blocking HIV-1 entry and cell to cell fusion. **Bioconjugate Chemistry**, v. 29, n. 5, p. 1584-1594, 2018.

HELANDER, H. F.; FÄNDRIKS, L. Surface area of the digestive tract - revisited. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 49, n. 6, p. 681-689, 2014.

HERLEMANN, D. P. et al. Transition in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. **The ISME Journal**, v. 5, 1571-1579, 2011.

HUNG, L. H. et al. GUIDock: Using docker containers with a common graphics user interface to address the reproducibility of research. **PLoS one**, v. 11, n. 4, p. 1-14, 2016.

IVANOV, I. I. et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 19, n. 21, p. 6218–6221, 2009.

KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. .1, p. 1-11, 2013.

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

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, 2014.

LUCAS, S.; NELSON, A. M. HIV and the spectrum of human

disease. **Journal of Pathology**, v. 235, n. 2, p. 229–241, 2015.

MACHIAVELLI, A. et al. The impact of in utero HIV exposure on gut microbiota, inflammation, and microbial translocation. **Gut Microbes**, v. 10, p. 1–16, 2019.

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

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Hiv, aids. **HIV Aids Boletim Epidemiológico**, p. 64, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2018. Boletim Epidemiológico - HIV Aids Julho de 2017 a junho de 2018. **Secretaria de Vigilância em Saúde - MS**, p. 72, 2018.

MOWAT, A. M.; VINEY, J. L. The anatomical basis of intestinal immunity. **Immunological Reviews**, v. 156, n. 1, p. 145–166, 1997.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Falhas nos mecanismos de defesa do hospedeiro. In: MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Imunologia de Janeway*. 7. ed. Porto Alegre, RS. Artmed. 2010. cap 12. p 495-544.

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

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

OKULICZ, J. F. et al. Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and longterm nonprogressors in the US department of defense HIV natural history study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 11, p. 1714–1723, 2009.

PAQUIN-PROULX, D. et al. Bacteroides are associated with

GALT iNKT cell function and reduction of microbial translocation in HIV-1 infection. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 1, p. 69–78, 2017.

PATRICK, S. The Human Mycobiome. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 5, p. 103–122, 2015.

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

POLO, T. A. A influência de polimorfismos de fatores de restrição na suscetibilidade ao HIV e na Progressão à Aids. 63f. Dissertação (Mestrado em genética e biologia molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2017.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 590–596, 2013.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em 02. jun. 2019.

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

SAKSENA, N. K. et al. Elite HIV controllers: Myth or reality? **AIDS Reviews**, v. 9, n. 4, p. 195–207, 2007.

SERRANO-VILLAR, S. et al. Gut bacteria metabolism impacts immune recovery in HIV-infected individuals. **EBioMedicine**, v. 8, p. 203–216, 2016.

SERRANO-VILLAR, S. et al. How can the gut microbiota affect immune recovery in HIV-infected individuals? **Future Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 195–199, 2017.

SHU, Z. et al. How intestinal bacteria can promote HIV replication. **AIDS Reviews**, v. 15, n. 1, p. 32–37, 2013.

UNAIDS. UNAIDS Data 2018. **Programme on HIV/AIDS**, p. 1–376, 2018.

VESTERBACKA, J. et al. Richer gut microbiota with distinct metabolic profile in HIV infected Elite Controllers. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

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

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

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

ZICARI, S. et al. Immune activation, inflammation, and non-aids co-morbidities in HIV-infected patients under long-term ART. **Viruses**, v. 11, n. 3, p. 200, 2019.