



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCIÊNCIAS

Wellinton Muniz do Nascimento

**ANÁLISE DA ESTRUTURA E FUNCIONALIDADE METABÓLICA DA
MICROBIOTA INTESTINAL DE INDIVÍDUOS HIV POSITIVOS CONTROLADORES
DE ELITE**

Florianópolis
2021

Wellinton Muniz do Nascimento

**ANÁLISE DA ESTRUTURA E FUNCIONALIDADE METABÓLICA DA
MICROBIOTA INTESTINAL DE INDIVÍDUOS HIV POSITIVOS CONTROLADORES
DE ELITE**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Rodrigo Zárate-Bladés

Florianópolis
2021

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

Nascimento , Wellinton Muniz do

Análise da estrutura e funcionalidade metabólica da microbiota intestinal de indivíduos HIV positivos controladores de elite / Wellinton Muniz do Nascimento ; orientador, Aguinaldo Roberto Pinto, coorientador, Carlos Rodrigo Zárate-Bladés, 2021.

78 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. HIV. 3. Microbiota intestinal . 4. Controladores de elite. 5. Subtipo viral. I. Pinto, Aguinaldo Roberto. II. Zárate-Bladés, Carlos Rodrigo . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

WELLINTON MUNIZ DO NASCIMENTO

**ANÁLISE DA ESTRUTURA E FUNCIONALIDADE METABÓLICA DA
MICROBIOTA INTESTINAL DE INDIVÍDUOS HIV POSITIVOS CONTROLADORES
DE ELITE**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Elayne Crestani Pereira
Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL)

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

Profa. Dra. Izabela Thaís da Silva
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Biociências pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências-UFSC.

Prof. Dr. Glauber Wagner
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências-UFSC

Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto
Orientador

Florianópolis, 2021

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Evanildo Muniz do Nascimento e Vaneide Santos do Nascimento, por sempre incentivarem eu e meus irmãos a estudar, apesar de todas as barreiras e dificuldades impostas pela vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida, por me fortalecer nos momentos de fraqueza, por me capacitar nos momentos de necessidade, pelas imensuráveis bênçãos recebidas. Obrigada também meu Deus pelas pessoas maravilhosas que sempre colocastes em minha vida.

À minha família, em especial meus pais Vaneide Santos do Nascimento e Evanildo Muniz do Nascimento, pelas inúmeras orações, pelos valores e educação que me deram, por todo o carinho, amor e apoio incondicional, que por vezes deixaram seus próprios desejos de lado para concretizar minhas realizações e mesmo muito distantes, nunca mediram esforços para que eu pudesse estar aqui neste momento. Obrigado por tudo, amo vocês.

À minha querida irmã Leticia Santos, por sempre torcer pelas minhas conquistas, por sempre me apoiar, principalmente financeiramente por me ajudar em todos os momentos difíceis da minha vida, mesmo muito distante, obrigado por tudo, te amo.

Ao meu querido irmão Raphael Santos, por todos esses anos compartilhados juntos sobre o mesmo teto, por todos os conselhos, por ter me dado forças em todos os momentos em que eu pensei em desistir. Agradeço a ti por todo o apoio e parceria, pelo amor e por todo o suporte que tem me dado desde o início da minha caminhada na vida acadêmica, obrigado por tudo meu irmão, eu te amo.

Às minhas amadas avós, Rosa Purcina pelas numerosas orações e pedidos por mim feito e por todo o apoio e Lurdes Santos por toda sua alegria contagiante e torcida por minhas conquistas, amo vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Aginaldo R. Pinto, primeiramente pela oportunidade concedida de orientação, por todos os ensinamentos, conversas e reuniões que por vezes constituíram uma aula à parte, por toda a paciência e calma em solucionar minhas dúvidas e problemas, foi gratificante, obrigado por tudo professor.

Agradeço também ao meu coorientador Prof. Dr. Carlos Zàrate, por toda a contribuição para a realização desse trabalho, especialmente por ter me incentivado, auxiliado e me apoiado nos momentos de dificuldade, pelas inúmeras conversas e

ideias científicas e principalmente por não ter desistido de mim, obrigado por tudo professor.

Aos professores Dr. Carlos Zanetti, Dr. Oscar Bruna-Romero, Dra. Célia Barardi e Dr. Rubens Tadeu pelos ensinamentos recebidos durante a realização da parte experimental deste estudo no laboratório de Imunologia Aplicada.

Ao Dr. Luiz Gustavo Escada, que nos abriu as portas do Hospital Regional de São José Dr. Homero de Miranda Gomes, por sua atenção e esforço para realização desse trabalho.

Ao Dr. Eduardo Campos que nos apoiou e nos abriu as portas para a realização das coletas no Hospital Nereu Ramos.

As enfermeiras do Hospital Regional, especificamente do Hospital Dia que me deram todo apoio, incentivo e auxílio e que não mediram esforços para realizar atividades referentes a esse trabalho, mesmo quando já tinha diversas outras obrigações.

Gostaria de agradecer também aos grandes amigos que fiz desde minha chegada à Florianópolis, em especial, Sadrack, Silvério e João Vitor (pão de queijo), por todos os momentos de alegrias, pelas confraternizações, pelos cultos, por toda a diversão e por me mostrarem como apreciar as coisas simples da vida, meu muito obrigado.

Aos meus queridos amigos do Acqua Plage, Felipe Farias, Willian, Tales, Yuri e Sofia pelo companheirismo e pelos incontáveis momentos de alegria e descontração.

Aos meus colegas de Pós-Graduação, Douglas, Aline e Lívia pelo companheirismo e por todo apoio para a realização deste trabalho.

Finalmente, a Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade da realização deste trabalho.

“Quando a vida decepciona, qual é a solução?

Continue a nadar! Continue a nadar!

Continue a nadar, nadar, nadar!

Para achar a solução, nadar, nadar!”

(WALTERS, GRAHAM; **PROCURANDO NEMO**, 2003.)

RESUMO

Indivíduos HIV positivos classificados como controladores de elite (EC, do inglês *Elite Controllers*) representam um grupo raro de indivíduos com a capacidade de controle da replicação viral, mantendo a viremia em níveis baixos ou indetectáveis por longos períodos na ausência de tratamento antirretroviral. Atualmente esses indivíduos representam modelo promissor para o estudo de diversos mecanismos envolvidos no controle natural da progressão do HIV. Diversos estudos têm sido desenvolvidos para caracterizar melhor esse grupo, na tentativa de uma maior compreensão dos fatores envolvidos no controle da infecção. Sabe-se que alterações na microbiota intestinal têm sido relacionadas a várias doenças e na infecção causada pelo HIV-1 estudos apontam diferenças na composição da microbiota de indivíduos HIV positivos em comparação a indivíduos não infectados. O objetivo desse estudo foi investigar a composição e funcionalidade da microbiota intestinal de uma coorte de indivíduos HIV positivos com perfil EC, bem como outros aspectos que possam contribuir para o controle da progressão da doença causada pelo HIV-1. Inicialmente foi observado que os pacientes HIV positivos apresentaram alterações na abundância de vários táxons quando comparados com indivíduos não infectados. As análises revelaram que a família Atopobiaceae e os gêneros *Acidaminococcus*, **Libanicoccus** e *Lachnospiraceae NK3A20* estavam mais enriquecidos nos indivíduos HIV positivos, enquanto que a ordem Verrucomicrobiales, classe Verrucomicrobiae, famílias Barnesiellaceae e Akkermansiaceae e os gêneros *Angelakissela*, *Oscillospira*, *Turicibacter*, *Bilophila* e *Akkermansia* eram mais abundantes entre os indivíduos HIV negativos. Também foi observado que vários táxons foram significativamente mais abundantes em HIV positivos com perfil EC em comparação com não-controladores e HIV negativos, incluindo *Acidaminococcus*, *Clostridium methylpentosum*, *Barnesiella*, *Eubacterium coprostanoligenes* e *Lachnospiraceae UCG-004*. Não foram observadas diferenças na diversidade alfa e beta entre pacientes HIV positivos e indivíduos saudáveis. A partir da predição do conteúdo funcional *in silico* foi possível identificar diversas vias metabólicas que variaram em abundância entre pacientes HIV positivos não-controladores e indivíduos não infectados. Observou-se que uma maior abundância do gênero *Prevotella* e uma diminuição de *Bacteroides* está associado ao comportamento de homens que fazem sexo com homens infectados pelo HIV. Ademais, demonstrou-se pela primeira vez que o subtipo viral parece influenciar na composição da microbiota intestinal. Indivíduos infectados com o subtipo B possuíam uma microbiota mais rica em *Succinivibrio*, enquanto que um enriquecimento de *Streptococcus* foi observado nos pacientes infectados pelo subtipo C. Este estudo representa a primeira caracterização da microbiota intestinal no Brasil de um grupo de indivíduos HIV positivos EC e pode contribuir para investigações futuras que considerem a microbiota intestinal como possível alvo terapêutico.

Palavras-chave: HIV. Microbiota intestinal. Controladores de elite. Metabolismo. Subtipo viral.

ABSTRACT

HIV-positive individuals classified as elite controllers (EC) represent a rare group of individuals with the ability to control viral replication, maintaining viremia at low or undetectable levels for long periods in the absence of antiretroviral treatment. Currently, these individuals represent a promising model for the study of several mechanisms involved in the natural control of HIV progression. Several studies have been developed to better characterize this group, in an attempt to better understand the factors involved in infection control. It is known that changes in the gut microbiota have been related to several diseases and in the infection caused by HIV-1, studies show differences in the composition of the microbiota of HIV-positive individuals compared to non-infected individuals. The aim of this study was to investigate the composition and functionality of the gut microbiota of a cohort of HIV-positive individuals with an EC profile, as well as other aspects that may contribute to the control of disease progression caused by HIV-1. Initially, it was observed that HIV-positive patients showed alterations in the abundance of several taxa when compared to non-infected individuals. The analyzes revealed that the Atopobiaceae family and the genera *Acidaminococcus*, *Libanicoccus* and *Lachnospiraceae* NK3A20 were more enriched in HIV-positive individuals, while the order Verrucomicrobiales, class Verrucomicrobiae, families Barnesiellaceae and Akkermansiaceae, and the genera *Angelakissela*, *Oscillospira*, *Turicibacter*, *Bilophila* and *Akkermansia* more abundant among HIV-negative individuals. It was also observed that several taxa were significantly more abundant in EC-profile positive HIV compared to non-controllers and HIV negative, including *Acidaminococcus*, *Clostridium methylpentosum*, *Barnesiella*, *Eubacterium coprostanoligenes* and *Lachnospiraceae* UCG-004. No differences in alpha and beta diversity were observed between HIV-positive patients and healthy individuals. From the prediction of functional content in silico, it was possible to identify several metabolic pathways that varied in abundance between non-controlling HIV positive patients and non-infected individuals. It was observed that a greater abundance of the genus *Prevotella* and a decrease in *Bacteroides* is associated with the behavior of men who have sex with men infected with HIV. Furthermore, it was demonstrated for the first time that the viral subtype seems to influence the composition of the intestinal microbiota. Individuals infected with subtype B had a microbiota richer in *Succinivibrio*, while an enrichment of *Streptococcus* was observed in patients infected with subtype C. This study represents the first characterization of the intestinal microbiota of a Brazilian cohort of HIV-positive EC individuals and may contribute for future investigations that consider the intestinal microbiota as a possible therapeutic target.

Keywords: HIV. Gut microbiota. Elite controllers. Metabolism. Viral subtype.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativas globais de crianças e adultos vivendo com HIV em 2019.....	36
Figura 2 - Taxa de detecção de aids (por 100.000 habitantes), segundo região de residência, por ano de diagnóstico, Brasil, 2009 a 2019.....	37
Figura 3 - Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV-1.....	40
Figura 4 - Curso natural da infecção pelo HIV na ausência de terapia antirretroviral...	42
Figura 5 - Curso natural da infecção pelo HIV em controladores do HIV.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos controladores de elite e não-controladores

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC - Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos
bNAbs – Anticorpos amplamente neutralizantes
CDC - Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América
CMSP – Células mononucleares do sangue periférico
CRFs - Formas recombinantes circulantes
EC – Controladores de elite
GALT – Tecido linfoide associado ao intestino
GF - *Germ-free*
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
HIVc- Controladores do HIV
HSH – Homens que fazem sexo com homens
IDO - Indoleamina 2,3- dioxigenase
ILCs – Células linfoides inatas
KIR - *killer immunoglobulin-like receptor*
LPS - Lipopolissacrídeo
LTNP – *Long-term non progressors*
NC – Não-controlador
NK – *Natural killer*
PT – Progressor típico
TARV – Terapia antirretroviral
TR – Transcriptase reversa
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
UNAIDS - Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS
URFs – Formas recombinantes únicas
VC – Controlador virêmico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1.2	EPIDEMIOLOGIA DO HIV/AIDS.....	13
1.3	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HIV-1.....	16
1.4	ESTRUTURA E O CICLO REPLICATIVO DO HIV-1.....	17
1.5	CURSO CLÍNICO DA INFECÇÃO PELO HIV-1 NA AUSÊNCIA DE ART.....	19
1.6	CONTROLADORES DO HIV.....	20
1.6.1	Fatores genéticos.....	22
1.6.2	Imunidade Inata.....	22
1.6.3	Imunidade adaptativa.....	24
1.6.4	Características virológicas.....	25
1.7	MICROBIOTA INTESTINAL.....	26
1.7.1	Composição e função da microbiota intestinal.....	26
1.7.2	O papel da microbiota intestinal no desenvolvimento do sistema imune.....	27
1.7.3	A infecção pelo HIV-1 altera a composição da microbiota do hospedeiro.....	28
1.8	OBJETIVOS.....	33
1.8.1	Objetivo Geral.....	33
1.8.2	Objetivos Específicos.....	33
2	METODOLOGIA.....	34
2.1	Local, população de estudo, critérios de inclusão e considerações éticas.....	34
2.2	Coleta e processamento das amostras.....	34
2.3	Análise da microbiota intestinal.....	35
2.3.1	Preparação da biblioteca genômica e sequenciamento das amostras.....	35
2.3.2	Análises de bioinformática.....	36
2.3	Genotipagem do CCR5Δ32.....	36
2.4	Análise do subtipo e tropismo viral.....	37
2.5	Análises estatísticas.....	37

3	CAPÍTULO 1.....	39
4	CAPÍTULO 2.....	41
4.2	RESULTADOS.....	41
4.2.1	Genotipagem do CCR5Δ32 e análise do tropismo viral.....	41
4.3	DISCUSSÃO.....	42
5	CAPÍTULO 3.....	44
6	DISCUSSÃO GERAL.....	45
7	CONCLUSÕES.....	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
	APÊNDICE A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	71
	APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..	76

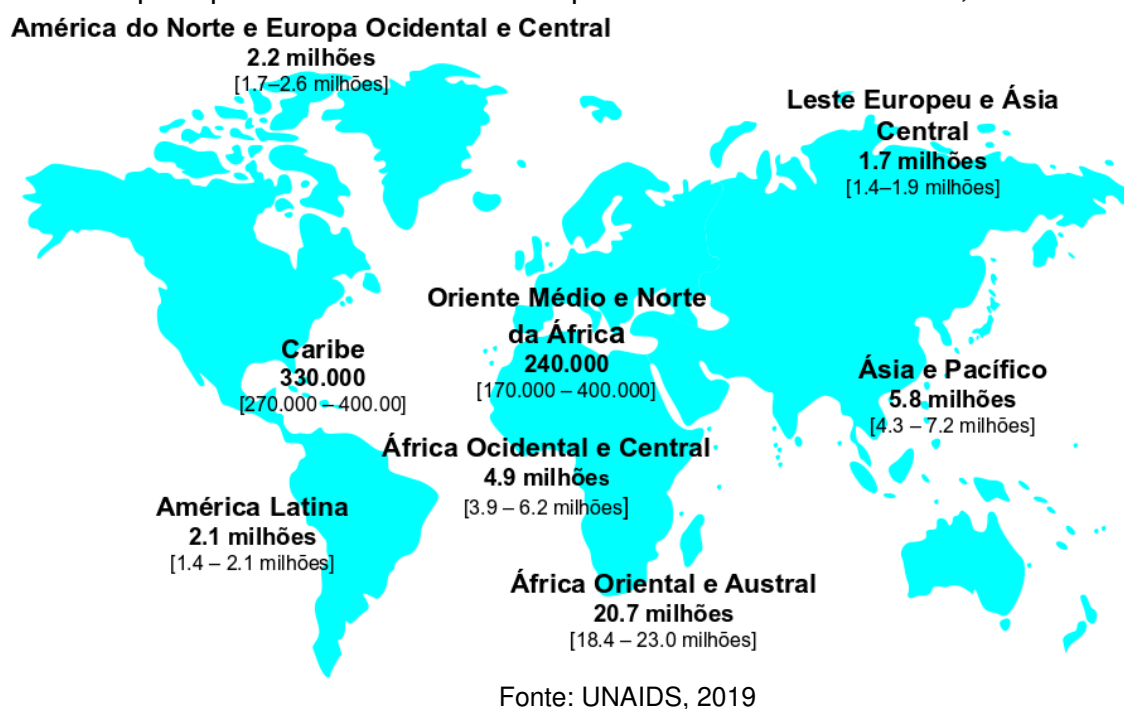
1 INTRODUÇÃO GERAL

A síndrome da imunodeficiência adquirida, também conhecida por aids, foi descrita pela primeira vez em 1981 pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC, do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*), quando um número crescente de homens jovens homossexuais apresentavam infecções oportunistas incomuns e doenças malignas raras como pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* e sarcoma de Kaposi (CDC, 1982; HOFFMANN *et al.*, 2007). Não demorou muito para que se percebesse que quadro clínico semelhante também ocorria em outras populações, como usuários de drogas injetáveis, pessoas que receberam transfusões sanguíneas e prisioneiros, sugerindo que essa nova síndrome poderia ser transmitida por meio de relações sexuais. Em 1983, apenas dois anos após o registro dos primeiros casos desta síndrome, seu agente causador foi isolado: o vírus da imunodeficiência humana (HIV).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DO HIV/AIDS

A aids é uma das doenças infecciosas de maior importância para saúde pública mundial. Segundo estimativas do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS, do inglês *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*), desde o início da epidemia, cerca de 76 milhões de pessoas foram infectadas com o vírus e 33 milhões de pessoas morreram de doenças relacionadas com a infecção. Em 2019, foram registrados 1,7 milhões de novas infecções e atualmente existem 38 milhões de pessoas infectadas, incluindo 1,8 milhões de crianças menores de 15 anos. Os casos de novas infecções reduziram 23% desde 2010. Em 2019, 690.000 mil pessoas morreram por doenças relacionadas com aids no mundo, em comparação com 1,1 milhões em 2010, representando um declínio de 39%. Todavia as reduções observadas nesses índices se devem ao sucesso no uso da terapia antirretroviral (TARV). Em 2019, 25,4 milhões de pessoas portadoras do HIV tiveram acesso ao tratamento, o que representou 67% de todas as pessoas infectadas no mundo (UNAIDS, 2020).

Figura 1 - Estimativas globais de crianças e adultos vivendo com HIV em 2019. Mapa representativo elaborado a partir de dados da UNAIDS, 2019



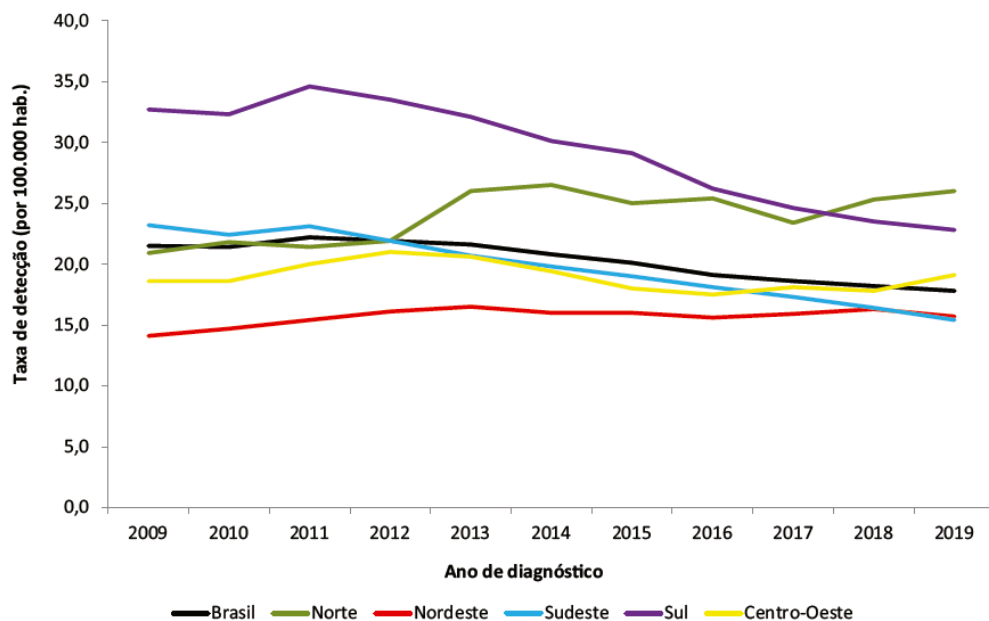
Na América Latina, em 2019, 2,1 milhões de pessoas viviam com HIV, equivalente a uma prevalência de 0,4% (Figura 1). As novas infecções aumentaram 21% de 2010 a 2019 nessa região e cerca de 37.000 pessoas morreram por complicações relacionadas a aids. No mesmo período, o número de mortes caiu ligeiramente de 41.000 em 2010 para 37.000 em 2019, diminuindo aproximadamente 8%. O tratamento com TARV já atinge 78% das pessoas que vivem com HIV na América Latina. O Brasil encontra-se entre os 15 países do mundo com mais casos de HIV, sendo o país com maior incidência na América Latina. Dentre todas as pessoas vivendo com HIV no mundo, aproximadamente 80% concentram-se em apenas 20 países, sendo o Brasil um desses (UNAIDS, 2020).

No Brasil, desde o início da epidemia em 1980 até junho de 2020, foram registrados 1.011.617 casos de aids, com uma média anual de 39 mil casos nos últimos 5 anos. A distribuição proporcional dos casos de aids demonstra uma concentração maior nas regiões Sul e Sudeste, compreendendo cada qual a 19,9 e 51% do total de casos identificados desde o início da epidemia. Nos últimos anos, a taxa de detecção de aids tem demonstrado uma diminuição, com uma média de 17,8 casos para cada 100 mil habitantes em 2019 (Figura 2). Nos últimos 10 anos também se observa uma diminuição na taxa de detecção na região Sul, passando de 32,7

casos para cada 100 mil habitantes em 2009 para 22,8 em 2019 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Figura 2 – Taxa de detecção de aids (por 100.000 habitantes), segundo região de residência, por ano de diagnóstico, Brasil, 2009 a 2019.

Fonte: Ministério da Saúde, 2020



Dentre os estados brasileiros, Roraima e Amazonas apresentaram as maiores taxas de detecção de aids em 2019, com 40,1 e 34,8 casos por 100 mil habitantes, respectivamente. Entre as capitais, Porto Alegre apresenta a maior taxa registrada em 2019, 58,5 casos para cada 100 mil habitantes, valor correspondente ao dobro da taxa do estado e 3,3 vezes maior que a taxa nacional. Já o estado de Santa Catarina apresentou nesse mesmo ano a sexta maior taxa de detecção com 25,1 casos para cada 100 mil habitantes, enquanto que Florianópolis apresentou uma incidência de 48,1 casos para cada 100 mil habitantes, tornando se quinta capital com maior incidência de casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

O total de óbitos acumulados no Brasil desde o primeiro caso da doença identificado em 1980 até final de ano de 2019, soma 349.784, sendo que desses a maioria ocorreu na região Sudeste (57,7%), seguida do Sul (17,8%), Nordeste (13,9%), Centro-Oeste (5,3%) e Norte (5,3%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Para acelerar os esforços para acabar com a epidemia de aids, a UNAIDS e parceiros lançaram as metas 90-90-90 em 2014. Esta estratégia global para controlar a pandemia de HIV/AIDS tem como objetivo diagnosticar 90% de todos os indivíduos

HIV positivos, aumentar o acesso à TARV em 90% dos indivíduos soropositivos e alcançar a supressão viral em 90% daqueles tratados até 2030 (UNAIDS, 2017). Seguindo essas recomendações, o Ministério da Saúde do Brasil recomendou o início do tratamento com antirretroviral para todos os indivíduos infectados pelo HIV, independentemente do seu estágio clínico, com o objetivo de zerar a carga viral, diminuir a transmissão e controlar o número de novas infecções pelo vírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Atualmente, estima-se que 89% das pessoas que vivem com HIV estão diagnosticadas, 77% dos diagnosticados estão em uso de TARV e desses 94% atingiram a supressão viral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b).

1.3 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HIV-1

O HIV-1 é um vírus altamente diverso e classificado em quatro grupos: M (*major*), N (*non-M, non-O*), O (*outlier*) e P, cada um originado de um evento independente de transmissão cruzada de espécies entre primatas não-humanos e humanos (SHARP; HAHN, 2011). O grupo M do HIV-1 se diversificou em diferentes linhagens, denominados subtipos, designados pelas letras A, B, C, D, F, G, H, J e K, onde A e F ainda são subdivididos em subsubtipos A1-A6, F1-F2. Além disso, mais de 50 diferentes formas recombinantes circulantes (CRFs) foram identificadas, juntamente com uma abundância de formas recombinantes únicas (URFs) (HEMELAAR *et al.*, 2019). Acredita-se que esses CRFs e URFs se originem de uma recombinação de material genético viral quando vírus de dois subtipos diferentes infectam a mesma célula. Se uma forma recombinante foi isolada de três sujeitos independentes em redes de transmissão separadas, então, por definição, é um CRF em vez de um URF. Existe uma variação genética entre os subtipos de 25 a 35% e até 20% de variação pode ser observada dentro de um subtipo (LI *et al.*, 2015).

A epidemiologia global do HIV-1 é muito heterogênea e varia em todo mundo, mesmo dentro das regiões do mesmo continente. Globalmente o subtipo C é responsável por quase metade de todas as infecções pelo HIV-1 no mundo. É considerada endêmica na África Subsaariana e Oriental (onde residem mais de dois terços dos indivíduos infectados), seguida pelo Pacífico Índico e região Sul do Brasil. O subtipo A é responsável por cerca de 10% das infecções, encontrado principalmente na África. O subtipo B é variante mais disseminada, responsável por

cerca de 12% das infecções, concentrados principalmente na Europa Ocidental e Central, América Latina e do Norte e Oceania. O CRF02_AG é responsável por 8% e CRF01_AE por 5% e ocorrem principalmente na África Ocidental e no Sudeste Asiático. Os subtipos F, H, J e K combinados representam cerca de 0,9% das infecções. Outros CRFs e URFs são responsáveis por 3,7% e 6,1% respectivamente, das infecções no mundo, elevando o total infecções por vírus recombinantes a aproximadamente 24% em todo o mundo (HEMELAAR *et al.*, 2019).

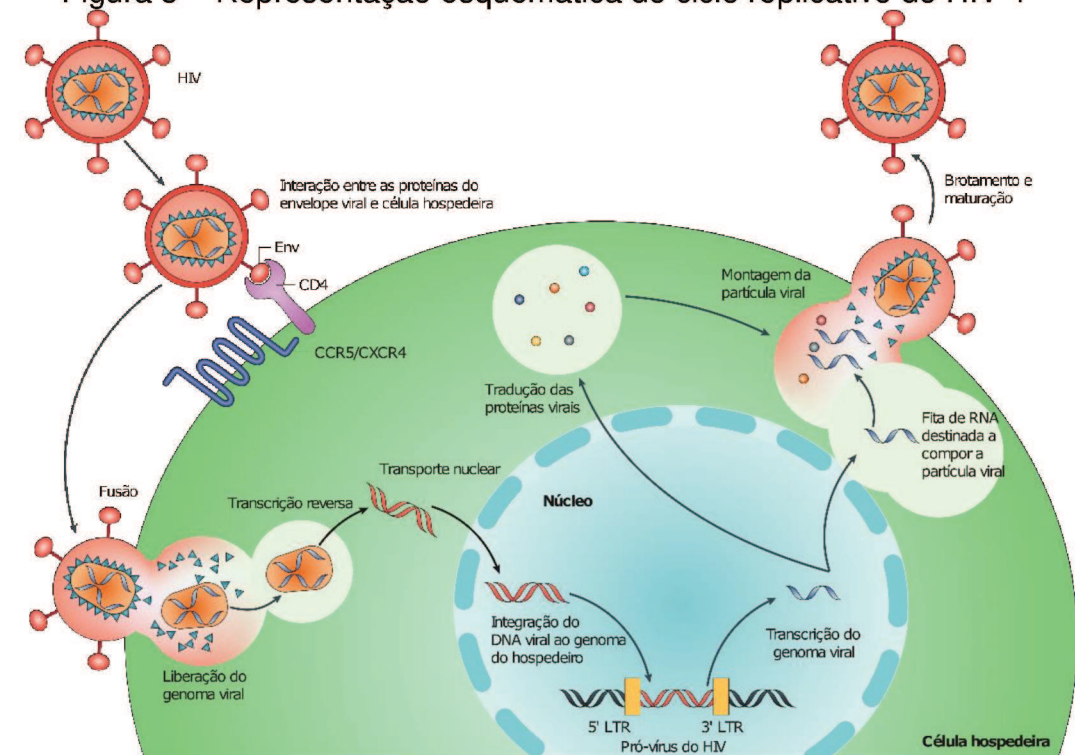
1.4 ESTRUTURA E O CICLO REPLICATIVO DO HIV-1

O HIV é um retrovírus da família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e que pertence ao gênero *Lentivirus* devido a seu longo período de incubação e lento desenvolvimento dos sintomas que compõem a doença que ele causa (KRUPOVIC *et al.*, 2018). Com base nas características genéticas e diferenças nos antígenos virais, o HIV é classificado como HIV-1 ou HIV-2. Enquanto o HIV-2 é menos patogênico e causa infecções restritas ao oeste da África, o HIV-1 é responsável por causar a pandemia mundial de aids (RAMBAUT *et al.*, 2004).

O HIV-1 é constituído na face externa por um envelope glicoprotéico composto por uma bicamada lipídica derivada das células do hospedeiro. Ancoradas ao envelope estão as glicoproteínas gp120 e gp41 responsáveis pela fusão do vírus à molécula CD4 e aos correceptores CCR5 (receptor de quimiocina C-C do tipo 5) ou CXCR4 (receptor de quimiocina C-X-C do tipo 4) localizados na superfície da célula alvo (NAIF, 2013). Na face interna encontra-se uma matriz protéica composta por subunidades da proteína p17 que envolve o capsídeo viral formado pela proteína p24. Dentro do capsídeo encontra-se o genoma viral que consiste em duas moléculas idênticas de RNA de fita simples, cada uma contendo cerca de 10 mil nucleotídeos e nove genes. Os três principais genes (*env*, *gag* e *pol*) estão presentes em todos os retrovírus. Esses genes são responsáveis por codificar as proteínas gp120 e gp41, as enzimas transcriptase reversa (TR), integrase e protease e as proteínas que formam o capsídeo viral. Além disso, outros 6 genes são considerados acessórios (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*), que podem estimular a transcrição do DNA proviral e o transporte do RNAm para o citoplasma, bem como o escape dos mecanismos de defesa do sistema imune (FANALES-BELASIO *et al.*, 2010).

As principais fases do ciclo de replicação do HIV-1 são demonstradas na Figura 3. O passo inicial de entrada do HIV nas células é a ligação da proteína do envelope gp120 à molécula CD4 encontrada na superfície de células como linfócitos T, macrófagos, monócitos, células dendríticas e da micróglia. A gp120 passa por uma mudança conformacional que promove a interação com o correceptor (CCR5 ou CXCR4), que é necessário para entrada do vírus na célula (BARRÉ-SINOUSI, 1996; PORNILLOS; GANSER-PORNILLOS, 2013). Após a entrada do vírus na célula, o RNA viral é transcrito em DNA proviral pela enzima TR. O DNA viral é transportado para o núcleo onde a proteína integrase faz a integração do DNA viral ao genoma celular. Após a integração no genoma da célula, o DNA viral passa a ser chamado de provírus (BARRÉ-SINOUSI, 1996; WONG-STAAAL, 1991). Novos vírions são formados no citoplasma, quando a protease viral cliva longos polipeptídeos que darão origem às proteínas virais. A partícula viral recém montada brota da membrana celular, resultando em um novo vírion capaz de infectar outras células (SUNDQUIST; KRÄUSSLICH, 2012).

Figura 3 – Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV-1



Fonte: Adaptado de Peterlin e Trono, 2003

1.5 CURSO CLÍNICO DA INFECÇÃO PELO HIV-1 NA AUSÊNCIA DE ART

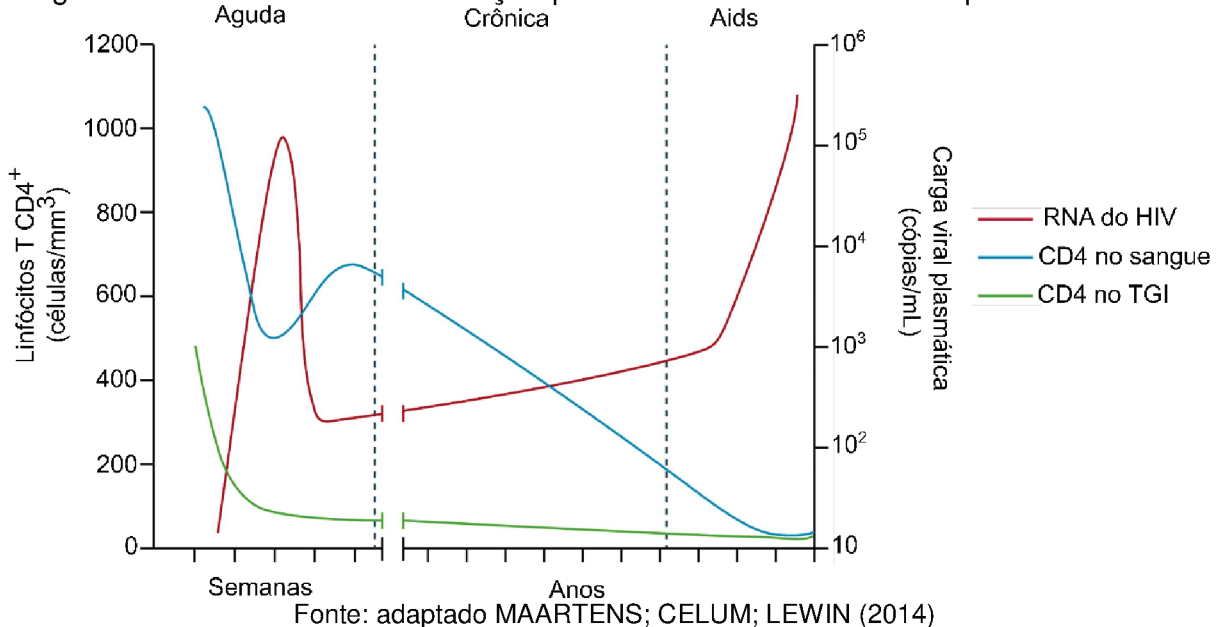
Clinicamente a infecção pelo HIV pode ser dividida em 3 fases: a fase aguda, a fase crônica e a fase de aids (Figura 4) (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014). A fase aguda ou infecção primária inicia-se dentro de 2 a 4 semanas após a infecção, quando os pacientes podem manifestar sintomas semelhantes à gripe, uma alta carga viral e um declínio acentuado dos linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico e no trato gastrointestinal (TGI). Nessa fase ocorre uma resposta imunológica intensa, que diminui a viremia, chegando a um patamar estável conhecido como *set point* (COFFIN; SWANSTROM, 2013). Quando os níveis de anticorpos passam a ser detectáveis, a fase aguda termina, momento em que ocorre a soroconversão. O número de linfócitos T CD4⁺ se recupera parcialmente. Além disso, nessa fase as células dendríticas e os macrófagos infectados fazem a disseminação do vírus para diversos sítios do corpo, principalmente os tecidos linfoides.

Com o final da fase aguda, a infecção entra num período crônico também chamado de fase de latência clínica, geralmente assintomática e caracterizada pela replicação viral persistente e depleção lenta e gradativa de linfócitos T CD4⁺ (COFFIN; SWANSTROM, 2013). O tempo de duração dessa fase na ausência de ART é extremamente variável entre os indivíduos e diferentes perfis de progressão podem ser observados. A maioria dos indivíduos infectados (70-80%), chamados de professores típicos, progredem para a doença entre 3 a 8 anos após a infecção. Aproximadamente 5 a 15% dos indivíduos infectados pelo HIV são chamados de progressores rápidos, pois apresentam um rápido declínio no número de linfócitos T CD4⁺ e alta taxa de replicação viral e evoluem para aids em 3 anos após a soroconversão (CASADO *et al.*, 2010). Uma pequena população de indivíduos infectados (<5%), conhecidos como progressores lentos ou LTNP (do inglês *long-term non progressors*), permanecem assintomáticos por muitos anos, conseguindo controlar a replicação viral e mantendo a viremia baixa e alto número de linfócitos T CD4⁺ (DEEKS; WALKER, 2007; GRABAR *et al.*, 2009).

Normalmente, após o final da fase crônica na ausência de ART, o número de linfócitos T CD4⁺ começam a diminuir chegando a níveis críticos (na maioria das vezes abaixo de 200 células/mm³), iniciando-se a fase de aids (STAPRANS & FEINBERG, 2004; NAIF, 2013). Nessa fase o sistema imune não é mais capaz de proteger o

indivíduo de infecções oportunistas como por exemplo, toxoplasmose, tuberculose, candidíase, dentre outras, marcando o início da fase de aids, a qual sem o emprego da TARV o desfecho é o óbito (EL-ATROUNI; BERBARI; TEMESGEN, 2006; NAIF, 2013). Entretanto, a TARV pode mudar o curso clínico da infecção, suprimindo a replicação viral, atuando em várias fases do ciclo replicativo e impedindo a multiplicação viral. Ademais, a terapia reestabelece a manutenção da resposta imune contra uma variedade de patógenos, além de melhorar a qualidade de vida dos indivíduos infectados (NAIF, 2013).

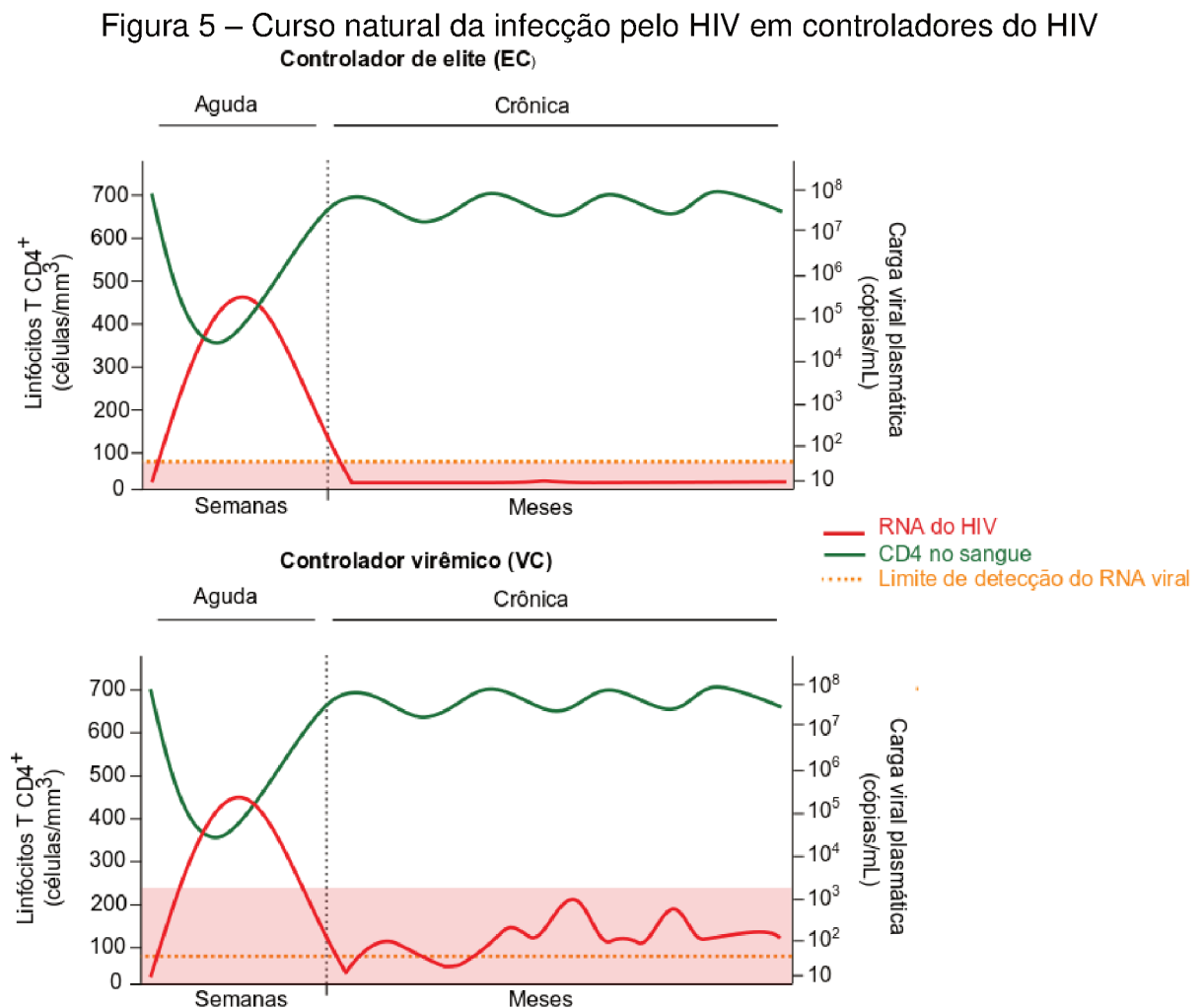
Figura 4 – Curso natural da infecção pelo HIV na ausência de terapia antirretroviral



1.6 CONTROLADORES DO HIV

Com o surgimento dos testes de quantificação de carga viral na década de 1990, foi reportado que um subgrupo de indivíduos infectados pelo HIV, em sua maioria LTNPs, capazes de resistir à progressão da doença, mantendo a carga viral em níveis baixos ou indetectáveis por períodos prolongados (2-10 anos) na ausência de TARV, sendo chamados de Controladores do HIV (HIVc) (DEEKS; WALKER, 2007; OKULICKZ; LAMBOTTE, 2011). Esse subgrupo de pacientes tem sido dividido em duas subcategorias: Controladores de elite (EC) e Controladores virêmicos (VC) (Figura 5). Os EC representam um pequeno número de indivíduos infectados pelo HIV (<1%) que mantém a carga viral abaixo dos limites de detecção (<50-80 cópias/mL) e

as contagens de linfócitos T CD4⁺ estáveis durante a fase crônica da infecção na maioria dos pacientes. Por outro lado, os VC consistem em pacientes que mantêm as cargas virais em níveis baixos, inferiores a 2.000 cópias/mL, concentrações de linfócitos T CD4⁺ estáveis durante fase crônica e representam até 7% dos indivíduos infectados pelo HIV (OKULICZ *et al.*, 2009) A manutenção do controle do HIV-1 em EC e VC é variável, mas alguns estudos têm demonstrado que esse controle pode durar por períodos de tempo extremamente longos (mais de 30 anos), demonstrando evidências claras que o controle da replicação viral na ausência de TARV é possível (WALKER; YU, 2013).



Fonte: adaptado MAARTENS *et al.* (2014)

O fato de os EC controlarem a replicação viral naturalmente sem o uso de TARV tornou-os os alvos de inúmeros investigações clínicas ao longo dos anos, pois

esses indivíduos representam um modelo para uma potencial cura terapêutica funcional (AUTRAN *et al.*, 2011; CASADO *et al.*, 2020). Assim, nos últimos anos várias hipóteses foram levantadas para explicar o controle da viremia observado nesses pacientes, que incluem fatores do hospedeiro (genético e imunológico) e/ou relacionados ao vírus (WALKER; YU, 2013).

1.6.1 Fatores genéticos

Dentre as razões genéticas de resistência à infecção pelo HIV, uma das consideradas mais importante é a homozigose para a deleção de 32 pares de bases no gene do receptor de quimiocina 5 (CCR5 Δ 32) (MOYLE *et al.*, 2005). Esta resulta na síntese de uma proteína truncada com apenas quatro dos sete domínios necessários para sua expressão na superfície das células e em consequência oferece resistência à infecção por cepas R5 do HIV-1. Os indivíduos heterozigotos para a mutação Δ 32 do CCR5 são susceptíveis à infecção pelo HIV-1, mas podem ter uma progressão lenta para a aids (MARMOR *et al.*, 2001; GALVANI; NOVEMBRE, 2005). Estudos já tem observado a mutação do gene CCR5 Δ 32 em indivíduos LTNP e EC (COHEN *et al.*, 1997; PASTORI *et al.*, 2006).

O segundo fator genético de maior importância é o conjunto de moléculas HLA de um indivíduo. Vários estudos já indicaram que o HLA parece exercer uma forte influência no controle da replicação viral e na progressão da doença (PEREYRA *et al.* 2010; ZAUNDERS; DYER; CHURCHILL, 2011). Alguns estudos têm relatado uma associação dos alelos de classe I, HLA-B*27 (PEREYRA *et al.*, 2008; PEREYRA *et al.*, 2010), HLA-B*57 (MIGUELES *et al.* 2000; PEREYRA *et al.*, 2008; LÉCUIROUX *et al.*, 2014) e HLA-B*52 (TEIXEIRA *et al.*, 2014) ao perfil LTNP/EC.

1.6.2 Imunidade Inata

Embora a imunidade inata desempenhe um papel na infecção pelo HIV atuando no recrutamento de células do sistema imune através da secreção de citocinas e quimiocinas, tem sido definida como menos relevante no controle viral em relação à imunidade adaptativa (WALKER; YU, 2013). Entretanto, estudos têm demonstrado propriedades exclusivas dos mecanismos de defesa imunológica inata

em indivíduos EC (DEEKS; WAKER, 2007; WALKER; YU, 2013; CROWELL; HATANO, 2015; CASADO *et al.*, 2020).

A população de células *natural killer* (NK) tem sido implicada no controle da replicação viral em EC (BERGER; ALTER, 2011; KURI-CERVANTES, 2014). Sabe-se que essas células têm a capacidade de eliminar com eficiência células infectadas pelo HIV por meio de suas atividades citolíticas ou pela produção de citocinas citotóxicas (SCULLY; ALTER, 2016). Outra característica importante é que essas células expressam em sua superfície uma família de glicoproteínas, conhecidas como moléculas KIR (do inglês, *killer immunoglobulin-like receptor*) que interagem com moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe I, ativando essas células para destruição de células infectadas. Alguns estudos têm demonstrado que os receptores KIR3DS1 e KIRDL1, ao interagir com alelos HLA-B, induzem respostas aumentadas, sendo associados ao retardo da progressão da doença (BOULET *et al.*, 2008; KAMYA *et al.*, 2011; PARSONS *et al.*, 2012; GENOVESE; NEBULONI; ALFANO, 2013). Outros estudos também observaram um controle da replicação viral em indivíduos EC e VC, expressando HLA-Bw4*80I em células alvo e o receptor KIR3DL1 nas células NK, demonstrando uma citotoxicidade maior quando comparado com linfócitos T CD8⁺ (TOMESCU *et al.*, 2012; GENOVESE; NEBULONI; ALFANO, 2013). Ademais, células NK de pacientes LTNP também produzem concentrações elevadas de IFN- γ , os quais são maiores do que os progressores típicos e indivíduos não infectados, o que é um importante mecanismo de controle nos LTNP (POROPATICH; SULLIVAN, 2008).

As células dendríticas, conhecidas pela sua função como células apresentadoras de antígenos, ainda não têm um papel totalmente elucidado na infecção pelo HIV. Sua função pode variar de acordo com o estágio da doença (HERBEUVAL; SMITH; THEZE, 2012). Um subconjunto dessas células, as células dendríticas plasmocitóides, exercem atividade antiviral na infecção pelo HIV por meio da secreção de altas concentrações de IFN- α , quantidades essas que são mantidas em níveis mais elevados em EC em comparação aos progressores típicos (BARBLU *et al.*, 2012). Embora ocorra uma diminuição de células dendríticas durante a infecção pelo HIV, já foi relatado que essas células mantêm sua funcionalidade preservada (BARBLU *et al.* 2012; MACHMACH *et al.* 2012).

1.6.3 Imunidade adaptativa

Algumas células da imunidade adaptativa como os linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, bem como os anticorpos neutralizantes, estão envolvidos diretamente ou indiretamente na progressão, susceptibilidade, resistência ou proteção à infecção pelo HIV-1. Entretanto, o grau de importância dessas células no controle viral em pacientes EC ainda permanece controverso (WALKER; YU 2013; ZAUNDERS; VAN BOCKEL, 2013).

Os linfócitos T CD4⁺, principais células alvo do vírus, são as células mais afetadas durante a infecção pelo HIV. Essas células podem ser ativadas pela apresentação de antígenos e pela produção de citocinas pró-inflamatórias. Todavia a ativação, infecção e morte dessas células vão provocar um alto nível de exaustão e consequentemente diminuição de linfócitos T CD4⁺ (CASTELLINO; GERMAIN, 2006; MANCHES *et al.*, 2008). Grande parte da replicação e morte dessas células ocorre no tecido linfóide associado ao intestino (GALT) (GUADALUPE *et al.*, 2003; BRENCHLEY *et al.*, 2004), que abriga um grande número de linfócitos T CD4⁺ que reconhecem peptídeos do HIV-1, denominados linfócitos T CD4⁺-específicos para o HIV-1, sendo estes os mais afetados (DOUEK *et al.*, 2002). Esses, por sua vez, exibem respostas com perfil Th1, secretando IFN- γ , TNF- α e IL-2 (MARTINEZ *et al.*, 2005). Em pacientes EC, essas células mantêm sua capacidade replicativa (SAEZ-CIRION *et al.*, 2011), habilidade de produção de múltiplas citocinas, principalmente IL-2 e IL-21, que por sua vez aumentam as atividades antivirais das células T CD8⁺ específicas para o HIV-1 (CHEVALIER *et al.*, 2010; PORICHIS; KAUFMANN, 2011), enquanto que em pacientes progressores típicos a proliferação e produção dessas citocinas é comprometida (WILSON *et al.*, 2000; HARARI *et al.*, 2004).

Indivíduos EC apresentam células T CD8⁺ com capacidade proliferativa aumentada, principalmente nos estágios iniciais da infecção e que são importantes na eliminação de células T CD4⁺ infectadas (DYER *et al.*, 2008). Isso se deve ao fato de que os EC possuem células T CD8⁺ com capacidade de sintetizarem quantidades maiores de grânulos citotóxicos, como granzima e perforina, tornando-os mais rápidos e eficientes na lise de células alvo infectadas, em comparação com linfócitos T CD8⁺ de progressores típicos (MIGUELES; OSBORNE; ROYCE, 2008; HERSPERGER *et al.*, 2011). Além disso, tem sido demonstrado que as células T CD8⁺ dos EC são

capazes de secretar simultaneamente múltiplas citocinas (IFN- γ , MIP1- β , TNF- α , IL-2 e CD107a (ZIMMERLI *et al.*, 2005; BETTS *et al.*, 2006; CARD *et al.*, 2012). Em conjunto, esses achados fornecem evidências de que as células T CD8⁺ estão fortemente relacionadas ao controle da replicação viral.

Os anticorpos amplamente neutralizantes (bNAbs) fornecem proteção contra diversos patógenos e estão presentes com vários graus de magnitude e amplitude em quase todos os indivíduos infectados pelo HIV-1 (LAMBOTTE *et al.*, 2009). Entretanto, estudos apontaram que nem todos os controladores do HIV têm capacidade de produzir bNAbs contra o HIV, mesmo com uma baixa replicação viral (GONZALEZ *et al.*, 2018). Alguns estudos têm sugerido que o desenvolvimento de bNAbs é uma consequência da replicação viral (SATHER *et al.*, 2009; DORIA-ROSE *et al.*, 2010), enquanto outros relatam que os bNAbs não podem contribuir para o controle da viremia devido ao escape contínuo do HIV da pressão imune por mutação ou glicosilação (GONZALEZ *et al.*, 2018). Entretanto, um trabalho que envolveu um paciente com perfil EC sugeriu que os bNAbs podem ter uma função no controle da replicação viral (FREUND *et al.*, 2017). Ademais, já foi demonstrado que a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) parece estar aumentada em EC quando comparado aos progressores típicos, sugerindo que mecanismos de defesa baseados no ADCC podem auxiliar no controle natural da replicação viral (LAMBOTTE *et al.*, 2009).

1.6.4 Características virológicas

Estudos iniciais demonstraram a presença de cepas virais defeituosas ou atenuadas em alguns pacientes com perfil LTNP e EC, sugerindo que as deleções genéticas virais, principalmente no gene *nef*, poderiam ser responsáveis pela incapacidade de replicação viral nesses indivíduos (MARIANI *et al.*, 1996; MICHAEL *et al.*, 1995; ALEXANDER *et al.*, 2000; LUM *et al.*, 2003; MOLOGNI *et al.*, 2006; RAJAN *et al.*, 2006). Posteriormente, outros estudos demonstraram que a maioria dos pacientes EC são infectados com uma forma de vírus competente que é predominantemente controlado por fatores relacionados ao hospedeiro (BLANKSON *et al.*, 2007; LAMINE *et al.*, 2007). Além disso, também foi descrito que pacientes EC infectados com vírus competentes transmitiram para outros para outros pacientes que

desenvolveram doença progressiva (BAILEY *et al.*, 2008; BUCKHEIT *et al.*, 2012). Outra característica virológica singular é que os EC podem ter os reservatórios virais reduzidos. Estudos demonstraram que células mononucleares do sangue periférico de pacientes EC tinham quantidades diminuídas de DNA do HIV em comparação com outros grupos de pacientes infectados pelo HIV (LAMBOTTE *et al.*, 2005; SAJADI *et al.*, 2009). Em resumo, essas investigações não conseguiram fornecer evidências que o vírus por si só desempenhe um papel no controle da viremia, indicando que os fatores relacionados ao hospedeiro são provavelmente o principal mecanismo para o desenvolvimento do fenótipo de controlador do HIV-1.

1.7 MICROBIOTA INTESTINAL

1.7.1 Composição e função da microbiota intestinal

A microbiota intestinal é uma comunidade complexa de microrganismos que habitam o trato digestivo. Os seres humanos abrigam trilhões desses microrganismos, incluindo bactérias, arqueas, fungos e vírus que colonizam o trato digestivo logo após o nascimento e que são essenciais para a homeostasia do hospedeiro (PASSOS; MORAES-FILHO, 2017), ao mesmo tempo em que ocupam um ambiente protegido e rico em nutrientes (GENSOLLEN *et al.*, 2016; DUBOURG *et al.*, 2017) e estabelecem uma relação simbiótica com o hospedeiro.

A microbiota intestinal abriga mais de 1.500 espécies, distribuídas em mais de cinquenta filos diferentes (ROBLES-ALONSO; GUARNER, 2013) e é bem aceito que os filos Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Fusobacteria, Actinobacteria e Verrucomicrobia são os mais abundantes, responsáveis por cerca de 90% da população bacteriana em humanos (JETHWANI; GROVER, 2019). Já os gêneros mais comumente encontrados são *Bacteroides*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* e *Peptostreptococcus*. Dentre esses, o gênero *Bacteroides* é o mais abundante, sendo que espécies desse gênero representam aproximadamente 30% das bactérias encontradas no intestino, sugerindo que o mesmo é de extrema importância para o funcionamento do organismo hospedeiro (SHAPIRA, 2016). Entretanto, vários fatores intrínsecos e extrínsecos influenciam na composição da microbiota intestinal, como a

genética do hospedeiro, sua idade, sexo além da dieta (ODAMAKI *et al.*, 2016), tipo de nascimento (NAGPAL *et al.*, 2017), uso de antibióticos e outras drogas (HASAN; YANG, 2019).

De fato, a microbiota intestinal desempenha diversas funções essenciais para o funcionamento normal do organismo do hospedeiro, incluindo a colonização de superfícies intestinais, criando uma estabilidade do sistema que evite a invasão de microrganismos patogênicos, síntese de vários produtos metabólicos, bem como o controle da proliferação e diferenciação de células epiteliais (ROTHSCHILD *et al.*, 2018; MILLS *et al.*, 2019; GOMAA, 2020). Além disso, já foi descrito que a microbiota intestinal tem a capacidade de sintetizar alguns produtos neuroquímicos que podem afetar os sistemas nervoso central, entérico e periférico (FORSYTHE *et al.*, 2010; GROCHOWSKA; LASKUS; RADKOWSKI, 2019; ZHENG *et al.*, 2019).

1.7.2 O papel da microbiota intestinal no desenvolvimento do sistema imune

Nos últimos anos, diversos trabalhos têm demonstrado que os sinais derivados da microbiota intestinal são essenciais para o desenvolvimento do sistema imunológico (WU; WU, 2012; SENDER; FUCHS, MILO, 2016). Os primeiros estudos realizados com animais livres de germes ou GF (do inglês *germ-free*) relataram que as bactérias que colonizam o intestino são importantes na formação da imunidade inata e adaptativa (THORBECKE, 1959; BAUER *et al.*, 1963; SMITH *et al.*, 2007). Anticorpos IgA apresentaram redução substancial em animais GF, que foram rapidamente restaurados pela colonização microbiana (HAPFELMEIER *et al.*, 2010). Outros estudos têm ampliado esses achados, demonstrando novas evidências de fatores celulares e moleculares envolvidos nessa relação, principalmente relacionados às células que secretam citocinas IL-17 e linfócitos T regulatórios. No caso dos linfócitos T auxiliares 17 (Th17), curiosamente, sabe-se que estas células dependem de um grupo específico de bactérias, conhecidas como bactérias filamentosas segmentadas (do inglês, *Segmented Filamentous Bacteria*), que são essenciais para a sua diferenciação e estimulação (KUWAHARA *et al.*, 2011; SCZESNAK *et al.*, 2011). Também já foi demonstrado que outras bactérias intestinais são importantes para o desenvolvimento do sistema imune, como por exemplo *Bacterioides fragilis* que mostrou ser capaz de induzir o desenvolvimento de uma resposta reguladora por meio

de suas moléculas de polissacarídeo A que são importantes para o desenvolvimento de linfócitos Treg (TROY; KASPER, 2010). Posteriormente, algumas espécies dos grupos IV e XIV do gênero *Clostridium* foram descritas como função similar para direcionar a diferenciação de linfócitos Treg (ATARASHI *et al.*, 2010; OMENETTI; PIZARRO, 2015). Um interesse considerável foi recentemente atribuído às células linfoides inatas (ILCs), um novo grupo de células efectoras da imunidade inata que são encontradas principalmente nas mucosas, que também demonstraram relações com a microbiota, principalmente as ILCs do tipo 3 (BERNINK *et al.*, 2013; CORDING *et al.*, 2018).

1.7.3 A infecção pelo HIV-1 altera a composição da microbiota do hospedeiro

Em humanos, o TGI compreende aproximadamente 40 a 65% de todas as células do sistema imune. Essa característica é coincidente com o fato de que a mucosa gastrointestinal é o local de principal ataque do HIV. Além disso, também é onde ocorre maior perda de linfócitos T CD4⁺, devido parcialmente à alta concentração de células T CD4 de memória que expressam CCR5, molécula que o vírus usa como co-receptor de invasão celular (BRENCHLEY *et al.*, 2004; LACKNER; LEDERMAN; RODRIGUEZ, 2012; SHU *et al.*, 2013). Estudos demonstram que a maioria (cerca de 60%) das células T CD4⁺ de memória presentes no GALT são infectadas em poucos dias após a chegada do HIV ao organismo (MATTAPALLIL *et al.*, 2005; LACKNER; MOHAN; VEAZEY, 2009; LACKNER; LEDERMAN; RODRIGUEZ, 2012.). De fato, essa depleção significativa e substancial de linfócitos T CD4⁺ presentes no GALT ocorre rapidamente já no início da infecção e persiste durante todo o curso da mesma. Com essa constante depleção de células, a infecção pelo HIV-1 causa um desequilíbrio entre o sistema imune de mucosa e a microbiota, e conseqüentemente ocasiona a ruptura da barreira epitelial intestinal. O efeito direto deste comprometimento da barreira epitelial é a passagem de bactérias intestinais e produtos microbianos, como o LPS, para o sangue periférico, processo denominado de translocação microbiana (SHU *et al.*, 2013; SOMSOUK *et al.*, 2015). Essas observações forneceram indicações de que a translocação microbiana seja uma das principais causas de ativação imune crônica, uma das principais características da infecção pelo HIV-1. O comprometimento da barreira epitelial intestinal e conseqüente

translocação microbiana ocorrem tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção e contribuem significativamente para a progressão da doença (EPPLÉ *et al.*, 2010; KLATT; FUNDERBURG; BRENCHLEY, 2013). Assim, a translocação microbiana aumentada, determinada comumente através da presença de lipopolissacrídeo (LPS) ou CD14 solúvel no plasma, está associada com a ativação e a proliferação de linfócitos T do sangue periférico, diminuição de células Th17, desenvolvimento de distúrbios neurocognitivos e aumento da mortalidade geral pelo HIV-1 (VASSALLO *et al.*, 2012; KLATT; FUNDERBURG; BRENCHLEY, 2013; MARCHETTI, TINCATI, SILVESTRI, 2013). Ademais, uma vez na circulação, esses produtos microbianos provocam potentes respostas inflamatórias por meio da ativação de vários receptores, como os receptores do tipo Toll (do inglês, *Toll-like receptors*), em especial o TLR-4 (SANDLER; DOUEK, 2012). Em células da imunidade inata, como macrófagos, células dendríticas e monócitos, a ligação desses receptores a metabólitos microbianos desencadeia uma cascata de sinalização e consequente secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α , IFN- α e IL-6. Embora essas respostas possam trazer benefícios para o hospedeiro, na infecção pelo HIV-1 elas podem contribuir para a progressão da doença (SANDLER; DOUEK, 2012; SHU *et al.*, 2013; ZEVIN *et al.*, 2016). Dessa forma, as bactérias intestinais indiretamente poderiam contribuir para que se mantenha um estado de tolerância imunológica, que pode promover a replicação e transmissão do vírus (SHU *et al.*, 2013).

Uma das consequências mais significativas para o GALT causado pelo HIV-1 é a diminuição drástica das células Th17. Sabe-se que essas células desempenham uma função importante na defesa do hospedeiro contra patógenos bacterianos e fúngicos de vida extracelular, especialmente aquelas encontradas em superfícies de mucosas (OUYANG; KOLLS; ZHENG, 2008). Essas células promovem o recrutamento de neutrófilos para sítios de infecção bacteriana, induzem proliferação de enterócitos e produção de defensinas bacterianas. Entretanto, a diminuição de células Th17 na mucosa intestinal de indivíduos infectados pelo HIV pode gerar uma redução no controle de bactérias intestinais, tornando os indivíduos mais suscetíveis à translocação microbiana e consequentemente à ativação imune crônica (BRENCHLEY *et al.*, 2008; OMENETTI; PIZARRO, 2015).

Por outro lado, a ingestão de bactérias probióticas já demonstrou prover benefícios para indivíduos infectados por HIV-1, incluindo a restauração das funções da barreira intestinal, auxílio na diminuição da translocação microbiana e na produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como o aumento no número de linfócitos T CD4⁺ (CARTER *et al.*, 2016). Um estudo realizado na Nigéria demonstrou que mulheres infectadas pelo HIV que consumiram um iogurte suplementado com os probióticos *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 tiveram um aumento no número de linfócitos T CD4⁺ (ANUKAM *et al.*, 2008). Trois e colegas também demonstraram que crianças brasileiras que receberam probióticos contendo em sua fórmula *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus thermophilus* tiveram um aumento na contagem de linfócitos T CD4⁺, demonstrando que os probióticos têm propriedades imunoestimulantes e que poderiam ser úteis no tratamento de crianças infectadas pelo HIV (TROIS; CARDOSO; MIURA, 2007).

Entretanto, a microbiota intestinal é um fator crítico no desenvolvimento e manutenção de respostas fisiológicas no hospedeiro. De fato, alterações na microbiota intestinal têm sido relacionadas a doenças de diversos tipos como obesidade (MONDOT *et al.*, 2013), doença inflamatória intestinal (FRANK *et al.*, 2007), diabetes tipo 1 (ALKANANI *et al.*, 2015), cirrose (MACNAUGHTAN; JALAN, 2015), doença periodontal (WANG *et al.*, 2013) e mais recentemente doenças cardiovasculares (YAMASHITA, 2017; YOSHIDA; YAMASHITA; HIRATA, 2018).

Já na infecção pelo HIV-1, uma variedade de estudos reporta alterações na composição da microbiota de indivíduos HIV positivos em comparação a indivíduos não infectados. Gori *et al.* (2007) foram os primeiros a abordar a potencial disbiose intestinal na infecção pelo HIV-1. Nesse estudo os autores observaram que indivíduos soropositivos, além de apresentarem alterações na microbiota, demonstraram uma prevalência de patógenos considerados oportunistas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*) e menor abundância de bactérias consideradas protetoras (*Bifidobacteria* e *Lactobacilli*); também observaram concentrações mais elevadas de calprotectina nas fezes, sugestivo de processo inflamatório na mucosa intestinal. Mais tarde, Ellis e colaboradores (2011), encontraram um aumento de bactérias pró inflamatórias pertencentes à ordem Enterobacteriales e Bacteroidales na mucosa de pacientes infectados pelo HIV em comparação com indivíduos saudáveis. Além disso, foi observado que a quantidade de bactérias pertencentes a essas ordens nas fezes

estava associada à diminuição de linfócitos T CD4⁺ no duodeno e à ativação de células T CD8⁺ no sangue periférico (ELLIS *et al.*, 2011).

Um achado recorrente é o enriquecimento do gênero *Prevotella* na microbiota intestinal de pacientes infectados pelo HIV em comparação com indivíduos não infectados. Lozupone *et al.* (2013) demonstraram que a microbiota de indivíduos infectados por HIV-1 apresenta um aumento no número de bactérias pertencentes ao gênero *Prevotella* e que a terapia antirretroviral não recupera a comunidade bacteriana completamente. Outros trabalhos já relataram que alterações na microbiota intestinal de indivíduos infectados pelo HIV incluem principalmente o aumento dos filos Proteobacteria e Firmicutes, enquanto Bacteroidetes está diminuído (DILLON *et al.*, 2014, 2016; SUN *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2018). Apesar de a infecção por HIV-1 ser caracterizada por inflamação crônica, as alterações na microbiota encontradas em pacientes infectados pelo HIV não são as mesmas encontradas em pacientes com outras doenças inflamatórias (SERRANO-VILLAR *et al.*, 2016; HERRERA; MARTÍNEZ-SANZ; SERRANO-VILLAR, 2019).

Ademais, também já tem sido demonstrado evidências que algumas bactérias comensais intestinais são capazes de induzir aumento da expressão de CCR5 pelas células T CD4⁺ da lâmina própria intestinal, levando a maior infecção e consequente depleção dessas células. Bactérias comumente encontradas em quantidades alteradas na mucosa intestinal de indivíduos HIV positivos, em especial gram-negativas, levaram a um aumento da infecção e maior depleção de células T CD4⁺ na mucosa. Ademais, esse estudo conduzido por Dillon *et al.* (2016) também reportou que a expressão de CCR5 foi significativamente aumentada nas células T CD4⁺ da lâmina própria após a exposição a essas bactérias gram-negativas. A forma como as bactérias intestinais causam o aumento da expressão de CCR5 nessas células e os mediadores envolvidos ainda não foram determinados, porém esse estudo começa a elucidar alguns dos mecanismos envolvidos na relação entre alterações da microbiota intestinal e a progressão do HIV, ressaltando a importância do estudo da comunidade de microrganismos comensais nos indivíduos infectados.

Além das alterações na microbiota intestinal causadas pelo HIV, a TARV também pode afetar a composição e função da microbiota intestinal. Vários autores têm reportado que o início da TARV está associado ao aumento relativo de *Fusobacterium*, Proteobacteria e *Tenella* e uma diminuição de Bacteroidetes e

Firmicutes (NOWAK *et al.*, 2015; PINTO-CARDOSO *et al.*, 2017; VILLANUEVA-MILLAN *et al.*, 2017). Ao mesmo tempo, há evidências de que a TARV pode ocasionar modificações na microbiota intestinal independente da infecção pelo HIV, indicando que a TARV contribui para o agravamento do desequilíbrio da microbiota intestinal (LOZUPONE *et al.*, 2013; NOWAK *et al.*, 2015; NOGUERA-JULIAN *et al.*, 2016). Mutlu *et al.* (2014) demonstraram mais especificamente que a microbiota de indivíduos infectados com HIV-1 que recebem TARV apresenta menor diversidade no cólon direito e íleo terminal quando comparada à de indivíduos saudáveis não infectados e que a microbiota nesses indivíduos apresentou perda de táxons tipicamente considerados comensais e aumento no número de bactérias consideradas patogênicas.

Embora a TARV seja eficiente em inibir a replicação viral, ela não é capaz de restaurar totalmente os danos à função gastrointestinal e a microbiota intestinal, e assim a recuperação da homeostase intestinal ainda continua prejudicada (GENG *et al.*, 2020). Mesmo que a quantidade de produtos microbianos (como LPS e DNA bacteriano) na circulação de pacientes com HIV tratados sejam menores do que pacientes não tratados, eles ainda são mais elevados do que o nível normal, sugerindo que a translocação microbiana ainda existe e influencia na recuperação da função imunológica (JIANG *et al.*, 2009; HOOPER; MACPHERSON, 2010; PONTE *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2018; GENG *et al.*, 2020).

Estudos avaliando as possíveis variações na microbiota intestinal entre diferentes classes de indivíduos infectados com HIV-1 que incluam EC são bastante escassos. Até o momento, apenas cinco estudos foram realizados com indivíduos EC (JENABIAN *et al.*, 2013; VUJKOVIC-CVIJIN *et al.*, 2013; NOWAK *et al.*, 2015; NOGUERA-JULIAN *et al.*, 2016; VESTERBACKA *et al.*, 2017), nenhum deles realizado no Brasil.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo Geral:

Analisar a composição e a funcionalidade metabólica da microbiota intestinal de pacientes HIV positivos controladores de elite e não-controladores e investigar se a via de infecção e o subtipo viral pode impactar a composição da microbiota.

1.8.2 Objetivos Específicos

Capítulo 1

- Caracterizar a microbiota intestinal de todos os pacientes HIV positivos.
- Investigar o perfil da microbiota intestinal de indivíduos EC e comparar com não controladores e indivíduos saudáveis.
- Identificar alterações nas vias metabólicas associadas com a microbiota intestinal dos indivíduos infectados pelo HIV.
- Identificar alterações na microbiota intestinal dos pacientes infectados pelo HIV de acordo com a via de infecção.
- Avaliar se o subtipo viral do HIV pode impactar a composição da microbiota intestinal.

Capítulo 2

- Determinar o perfil genético dos participantes deste estudo por meio da análise da presença da mutação CCR5 Δ 32.
- Identificar o tropismo viral presente nos pacientes infectados pelo HIV participantes deste estudo.

2 METODOLOGIA

2.1 Local, população de estudo, critérios de inclusão e considerações éticas.

Este foi um estudo transversal. A população de estudo foi composta por homens e mulheres, maiores de 18 anos de idade, recrutados no departamento de Infectologia do Hospital Regional Homero de Miranda Gomes, São José, SC e Hospital Nereu Ramos, Florianópolis, SC. Foram recrutados 16 pacientes infectados pelo HIV, que foram classificados e divididos em 2 grupos, de acordo com a carga viral: 1) Controladores de elite que apresentaram níveis de cargas virais indetectáveis em todas as mensurações de carga viral (n=6); 2) Controladores virêmicos que apresentaram uma viremia persistente de baixo nível que variou entre 51-2.000 cópias/ml (n=3); e Não-controladores que apresentaram uma viremia entre 2.000 e 20.000 cópias/ml (n=7). Todos os pacientes recrutados tinham infecção documentada por mais de 5 anos e mantinham a contagem de células T CD4⁺ acima de 500 células/mm³. Além disso, também foram recrutados 9 indivíduos HIV negativos no Banco de Sangue de Sangue da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina sob o parecer nº 1.622.458. Todos os participantes foram abordados durante as consultas de rotina e convidados a participar do estudo. Ademais, foram esclarecidas todas as dúvidas em relação participação neste estudo e todos assinaram voluntariamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando sua participação (Anexo A).

2.2 Coleta e processamento das amostras

Durante o recrutamento dos voluntários foram solicitadas amostras de sangue, fezes e acesso aos prontuários médico para coleta de dados clínicos (número de linfócitos T CD4/CD8 e medidas de carga viral plasmática) e epidemiológicos (sexo, idade, altura, peso e índice de massa corporal). As demais informações referentes aos hábitos de vidas e intestinais foram fornecidas pelos participantes por meio do preenchimento de um questionário.

Para analisar a composição da microbiota intestinal, todos os participantes foram orientados como realizar a coleta de fezes, bem como seu armazenamento. Durante o recrutamento todos receberam um frasco estéril de polipropileno e as amostras foram recolhidas na residência dos participantes ou nos hospitais onde foram realizados o recrutamento, de acordo com a preferência de cada voluntário. Após ser recolhida, amostra foi transportada até o Laboratório de Imunologia Aplicada (MIP/CCB/UFSC) onde foi realizada a extração de DNA bacteriano utilizando o kit QIAmp DNA Stool Mini Kit (Quiagen, Alemanha), conforme as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi imediatamente armazenado a -20 °C até o momento das análises.

No momento do recrutamento, além da amostra de fezes também foram coletadas 50 ml de sangue periférico em tubos com EDTA que foi utilizado para obtenção de células mononucleares do sangue periférico. Estas células foram separadas por meio do processo de diferença de gradiente de densidade por solução de Ficoll Hypaque (GE Healthcare, EUA). Após a separação das células mononucleares do sangue periférico, estas foram criopreservadas e congeladas em nitrogênio líquido para serem utilizadas na genotipagem do CCR5 Δ 32 e identificação do tropismo e subtipo viral que infecta os pacientes. Além disso parte dessas células serão utilizadas em estudos futuros que darão continuidade a este projeto.

2.3 Análise da microbiota intestinal

2.3.1 Preparação da biblioteca genômica e sequenciamento das amostras

O DNA extraído a partir das fezes foi quantificado utilizando-se o kit Qubit dsDNA HS (Thermo Fischer, EUA). A integridade das preparações de DNA foi examinada por eletroforese em gel de agarose 2%. A amplificação das regiões V3 e V4 do gene do rRNA 16S foi realizada por PCR, utilizando-se os iniciadores Illumina universais para Eubacteria S-D-Bact-0341-b-S-17 (*forward*) and S-D-Bact-0785-a-A-21 (*reverse*) e as amostras amplificadas foram confirmadas por meio de eletroforese em gel de agarose 2%. Para a preparação da biblioteca de rRNA 16S, os produtos PCR obtidos das amostras foram purificados utilizando-se microesferas magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, EUA), onde os adaptadores para

identificação das amostras foram adicionados com o kit Nextera XT index (Illumina, EUA) e posteriormente as amostras foram quantificadas por qPCR utilizando-se o kit KAPA Library Quantification kit Universal (Kapa Biosystems). Em seguida foi realizado um pool equimolar a 3nM e o sequenciamento foi realizado na plataforma Miseq (Illumina) com um kit de reagentes de 2 x 250 (500 ciclos) (v2) (MS-102–2003, Illumina Inc, EUA).

2.3.2 Análises de Bioinformática

A ferramenta Trimmomatic versão 0.38 foi utilizada para filtrar as sequências de baixa qualidade de acordo com o tamanho das sequências e valor de *phred score*. Os nucleotídeos que tinham qualidade menor que 20 no início ou final das sequências, ou que apresentassem qualidade média menor que 20 a cada grupo contendo 5 nucleotídeos foram considerados de baixa qualidade e removidos. As sequências com menos de 200 ou com mais de 259 nucleotídeos também foram excluídas. O pareamento dos pares de fragmentos, a remoção de quimeras e a determinação das ASVs (do inglês, *Amplicon Sequence Variants*) foram determinadas utilizando a abordagem DADA2 no pacote R versão 1.15.5. A taxonomia foi atribuída utilizando o banco de dados SILVA_SSU_r138_2019. A tabela de ASVs resultantes foi convertida em um arquivo no formato BIOM e importada para o R e ATIMA (do inglês, *Agile Toolkit for Incisive Microbial Analyses*). A predição do conteúdo funcional foi realizada por meio da ferramenta PICRUST, com a tabela de ASVs normalizadas considerando o número de cópias dos genes com base na KEGG (do inglês, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). O dado resultante do sequenciamento de cada amostra está disponível no repositório NCBI (número de acesso do projeto PRJNA682416; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject>).

2.3 Genotipagem do CCR5 Δ 32

O DNA genômico foi extraído a partir de células mononucleares do sangue periférico utilizando-se o método de colunas de sílica do *kit QIAamp® DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente o DNA extraído foi armazenado a -20 °C até o uso. A presença da variante Δ 32 no gene

CCR5 foi determinada por amplificação em PCR e visualizados por eletroferose em gel de agarose. Uma única banda de 239 pares de base indicou o genótipo de tipo selvagem CCR5/CCR5, enquanto o genótipo heterozigoto CCR5/ Δ 32 foi detectado pelas bandas de 239 e 207 pares de bases. O genótipo homozigoto Δ 32/ Δ 32 fornece uma única banda de 207 bp.

2.4 Análise do subtipo e tropismo viral

Para identificar o subtipo viral, os crioperservados de células mononucleares do sangue periférico foram descongelados, lavados e imediatamente foi realizado a extração do DNA utilizando-se *kit QIAamp DNA Blood Mini kit* (Qiagen, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação do gene *env* do HIV-1 foi realizado por uma diluição *nested* PCR. Um fragmento de quase 600 pares de bases do gene *env* do HIV-1 foi amplificado por PCR usando AmpliTaq Gold[®] 360 DNA Polimerase (Applied Biosystems, EUA). Os produtos finais do PCR foram purificados usando o kit de purificação de DNA *Illustra GFX PCR* (GE Healthcare, EUA) e sequenciados diretamente usando o *kit de reação ABI BigDye Terminator v.3.1* (Applied Biosystems, EUA) em um sequenciador automático *ABI PRISM 3100* (Applied Biosystem). Os cromatogramas foram montados usando o software SeqMan 7.0 (DNASTAR Inc., EUA) e as sequências *env* consenso cobrindo as posições 7.008-7.650 relativas ao genoma de referência HXB2 foram geradas. As sequências *env* foram alinhadas com as sequências de referência de subtipo baixadas do banco de dados de sequências de HIV Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/>) usando ClustalW e em seguida foram editadas manualmente e subtipadas por reconstruções de árvore filogenética de máxima verossimilhança com o programa PhyML 3.0. Para a previsão *in silico* do tropismo do HIV, a região V3 das sequências *env* foi traduzida e analisada utilizando a ferramenta online Geno2pheno com um corte de taxa de falsos positivos de 20%.

2.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R v.3.6.0 e pelo ATIMA utilizando os testes Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e Wilcoxon para variáveis

não paramétricas. Para avaliar as diferenças composição da microbiota intestinal entre os indivíduos (diversidade beta) foi o utilizando o índice de dissimilaridade Bray-curtis. Na determinação da diversidade alfa foram utilizados os índices de Shannon e Simpson e para avaliar a riqueza foi utilizado o índice de Chao1. O algoritmo Lefse (Linear discriminant analysis (LDA) – effect syze) foi utilizado para identificar diferenças na abundância de táxons da microbiota intestinal entre os grupos estudados. A LDA foi determinada usando uma estratégia de um contra todos com um score >2.0. O Lefse utiliza os testes de Kruskal-wallis e Wilcoxon para detectar os táxons com abundância significativamente diferentes e com relevância biológica. A previsão do conteúdo funcional foi avaliada utilizando o teste de Mann-Whitney. Valores de p menores que 0,05, após correção com o teste FDR (False discovery rate) foram considerados significativos.

3 CAPÍTULO 1

Gut microbiome profiles and associated metabolic pathways in HIV-infected treatment-naïve patients

Apresentação do manuscrito 1

Neste capítulo são apresentados os resultados referentes a composição e funcionalidade da microbiota intestinal dos pacientes HIV positivos controladores de elite e não controladores. Esse manuscrito foi publicado na revista Cell, fator de impacto JCR 6,600.

NASCIMENTO, W. M.; MACHIAVELLI, A.; FERREIRA, L. G. E.; SILVEIRA, L. C.; AZEVEDO, S. S. D.; BELLO, G.; SMITH, D. P.; MEZZARI, M. P.; PETROSINO, J. F.; DUARTE, R. T. D.; Zárate-Bladés, C. R.; PINTO, A. R. Gut microbiome profiles and associated metabolic pathways in hiv-infected treatment-naïve patients. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 385, 2021. <https://doi:10.3390/cells10020385>

Resumo:

A composição normal da microbiota intestinal é um fator chave para manter a homeostase saudável e conseqüentemente a disbiose é bem conhecida por estar presente em pacientes com HIV-1. Este artigo investiga o perfil da microbiota intestinal de pacientes HIV-1 virgens de terapia antirretroviral e de doadores saudáveis que vivem na América Latina em uma coorte de 13 pacientes HIV positivos (seis controladores de elite (EC) e sete não controladores (NC)) e nove doadores saudáveis (HD). A composição da microbiota em amostras de fezes foi determinada pelo sequenciamento da região V3-V4 do rRNA 16S bacteriano e a previsão funcional foi inferida usando o PICRUSt. Vários táxons foram enriquecidos em EC em comparação com grupos NC ou HD, incluindo *Acidaminococcus*, *Clostridium methylpentosum*, *Barnesiella*, *Eubacterium coprostanoligenes* e *Lachnospiraceae UCG-004*. Além disso, nossos dados indicam que a rota de infecção é um fator importante associado às mudanças na composição do microbioma intestinal e estendemos esses resultados identificando várias vias metabólicas associadas a cada rota de infecção. É importante

ressaltar que observamos vários táxons bacterianos que podem estar associados a diferentes subtipos virais, como *Succinivibrio*, que foi mais abundante em pacientes infectados pelo HIV subtipo B e enriquecimento de *Streptococcus* em pacientes infectados pelo subtipo C. Em conclusão, nossos dados trazem contribuição para a compreensão das alterações associadas à disbiose na infecção pelo HIV e descreve pela primeira vez as diferenças na composição da microbiota de acordo com os subtipos de HIV. Esses resultados garantem uma confirmação adicional em uma coorte maior de pacientes.

Segue abaixo o link para consulta:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7917727/>

4 CAPÍTULO 2

Neste capítulo são apresentados, de forma sucinta, os resultados de outros experimentos realizados durante o doutoramento, com ênfase na caracterização genética e viral dos pacientes com HIV participantes do estudo.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Genotipagem do CCR5 Δ 32 e análise do tropismo viral

A Tabela 1 demonstra que a predição de tropismo viral para as sequências *env* de consenso indicou tropismo para o correceptor CCR5 (R5-trópico) em 10 (76,9%) dos pacientes e CXCR4 (X4-trópico) em 3 (23,1%) pacientes. A deleção heterozigótica CCR5 Δ 32 foi observada em dois pacientes, um deles EC e o outro NC.

Tabela 1 – Características dos controladores de elite e não-controladores

Paciente	Genótipo CCR5	Tropismo viral
EC 03	WT/WT	CCR5
EC 04	WT/WT	CCR5
EC 06	WT/WT	CXCR4
EC 10	WT/Δ32	CXCR4
EC 12	WT/WT	CCR5
EC 21	WT/WT	CCR5
NC 02	WT/WT	CXCR4
NC 11	WT/WT	CCR5
NC 14	WT/WT	CCR5
NC 18	WT/Δ32	CCR5
NC 19	WT/WT	CCR5
NC 23	WT/WT	CCR5
NC 24	WT/WT	CCR5

Abreviações: EC: Controlador de elite; NC: Não-controlador; WT: Wild type

4.3 DISCUSSÃO

Muitas questões básicas sobre a patogênese da infecção pelo HIV ainda não foram elucidadas. Diversos estudos têm reportado que os pacientes que vivem com HIV apresentam diferenças na susceptibilidade e na progressão da doença (CHAUDHARI *et al.*, 2015; NARANBHAI; CARRINGTON, 2017; VEGA *et al.*, 2017). Dessa forma, a importância de diferentes genes na progressão do HIV/aids ainda permanece controverso. A molécula CCR5 é correceptor de quimiocina mais importante para a entrada do HIV-1 com tropismo para macrófagos na célula. A proteína CCR5 do tipo selvagem (CCR5-CCR5) é constituída por 352 aminoácidos, sendo dobrada em sete domínios que abrangem a membrana, conectados por três alças extracelulares e três intracelulares. Além do tipo selvagem, um alelo CCR5 com uma deleção de 32 pares de bases (CCR5 Δ 32) na região de codificação é prevalente. Seu produto é uma proteína truncada que não pode ser detectada na superfície celular (LIU *et al.*, 1996). Estudos já tem demonstrado que indivíduos homozigotos para o alelo CCR5 Δ 32 (Δ 32/ Δ 32) podem ser resistentes à infecção por cepas R5 do HIV-1 quando comparados a indivíduos do tipo selvagem (CCR5/ CCR5), enquanto indivíduos heterozigotos (CCR5/ Δ 32) têm uma progressão mais lenta da doença (PEREYRA *et al.*, 2008; MCLAREN; CARRINGTON, 2015). O alelo CCR5 Δ 32 ocorre com uma frequência de 4% no população brasileira (SILVA-CARVALHO *et al.*, 2016). Em nosso estudo, dois dos 13 pacientes (um EC e um NC) eram heterozigotos para o CCR5 Δ 32, mas não identificamos nenhum paciente homozigoto para essa mutação. De fato, as frequências da mutação CCR5 Δ 32 não foram diferentes das observadas na população de indivíduos soronegativos para o HIV (PEREYRA *et al.*, 2008). Em contrapartida, um estudo realizado anteriormente demonstrou uma maior prevalência da mutação CCR5 Δ 32 em EC em comparação com a observada na população em geral (PEREYRA *et al.*, 2010).

Estudos também demonstraram que a mutação do gene CCR5 Δ 32 têm indicado novos caminhos para a cura do HIV. O caso mais conhecido é o do paciente de Berlim (HUTTER *et al.*, 2009). Esse paciente era portador de leucemia mieloide aguda e foi submetido a um transplante de células tronco hematopoiéticas utilizando células de um doador homozigoto CCR5 Δ 32. Após o transplante o vírus não foi mais detectado, mesmo na interrupção de ART. Em 2014, cinco anos após o acontecimento

do paciente de Berlim, um estudo reportou um procedimento semelhante, conhecido como o paciente de Essen (KORDELAS *et al.*, 2014). Entretanto, devido a cepa que infectava o paciente possuir tropismo alternativo para o correceptor CXCR4, observou-se que a carga viral se manteve em recuperação 3 semanas após o transplante. Mais recentemente, 10 anos após o transplante que resultou na cura esterilizante do paciente de Berlim, um segundo caso de possível cura foi reportado no paciente de Londres (GUPTA *et al.*, 2014). Esse paciente infectado com HIV, possuía Linfoma de Hodgkin, foi submetido a um transplante de células tronco hematopoiéticas, tendo como doador um indivíduo com a mutação homozigótica no correceptor do HIV CCR5 (CCR5 Δ 32/ Δ 32). Até o momento o paciente apresenta remissão da infecção pelo HIV após 30 meses da realização do procedimento. Assim, esses relatos bem-sucedidos ressaltam o papel importante do correceptor CCR5 durante a infecção pelo HIV-1 e na progressão da doença, apontando que estratégias baseadas na prevenção da expressão do CCR5 podem indicar novos caminhos no desenvolvimento de opções de tratamento.

5 CAPÍTULO 3

Gut microbial dysbiosis and HIV infection

Apresentação do manuscrito 2

Neste capítulo é apresentado uma revisão sobre as disfunções e alterações na microbiota intestinal durante a infecção pelo HIV. Este manuscrito foi publicado na forma de um capítulo de livro pela editora Elsevier.

NASCIMENTO, W. M.; MACHIAVELLI, A.; FERREIRA, F. A.; SINCERO, T. C. M.; ZÁRATE-BLADÉS, C. R.; PINTO, A. R. Gut microbial dysbiosis and HIV infection. Elsevier: **Food Science**, 2021.

Resumo:

O dano à mucosa intestinal está associado à infecção pelo HIV, ocorrendo depleção maciça de linfócitos T CD4⁺ no tecido linfoide associado ao intestino (GALT), o que leva a uma perda de integridade da mucosa, disbiose da microbiota intestinal, ativação imune persistente e inflamação crônica. A microbiota intestinal de indivíduos com HIV, incluindo aqueles que controlam a doença com drogas antirretrovirais combinadas (cART) é substancialmente diferente da microbiota daqueles não infectados. Aqui, revisamos as evidências existentes de disfunção da imunidade intestinal e mudanças na microbiota durante a infecção pelo HIV e sua ligação potencial à patogênese do HIV, bem como possíveis estratégias terapêuticas que podem restaurar a diversidade microbiana do intestino.

Segue abaixo o link para consulta:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128192658000541?via%3Dihub>

6 DISCUSSÃO GERAL

A infecção pelo HIV-1 continua sendo responsável por uma pandemia de grande importância no mundo e indivíduos infectados que conseguem controlar a progressão da doença (EC), representam uma situação singular para o entendimento de mecanismos naturais de proteção contra esse vírus. Todavia, o mecanismo que confere resistência aos EC é desconhecido e atualmente acredita-se que o controle da carga viral não exista devida a presença ou ausência de um único fator, mas sim que EC são na verdade um grupo heterogêneo que possui múltiplos mecanismos de defesa contra o HIV-1 e que diferentes fatores podem conferir proteção em cada indivíduo (COCKERHAM; HATANO, 2015). No entanto, mesmo que esses indivíduos possam controlar a viremia, tanto a disbiose quanto a translocação microbiana ainda fazem parte do curso da infecção pelo HIV-1 (ZILBERMAN-SCHAPIRA *et al.*, 2016). No presente estudo investigou-se se a infecção pelo HIV-1 afeta de forma diferente a composição e funcionalidade da microbiota intestinal de indivíduos EC e NC. Além disso, também foi explorado se o subtipo viral e a via de infecção estão associados a essas alterações. Não foram observadas diferenças em relação à diversidade alfa ou beta entre os grupos de pacientes HIV positivos comparados com indivíduos saudáveis. Entretanto foi possível identificar vários táxons com abundância diferenciada entre os grupos. Também foi demonstrado pela primeira vez que o subtipo viral está associado à composição diferencial da microbiota intestinal. Ademais, a análise do PICRUST prevendo o conteúdo funcional metagenômico da microbiota intestinal revelou várias diferenças significativas entre os grupos.

Nesse estudo os indivíduos caracterizados como EC apresentaram contagens de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ acima de 500 células/mm³ e carga viral indetectável em 100% das mensurações. Por outro lado, os indivíduos caracterizados como NC também apresentaram contagens de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ acima de 500 células/mm³, enquanto a carga viral plasmática variou entre 2.000 e 20.000 cópias de RNA/mL em 70% das mensurações. Todos os indivíduos HIV positivos recrutados para o estudo tinham mais de 5 anos de acompanhamento médico e não tinham recebido tratamento antiviral até o momento da coleta das amostras para esta pesquisa. Assim, esses dados são relevantes, pois caracterizam o grupo de pacientes

EC e NC e demonstra, mesmo que se trate de um número relativamente reduzido de pacientes, a particularidade e riqueza do grupo estudado.

Um dos maiores problemas no combate à epidemia do HIV/aids continua sendo a diversidade genética do vírus, sendo que um aumento das formas recombinantes circulantes tem agravado ainda mais essa situação. No entanto, essa diversidade viral, ou um subtipo específico, ainda não tem sido relacionado à progressão da doença. O cenário epidemiológico de HIV/aids no mundo tem o subtipo C como responsável por mais de 50% das infecções e o subtipo B por aproximadamente 10% (ARIËN; VANHAM; ARTS, 2007; BBOSA; KALEEBU; SSEMWANGA, 2019). A epidemiologia molecular do HIV no Brasil é impulsionada principalmente pelo subtipo B, seguido pelo subtipo F1, subtipo C, além das formas recombinantes (BELLO *et al.*, 2011; ALENCAR *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2017). Nos últimos anos o Brasil tem demonstrado alterações nesse cenário epidemiológico. Gräf e colaboradores (2011) demonstraram que a região Sul, principalmente os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, são considerados os estados mais endêmicos do subtipo C, juntamente com outras formas recombinantes. A maior da prevalência do subtipo C, seguido pelo subtipo B, encontrado nesse estudo está de acordo com o cenário epidemiológico molecular do HIV-1 encontrado no estado de Santa Catarina.

Estudos prévios já têm demonstrado que as epidemias do HIV-1 subtipo C e B podem incidir de forma diferente nas categorias de exposição sexual. Num estudo conduzido nas cidades de Florianópolis/SC e Rio Grande/RS observou-se que o subtipo C é mais associado a indivíduos com comportamento heterossexual, enquanto o subtipo B foi o mais frequente em HSH (GRÄF *et al.*, 2011). Semelhante aos achados de Gräf e colaboradores, nossos resultados revelaram que o subtipo C foi responsável pela maioria das infecções em indivíduos heterossexuais, enquanto o subtipo B foi responsável por 100% das infecções nos indivíduos HSH. Entretanto, os motivos pelo qual o subtipo C está associado à categoria de exposição heterossexual ainda não são claros. Uma possível explicação seria que essa segregação se deva a separação que ocorre em diferentes redes de transmissão, neste caso a rede, de heterossexuais e HSH (BELLO *et al.*, 2006), entendendo rede como a transmissão entre um grupo de indivíduos ligados epidemiologicamente (HASSAN *et al.*, 2017). Outra possível explicação pode ser pelo fato de que o subtipo C do HIV-1 possa ter alguma vantagem biológica em relação ao subtipo B, já que estudos têm demonstrado

que o subtipo B foi introduzido antes do subtipo C no Brasil e atualmente é observado com uma prevalência menor que 30% nas regiões onde ele compete com o subtipo C (BELLO *et al.*, 2006; VASAN *et al.*, 2006; ARIËN; VANHAM; ARTS, 2007).

Além do receptor CD4, o HIV necessita de um correceptor de quimiocina, CCR5 ou CXCR4, para estabilizar sua interação com a célula hospedeira, possibilitando a fusão das membranas e conseqüentemente a entrada do vírus. No início da infecção o HIV-1 geralmente utiliza o correceptor CCR5, mas aproximadamente 50% dos indivíduos infectados com cepas R5 mudam para o uso de CXCR4, o que geralmente está associado a um declínio acelerado de linfócitos T CD4⁺ e uma rápida progressão à doença (REGOES; BONHOEFFER, 2005; SHEN *et al.*, 2016). No presente estudo foi observado que a maioria dos indivíduos HIV positivos foram infectados com cepas virais que utilizam o correceptor CCR5. Foi observado também que todas as cepas de HIV-1 com tropismo para X4 detectadas correspondiam ao subtipo B. Esses dados são consistentes com achados de outro estudo conduzido na região Sudeste brasileira (AZEVEDO *et al.*, 2017). Ademais, identificar o uso específico dos correceptores é essencial para um tratamento eficaz com TARV.

A deleção heterozigótica CCR5 Δ 32 foi observada em 2 pacientes infectados pelo HIV. Já tem sido demonstrado que o polimorfismo CCR5 Δ 32 está associado a cargas virais mais baixas e a uma progressão mais lenta para aids e menor taxa de mortalidade (SANTA-MARTA *et al.*, 2013). No caso desse estudo, um dos pacientes tem o perfil de EC, aspecto que pode contribuir para a progressão lenta da doença.

A disbiose intestinal em indivíduos HIV positivos com infecção progressiva já foi descrita anteriormente (DIHN *et al.*, 2015; DILLON *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2019). A análise da microbiota intestinal revelou que os filos Firmicutes, Bacteroidota, Proteobacteria e Actinobacteria foram os mais abundantes entre os indivíduos infectados pelo HIV, independente do status da infecção, resultados que são similares a dados publicados sobre a microbiota intestinal de indivíduos infectados pelo HIV (DIHN *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019). Não foram observadas diferenças na diversidade alfa e beta entre indivíduos HIV positivos e controles saudáveis. Esses resultados demonstram que a estrutura geral da comunidade bacteriana foi similar ao comparar indivíduos HIV-positivos com HIV-negativos. Corroborando nossos achados, vários outros estudos também não encontraram

diferenças na diversidade alfa e beta de indivíduos infectados pelo HIV em comparação com indivíduos saudáveis (DILLON *et al.*, 2014; LING *et al.*, 2016; MONACO *et al.*, 2016). Dihn e colaboradores (2015) avaliaram a composição da microbiota de 16 indivíduos com infecção crônica pelo HIV e não observaram diferenças na diversidade alfa em comparação com indivíduos não infectados. Em contrapartida, outros estudos encontraram uma diminuição da diversidade em indivíduos infectados pelo HIV (MCHARDY *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2018; LU *et al.*, 2019). Um estudo realizado na França demonstrou que mudanças importantes ocorreram na diversidade de indivíduos infectados pelo HIV. Os autores demonstraram que a diversidade alfa foi significativamente diminuída em indivíduos infectados pelo HIV em comparação com não infectados pelo HIV, conforme avaliado pelo índice de Shannon (DUBOURG *et al.*, 2016).

Quando avaliados os táxons diferencialmente abundantes, foi encontrado um enriquecimento dos gêneros *Acidaminococcus*, *Libanicoccus* e *Lachnospiraceae NK3A20 group* nos indivíduos HIV positivos do presente estudo. Os *Acidaminococcus* são diplococos gram-negativos que residem no intestino e no trato urinário (D'AURIA *et al.*, 2011). Espécies que pertencem ao gênero *Acidaminococcus* tem sido descritas como membros distintos da microbiota associada ao HIV, pois essas espécies apresentam um conteúdo gênico que está envolvido em todas as vias que caracterizam o metabolismo disbiótico da microbiota associada ao HIV, como por exemplo, a resistência ao estresse oxidativo (URSELL; KNIGHT, 2013). Além disso, um alto número de *Acidaminococcus* colonizando a microbiota pode potencializar a infecção causada pelo HIV-1 (LOZUPONE *et al.*, 2013; VÁZQUEZ-CASTELLANOS *et al.*, 2018).

Quando se considera a composição bacteriana, uma variedade de estudos identificou diferentes padrões de composição em pacientes infectados pelo HIV. Lozupone e colaboradores (2013) reportou que a composição da microbiota intestinal de indivíduos infectados pelo HIV tem um padrão comum, no qual o enriquecimento de Erypelotrichaceae, Enterobacteriaceae, Desulfovibrinoaceae e *Fusobacteria* e a depleção de Lachnospiraceae, Ruminocococceae, *Bacteroides* e Rikenellaceae estão fortemente associados à progressão da doença. Dillon *et al.* (2014) investigaram alterações na microbiota de indivíduos infectados pelo HIV e controles saudáveis. Nesse estudo foi observado um aumento significativo nas

famílias Prevotellaceae e Ruminococcaceae e uma redução significativa nas famílias Bacteroidaceae e Lachnospiraceae em indivíduos infectados pelo HIV comparado aos controles saudáveis. Recentemente o estudo conduzido por Zhou e colegas (2018) demonstrou que os pacientes infectados com HIV apresentaram proporções mais altas de bactérias consideradas patogênicas, como Proteobacteria, *Enterococcus*, *Lachnoclostridium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Ruminococcus*. Além disso, quando comparado a indivíduos saudáveis, a microbiota intestinal dos pacientes com HIV tinha níveis mais baixos de Bacteroidetes, *Prevotella*, *Megamonas*, *Dialister*, *Ruminoclostridium*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Lachnospira*, *Roseburia*, *Blautia*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides uniformis*, *Phascolarctobacterium faecium*, *Ruminococcus bromii* e *Bacteroides stercoris*. Outro estudo conduzido por Wang et al. (2019) avaliou a composição da microbiota de 185 mulheres infectadas pelo HIV. Os autores encontraram uma maior abundância de *Oscillospira* e *Ruminococcus* e uma diminuição na abundância de *Bifidobacterium* e *Collisella* em mulheres infectadas pelo HIV em comparação às não infectadas. Mudanças como essas contribuem para o desequilíbrio microbiano e consequente destruição da barreira epitelial da mucosa intestinal, aumentando a translocação microbiana, inflamação e ativação imunológica.

Embora um baixo número de indivíduos EC tenha sido incluído nesses estudos de coortes, diferenças significativas têm sido encontradas na composição da microbiota intestinal desses pacientes quando comparado com os progressores típicos e indivíduos não infectados pelo HIV (VUJKOVIC-CVIJIN *et al.*, 2013; NOWAK *et al.*, 2015; NOGUERA-JULIAN *et al.*, 2016; VESTERBACKA *et al.*, 2017). Os achados do presente estudo confirmam e expandem as observações de estudos anteriores. Descobrimos que os indivíduos com perfil EC possuem uma assinatura da microbiota com perfil único, composta pelos gêneros *Acidaminococcus*, *Barnesiella*, *Clostridium methylpentosum* group, *Eubacterium ventriosum* group e *Lachnospiraceae* UCG-04. Corroborando com nossos dados, um estudo anterior também demonstrou uma abundância maior do gênero *Barnesiella* em indivíduos HIV positivos (DIHN *et al.*, 2015). Em contrapartida, Dillon e colegas (2014) anteriormente encontraram uma diminuição da abundância de *Barnesiella* em pacientes infectados com HIV, enquanto Mutlu e colegas (2014) observaram um enriquecimento de Barnesiellaceae em indivíduos saudáveis.

Embora esse estudo tenha demonstrado um enriquecimento de *Lachnospiraceae UCG-004* em pacientes HIV positivos EC, outros trabalhos encontraram populações diminuídas de membros da família *Lachnospiraceae* em indivíduos HIV positivos comparados com indivíduos saudáveis (DILLON *et al.*, 2014; MUTLU *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2016). Já tem sido demonstrado que bactérias pertencentes a família *Lachnospiraceae* são excelentes produtoras de ácidos graxos de cadeia curta, principalmente o butirato (MEEHAN; BEIKO, 2014; LOUIS; FLINT, 2017), que é uma importante fonte de energia para os colonócitos e auxilia na manutenção da homeostase intestinal por meio de ações anti-inflamatórias (THAISS *et al.*, 2016; VENEGAS *et al.*, 2019). O butirato também é de extrema importância para manutenção da barreira epitelial, proliferação celular, bem como na modulação da resposta imune (THAISS *et al.*, 2016). Outras bactérias encontradas com maior abundância nos indivíduos EC, como *Clostridium methylpentosum group* e *Eubacterium ventriosum group*, também são caracterizadas como ótimas produtoras de butirato no intestino humano, além de serem conhecidas como reguladoras indispensáveis da homeostase intestinal (LOUIS; FLINT, 2017; GUO *et al.*, 2020). Nesse sentido, uma maior proporção de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta na microbiota de indivíduos EC pode ser sugestivo de que mesmo com modificações, esses indivíduos ainda apresentam uma microbiota mais próxima da situação saudável.

Nowak e colaboradores (2015) investigaram alterações na microbiota de pacientes virêmicos, EC e indivíduos saudáveis. Neste estudo, os autores encontraram diferenças na composição da microbiota dos pacientes virêmicos em comparação aos controles saudáveis. Os EC possuíam maior abundância relativa de bactérias pertencentes ao filo Bacteroidetes comparados aos pacientes virêmicos, enquanto que esses últimos apresentaram uma maior abundância de bactérias pertencentes aos filos Actinobacteria e Proteobacteria. Assim, a microbiota dos EC apresentou um perfil mais semelhante à de indivíduos saudáveis. No entanto, esse estudo contou com apenas três indivíduos EC, portanto, as conclusões devem ser vistas com essa limitação. Mais recentemente Vesterbacka et al (2017) caracterizaram o perfil da microbiota e as vias metabólicas associadas à comunidade bacteriana relacionadas à disfunção imune de um grupo de pacientes EC, progressores não tratados e controles saudáveis. Os autores observaram que os pacientes EC tinham

uma maior riqueza bacteriana e maior número de gêneros observados na microbiota fecal em comparação aos progressores não tratados. Os gêneros *Sutterella*, *Succinivibrio*, *Oscillospira*, *Delftia*, *Anaerofilum* e *Rhizobium* foram mais abundantes nos EC. Além disso, as vias metabólicas do ácido graxo e as proteínas da biossíntese de lipídios também foram enriquecidas nos EC em comparação aos progressores não tratados. Os autores concluíram que os EC têm uma microbiota intestinal mais rica do que os pacientes progressores não tratados e um perfil metabólico diferente que pode contribuir para o controle da replicação viral. Esses estudos demonstram que pode existir fatores relacionados à mucosa intestinal desses indivíduos que auxiliem no controle da viremia, evitando mudanças drásticas na composição da microbiota.

Estudos anteriores têm reportado que o conteúdo funcional da microbiota pode permanecer relativamente estável ao longo do tempo, independentemente do perfil da microbiota. Em contrapartida, outros trabalhos destacaram que o conteúdo funcional da microbiota pode variar no contexto de certas patologias (TURNBAUGH *et al.*, 2009; HUTTENHOWER *et al.*, 2012; MORGAN *et al.*, 2012). Esses achados, associados com as alterações observadas na composição da microbiota, indicam que diferentes funções metabólicas aparecem de acordo com as diferentes comunidades microbianas, que geralmente são mais nítidas em indivíduos infectados pelo HIV. No presente estudo foram observadas diversas vias metabólicas funcionais envolvidas no metabolismo de carboidratos, lipídios, cofatores e vitaminas, metabolismo energético e biossíntese de glicanos que estavam menos representadas em indivíduos HIV positivos NC em comparação com indivíduos saudáveis. Esse desequilíbrio encontrado sugere que em indivíduos infectados pelo HIV a disponibilidade de vitaminas e nutrientes podem ser alterados. Já nos pacientes HIV positivos EC não foram encontradas diferenças significativas na funcionalidade metabólica quando comparado com HIV positivos NC e indivíduos não infectados pelo HIV.

No trabalho realizado por Vujkovic-Cvijin *et al.* (2013), que incluiu pacientes LTNP, foram avaliadas alterações na microbiota e sua relação com a progressão da doença em indivíduos infectados pelo HIV. Foi observado uma quantidade maior de bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria e que abundâncias menores de Bacteroidia estão associadas a presença de marcadores de disfunção em indivíduos com perfil LTNP, que também apresentaram uma microbiota semelhante à de indivíduos não infectados. Além disso, foi observado que os indivíduos infectados pelo

HIV possuíam bactérias residentes no intestino com capacidade de catabolizar o triptofano através da via da quinurenina. Os autores concluíram que as populações microbianas residentes no intestino podem influenciar a homeostase desse órgão durante a infecção pelo HIV. Outro trabalho avaliou o catabolismo do triptofano induzido pela enzima indoleamina 2,3- dioxigenase (IDO) em relação ao equilíbrio Th17/Treg em uma grande coorte de pacientes infectados pelo HIV, incluindo indivíduos EC (JENABIAN *et al.*, 2013). Neste estudo, indivíduos EC apresentaram concentrações diminuídas de triptofano e IDO, bem como índices preservados de linfócitos Th17 e Treg. Portanto, foi concluído que novas intervenções terapêuticas modulando o catabolismo de triptofano mediado por IDO podem ajudar a limitar a progressão da doença.

O presente estudo também avaliou a composição da microbiota intestinal de acordo a diferentes vias de transmissão para identificar biomarcadores que possam estar associados à infecção pelo HIV. Consistente com nossos achados, Noguera-Julian e colaboradores (2016) demonstraram que a microbiota intestinal de homens que fazem sexo com homens (HSH) tinham uma maior abundância do gênero *Prevotella*, enquanto a maioria dos indivíduos não-HSH apresentavam uma maior abundância do gênero *Bacteroides*, independente do status da infecção pelo HIV-1. Em adição, esse mesmo estudo também apontou que a microbiota dos indivíduos HSH era mais rica e diversificada em comparação aos indivíduos não-HSH, confirmando que uma das possíveis marcas da disbiose relacionada a infecção pelo HIV seria uma redução no número de espécies bacterianas. Outros estudos também relataram resultados semelhantes demonstrando que o enriquecimento dos gêneros *Prevotella* e a depleção de *Bacteroides* estão associados ao comportamento de indivíduos HSH, independente do status da infecção pelo HIV-1 (KELLEY *et al.*, 2017; ARMSTRONG *et al.*, 2018). Ao contrário, um estudo descreveu que a microbiota de HSH foi enriquecida principalmente pelos táxons Bacilli, Lactobacillales e Enterococcaceae, enquanto *Prevotella*, *Lachnoclostridium*, *Phascolarbacterium* e *Parabacteroides* foram mais abundantes entre os pacientes de comportamento heterossexual (ZHOU *et al.*, 2018). Mais recentemente um estudo reportou que HSH apresentam um perfil único da microbiota caracterizada por um enriquecimento de *Prevotella* e aumento da diversidade alfa, que está associada à relação anal receptiva, tanto em homens quanto em mulheres (VUJKOVIC-CVIJIN *et al.*, 2020).

Por fim, caracterizamos pela primeira vez a microbiota intestinal de pacientes infectados pelo HIV de acordo com o subtipo viral. Já foi reportado em estudos anteriores que os subtipos estão associados à progressão da doença, embora esse fator ainda seja controverso (AGWALE *et al.*, 2002; VENNER *et al.*, 2016). Estudos demonstrando se o subtipo viral influencia na resposta a TARV variam; entretanto, a maioria tem demonstrado que o subtipo viral não exerce efeitos sobre os resultados alcançados pela terapia (BHARGAVA *et al.*, 2014; OGBENNA *et al.*, 2020). Nesse estudo foi demonstrado que pacientes infectados pelo subtipo B e C possuem diferenças na composição da microbiota. Enquanto aqueles infectados pelo subtipo C têm uma microbiota enriquecida por *Streptococcus*, *Eggerthella*, *Veillonella*, *Christensenella* e *Enterococcus*, os pacientes infectados pelo subtipo B possuem uma microbiota mais rica em *Succinivibrio*, *Mitsuokella*, *Solobacterium*, *Anaerovibrio* e *Allisonella*. Todavia, estudos envolvendo um maior número de pacientes e uma maior variedade de subtipos virais são necessários para ampliação e confirmação desses achados.

Com base nos dados apresentados aqui, a investigação da microbiota intestinal de pacientes HIV positivos controladores de elite é importante e devem incluir maior número de indivíduos, na tentativa de se melhor entender o impacto das alterações específicas causadas pelo HIV-1 na microbiota intestinal desses indivíduos. Além disso, trabalhos futuros avaliando alterações da microbiota intestinal nesses pacientes devem levar em consideração o pareamento pela prática sexual, bem como o subtipo viral do HIV que os infecta, permitindo assim uma melhor compreensão da disbiose nesses indivíduos, como já apontado por Vujkovic-Cvijin e colaboradores em 2020 (VUJKOVIC-CVIJIN *et al.*, 2020). Contudo, os resultados obtidos no presente estudo podem dar suporte para investigações futuras que considerem a microbiota intestinal como possível alvo terapêutico, de forma a criar terapias que visem, principalmente, a redução dos efeitos associados à infecção e assim melhorar a qualidade de vida e, possivelmente, também incidir positivamente na expectativa de vida.

7 CONCLUSÕES

- A microbiota intestinal dos indivíduos HIV positivos apresentou alterações significativas na abundância de vários táxons em comparação aos indivíduos não infectados pelo HIV.
- Os pacientes HIV positivos com perfil de EC apresentaram uma assinatura única da microbiota intestinal com vários táxons significativamente mais abundantes.
- Pacientes HIV positivos NC apresentaram diversas vias metabólicas que variaram em abundância em comparação a indivíduos saudáveis.
- Uma maior abundância de *Prevotella* e uma diminuição de *Bacteroides* está associado a comportamento HSH em indivíduos infectados pelo HIV.
- Alterações na microbiota intestinal de pacientes infectados pelo HIV pode estar associado ao subtipo viral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGWALE, S.M. et al. Molecular surveillance of HIV-1 field strains in Nigeria in preparation for vaccine trials¹Use of trade names is for identification only and does not constitute endorsement by the US Department of Health and Human Service, or the Centers for Disease Control and Prevention.¹ **Vaccine**, v. 20, n. 16, p. 2131-2139, 2002.

ALENCAR, C. S. et al. HIV genotypes and primary drug resistance among HIV-seropositive blood donors in Brazil. **Journal Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 63, n. 3, p. 387-392, 2013.

ALEXANDER, L. et al. Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. **Journal of Virology**, v. 74, n. 9, p. 4361-4376, 2000.

ALKANANI, A. K. et al. Alterations in intestinal microbiota correlate with susceptibility to type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 64, n. 10, p. 3510-3520, 2015.

ALONSO, V. R.; GUARNER, F. Linking the gut microbiota to human health. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 2, p. 21-26, 2013.

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, 2008.

ARIËN, K. K.; VANHAM, G.; ARTS, E. J. Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 141-151, 2007.

ARMSTRONG, A. J. S. et al. An exploration of *Prevotella*-rich microbiomes in HIV and men who have sex with men. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2018.

ATARASHI, K. et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous clostridium species. **Science**, v. 331, p. 337-341, 2010.

AUTRAN, B. et al. Elite controllers as a model of functional cure. **Current Opinion In HIV and Aids**, v. 6, n. 3, p. 181-187, 2011.

AZEVEDO, S. S. D. et al. Highly divergent patterns of genetic diversity and evolution in proviral quasispecies from HIV controllers. **Retrovirology**, v. 14, p. 29, 2017.

BAILEY, J. R. et al. Transmission of human immunodeficiency virus Type 1 from a patient who developed AIDS to an elite suppressor. **Journal of Virology**, v. 82, n. 15, p. 7395-7410, 2008.

BARBLU, L. et al. Plasmacytoid dendritic Cells (pDCs) from HIV controllers produce interferon- α and differentiate into functional killer pDCs under HIV activation. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 5, p. 790-801, 2012.

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

BAUER, H. et al. The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. **The American Journal of Pathology**, v. 42, n. 4, p. 471–483, 1963.

BBOSA, N.; KALEEBU, P.; SSEMWANGA, D. HIV subtype diversity worldwide. **Current Opinion in HIV And Aids**, v. 14, n. 3, p. 153-160, 2019.

BELLO, G. et al. Evolutionary history of HIV-1 subtype B and F infections in Brazil. **AIDS**, v. 20, p. 763–768, 2006.

BELLO, G. et al. The use of bioinformatics for studying HIV evolutionary and epidemiological history in South America. **Aids Research and Treatment**, v. 2011, p. 1-13, 2011.

BERGER, C. T.; ALTER, G. Natural killer cells in spontaneous control of HIV infection. **Current Opinion in HIV and Aids**, v. 6, n. 3, p. 208-213, 2011.

BERNINK, J.H. et al. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. **Nature Immunology**, v.14, p.221–229, 2013.

BETTS, M. R, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. **Blood**, v. 10, n.12, p. 4781-4789, 2006.

BHARGAVA, M. et al. Do HIV-1 non-B subtypes differentially impact resistance mutations and clinical disease progression in treated populations? Evidence from a systematic review. **Journal of the International Aids Society**, v. 17, n. 1, p. 18944, 2014.

BLANKSON, J. N. et al. Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. **Journal of Virology**, v. 81, n. 5, p. 2508-2518, 2007.

BOULET, S. et al. Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals. **Aids**, v. 22, n. 5, p. 595-599, 2008.

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

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.

BUCKHEIT, R. W. et al. Host factors dictate control of viral replication in two HIV-1 controller/chronic progressor transmission pairs. **Nature Communications**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2012.

CARD, C. M. et al. HIV controllers are distinguished by chemokine expression profile and HIV-specific T-cell proliferative potential. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**. v. 59, n. 5, p. 427–37, 2012.

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. 1-13, 2016.

CASADO, C. et al. Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. **Plos One**, v. 5, p. 1-6, 2010.

CASADO, C. et al. Permanent control of HIV-1 pathogenesis in exceptional elite controllers: a model of spontaneous cure. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1902, 2020.

CASTELLINO, F.; GERMAIN, R. N. Cooperation between CD4+and CD8+T cells: when, where, and how. **Annual Review of Immunology**, v. 24, n. 1, p. 519-540, 2006.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). A Cluster of Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis carinii Pneumonia among Homosexual Male Residents of Los Angeles and range Counties, California. Editorial note CDC, v. 31, n. 23, p. 305-307, 1982. Disponível em: <<http://https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001114.htm>>. Acesso em 05 abril de 2021.

CHAUDHARI, D. et al. Chemokine receptors CCR5 and CCR2 genes in HIV positive, HIV exposed seronegative and in HIV unexposed individuals: a study from mumbai. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 81, n. 5, p. 548, 2015.

CHEVALIER, M. F. et al. HIV-1-Specific Interleukin-21+ CD4+ T cell responses contribute to durable viral control through the modulation of HIV-specific CD8+ T cell function. **Journal of Virology**, v. 85, n. 2, p. 733-741, 2010.

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

COFFIN, J.; SWANSTROM, R. HIV pathogenesis: dynamics and genetics of viral populations and infected cells. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n.1, p. 1-16, 2013.

COHEN, O. J. et al. Heterozygosity for a defective gene for CC chemokine receptor 5 is not the sole determinant for the immunologic and virologic phenotype of HIV-infected long-term nonprogressors. **Journal of Clinical Investigation**, v.100, n. 6, p.1581-1589, 1997.

CORDING, S. et al. Mouse models for the study of fate and function of innate lymphoid cells. **European Journal of Immunology**, v. 48, n. 8, p. 1271-1280, 2018.

CROWELL, T. A.; HATANO, H. Clinical outcomes and antiretroviral therapy in 'elite' controllers: a review of the literature. **Journal of Virus Eradication**, v. 1, p. 72-77, 2015.

D'AURIA, G. et al. Complete genome sequence of *Acidaminococcus intestini* RYC-MR95, a gram-negative bacterium from the phylum Firmicutes. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 24, p. 7008-7009, 2011.

DEEKS, S. G.; WALKER, B. D. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. **Immunity**, v. 27, n. 3, p. 406-416, 2007.

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. 983–94 994, 2014.

DILLON, S. M. et al. Enhancement of HIV-1 infection and intestinal CD4 + T cell depletion ex vivo by gut microbes altered during chronic HIV-1 infection. **Retrovirology**, v. 13, n. 5, p. 1-14, 2016.

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.

DORIA-ROSE, N. A. et al. Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. **Journal of Virology**, v. 84, n. 3, p. 1631-1636, 2010.

DOUEK, D. C. et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. **Nature**, v. 417, n. 6884, p. 95-98, 2002.

DUBOURG, G. et al. Microbiome of HIV-infected people. **Microbial Pathogenesis**, v. 106, p. 85–93, 2017.

DYER, W. B. et al. Mechanisms of HIV on-progression; robust and sustained CD4 + T cell proliferative responses to p24 antigen correlate with control of viremia and lack disease progression after long-term transfusion-acquired HIV-infection. **Retrovirology**, v. 5, p. 1-14, 2008.

EL-ATROUNI, W.; BERBARI, E.; TEMESGEN, Z. HIV-associated opportunistic infections. Bacterial infections. **Journal Medical Libanais**, v. 54, n. 2, p. 80-3, 2006.

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

EPPLE, H. J. et al. Acute HIV infection induces mucosal infiltration with CD4+ and CD8+ T cells, epithelial apoptosis, and a mucosal barrier defect. **Gastroenterology**, v. 139 p. 1289-1299, 2010.

FANALES-BELASIO, E. et al. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 46, n. 1, p. 5–14.

FORSYTHE, P. et al. Mood and gut feelings. **Brain, Behavior, And Immunity**, v. 24, n. 1, p. 9-16, 2010.

FRANK, D. N. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 34, p. 13780-13785, ago. 2007.

FREUND, N. T. et al. Coexistence of potent HIV-1 broadly neutralizing antibodies and antibody-sensitive viruses in a viremic controller. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 373, p. 1-23, 2017.

GALVANI, A. P.; NOVEMBRE, J. The evolutionary history of the CCR5-Δ32 HIV-resistance mutation. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 302-309, 2005.

GENG, ST. et al. Regulation of gut microbiota on immune reconstitution in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1-11, 2020.

GENOVESE, L.; NEBULONI, M.; ALFANO, M. Cell-mediated immunity in elite controllers naturally controlling HIV viral Load. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 86, p. 1-12, 2013.

GENSOLLEN, T. et al. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. **Science**, v. 352, n. 6285, p. 539-544, 2016.

GOMAA, E. Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 113, n. 12, p. 2019-2040, 2020.

GONZÁLEZ, N. et al. Characterization of broadly neutralizing antibody responses to HIV-1 in a cohort of long-term non-progressors. **PLoS One**, v. 13, n. 3, p. 2018.

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

GRABAR, S. et al. Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. **AIDS**, v. 23, p. 1163-1169, 2009.

GRÄF, T. et al. HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naïve patients from Southern Brazil: An association of HIV-1 subtypes with exposure categories. **Journal of Clinical Virology**, v. 51, n. 3, p. 186–191, 2011.

GROCHOWSKA, M.; LASKUS, T.; RADKOWSKI, M. Gut Microbiota in Neurological Disorders. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, v. 67, n. 6, p. 375-383, 2019.

GUADALUPE, M. et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 Infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. **Journal of Virology**, v. 77, n. 21, p. 11708-11717, 2003.

GUO, P. et al. Clostridium species as probiotics: potentials and challenges. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2020.

GUPTA, R. K. et al. HIV-1 remission following CCR5 Δ 32/ Δ 32 haematopoietic stem-cell transplantation. **Nature**, v. 568, n. 7751, p. 244-248, 2019.

HAPFELMEIER, S. et al. Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. **Science**, v. 328, n. 5986, p. 1705-1709, 2010.

HARARI, A. et al. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1–infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. **Blood**, v. 103, n. 3, p. 966-972, 2004.

HASAN, N.; YANG, H. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. **Peerj**, v. 7, p. 1-31, 16 ago. 2019.

HASSAN, A. S. et al. Defining HIV-1 transmission clusters based on sequence data. **AIDS**, v. 31, n. 9, p. 1211-1222, 2017.

HEMELAAR, J. et al. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. **Lancet Infectious Diseases**. v. 19, n. 2, p. 143–55, 2019.

HERBEUVAL, J. P.; SMITH, N.; THÈZE, J. Characteristics of plasmacytoid dendritic cell and CD4+ T cell in HIV elite controllers. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

HERRERA, S.; MARTÍNEZ-SANZ, J.; SERRANO-VILLAR, S. HIV, Cancer, and the microbiota: common pathways influencing different diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1-11, 2019.

HERSPERGER, A. R. et al. Increased HIV-specific CD8+ T-cell cytotoxic potential in HIV elite controllers is associated with T-bet expression. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3799–3808, 2011.

HOFFMANN, C.; ROCKSTROH, J.; KAMPS, B. HIV Medicine. 15 ed. Flying Publisher, 2007. Disponível em: <http://www.hivmedicne.com/hivmedicine2007.pdf>. Acesso em 05 de abril de 2021.

HOOPER, L. V.; MACPHERSON, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 159-169, 2010.

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

HÜTTER, G. et al. Long-Term Control of HIV by CCR5Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 7, p. 692-698, 2009.

JENABIAN, Mohammad-ali et al. Distinct tryptophan catabolism and th17/treg balance in HIV progressors and elite controllers. **Plos One**, v. 8, n. 10, p. 1-13, 2013.

JETHWANI, P.; GROVER, K. Gut microbiota in health and diseases – A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 8, n. 08, p. 1586-1599, 2019.

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, 2009.

KAMYA, P. et al. Receptor-ligand requirements for increased NK cell polyfunctional potential in slow progressors infected with HIV-1 coexpressing KIR3DL1**h*/**y* and HLA-B*57. **Journal of Virology**, v. 85, n. 12, p. 5949-5960, 2011.

KELLEY, C. F. et al. The rectal mucosa and condomless receptive anal intercourse in HIV-negative MSM: implications for hiv transmission and prevention. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 4, p. 996-1007, 2016.

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, 2013.

KORDELAS, L. et al. Shift of HIV tropism in stem-cell transplantation with CCR5 delta32 mutation. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 9, p. 880-882, 2014.

KRUPOVIC, M. et al. Ortervirales: new virus order unifying five families of reverse-transcribing viruses. **Journal of Virology**, v. 92, n. 12, p. 1-5, 2018.

KURI-CERVANTES, L. et al. Activation of NK cells is associated with HIV-1 disease progression. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 96, n. 1, p. 7–16, 2014.

KUWAHARA, T. et al. The lifestyle of the segmented filamentous bacterium: a non-culturable gut-associated immunostimulating microbe inferred by whole-genome sequencing. **Dna Research**, v. 18, n. 4, p. 291-303, 2011.

LACKNER, A. A.; LEDERMAN, M. M.; RODRIGUEZ, B. HIV Pathogenesis: the host. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 9, p. 1-23, 2012.

LACKNER, A. A.; MOHAN, M.; VEAZEY, R. S. The gastrointestinal tract and aids pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 1966-1978, 2009.

LAMBOTTE, O. et al. Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. **Aids**, v. 23, n. 8, p. 897–906, 2009.

LAMBOTTE, O. et al. HIV Controllers: a homogeneous group of hiv-1--infected patients with spontaneous control of viral replication. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 7, p. 1053-1056, 2005.

LAMINE, A. et al. Replication-competent HIV strains infect HIV controllers despite undetectable viremia (ANRS EP36 study). **Aids**, v. 21, n. 8, p. 1043-1045, 2007.

LECUROUX, C. et al. Both HLA-B*57 and plasma HIV RNA levels contribute to the HIV-specific CD8+ T cell response in HIV controllers. **Journal of Virology**, v. 88, n. 1, p. 176-187, 2014.

LIMA, K. et al. Increase in human immunodeficiency virus 1 diversity and detection of various subtypes and recombinants in north-eastern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 526-535, 2017.

LING, Z. et al. Alterations in the fecal microbiota of patients with HIV-1 infection: an observational study in a chinese population. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016.

LIU, R. et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 367-377, 1996.

LOUIS, P.; FLINT, H. J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 29-41, 2016.

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

LU, J. et al. Changes in peripheral blood inflammatory factors (TNF- α and IL-6) and intestinal flora in AIDS and HIV-positive individuals. **Journal Of Zhejiang University-Science B**, v. 20, n. 10, p. 793-802, 2019.

LU, W. et al. Association between gut microbiota and CD4 recovery in HIV-1 infected patients. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-10, 2018.

LUM, J. J. et al. Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 10, p. 1547-1554, 2003.

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

MACHMACH, K. et al. Plasmacytoid dendritic cells reduce HIV production in elite controllers. **Journal of Virology**, v. 86, n. 8, p. 4245-4252, 2012.

MACNAUGHTAN, J.; JALAN, R. Clinical and pathophysiological consequences of alterations in the microbiome in cirrhosis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 110, n. 10, p. 1399-1410, 2015.

MANCHES, O. et al. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 10, p. 3431-3439, 2008.

MARCHETTI, G.; TINCATI, C.; SILVESTRI, G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p.2-18, 2013.

MARIANI, R. et al. High frequency of defective nef alleles in a long-term survivor with nonprogressive human immunodeficiency virus type 1 infection. **Journal of Virology**, v. 70, n. 11, p. 7752-7764, 1996.

MARMOR, M. et al. Homozygous and heterozygous CCR5-Delta32 genotypes are associated with resistance to HIV infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 27, n.5, p. 472-481, 2001.

MARTINEZ, V. et al. Combination of HIV-1-specific CD4 Th1 cell responses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term Nonprogression. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 12, p. 2053-2063, 2005.

MATTAPALLIL, J. J. et al. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. **Nature**, v. 434, n. 7037, p. 1093-1097, 2005.

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.

MCLAREN, P. J.; CARRINGTON, M. The impact of host genetic variation on infection with HIV-1. **Nature Immunology**, v. 16, n. 6, p. 577-583, 2015.

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

MICHAEL, N. L. et al. Defective accessory genes in a human immunodeficiency virus type 1-infected long-term survivor lacking recoverable virus. **Journal of Virology**, v. 69, n. 7, p. 4228-4236, 1995.

MIGUELES, S. A. et al. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long-term nonprogressors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 6, p. 2709-2714, 2000.

MIGUELES, S.; OSBORNE, C.; ROYCE, C. Lytic granule loading of CD8+ T cells is requires for HIV-infected cell elimination associated with immune control. **Immunity**, v. 29, n. 6, p. 1009–1021, 2008.

MILLS, S. et al. Precision nutrition and the microbiome, Part I: current state of the science. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 923, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico: HIV AIDS. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2020, 68p.

MINISTÉRIO DA SAÚDEb. Relatório de monitoramento clínico do HIV. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2020, 123p.

MOLOGNI, D. et al. Vpr and HIV-1 disease progression: r77q mutation is associated with long-term control of hiv-1 infection in different groups of patients. **Aids**, v. 20, n. 4, p. 567-574, 2006.

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

MONDOT, S. et al. The Human Gut Microbiome and Its Dysfunctions. **Digestive Diseases**, v. 31, n. 3-4, p. 278-285, 2013.

MORGAN, X. C. et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. **Genome Biology**, v. 13, n. 9, p. 1-18, 2012.

MOYLE, G. J. et al. Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection. **Journal of Infectious Diseases**, v.191, p.866-872, 2005.

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. 1-18, 2014.

NAGPAL, R. et al. Ontogenesis of the gut microbiota composition in healthy, full-term, vaginally born and breast-fed infants over the first 3 years of life: a quantitative bird's-eye view. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-9, 2017.

NAIF, H. M. Pathogenesis of HIV infection. **Infectious Disease Reports**, v. 5, n. 1, p. 26-30, 2013.

NARANBHAI, V.; CARRINGTON, M. Host genetic variation and HIV disease: from mapping to mechanism. **Immunogenetics**, v. 69, n. 8-9, p. 489-498, 2017.

NOGUERA-JULIAN, M. et al. Gut microbiota linked to sexual preference and HIV infection. **Ebiomedicine**, 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.

ODAMAKI, T. et al. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. **Bmc Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2016.

OGBENNA, A. A. et al. The impact of HIV-1 subtypes on virologic and immunologic treatment outcomes at the Lagos University Teaching Hospital: a longitudinal evaluation. **Plos One**, v. 15, n. 8, p. 1-6, 2020.

OKULICZ, J. F. et al. Clinical outcome of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. **The Journal of infectious Diseases**, v. 200, p. 1714-1723, 2009.

OKULICZ, J. F.; LAMBOTTE, O. Epidemiology and clinical characteristics of elite controllers. **Current Opinion In HIV and Aids**, v. 6, n. 3, p. 163-168, 2011.

OMENETTI, S.; PIZARRO, T. T. The Treg/Th17 axis: A dynamic balance regulated by the gut microbiome. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 639, p. 1-8, 2015.

OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. The biological functions of T Helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 454-467, 2008.

PARSONS, M. S. et al. HIV infection abrogates the functional advantage of natural killer cells educated through KIR3DL1/HLA-Bw4 interactions to mediate anti-HIV antibody-dependent cellular cytotoxicity. **Journal of Virology**, v. 86, n. 8, p. 4488-4495, 2012.

PASSOS, M. C. F.; MORAES-FILHO, J. P. Intestinal microbiota in digestive diseases. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 54, n. 3, p. 255-262, 2017.

PASTORI, C. et al. Long-lasting CCR5 internalization by antibodies in a subset of long-term nonprogressors: a possible protective effect against disease progression. **Blood**, v.107, n. 12, p. 4825-4833, 2006.

PEREYRA, F. et al. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 4, p. 563–571, 2008.

PEREYRA, F. et al. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. **Science**, v. 330, n. 6010, p.1551-1557, 2010.

PETERLIN, B.; TRONO, D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 97-107, 2003.

PINTO-CARDOSO, S. et al. Fecal Bacterial Communities in treated HIV infected individuals on two antiretroviral regimens. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.

PONTE, R. et al. Reversing gut damage in HIV infection: using non-human primate models to instruct clinical research. **Ebiomedicine**, v. 4, p. 40-49, 2016.

PORICHIS, F.; KAUFMANN, D. E. HIV-specific CD4 T cells and immune control of viral replication. **Current Opinion in HIV and Aids**, v. 6, n. 3, p. 174-180, 2011.

PORNILLOS, O.; GANSER-PORNILLOS, B. K. HIV-1 Virion Structure. In: Encyclopedia of AIDS. New York, NY: **Springer New York**; p. 1–6, 2013.

POROPATICH, K.; SULLIVAN, D. J. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non progression. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 2, p. 247-268, 2010.

RAJAN, D. et al. Effect of R77Q, R77A and R80A changes in Vpr on HIV-1 replication and CD4 T cell depletion in human lymphoid tissue ex vivo. **Aids**, v. 20, n. 6, p. 831-836, 4 abr. 2006.

RAMBAUT, A. et al. The causes and consequences of HIV evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 1, p. 52-61, 2004.

REGOES, R. R.; BONHOEFFER, S. The HIV coreceptor switch: A population dynamical perspective. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 269–277, 2005.

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

SAEZ-CIRION, A. et al. Restriction of HIV-1 replication in macrophages and CD4 + T cells from HIV controllers. **Blood**, v.118, n. 4, p. 955-964, 2011.

SAJADI, M. M. et al. Epidemiologic characteristics and natural history of HIV-1 natural viral vuppressors. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 50, n. 4, p. 403-408, 2009.

SANDLER, N. G.; DOUEK, D. C. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 655–666, 2012.

SANTA-MARTA, M. et al. Host factors and HIV-1 replication: Clinical evidence and potential therapeutic approaches. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 343, p. 1–20, 2013.

SATHER, D. N. et al. Factors associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during human immunodeficiency virus type 1 Infection. **Journal of Virology**, v. 83, n. 2, p. 757-769, 2009.

SCULLY, E.; ALTER, G. NK cells in HIV disease. **Current Hiv/Aids Reports**, v. 13, n. 2, p. 85-94, 21 mar. 2016.

SCZESNAK, A. et al. The genome of Th17 cell-Inducing segmented filamentous bacteria reveals extensive auxotrophy and adaptations to the intestinal environment. **Cell Host & Microbe**, v. 10, n. 3, p. 260-272, 2011.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the Body. **Plos Biology**, v. 14, n. 8, p. 1-14, 2016.

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

SHAPIRA, M. Gut microbiotas and host evolution: scaling up symbiosis. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 31, n. 7, p. 539-549, 2016.

SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, v. 1, n. 1, p. 1-22, 2011.

SHEN, H. S. et al. HIV coreceptor tropism determination and mutational pattern identification. **Scientific Reports**, v. 6, n. 21280, p. 1–11, 2016.

SHU, Z. et al. How intestinal bacteria can promote HIV replication. **Aids Reviews**, v. 32, p. 32-37, 2013.

SILVA-CARVALHO, W.H. et al. Frequency of the CCR5 -delta32 allele in Brazilian populations: a systematic literature review and meta-analysis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 101-107, 2016.

SMITH, K. et al. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 2, p. 59-69, 2007.

SOMSOUK, M. et al. Gut epithelial barrier and systemic inflammation during chronic HIV infection. **Aids**, v. 29, n. 1, p. 43-51, 2015.

STAPRANS, S.; FEINBERG, M. B. The roles of nonhuman primates in the preclinical evaluation of candidate AIDS vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 3, n. 1, p. 5-32, 2004.

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

SUNDQUIST, W. I.; KRÄUSSLICH, H.G. HIV-1 assembly, budding, and maturation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 7, p. 1-24, 2012.

TEIXEIRA, S. L. M. et al. Association of the HLA-B*52 allele with non-progression to AIDS in Brazilian HIV-1-infected individuals. **Genes & Immunity**, v. 15, n. 4, p. 256-262, 2014.

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

THORBECKE, G. J. Some histological and functional aspects of lymphoid tissue in germfree animals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 78, p. 237–246, 1959.

TOMESCU, C. et al. Impact of protective killer inhibitory receptor/human leukocyte antigen genotypes on natural killer cell and T-cell function in HIV-1-infected controllers. **Aids**, v. 26, n. 15, p. 1869-1878, 2012.

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, 2008.

TROY, E. B.; KASPER, D. L. Beneficial effects of *Bacteroides fragilis* polysaccharides on the immune system. **Frontiers in Bioscience**, v. 15, p. 25-34, 2011.

TURNBAUGH, P. J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 480-484, 2009.

UNAIDS. UNAIDS Data 2017. UNAIDS: Geneva, Switzerland, 2020, 434p.

URSELL, L. K.; KNIGHT, R. Xenobiotics and the Human Gut Microbiome: metatranscriptomics reveal the active players. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 3, p. 317-318, 2013.

VASAN, A. et al. Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 843–852, 2006.

VASSALLO, M. et al. The role of lipopolysaccharide as a marker of immune activation in HIV-1 infected patients: a systematic literature review. **Journal of Virology**, v. 9, n. 1, p. 2-8, 2012.

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, 2018.

VEGA, J. A. et al. Haplotypes in CCR5-CCR2, CCL3 and CCL5 are associated with natural resistance to HIV-1 infection in a Colombian cohort. **Biomédica**, v. 37, n. 2, p. 267-273, 2017.

VENEGAS, D. P. et al. Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1-16, 2019.

VENNER, C. M. et al. Infecting HIV-1 subtype predicts disease progression in women of Sub-Saharan Africa. **Ebiomedicine**, v. 13, p. 305-314, 2016.

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.

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

VUJKOVIC-CVIJIN, I. et al. HIV-associated gut dysbiosis is independent of sexual practice and correlates with noncommunicable diseases. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2020.

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, p. 1-28, 2013.

WALKER, B. D.; YU, X. G. Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 7, p. 487–498, 2013.

WANG, J. et al. Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2013.

WANG, Z. et al. Altered gut microbiota and host metabolite profiles in women with human immunodeficiency virus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 9, p. 2345-2353, 2019.

WILSON, J. D. K. et al. Loss of CD4+T cell proliferative ability but not loss of human immunodeficiency virus type 1 specificity equates with progression to disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 3, p. 792-798, 2000.

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

WU, H. J.; WU, E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. **Gut Microbes**, v. 3, n. 1, p. 4-14, 2012.

YAMASHITA, T. Intestinal immunity and gut microbiota in atherogenesis. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 24, n. 2, p. 110-119, 2017.

YOSHIDA, N.; YAMASHITA, T.; HIRATA, K. Gut Microbiome and cardiovascular diseases. **Diseases**, v. 6, n. 3, p. 1-10, 2018.

ZAUNDERS, J.; DYER, W.B.; CHURCHILL, M. The sydney blood bank cohort: implications for viral fitness as a cause of elite control. **Current Opinion in HIV and Aids**, v. 6, p. 151-156, 2011.

ZAUNDERS, J.; VAN BOCKEL, D. Innate and Adaptive Immunity in Long-Term Non-Progression in HIV Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 1-14, 2013.

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, 2016.

ZHENG, P. The gut microbiome from patients with schizophrenia modulates the glutamate-glutamine-GABA cycle and schizophrenia-relevant behaviors in mice. **Science Advances**, v. 5, n. 2, p. 1-11, 2019.

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

ZILBERMAN-SCHAPIRA, G. et al. The gut microbiome in human immunodeficiency virus infection. **Bmc Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2016.

ZIMMERLI, S.C. et al. HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 7239–7244, 2005.

APÊNDICE A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudo das células linfóides inatas (ILCs) e da microbiota intestinal de indivíduos HIV positivos controladores de elite.

Pesquisador: Aginaldo Roberto Pinto

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 56130116.9.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.724.745

Apresentação do Projeto:

"Estudo das células linfóides inatas (ILCs) e da microbiota intestinal de indivíduos HIV positivos controladores de elite". Indivíduos EC apresentam características relacionadas ao sistema imune e a microbiota intestinal diferentes dos demais indivíduos HIV positivos, sendo essas alterações relacionadas ao controle da progressão da doença. Assim sendo, este estudo visa caracterizar a resposta imune inata e a microbiota intestinal de indivíduos EC, avaliando fatores que possam estar envolvidos no controle da progressão da infecção causada pelo HIV-1.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar a resposta imune inata e a microbiota intestinal de indivíduos EC, avaliando fatores que possam estar envolvidos no controle da progressão da infecção causada pelo HIV-1.

Objetivo Secundário:

a) Determinar a frequência das ILCs no sangue periférico de indivíduos controladores de elite e comparar com pacientes controladores de viremia, progressores clássicos com e sem tratamento e

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Retórica II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-6004 **E-mail:** cep.propetq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.726.745

Indivíduos saudáveis;

- b) Caracterizar funcionalmente as ILCs através de ensaios de estimulação celular e produção de citocinas;
- c) Determinar o perfil genético dos indivíduos participantes deste estudo através da análise da presença da mutação CCR5 32, da genotipagem dos haplótipos de HLA I e dos alelos KIR;d) Identificar o subtipo e o tropismo do HIV presente nos pacientes recrutados;
- e) Identificar a possível relação das ILCs e suas características fenotípicas e funcionais com a resistência à progressão da infecção pelo HIV;
- f) Caracterizar a microbiota intestinal de diferentes grupos de indivíduos infectados por HIV-1, oriundos de diferentes estados brasileiros;
- g) Comparar a microbiota intestinal de EC a de pacientes controladores de viremia, progressores clássicos com e sem tratamento e indivíduos saudáveis;
- h) Avaliar a presença de marcadores de translocação microbiana (LPS e sCD14) nos diferentes grupos estudados;
- i) Correlacionar a presença de marcadores de translocação microbiana e o perfil genético dos indivíduos com as possíveis alterações na microbiota nos diferentes grupos avaliados;
- j) Identificar alterações na microbiota intestinal que possam estar relacionadas ao controle da infecção pelo HIV;
- k) Verificar se indivíduos infectados pelo HIV-1 capazes de controlar naturalmente a replicação viral (EC e VC), apresentam níveis de inflamação similares aos observados em indivíduos não infectados pelo HIV-1;
- l) Verificar se indivíduos EC e VC apresentam níveis de ativação imune similares aos observados em indivíduos não infectados pelo HIV-1;
- m) Avaliar se existe alteração na proporção de populações de macrófagos e o nível de ativação dessas populações em EC e VC quando comparados com indivíduos não infectados pelo HIV-1;
- n) Avaliar se mesmo com carga viral plasmática indetectável ocorre ativação plaquetária e maior formação de agregados monócitos-plaquetas nos EC e VC;
- o) Verificar se existe uma correlação entre a ativação e inflamação avaliada nos EC e VC e dados clínicos associados com doenças cardiovasculares.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Na coleta de sangue os voluntários podem sentir algum desconforto decorrente da punção na pele.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
 Bairro: Trindade CEP: 88 040-400
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
 Telefone: (48)3721-6004 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.724.745

Se

houver pequena perda de sangue no local da punção geralmente há um desconforto que desaparece em poucos dias. Assumimos a responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos.

Benefícios:

Muito provavelmente este estudo não reverterá em nenhum benefício imediato aos pacientes recrutados. Fornecerá, porém, informações importantes sobre mecanismos que podem estar envolvidos no controle da replicação do vírus, o que pode levar ao desenvolvimento de novas terapias para esses indivíduos. O pesquisador não terá nenhum benefício pessoal/financeiro com esta pesquisa, exceto os resultados dele decorrente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata o presente de uma Emenda do projeto de pesquisa "Estudo das células linfóides inatas (ILCs) e da microbiota intestinal de indivíduos HIV positivos controladores de elite" coordenado pelo Prof. Dr. Aguilaino Roberto Pinto justificando que devido ao reduzido número de indivíduos controladores de elite ou controladores de viremia que procuram atualmente os serviços médicos do Hospital Regional Dr. Homero de Miranda Gomes e do Hospital Nereu Ramos está incluindo o Hospital Nossa Senhora da Conceição, localizado em Porto Alegre/RS. Informa também o escopo do estudo não será modificado, nenhuma nova amostra adicional de material biológico será necessária e que as modificações não trazem nenhum risco adicional aos voluntários. A declaração de aceite de participação neste estudo por parte do hospital citado foi anexada. Diante do exposto, o Comitê tomou ciência e recomenda a sua aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentação completa.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:

Não se aplica.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
 Telefone: (48)3721-6064 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.724.745

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE_INFORMAÇÕES_BASICAS_776437_ET.pdf	25/08/2016 13:16:45		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Cartajustificativa.pdf	25/08/2016 13:14:21	WELLINTON MUNIZ DO NASCIMENTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoHospRS.pdf	25/08/2016 13:00:27	WELLINTON MUNIZ DO NASCIMENTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLErevisado.docx	17/06/2016 16:30:18	WELLINTON MUNIZ DO NASCIMENTO	Aceito
Outros	cartaresposta.pdf	17/06/2016 16:29:59	WELLINTON MUNIZ DO NASCIMENTO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	16/05/2016 12:29:52	WELLINTON MUNIZ DO NASCIMENTO	Aceito
Outros	Questionariomicrobiota.docx	16/05/2016 12:27:21	WELLINTON MUNIZ DO NASCIMENTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	16/05/2016 12:25:39	WELLINTON MUNIZ DO NASCIMENTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoBarcodeSangueHUUFSC.pdf	16/05/2016 12:23:46	WELLINTON MUNIZ DO NASCIMENTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoHospRegionalSaoJose.pdf	16/05/2016 12:22:54	WELLINTON MUNIZ DO NASCIMENTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoHospNereuRamos.pdf	16/05/2016 12:19:57	WELLINTON MUNIZ DO NASCIMENTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracaodalinstituicao.pdf	16/05/2016 12:13:38	WELLINTON MUNIZ DO NASCIMENTO	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	16/05/2016 12:09:16	WELLINTON MUNIZ DO NASCIMENTO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
 Telefone: (48)3721-6004 E-mail: conep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Processo: 1.126.745

FLORIANOPOLIS, 13 de Setembro de 2016

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vítor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-8004 E-mail: cep.propeq@contato.ufsc.br

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa intitulada “Estudo das células linfóides inatas (ILCs) e da microbiota intestinal de indivíduos HIV positivos controladores de elite”, coordenada pelo Professor Aguinaldo R. Pinto do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC. Esta pesquisa pretende avaliar componentes do sangue e os micro-organismos intestinais presente nas fezes de indivíduos HIV positivos.

O HIV, ou vírus da imunodeficiência humana, é o causador da Aids (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). Esse vírus ataca as células responsáveis pela defesa do organismo e assim o corpo fica sem proteção. Ao se infectar com o vírus, nas primeiras semanas a pessoa pode apresentar sintomas parecidos com os de uma gripe comum. Porém esses sintomas logo desaparecem e o HIV pode ficar anos agindo no organismo sem apresentar sintomas. Após esse tempo, que pode variar muito de pessoa para pessoa, aparecem sintomas graves devido ao aumento da destruição das células de defesa. Existe uma pequena parte dos indivíduos infectados que pode passar mais de dez anos após a infecção com baixos níveis de vírus no sangue, mesmo sem nunca ter tomado nenhum antirretroviral. Essas pessoas são chamadas de Controladores de Elite, devido a sua capacidade de controlar naturalmente a replicação do vírus. Ainda não se sabe o que faz com que essas pessoas consigam controlar o desenvolvimento da doença, e portanto estudar esses indivíduos é muito importante. O objetivo de nosso estudo é justamente tentar esclarecer essa questão. Iremos estudar alguns fatores biológicos que podem estar relacionados ao controle da replicação do vírus nos controladores de elite.

Também pretendemos estudar as bactérias presentes no intestino, uma vez que alterações na quantidade e tipo destes micro-organismos estão associadas a várias doenças, incluindo a Aids. Em pessoas com HIV, alguns componentes de bactérias intestinais podem passar para o sangue e contribuir para os sintomas da doença. Assim, estudar esses micro-organismos através do exame de fezes também pode ajudar a entender melhor o desenvolvimento da Aids.

Metodologia: Para a realização desse estudo a sua participação é muito importante. Se você voluntariamente decidir participar deste estudo, após ter lido este termo de consentimento, o pesquisador lhe pedirá que responda a um questionário sobre alimentação e hábitos de vida. Serão realizadas também coletas de sangue venoso (50 ml) e de fezes. A coleta de fezes deverá ser realizada em sua residência, sob as orientações do médico ou dos pesquisadores e você deverá levar a amostra de fezes congelada até o ponto de coleta. Pedimos também autorização para consultar seu prontuário médico. Ressaltamos que a sua participação ocorrerá somente uma única vez.

Riscos: Na coleta de sangue você pode sentir algum desconforto decorrente da punção na pele. Se houver pequena perda de sangue no local da punção geralmente há um desconforto que desaparece em poucos dias. Assumimos a responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos. Caso você tenha algum prejuízo material ou imaterial em decorrência da pesquisa poderá solicitar indenização, de acordo com a legislação vigente e amplamente consubstanciada na Resolução CNS 466/12. Os eventuais custos decorrentes de algum prejuízo material ou imaterial serão pagos com recursos do coordenador da pesquisa.

Benefícios: Muito provavelmente nosso estudo não reverterá em nenhum benefício imediato a você. Porém fornecerá informações importantes sobre alguns mecanismos que podem estar envolvidos no controle da replicação do vírus, podendo contribuir para o desenvolvimento de novas tecnologias de combate ao HIV e/ou novos alvos terapêuticos. O pesquisador não terá nenhum benefício pessoal/financeiro com esta pesquisa, exceto os resultados dele decorrente.

Direitos do indivíduo pesquisado:

1- **Garantia de privacidade à sua identidade e do sigilo de suas informações:** Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados por cinco anos em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os participantes, focalizando o seu conteúdo geral e os resultados estatísticos.

2- **Garantia de esclarecimento e resposta a qualquer pergunta:** O entrevistador responderá a quaisquer perguntas que você tiver acerca do estudo.

3- **Liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento sem prejuízo para si ou para seu tratamento:** Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa.

DÚVIDAS E ESCLARECIMENTOS

Durante o período da pesquisa você poderá tirar suas dúvidas no endereço abaixo ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC, cujo endereço consta deste documento. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

O pesquisador responsável, que também assina esse documento, compromete-se a conduzir a pesquisa de acordo com o que preconiza a Resolução CNS 466/12 de 12/06/2012, que trata dos preceitos éticos e da proteção aos participantes da pesquisa.

CONSENTIMENTO:

Eu recebi uma cópia e li (ou leram para mim) as informações referentes a esta pesquisa. Foram explicados todos os procedimentos deste estudo. Sei que posso perguntar o que desejar e compreendo exatamente que o meu sangue e fezes serão utilizados para realização de pesquisas sobre o HIV. Sei também dos possíveis desconfortos e benefícios com a participação neste estudo. Mantendo-se o sigilo dos dados autorizo toda documentação necessária, a divulgação e a publicação dos dados gerados com este estudo em periódicos, revistas, bem como apresentação em congressos, simpósios e quaisquer eventos de caráter científico. Sou livre para autorizar ou não a minha participação neste estudo.

Eu, _____,
declaro que fui devidamente esclarecido e concordo em participar voluntariamente da pesquisa coordenada pelo Professor Aguinaldo Roberto Pinto.

Assinatura ou impressão datiloscópica

Data: ___/___/___.

Pós-Graduando:
Wellinton Muniz do Nascimento

Orientador:
Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto

Endereço do Coordenador da Pesquisa:

Prof. Aguinaldo R. Pinto. Laboratório de Imunologia Aplicada (Sala 310) Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) - Universidade Federal de Santa Catarina. Campus Universitário da Trindade, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil. Telefone: (048) 3711-5206. E-mail: aguinaldo.pinto@ufsc.br

Endereço do CEPESH/UFSC:

Comitê de ética em pesquisa com seres humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina – CEPESH/UFSC. Universidade Federal de Santa Catarina. Prédio Reitoria II, Rua Desembargador Vitor

Lima, 222, sala 401. Campus Universitário da Trindade - CEP 88040-400 - Florianópolis, SC, Brasil.
Telefone: (048) 3721-6094. E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br