



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**

**Avaliação da Translocação Microbiana em
Gestantes Infectadas Pelo HIV**

Vanessa Martinez Manfio

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre em
Doenças Tropicais

Orientadora: Profa. Adjunta Lenice do Rosário de Souza

Botucatu

2016

Vanessa Martinez Manfio

AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA EM
GESTANTES INFECTADAS PELO HIV

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais

Orientadora: Profa. Adjunta Lenice do Rosário de Souza

Botucatu
Fevereiro de 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Manfio, Vanessa Martinez.

Avaliação da translocação microbiana em gestantes infectadas pelo HIV / Vanessa Martinez Manfio. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Lenice Do Rosário de Souza

Capes: 40101096

1. Mulheres grávidas. 2. HIV (Vírus). 3. AIDS (Doença).
4. Translocação bacteriana. 5. Indicadores biológicos.
6. Resposta imune.

Palavras-chave: Gestantes; HIV; Translocação microbiana; sCD14.

Agradecimentos



Agradeço a Deus todos os dias pelo caminho que tenho percorrido e por me sustentar até aqui nesta jornada.

... Anselmo e Cibele, meus pais, muito obrigada por sempre acreditar em mim, pelo esforço financeiro, pelo companheirismo e força para que eu nunca desista. Obrigada mãe pelas orações e Pai por fazer de tudo por mim. ...por todo amor e carinho que sempre me deram a distância e na fase mais importante e crucial da minha vida, “Não deixaram a peteca cair”. Amo muito vocês Pai e Mãe.

...Vitor, meu companheiro de vida, meu amor, meu amigo e meu professor. Obrigada por fazer parte da minha vida e me fazer crescer sempre, por toda ajuda com meu trabalho e compreensão. Sem você eu não conseguiria a metade do que já conquistei. Agradeço por me incentivar e ser uma pessoa tão paciente e amável comigo. Não poderia deixar de agradecer pelo frutinho que eu venho trazendo aqui dentro, pela alegria de você e eu de iniciarmos uma família linda e abençoada. Te amo.

...Mana (Natália)! Obrigada por todo o caminho que você percorreu comigo, pela sua amizade, conselhos, desabafos e pelo orgulho de ser sua irmã. Sempre vi em você honestidade, compaixão, amor e sabedoria. Sempre quis ser pelo menos 10% do que você é. Uma mulher com belos princípios e uma índole incrível. Espelhei-me em você para chegar até aqui e você sabe nos sentidos que eu digo. Obrigada pelas correções e apoio em toda minha vida. E você será uma tia maravilhosa!!! Amo você minha irmã.

...Lenice, minha orientadora, amiga e conselheira. Muito obrigada por me acolher quando eu estava desorientada na pós-graduação e oferecer esta oportunidade. Nunca me criticou ou me deixou desanimada, pelo contrário, incentivou sua aluna novata na área a ir com tudo, e graças a você, eu amo o que eu faço e amo do jeito que eu faço. Obrigada por continuar comigo em mais uma fase da minha vida!

*Não sei como escrever e agradecer a você minha amiga Karen,
Tudo deste trabalho você faz parte.*

E não só isso, o apoio em cada decisão para torná-lo possível.

Obrigada por todas as horas de trabalho que você parou de fazer suas coisas para me ajudar com as minhas. Cada artigo que você pesquisou para me explicar o que eu não entendia. Cada “whats up” socorrido e por sempre me elogiar e me colocar pra cima, quando eu não achava que estava bom o suficiente.

Mas você não estava só na minha vida de pós-graduanda, mas, também está fazendo parte deste meu momento incrível e esta sendo uma tia excelente.

Obrigada por você me dar à chance de te conhecer melhor neste tempo e ver o quão espetacular você é!!!

... Mariana Gatto, amigona, cúmplice, parceira, irmã e tia do Pedro agora. Amiga sem você eu não conseguiria nem descobrir o quanto eu amo o que estou fazendo. Obrigada por me ajudar a chegar até aqui e por me apoiar. Obrigada pelas noites de amizade e vários desabaços que você me socorreu, pelos choros, risos, brigas e amor. Você é muito especial para mim e tem um papel marcante desde que cheguei a Botucatu. Obrigada por ser minha amiga de bancada também, pelos experimentos e “helps” que só você dá um jeitinho e ajuda a todos.

Você é única!

...as minhas amigas da vida Ivina e Laryssa que sempre me apoiaram e fizeram eu sempre perceber que o que escolhi fazer é difícil, mas tem sua recompensa.

Obrigada pela amizade de muitos anos.

Agradeço ao pessoal do Laboratório da MI: Fran, Jéssica, Mizi, Drica, Thaty, Laura, Paty, Thaysa, Lariza, Responsável Técnico Rodrigo e Profa Sueli. Vocês sempre foram como uma família para mim e espero poder estar com vocês mais quatro anos ainda.

Agradeço ao Departamento de Doenças Tropicais e aos funcionários Michele e Júlio pela disponibilidade para me ajudar e responder as dúvidas.

Agradeço a Banca de Exame Geral de Qualificação Prof. Dr. Ricardo Almeida e Prof. Dr. Joélcio Abbade por toda ajuda e sugestões para melhorar meu desempenho.

Agradeço a Banca da dissertação do meu mestrado, Prof. Dr. José Carlos Peraçoli e Profa. Dra. Alcyone pela disponibilidade e esforço para estar presente neste dia e contribuir com minha pesquisa.

Agradeço aos funcionários do Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAEI-DAM), do Complexo “FMB-UNESP”, que sempre estiveram dispostos a colaborar com minha pesquisa.

Agradeço as enfermeiras do ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das clínicas da FMB-UNESP, pela paciência e contribuição para coleta das pacientes.

Agradeço a todas participantes deste estudo, pela disposição e por oferecer um breve tempo de sua consulta para eu explicar meu trabalho e realizar a coleta de amostras. Sem vocês este trabalho não seria possível.

Agradeço a Capes, pelo financiamento da bolsa de estudos.

Resumo e Abstract



Resumo

Introdução: aproximadamente 39.000.000 de pessoas vivem com HIV/aids no mundo, sendo 757.042 no Brasil, notificados desde 1980 até junho de 2014, e estima-se 12.000 casos de mulheres gestantes infectadas por ano. Na infecção pelo HIV, além da depleção intensa de linfócitos T CD4+ no intestino, ocorre comprometimento de vários mecanismos protetores epiteliais, fatores que causam danos na barreira intestinal e resultam na translocação microbiana, induzindo aumento da ativação imune sistêmica e inflamação crônica. No entanto, a translocação microbiana na infecção pelo HIV tem sido pouco investigada durante a gestação, período em que a mulher é suscetível a infecções bacterianas. **Objetivo:** estudar marcadores de translocação microbiana e inflamação em grávidas infectadas pelo HIV. **Casuística e métodos:** foram estudadas 30 voluntárias, sendo 12 gestantes infectadas pelo HIV (G1), 10 gestantes não infectadas (G2) e, oito mulheres infectadas pelo HIV não grávidas (G3), mas dentro da faixa etária reprodutiva. Foram coletados dados referentes à idade, idade gestacional (IG), carga viral plasmática do HIV (CV), contagem de linfócitos T CD4+ e *nadir* de T CD4+. A translocação microbiana foi avaliada por dosagem plasmática de sCD14 solúvel (sCD14) pelo método imunoenzimático (ELISA) e, o estado inflamatório, pela análise de IL-17, IL-10, IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-12p70 e TNF- α por citometria de fluxo (CBA). Para a análise estatística paramétrica foi utilizado o teste ANOVA, seguido de Tukey-Kramer e, para as não paramétricas, Distribuição Gamma, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. **Resultados:** a média de T CD4+, CV e *nadir* foram, respectivamente, para G1, 601 células/mm³, 25670 cópias/mL e 442 células/mm³ e, para G3, 583 células/mm³, 2299 cópias/mL e 196 células/mm³. Em relação à idade, os grupos diferiram entre si, sendo menor em G1 e maior em G3. Não houve diferenças nas dosagens de citocinas. Foram observados níveis elevados de sCD14 em todos os grupos, havendo diferença entre G1 (6727 \pm 2030) e G3 (11515 \pm 10746), [$p=0,02$] e entre G2 (5456 \pm 769) e G3 [$p < 0,001$]. **Conclusão:** Embora não tenha ocorrido diferença no estado inflamatório entre os grupos, todas as gestantes mostraram níveis elevados de sCD14, independente da presença ou não da infecção pelo HIV, porém, os maiores valores foram das mulheres infectadas e não gestantes, sugerindo que a gravidez poderia influenciar em mecanismos de translocação, alterando, especialmente os níveis do marcados estudado.

Palavras-chave: translocação microbiana, gestantes, HIV, sCD14, citocinas

Abstract

Introduction: Approximately 39.000.000 million people are living with HIV/AIDS worldwide and 757.042 in Brazil, reported from 1980 to June 2014, and it is estimated 12.000 cases of HIV-infected pregnant women annually. In HIV infection, besides the intense basal CD4+ T lymphocytes depletion, occurs impairment of various epithelial protective mechanisms, factors that contribute to intestinal barrier damages and result in microbial translocation, leading to increased systemic immune activation and chronic inflammation. However, microbial translocation in HIV infection has been poorly investigated during pregnancy, period which women are susceptible to bacterial infections. **Objective:** to study microbial translocation markers and the inflammatory status in HIV-infected pregnant women. **Patients and Methods:** We studied 30 volunteers, 12 HIV-infected pregnant women (G1), 10 HIV-uninfected pregnant women (G2) and 8 HIV-infected nonpregnant women (G3) in the same reproductive age than the other groups. Data were collected regarding age, gestational age (GA), plasma HIV viral load (VL), lymphocyte CD4+ T count and *nadir*. The microbial translocation was evaluated by measurement of plasmatic soluble CD14 (sCD14), performing the immunoenzymatic method (ELISA) and of inflammatory cytokines (IL-17, IL-10, IL-8, IL-1 β , IL-6, IL -12p70 and TNF- α) by flow cytometry (CBA). The parametric statistical analysis was performed using ANOVA followed by Tukey-Kramer post-hoc test, and for non-parametric, Gamma Distribution, considered significant when $p < 0.05$. **Results:** The mean of CD4+ T count, *nadir* and VL were, respectively for G1 601 cells/mm³, 442 cells/mm³ and 25670 copies/mL, and for G3, 583 cells/mm³, 196 cells/mm³ and 2299 copies/mL. The age was different between G1 and G3. Plasmatic levels of cytokines did not differ among groups. High levels of sCD14 were observed in all groups, with statistical difference between G1 (6727 \pm 2030) and G3 (11515 \pm 10746) [$p = 0.02$] and G2 (5256 \pm 769) and G3 [$p < 0.001$]. **Conclusion:** Although there was no difference in the inflammatory state between the groups, all pregnant women showed high levels of sCD14, those HIV-infected and uninfected, however, the HIV-infected non-pregnant women showed the highest values of this marker, suggesting that the pregnancy might influence on translocation mechanisms, changing the plasmatic sCD14 values.

Keywords: microbial translocation, pregnant women, HIV, sCD14, cytokines

Sumário



SUMÁRIO

Resumo

Abstract

I. CAPÍTULO 1

1-Revisão Bibliográfica

1.1)Aspectos gerais da infecção pelo HIV/aids.....	1
1.2)Infecção pelo HIV e Gravidez.....	6
1.3)Translocação Microbiana e Inflamação.....	8
1.4) Translocação Microbiana e Gravidez.....	12
2 - Objetivos	
2.1) Objetivo Geral	14
2.2) Objetivos Específicos	14
3- Referências bibliográficas.....	15

II. CAPÍTULO 2

1 - Artigo 1	22
--------------------	----

III CONCLUSÃO.....	36
--------------------	----

IV. ANEXOS

Artigo submetido versão inglês.....	37
Anexo 1.....	50
Anexo 2.....	51

Capítulo 7



I. CAPÍTULO 1

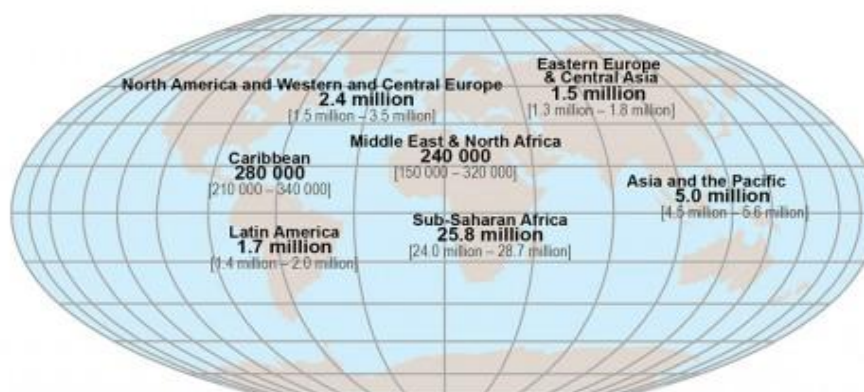
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Aspectos gerais da infecção pelo HIV/aids

Mais de 30 anos após a descrição dos primeiros casos, o cenário da epidemia mudou e a infecção pelo HIV/aids tornou-se uma doença crônica, devido principalmente à eficácia de seu tratamento, que aumenta a sobrevivência e melhora a qualidade de vida dos indivíduos infectados. No entanto, ainda é um grande problema de saúde pública, em função do seu caráter pandêmico e de sua gravidade.

Aproximadamente 36.900.000 pessoas vivem com HIV/aids no mundo (Figura 1), sendo 757.042 casos no Brasil, notificados desde 1980 até junho de 2014.^{1,2} No Estado de São Paulo, no mesmo período, 242.475 casos foram notificados, dos quais 1.401 pertenciam aos municípios que constituem o Grupo de Vigilância Epidemiológica da microrregião de Botucatu, do Departamento Regional de Saúde VI (DRS-VI), de Bauru.^{2,4} Com relação ao gênero feminino, no mesmo período, foram identificados 265.251 casos no país e estima-se 12.000 casos de mulheres gestantes infectadas por ano.²

Adults and children estimated to be living with HIV | 2014



Total: 36.9 million [34.3 million - 41.4 million]



Figura 1. Pessoas vivendo com HIV no mundo.

Fonte: UNAIDS, 2015⁴

A infecção pelo HIV, como demonstrada na Figura 2, ocorre, inicialmente, pela ligação e fusão do vírus com receptores CD4 da célula alvo e seus correceptores CCR5 e/ou CXCR4.⁵ Após alterações conformacionais glicoproteicas, ocorre a liberação do material genético do *core* proteico do HIV no citoplasma celular. Dá-se início às etapas de transcrição do ácido ribonucleico (RNA) viral em ácido desoxirribonucleico (DNA) pela enzima transcriptase reversa e, após, duplicação do DNA viral, que será inserido posteriormente no genoma do hospedeiro com o auxílio de outra enzima viral, a integrase.⁶⁻⁹ Ocorre, então, a transcrição e tradução das proteínas virais e, então, a enzima protease atua, iniciando em seguida o processo de montagem e liberação dos *virions* da célula que ocorre pelo processo de brotamento sendo que, parte da membrana plasmática do hospedeiro dará origem à cápsula viral.¹⁰⁻¹² A partícula imatura é liberada e, finalmente, ocorre o processo de maturação, fase que formam-se os vírus. Por fim, além dos vários efeitos citopáticos virais, sua taxa de replicação pode alcançar níveis tão altos, que levam à morte da célula.¹³⁻¹⁶

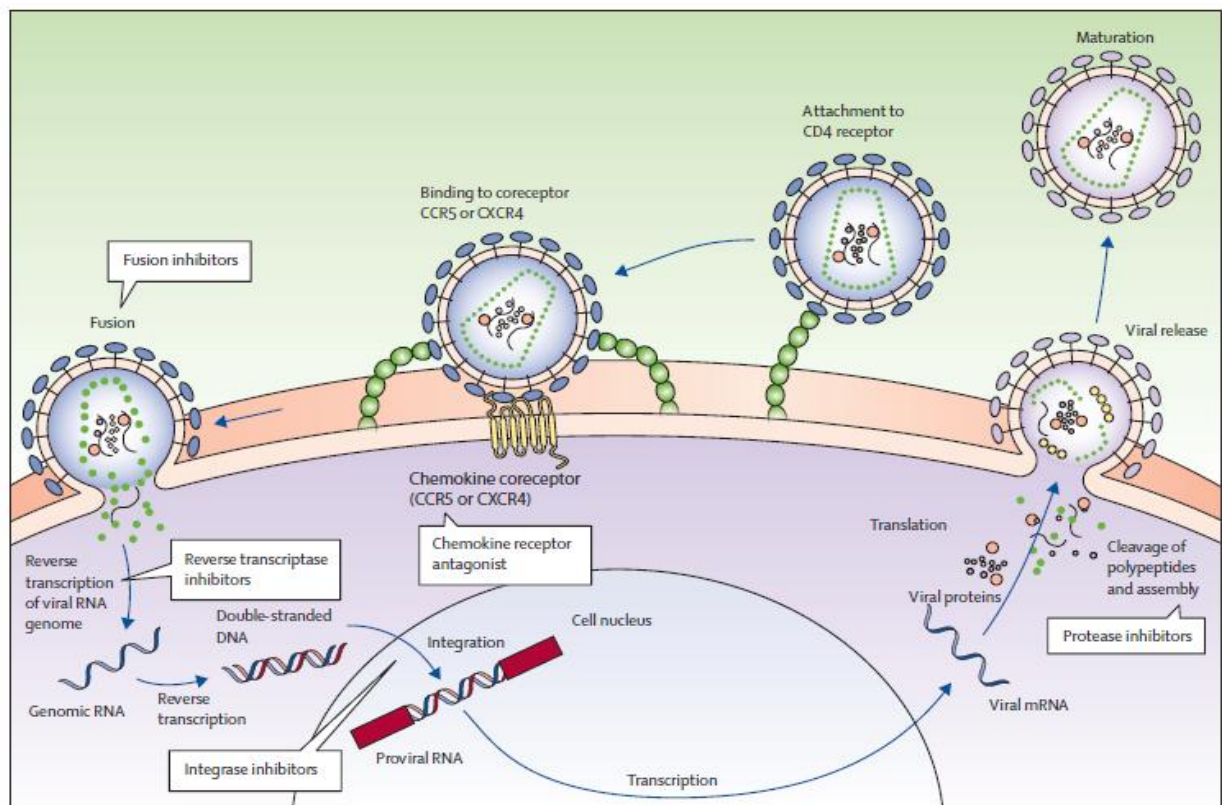


Figura 2. Ciclo e replicação do HIV

Fonte: Maartens, 2014¹⁷

Assim, o principal dano causado pelo HIV é o acometimento progressivo do sistema imune celular, levando à grave imunodepressão, o que torna o indivíduo mais suscetível às doenças oportunistas ou certos tipos de neoplasias.¹⁸ Várias são as células alvo do HIV, tais como, linfócitos, macrófagos, monócitos, células dendríticas, entre outras.¹⁹

Após o contágio pelo HIV, a infecção se caracteriza por três fases clínicas (Figura 3). Na fase aguda pode ocorrer febre, astenia, cefaleia, mialgia, adenopatia, faringite e *rash* cutâneo, que são reflexos do estado intenso de replicação viral e do maior pico de viremia.²¹⁻²³ Nesse período, também ocorre semeadura do vírus nos tecidos linfoides.²⁴ No sangue periférico há redução intensa nas contagens de células T CD4+ devido à alta viremia. Na sequência, há queda da carga viral (CV)^{25,26} e verifica-se recuperação lenta e parcial das contagens dos linfócitos T CD4+, enquanto que o número dos T CD8+ na circulação, retorna em níveis semelhantes aos anteriores à infecção.²⁴ A soroconversão ocorre, então, entre três e cinco semanas após o contágio, período denominado “janela imunológica”.²⁸

A fase crônica ou assintomática é caracterizada por ausência de sinais e sintomas, também chamada de “latência clínica”. No entanto, durante esta fase ocorre replicação viral persistente, além de depleção intensa de células T CD4+, principalmente, no tecido linfoide associado à mucosa intestinal ou GALT (*gut-associated lymphoid tissue*) e nos gânglios linfáticos, acometendo a estrutura e função destes tecidos, o que dificulta o desenvolvimento de respostas imunológicas competentes.^{29,30}

A fase sintomática ou aids, é marcada por depleção progressiva dos linfócitos T CD4+, que ocorre devido ao aumento da apoptose de linfócitos infectados e não infectados pelo HIV,³¹ o que acomete também, a produção e/ou ativação de citocinas pró e anti-inflamatórias, refletindo na maior replicação viral e grave imunossupressão, momento em que surgem as infecções oportunistas ou neoplasias definidoras de aids.^{18,32}

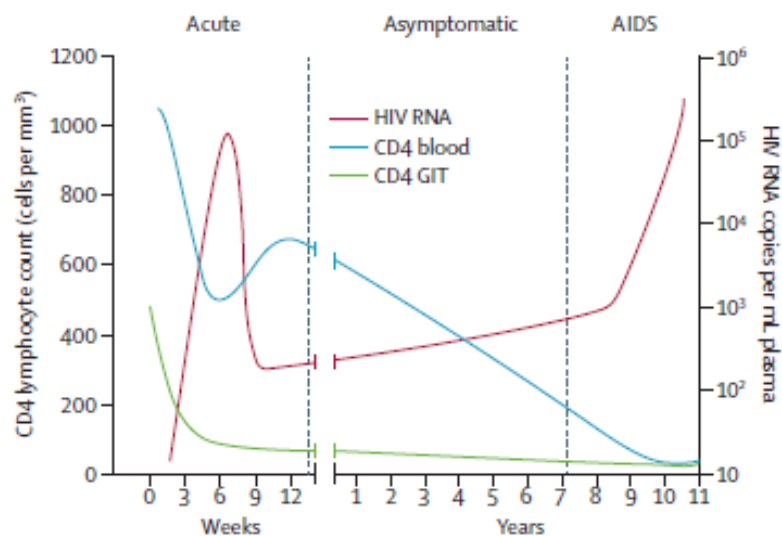


Figura 3. Patogênese do HIV.

CD4 GIT: células T CD4+ presente no GALT.

Fonte: Maartens, 2014¹⁷

A infecção pelo HIV também se caracteriza por aumento acentuado da ativação imune, que inclui tanto resposta inata quanto a adaptativa.³³ Os linfócitos T CD4+ são essenciais para a ativação de macrófagos e geração de linfócitos T citotóxicos (CTL) (Figura 4). Uma das características principais do controle da replicação do HIV é a presença de células T CD8+ específicas com elevada capacidade proliferativa sendo que, a inibição da replicação mediada por CTL pode ocorrer por meio de vários mecanismos relacionados, tanto com sua capacidade citolítica, quanto com a produção de moléculas não citotóxicas com atividade antiviral.^{34,35}

Além da imunidade celular, a resposta humoral também desempenha papel importante no controle da replicação viral, pela produção de anticorpos neutralizantes e não neutralizantes, levando à opsonização viral e, por atuar em conjunto com o sistema complemento³⁶.

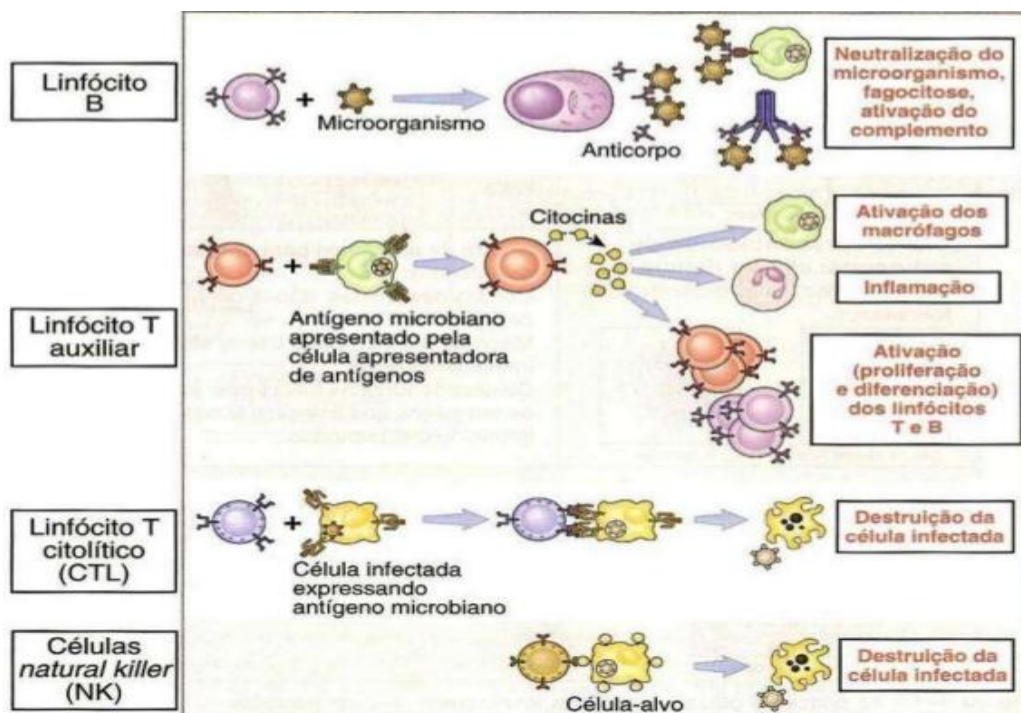


Figura 4. Ação das células do sistema imunológico

Fonte: Abbas, 2012³⁷

No entanto, a partir da descoberta das diversas drogas antirretrovirais, o controle da replicação do HIV tem mudado o cenário da epidemia. Desde a liberação da zidovudina para uso clínico, ainda, no final da década de 1980, vários são os esquemas e recomendações que, ao longo do tempo vêm sendo modificados, sendo que as indicações do momento mais adequado para se iniciar a terapia, ainda, é um assunto muito discutido em todo o mundo.

A partir de 2013, a Organização Mundial de Saúde (OMS), divulgou novas diretrizes para início da terapia antirretroviral (TARV) visando, em seu uso precoce, a prevenção da transmissão do HIV, além, é claro, dos benefícios individuais da pessoa que vive com o HIV/aids. Hoje, a maioria dos *guidelines* recomenda o tratamento para todos os portadores do vírus, independentemente dos níveis de linfócitos T CD4+, o que pode ser feito a partir de seu diagnóstico.^{2,38}

A TARV melhora progressivamente a imunidade, mesmo que parcialmente, e prolonga a vida do infectado, além de reduzir substancialmente o risco de transmissão do HIV. Recente estudo, *START study group*,³⁹ concluiu que, o início da TARV em pacientes com mais de 500 células/mm³ de T CD4+ tem mostrado maior benefício na redução de doenças relacionadas, do que naquelas não relacionadas à aids. Assim, há necessidade de maior atenção à prevenção de

doenças crônicas, resultado não somente, do uso prolongado da TARV, mas, também, do aumento na sobrevida e envelhecimento dos portadores do HIV. Entre elas estão a doença isquêmica cardíaca, acidente vascular encefálico e outras alterações do sistema nervoso central, dislipidemias, hepatopatias, doença renal crônica, *diabetes mellitus*, alterações ósseas, infecções e cânceres não relacionados à aids.⁴⁰⁻⁴³

1.2. Infecção pelo HIV e Gravidez

A gestação caracteriza-se por alterações fisiológicas, hormonais e imunológicas. Do ponto de vista imunológico, a manutenção da gestação depende do equilíbrio entre as citocinas, que se diferenciam em perfis específicos de acordo com as alterações da resposta imune ao longo do período gestacional.⁴⁴ No primeiro trimestre há resposta imune de perfil T *helper* do tipo 1 (Th1), visto que o ambiente torna-se inflamatório, tanto para permitir o adequado reparo do epitélio uterino, que sofre alterações devido à implantação do feto, quanto para remoção de restos celulares. No segundo trimestre, o domínio passa a ser da resposta imune do tipo Th2,^{45,46} com aumento de citocinas anti-inflamatórias, que são responsáveis pela manutenção da gestação. No terceiro trimestre e no momento do parto, o perfil Th1 volta a ser predominante na circulação, bem como no tecido placentário e no líquido amniótico.⁴⁸⁻⁴⁹ Neste último período, níveis crescentes de citocinas inflamatórias como interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral *alpha* (TNF- α) são secretados pelo tecido placentário para viabilizar o parto.⁵⁰⁻

52

Desta forma, recente estudo⁵³ associa a gravidez com o aumento de marcadores inflamatórios. Além disso, observa-se aumento nos níveis de células T regulatórias (Tregs), que possuem a capacidade de regular a resposta imunológica e garantir a homeostase deste sistema.

Sabe-se que a gravidez não acelera a progressão da infecção pelo HIV para aids, nem aumenta o risco de mortalidade da gestante, porém, tem relação com a transmissão perinatal do vírus.⁵³⁻⁵⁶ No entanto, em países de baixa renda, onde a TARV não tem a mesma distribuição comparado a países de alta renda, a gravidez em mulheres infectadas poderia aumentar o risco de progressão da doença.^{53,57,58} Em um estudo de metanálise, observou-se, inclusive que, entre as mulheres infectadas pelo HIV, as gestantes são as mais conscientes em relação à adesão da terapia e acompanhamento no serviço, o que reflete em bom prognóstico tanto da gravidez quanto da própria infecção pelo vírus.⁵⁴

Programa de prevenção no mundo todo, com o objetivo de monitorar a profilaxia da transmissão vertical do HIV, aumentou sua atuação em aproximadamente 15%, impedindo mais de 670.000 crianças de adquirirem o vírus no período de 2009 a 2012. Atualmente, cerca de 73% das mulheres grávidas infectadas pelo HIV recebem TARV durante a gestação, o que reduziu em 58% o risco de transmissão vertical no mundo.^{1,59,60}

Em 2012, em locais que a infecção tem caráter epidêmico, principalmente, os mais pobres do continente africano, a cobertura da TARV foi substancialmente mais baixa durante a amamentação do que durante a gravidez. Estima-se que a metade de novos casos de transmissão do HIV para crianças ocorra no período de amamentação, quando a maioria das mulheres lactantes não recebe profilaxia necessária para prevenir a transmissão por essa via e não suspende o aleitamento.^{59,60}

A amamentação estabelece potente imunidade ao bebê frente aos primeiros meses de vida. O leite materno contribui para maturação do trato gastrointestinal e contém fatores que ajudam na defesa do organismo, característica dada por nutrientes ideais e substâncias anti-inflamatórias, como imunoglobulinas e citocinas.⁶¹ Por causa disso, a amamentação está relacionada com a redução da mortalidade infantil por doenças infecciosas, particularmente, diarreias e pneumonias, com menos de 800.000 mortes a elas atribuídas, além de ser responsável por prevenir desnutrição em crianças até 5 anos.^{61,62} Em locais onde o risco de mortalidade por estas doenças é alto, que inclui alta prevalência da infecção pelo HIV, como por exemplo países do continente africano, a implementação da TARV aumenta consideravelmente a chance de sobrevivência das crianças expostas ao vírus.⁶³

Rollins et al,⁶⁴ em estudo de revisão, demonstraram que, na ausência da TARV, a probabilidade de aquisição do HIV por crianças expostas durante a amamentação é de 1,57% ao mês, quando as contagens de T CD4+ são menores do que 350 células/mm³ e de 0,51%, quando são maiores do que este valor, o que provavelmente é reflexo da alta carga viral materna. Algumas pesquisas clínicas que intervêm na transmissão pós-natal do HIV, sem uso da TARV, estão em andamento. Esses autores vêm testando a prática do tratamento térmico de leite materno, que pode inativar efetivamente o vírus, com processos de pasteurização em casa ou comercial,⁶⁵ protetores de mamilo contendo TARV para crianças no momento da amamentação⁶⁶ e vacinas em fase de teste em animais e humanos.⁶⁷

Assim, mesmo que estas alternativas ainda não estejam em uso, é muito importante que se acredite nessas possibilidades de intervenção para impedir a transmissão do HIV e promover benefício da amamentação, especialmente nos países de baixa renda.

1.3. Translocação Microbiana e Inflamação

A microbiota intestinal é composta aproximadamente de 1.000 microrganismos, dos quais muitos ainda não foram descritos, sendo que ela é fundamental para o funcionamento do GALT. Esta colonização é importante para diversos processos fisiológicos, como a manutenção da barreira epitelial intestinal, que tem papel na aquisição de nutrientes, capacitação do sistema imune e defesa contra enteropatógenos.⁶⁸

O epitélio intestinal contém abundância de células epiteliais, imunoglobulina (Ig) A e células do sistema imunológico, como macrófagos, células dendríticas e células T, que atuam como barreira para o conteúdo luminal, incluindo as bactérias e endotoxinas. Esses e outros fatores estruturais e imunológicos do hospedeiro mantêm a integridade do epitélio, prevenindo, assim, que produtos microbianos atravessem do lúmen intestinal para o sangue periférico. No entanto, a mucosa epitelial abriga a maioria dos linfócitos, comparada ao sangue periférico, característica que a torna extremamente suscetível à infecção/replicação do HIV (Figura 5).⁶⁹⁻⁷¹

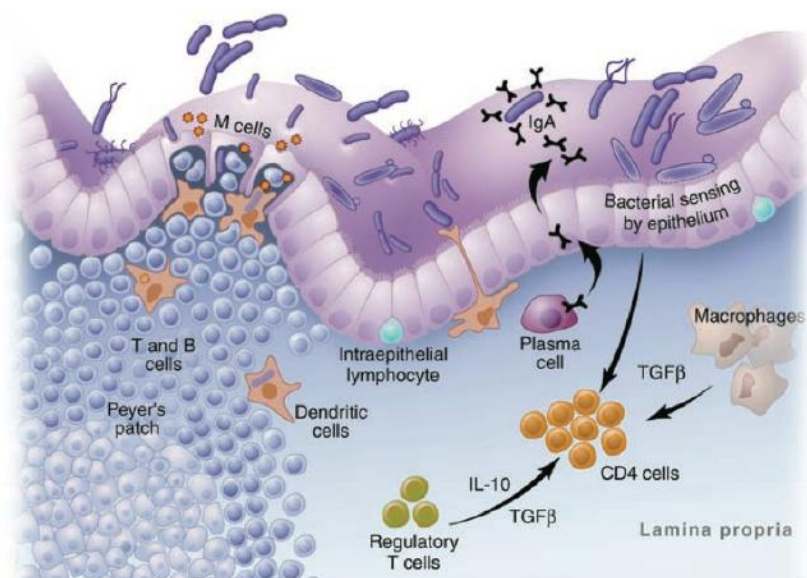


Figura 5. Mecanismos imunológicos envolvidos na proteção da translocação microbiana

Fonte: Macdonald e Monteleone, 2005⁷²

Estudos sugerem⁷¹ que a proteína ligante de lipopolissacarídeo (LBP), CD14, *Toll like-4* (TLR-4) e MD-2, juntas, iniciam a ativação das vias de sinalização para produção de citocinas inflamatórias.

O lipopolissacarídeo (LPS), um glicolípido expresso na parede celular de bactérias gram-negativas, está envolvido na resposta imunológica de fase aguda para infecções

bacterianas e tem sido considerado o mais conhecido marcador de translocação microbiana.⁷³⁻⁷⁵ A LBP, sintetizada principalmente no fígado mediante estímulos do LPS, interage com o receptor de CD14, provavelmente com papel regulatório das respostas de monócitos LPS-dependentes.⁷⁶ Além do mais, a translocação microbiana também pode ser identificada pelas medidas dos níveis plasmáticos de CD14 solúvel (sCD14). O CD14, quando constituído na membrana de monócitos, macrófagos e neutrófilos é um receptor multifuncional com especificidade para LPS e outros componentes derivados da parede bacteriana.⁷⁷ Quando o LPS liga-se ao CD14, ocorre ativação de receptores *toll* que reconhecem o padrão da célula e ativa o fator de transcrição NF- κ B com produção intensa de citocinas inflamatórias. (Figura 6)^{78,79}

Além do aumento destes biomarcadores, estudos de Vesterbacka et al.⁷⁶ e Sandler et al.⁸⁰ observaram níveis elevados de proteínas de ligação de ácidos graxos intestinais (iFABP), liberada a partir da morte dos enterócitos, ocasionando dano epitelial e aumento da permeabilidade intestinal.

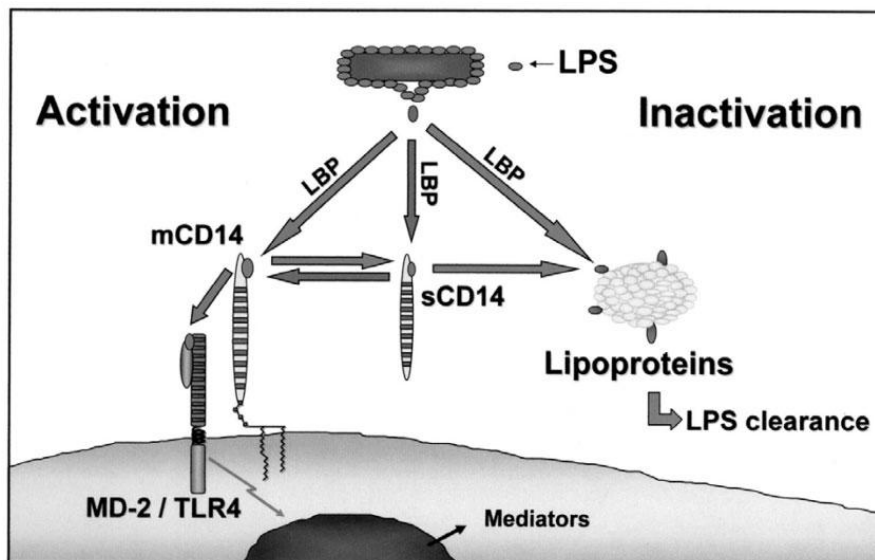


Figura 6. Ativação de LPS

Fonte: Richard 2005⁸¹

Quando essa translocação microbiana ocorre em indivíduos saudáveis existem vários mecanismos imunológicos capazes de eliminar os microrganismos ou transportá-los de volta ao lúmen do intestino, tais como, a presença de IgG, IgA e de anticorpos do *core* da endotoxina (EndoCab), que neutralizam a atividade do LPS.^{82,83}

Na infecção pelo HIV, entretanto, ocorre comprometimento de vários desses mecanismos protetores, além da depleção intensa de linfócitos T CD4+ no intestino, fatores que causam danos na barreira intestinal e, resultam na translocação microbiana, induzindo aumento na ativação imune sistêmica e inflamação crônica. Também, são observados nestes indivíduos, disfunção de células B com redução nos níveis de IgA e inibição da adesão da bactéria no epitélio do intestino.⁸⁴⁻⁸⁶

Além disso, alguns estudos na infecção pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV) demonstraram que, o nível de translocação microbiana estava diretamente relacionado com o risco de doenças cardiovasculares, pois foram observados altos níveis de LPS e de alguns biomarcadores de coagulação, como d-dímeros, em macacos infectados.^{84,86,87} Níveis aumentados de LPS são encontrados, também, em pacientes infectados pelo HIV com coinfeções, como por exemplo, tuberculose, hepatites crônicas por vírus B e C e leishmaniose visceral.⁸⁸⁻⁹⁰ Apesar de a TARV diminuir estes níveis, sabe-se que eles não são normalizados, mesmo depois de 70 semanas do tratamento associado ao cotrimoxazol, utilizado para reduzir a translocação microbiana.⁷⁶

Elevados níveis de sCD14, TNF- α , interferon γ (IFN- γ) e baixos níveis séricos de EndoCAb, foram observados em usuários de drogas, infectados pelo HIV, com intensa translocação microbiana decorrente da depleção de células T no GALT.⁹¹ No entanto, o aumento de LPS e sCD14 está associado com persistente ativação imune, o que leva ao estado de inflamação crônica e contribui com o desenvolvimento de algumas comorbidades relacionadas ou não ao HIV, tais como, demência, disfunções endoteliais, maior risco de doenças cardiovasculares, trombofilia, entre outras⁹²⁻⁹⁶, o que torna importante o estudo destes marcadores.

Sabe-se que, além do desequilíbrio entre as células Th1 e Th2 observado na infecção pelo HIV há, também, o comprometimento do perfil Th17, população de células secretoras de IL-17. Predominante no trato gastrointestinal, as células Th17, contribuem para a defesa contra infecções bacterianas, fúngicas e parasitárias, além de estar envolvida na regeneração epitelial e no recrutamento de neutrófilos e células mielóides para o GALT. A depleção de células T no GALT durante a infecção pelo HIV leva ao esgotamento de células Th17, o que causa perda da integridade da barreira intestinal, facilitando ainda mais a translocação de produtos microbianos.^{97,98}

Dentro deste contexto, o bloqueio de um receptor de quimiocinas essencial para fusão do HIV nas células alvo, o CCR5, pode ocorrer por seu antagonista, por exemplo, o antirretroviral

maraviroc, interferindo na função imune de células responsáveis pela manutenção da mucosa e também, morte celular, que resulta na translocação microbiana e na ativação de células T $\beta 7+$.⁹⁹ As moléculas $\beta 7$ são expressas em células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, em níveis baixos, sendo induzidas por diversos estímulos como produtos microbianos que se acoplam aos receptores *Toll* e às citocinas, como o IFN- γ .³⁷ Quando há aumento na translocação microbiana, são expressos maiores níveis de células T $\beta 7+$, admitindo-se que algumas células migram do sangue periférico para a mucosa intestinal na tentativa de promover a reconstituição de seu epitélio.⁹⁹

Cohen et al.¹⁰⁰ e Munoz-Fernandez et al.¹⁰¹ apontaram que níveis séricos de citocinas inflamatórias, tais como, TNF- α , IL-1 e IL-6 estão elevados mesmo na fase assintomática da infecção pelo HIV, sendo que, estas citocinas no GALT aumentam a permeabilidade intestinal. Essas citocinas também contribuem para replicação viral e muitas das manifestações de imunodeficiência, interferindo na função de várias células do sistema imune, o que leva ao comprometimento da capacidade regenerativa imunológica em nível da medula óssea, timo e gânglios linfáticos.^{92,102,103} O comprometimento do timo resulta na ativação imune crônica das células T, que se relaciona com maior CV do HIV. Este ciclo continua, pois, o aumento da viremia favorece ainda mais a produção de citocinas inflamatórias.¹⁰⁴ Sabe-se que a TARV diminui substancialmente a inflamação, no entanto, estudos^{76,105} demonstraram que mesmo após dois anos de TARV, o processo inflamatório crônico não regride, indicando que a translocação microbiana contribui para ativação intensa de macrófagos e monócitos, independentemente da replicação viral.

Além de contribuíram com o desenvolvimento de comorbidades que podem se associar ou não ao HIV,⁹³⁻⁹⁶ a translocação microbiana está envolvida na patogenia de várias outras doenças, como por exemplo, a doença de Crohn, com a participação das bactérias *Listeria* sp, *Escherichia coli* e *Streptococcus* sp.¹⁰⁶ A translocação microbiana pode agravar o desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica, caracterizada pelo forte dano às células endoteliais, permeabilidade tecidual aumentada, ativação da cascata de coagulação, agregação plaquetária e hipóxia tecidual,¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ além de aumentar o risco de sepse e síndrome de disfunção de múltiplos órgãos.¹¹⁰⁻¹¹³ Ademais, altos níveis de endotoxinas têm sido observados em indivíduos submetidos à cirurgia gastrointestinal invasiva e na doença do enxerto contra hospedeiro, sugerindo que a manipulação intestinal também pode prejudicar a função de sua barreira.^{75,114}

1.4 Translocação Microbiana e Gravidez

Estudos em humanos mostram que alguns distúrbios podem ocorrer durante a gestação, tais como, aborto espontâneo, diabetes gestacional, pré-eclâmpsia e má formação fetal, independente da presença ou não de infecções.¹¹⁵⁻¹¹⁷

Kourtis et al.,¹¹⁸ em estudo com filhos infectados e não infectados pelo HIV, de mães portadoras do vírus, avaliaram a amamentação e o papel da translocação microbiana na aquisição do HIV e observaram maiores níveis de LPS e sCD14 nas crianças infectadas, comparadas às não-infectadas. Entre os marcadores avaliados, o sCD14 foi o preditor de aquisição do HIV via amamentação, podendo sugerir que a permeabilidade intestinal favoreceria a infecção. Neste mesmo trabalho, maior translocação esteve relacionada, também, ao desmame e à profilaxia com antibióticos. Isto levou ao menor crescimento da criança nos meses analisados, o que reforçou a necessidade de outras intervenções durante a amamentação, além do uso da TARV, tais como, uso de probióticos e vacina contra rotavírus.

Já em estudo experimental, Tan et al.¹¹⁹ observaram translocação microbiana em ratas prenhas inoculadas via oral com *Enterococcus faecalis*, o que levou à redução da defesa intestinal e acúmulo de grande quantidade de produtos microbianos na corrente sanguínea e baço destes animais. Com isso, além de distúrbios maternos e fetais, caracterizados por perda de peso da placenta e do próprio feto, as ratas apresentaram bacteremia. Em outro estudo, Tsuda et al.,¹²⁰ também, observaram evolução para sepse após translocação do *E. faecalis* em ratas prenhas.

López et al.¹²¹ em estudo recente realizado demonstraram o envolvimento da translocação microbiana na ocorrência de parto prematuro em gestantes infectadas pelo HIV, numa proporção de 25%. Observaram também que, somente no primeiro trimestre da gravidez, níveis aumentados de sCD14 e LBP tiveram relação com partos prematuros e abortos espontâneos, mesmo em gestantes em uso de TARV, antes e durante a gravidez. Estes mesmos autores¹²¹, também avaliaram marcadores de translocação microbiana no sangue do cordão umbilical de bebês dessas mães infectadas e não infectadas, porém, não observaram diferenças entre os grupos analisados.

Poucos são os estudos que avaliaram marcadores de translocação microbiana durante a gravidez. Espinoza et al.¹²² e Gardella et al.¹²³ observaram aumento dos níveis de LBP e sCD14 no líquido amniótico de mulheres grávidas em trabalho de parto prematuro em comparação com os partos a termo. Em outro estudo, Martinez-López et al.¹²⁴ relataram aumento de sCD14 e

LPS, em sangue do cordão umbilical em recém nascidos prematuros, em consequência de corioamnionite.

Embora venham sendo estudadas estratégias com a finalidade de prevenir o dano da barreira epitelial intestinal causada pela depleção das células T CD4+ na infecção pelo HIV, são escassos os ensaios clínicos que indicam administração de antibióticos, drogas anti-inflamatórias ou suplementação simbiótica-probiótica associadas à TARV, na intenção de prevenir a translocação microbiana.⁸³ Além disso, a avaliação da translocação microbiana tem sido pouco investigada em gestantes, inclusive, em aquelas infectadas pelo HIV e com abordagem nas possíveis complicações gestacionais que possam ocorrer. Além disso, entender os mecanismos de ativação imune e inflamação crônica nestas mulheres, poderia esclarecer lacunas literárias importantes, no que diz respeito à vulnerabilidade desta população ao desenvolvimento precoce de doenças não associadas à aids.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar marcadores plasmáticos de inflamação e translocação microbiana em gestantes infectadas pelo HIV.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a ocorrência de translocação microbiana por dosagem plasmática de sCD14;
- Estudar o estado inflamatório crônico por dosagens plasmáticas de IL-17, IL-10, IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12p70;
- Avaliar contagens de T CD4+ no momento da coleta, o *nadir* de T CD4+, quantificações da CV plasmática do HIV das pacientes;
- Relacionar todos os parâmetros acima e discutir possíveis mecanismos envolvidos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. UNAIDS. 15 Years, 15 Lessons of Hope from the Aids Response. Global Statistics; 2015.
2. Boletim epidemiológico- AIDS e DST. Ano III N° 01. Janeiro a junho de 2014.
3. Science. New report card on global HIV/AIDS epidemic (acesso em 22/01/16 21h35min) Disponível em <http://www.sciencemag.org/news/2015/07/new-report-card-global-hiv-aids-epidemic>
4. Duarte MTC, Parada CMGL, Souza LR. Vulnerabilidade de mulheres vivendo com HIV/aids. Rev Latino Ame Enf, 2014; 22(1).
5. Clapham PR, McKnight A. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. J Gen Virol. 2002; 83(8): 1809-29.
6. CDC. Center for Diseases Control. Epidemiology notes and reports immunodeficiency among female sexual partners of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 1983; 31(52): 697-98.
7. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science. 1983; 220(4599): 868-871.
8. Gallo RC, et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science, 1983; 220(4599): 865-867.
9. Tancredi MV. Tendência da epidemia de AIDS no município de São Paulo, 1985 a 2000 [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2003.
10. Boletim Epidemiológico CRT – DST/Aids, CVE. Ano XXVII, n.1, 2010.
11. Ministério da Saúde (Brasil) [Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Tratamento de HIV e aids 2008 [acesso em 20 dez 2011]. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br>>.
12. Freed EO. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. Virology. 1998; 251(1): 1-15.
13. Department of Energy's NNSA. The circulating recombinant forms (CRFs) [Internet]. Los Alamos National Laboratory. [Acesso em: 16 jun. 2010]. Disponível em: <<http://www.hiv.lanl.gov>>.
14. Peçanha EP, Antunes OAC, Tanuri A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. Química Nova. 2002; 25(6b): 1108-16.
15. Oliveira AJ, Osti NM, Parise Filho R, Chorilli M. Novas abordagens no desenvolvimento de fármacos antirretrovirais. Rev de La Organización de Farmacéuticos Ibero-Latino americanos. 2009; 19(1): 42-56.
16. Piatak M Jr, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. Science. 1993; 259(5102): 1749-54.
17. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV Infection: epidemiology, pathogenesis, treatment and prevention. Semilar. 2014; 1-14.
18. Ministério da Saúde (Brasil) [Internet]. AIDS Boletim Epidemiológico 1998 [acesso em 16 jan 2012]. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br>>.
19. Vaishnav YN, Wong-Staal F. The Biochemistry of Aids. Annu Rev Biochem. 1991; 60: 577-630.
20. Quinn TC. Acute primary HIV infection. JAMA. 1997; 278: 58-62.
21. Ministério da Saúde (Brasil) [Internet]. AIDS: etiologia, clínica, diagnóstico e tratamento. [acesso em ago 2011]. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br>>.

22. Mellors J, Rinaldo C, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*. 1996; 272(5265): 1167–70.
23. Wu L, KewalRamani VN. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(11): 859-68.
24. Koup, R. A. *et al.* Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol*. 1994; 68, 4650–4655.
25. Schacker TH, Hughes JP, Shea T, Coombs RW, Corey L. Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. *Ann Intern Med*. 1998; 128(8): 613-20.
26. Gaines H, Von Sydow MA, Von Stedingk LV, Biberfeld G, Böttiger B, Hansson LO, *et al.* Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS*. 1990; 4(10): 995-9.
27. Weber B. Screening of HIV infection: role of molecular and immunological assays. *Expert Rev Mol Diagn*. 2006; 6(3): 399-411.
28. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006; 12(12): 1365-71.
29. Lederman, MM, Margolis L. The lymph node in HIV pathogenesis. *Semin Immunol*. 2008; 20(3): 187-95.
30. Badley AD, Pilon AA, Landay A, Lynch DH. Mechanism of HIV associated lymphocyte apoptosis. *Blood*. 2000; 96(9): 2951-2964.
31. Forsman A, Weiss RA. Why is HIV a pathogen? *Trends Microbiol*. 2008; 16(12): 555-60.
32. Gandhi RT, Walker BD. Immunogenic control of HIV-1. *Ann. Rev. Med* 2002; 53:149-72.
33. Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, Hallahan CW, *et al.* HIV-specific CD8 T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol*. 2002; 3: 1061–68.
34. Kuiken C, Thakallapalli HR, Esklid A, de Ronde A, *et al.* Genetic analysis reveals epidemiologic patterns in the spread of human immunodeficiency virus. *Am J Epidemiol*. 2000; 152(9): 814-822.
35. Montefiori DC, Mascola JR. Neutralizing antibodies against HIV-1: can we elicit them with vaccines and how much do we need? *Curr Opin HIV AIDS* 2009; 4(5): 347-51.
36. Huber MM, Fischer M, Misselwitz B, Manrique A, Kuster H, Niederöst B, *et al.* Complement lysis activity in autologous plasma is associated with lower viral loads during the acute phase of HIV-1 infection. *PLoS Med*. 2006; 3(11): e441.
37. Abbas K LS, Pillai: *Cellular and Molecular Immunology*. Seventh edition, Elsevier/Saunders 2012.
38. World Health Organization. *Global Update On The Health Sector Response to HIV*. Geneva: Who library; 2014.
39. The START Study Group. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *The New J of Med*. 2015; 373(9): 795-807.
40. Paterson DL, Swindells S, Mohr J, Brester M, Verges EN, Squir C, *et al.* Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection. *Ann Intern Med*. 2000; 133(1): 21-30.
41. Pereira CCA, Machado CJ, Rodrigues RN. Perfis de causas múltiplas de morte relacionadas ao HIV/AIDS nos municípios de São Paulo e Santos, Brasil, 2001. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 2007; 23(3): 645-655.

42. Hasse B, Ledergerber B, Egger M, et al. Aging and Non-HIV-associated Co-morbidity in HIV+ Persons: The SHCS - 18th Conf on Retroviruses and Opportunist Infection, Paper 79, 2011. Disponível em: www.retroconference.org/2011/Abstracts/40790.html.
43. The SMART Study Group. CD4+ Count-Guided Interruption of Antiretroviral Treatment. *The New J of Med.* 2006; 355(22): 2283-2296.
44. Chaouat G et al. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol* 2007; 29:95-113.
45. Makhseed M, Raghupathy R, El-Shazly S, Azizieh F, Al-Harmi JA, Al-Azemi MM. Pro-inflammatory maternal cytokine profile in preterm delivery. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49:308-18.
46. El-Shazly S, Makhseed M, Azizieh F, Raghupathy R. Increased expression of pro-inflammatory cytokines in placentas of women undergoing spontaneous preterm delivery or premature rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52:45-52.
47. Arntzen KJ, Lien E, Austgulen R. Maternal serum levels of interleukin-6 and clinical characteristics of normal delivery at term. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 76:55-60.
48. Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Hum Pathol* 2004; 35:47-54.
49. Von Dadelszen P, Watson RW, Noorwali F, Marshall JC, Parodo J, Farine D, et al. Maternal neutrophil apoptosis in normal pregnancy, preeclampsia, and normotensive intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:408-14.
50. Gustafsson C, Hummerdal P, Matthiesen L, Berg G, Ekerfelt C, Ernerudh J. Cytokine secretion in decidual mononuclear cells from term human pregnancy with or without labour: ELISPOT detection of IFN-gamma, IL-4, IL-10, TGF-beta and TNF-alpha. *J Reprod Immunol* 2006; 71:41-56.
51. Dudley DJ, Collmer D, Mitchell MD, Trautman MS. Inflammatory cytokine mRNA in human gestational tissues: implications for term and preterm labor. *J Soc Gynecol Investig* 1996; 3:328-35.
52. Mor G. Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127:121-8.
53. Richardson K, Weinberg A. Dynamics of regulatory T-cells during pregnancy: effect of HIV infection and correlations with other immune parameters. *Plos One* 2011; 6(11):1-8 e28172.
54. Calvert C, Ronsmans C. Pregnancy and HIV disease progression: a systematic review and meta-analysis. *Tropical Medicine and International Health* 2015; 20 (2): 122-145.
55. Vimercati A, Greco P, Lopalco P et al. Immunological markers in HIV-infected pregnant and non-pregnant women. *Eur J Obs Gyn.* 2000; 37-41.
56. Somerset D, Zheng Y, Kilby M, Samsom D, Drayson M. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD251 CD41 regulatory T-cell subset. *Immunology* 2004 112; 38-43.
57. Paal LV, Shafer LA, et al. Effect of pregnancy on HIV disease progression and survival among women in rural Uganda. *Tropical Medicine and International Health.* 2007; 12 (8): 920-928.
58. Lathrop E, Jamieson D, Danel I. HIV and maternal mortality. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 2014; 1-3.
59. Global AIDS response progress reporting 2014. Who library. Janeiro 2014.

60. Asfaw HM, Gashe FE. Contraceptive use and method preference among HIV positive women in Addis Ababa, Ethiopia: a cross sectional survey. *BMC Public Health* 2014, 14:566.
61. Pedersen SH, Wilkinson AL, Andreasen A et al. Longitudinal analysis of mature breastmilk and serum immune composition among mixed HIV-status mothers and their infants. *Clinical Nutrition*. 2015; 1-9.
62. Horta BL, Victora CG. Short-term effects of breastfeeding: a systematic review on the benefits of breastfeeding on diarrhoea and pneumonia mortality. Geneva: World Health Organization; 2013.
63. Rollins N, Coovadia HN. Breastfeeding and HIV transmission in the developing world: past, present, future. *WolKlr Health* 2013; 468-473.
64. Rollins N, Mahy M, Becquet R et al. Estimates of peripartum and postnatal mother-to-child transmission probabilities of HIV for use in Spectrum and other population-based models. *Sex Transm Infect* 2012; 88:44–51.
65. Hoque SA, Hoshino H, Anwar KS, et al. Transient heating of expressed breast milk up to 65 degrees C inactivates HIV-1 in milk: a simple, rapid, and cost effective method to prevent postnatal transmission. *J Med Virol* 2013; 85:187–193.
66. Gerrard SE, Baniecki ML, Sokal DC, et al. A nipple shield delivery system for oral drug delivery to breastfeeding infants: microbicide delivery to inactivate HIV. *Int J Pharm* 2012; 434:224–234.
67. Lohman-Payne B, Slyker J, Rowland-Jones SL. Immune approaches for the prevention of breast milk transmission of HIV-1. *AdvExp Med Biol* 2012; 743:185–195.
68. Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, et al. Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host & Microbe*. 2007; (2) 119–129.
69. Cerf-Bensussan N, and D. Guy-Grand. Intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 1991; 20:549–576.
70. Smit-McBride Z, Mattapallil JJ, McChesney M, Ferrick D, Dandekar S. Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4+ T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes. *J. Virol.* 1998; 72:6646–6656.
71. McGowan IM, Elliott J et al. Increased HIV-1 mucosal replication is associated with generalized mucosal cytokine activation. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 2004. In press.
72. Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation and allergy in the gut. *Science*. 2005;307(5717):1920-5.
73. Caradonna L, Amati L, Magrone T, Pellegrino NM, Jirillo E, Caccavo D. Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J. Endotoxin Res.* 2000; 6:205–214.
74. Cooke KR, Gerbitz A, Crawford JM, Teshima T, Hill GR, Tesolin A, Rossignol DP, Ferrara JL. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.* 2001; 107:1581–1589.
75. Schietroma M, Carlei F, Cappelli S, Amicucci G. 2006. Intestinal permeability and systemic endotoxemia after laparotomic or laparoscopic cholecystectomy. *Ann. Surg.* 2006; 243:359–363.
76. Vesterbacka et al. Effects of Co-Trimoxazole on Microbial Translocation in HIV-1-Infected Patients Initiating Antiretroviral Therapy. *AIDS research and human retroviruses*. 2015; 31: 1-7.

77. Blodget E, Shen C, Aldrovandi G, et al. Relationship between Microbial Translocation and Endothelial Function in HIV Infected Patients. *PLoS ONE*. 2012; 7(8): 1-5.
78. Vassallo M, Mercié P, Cottalorda J, Ticchioni M, Dellamonica P. The role of lipopolysaccharide as a marker of immune activation in HIV-1 infected patients: a systematic literature review. *Virology Journal*. 2012; 9:174.
79. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine*. 2006; 12(12): 1365-1371.
80. Sandler NG, Wand H, Roque A et al. Plasma Levels of Soluble CD14 Independently Predict Mortality in HIV Infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011; 1-11.
81. Kitchens RL, Thompson PA. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cells interactions. *J End Res*. 2005; 11(4):225-229.
82. Cerf-Bensussan N, and D. Guy-Grand. Intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol. Clin. North Am*. 1991; 20:549–576.
83. Smit-McBride Z, Mattapallil JJ, McChesney M, Ferrick D, Dandekar S. Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4+ T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes. *J. Virol*. 1998; 72:6646–6656.
84. Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation and HIV disease. *Trends Microbiol*. 2013; 21(1): 6–13.
85. Steele AK, Lee EJ, Vestal B, et al. Contribution of Intestinal Barrier Damage, Microbial Translocation and HIV-1 Infection Status to an Inflammaging Signature. *PLoS ONE*. 2014; 9(5): 1-13.
86. Kristoff J, Haret-Richter G, Ma D, et al. Early microbial translocation blockade reduces SIV-mediated inflammation and viral replication. *J Clin Invest*. 2014; 124(6):2802–2806.
87. Estes JD, Harris LD, Klatt NK, et al. Damaged Intestinal Epithelial Integrity Linked to Microbial Translocation in Pathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infections. *PLoS Pathog*. 2010; 6(8):1-15.
88. Marchetti G, Lepri-Cozzi A. et al. Immune activation and microbial translocation in liver disease progression in HIV/hepatitis co-infected patients: results from the Icona Foundation study. *BMC Infectious Diseases* 2014,14:79.
89. Santos –Oliveira JR, Regis EG, et al. Microbial Translocation Induces an Intense Proinflammatory Response in Patients With Visceral Leishmaniasis and HIV Type 1 Coinfection. *The Journal of infectious Diseases*. 2013; 208:57–66.
90. Toossi Z, Funderburg NT, ET AL. Systemic Immune Activation and Microbial Translocation in Dual HIV/Tuberculosis-Infected Subjects. *The Journal of infectious Diseases*. 2013; 207:1841–9.
91. Volpe GE, Ward H et al. Associations of Cocaine Use and HIV Infection with the Intestinal Microbiota, Microbial Translocation, and Inflammation. *Journal of studies on alcohol and drugs*. 2014; 347-357.
92. Brenchley JM, Price DA, Douek DC HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature Immunology*. 2006; 7: 235–239.
93. Ancuta P, Kamat A, Kunstman K, Kim E, Autissier P, Wurcel A, et al. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PLoS ONE* 2008;3: e2516.
94. Sun J, Zheng J, Zhao M, Lee S, Goldstein H. Increased in vivo activation of microglia and astrocytes in the brains of mice transgenic for an infectious R5 human immunodeficiency virus type 1 provirus and for CD4-

- specific expression of human cyclin T1 in response to stimulation by lipopolysaccharides. *J Virol* 2008; 82:5562–5572.
95. Funderburg N, Mayne E, Sieg S, Asaad R, Jiang W, Kalinowska M, et al. Increased tissue factor expression on circulating monocytes in chronic HIV infection: relationship to in vivo coagulation and immune activation. *Am Soc Hematology*. 2010; 115(2):161-167.
 96. Mullerat J, Perrett C, Deroide F, Winslet M, Bofill M, Poulterers L. The role of macrophages in angiogenesis. Comparison between HIV+ and HIV- populations with anal dysplasia and anal cancer. *Anticancer Res* 2005.
 97. Wang H, Kotler DP. HIV enteropathy and aging: gastrointestinal immunity, mucosal epithelial barrier, and microbial translocation. *Curr Opin HIV AIDS*. 2014; 9:309–316.
 98. Favre D, Lederer S, Kanwar B, et al. Critical Loss of the Balance between Th17 and T Regulatory Cell Populations in Pathogenic SIV Infection. *PlosPathogens* 2009; 2(5): e1000295. 2A:693-9.
 99. Abad- Fernández M, Gutiérrez C, Madrid N et al. Expression of gut-homing $\beta 7$ receptor on T cells: surrogate marker for microbial translocation in suppressed HIV-1-infected patients? *HIV Medicine*. 2014; 1-9.
 100. Cohen O, Weissman D, Fauci AS. The Immunopathogenesis of HIV Infection. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. Fourth Edition ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1999; p.1455-509.
 101. Munoz-Fernandez MA, Navarro J, Garcia A et al. Replication of human immunodeficiency virus-1 in primary human T cells is dependent on the autocrine secretion of tumor necrosis factor through the control of nuclear factor-kappa B activation. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 838-45.
 102. Poccia F, Boullier S, Lecoeur H, Cochet M, Poquet Y, Collizzi V, et al. Peripheral V gamma 9/V delta 2 T cell deletion and anergy to nonpeptidic mycobacterial antigens in asymptomatic HIV-1-infected persons. *J Immunol*. 1996; 157(1): 449-61.
 103. Haynes BF, Hale LP, Weinhold KJ, Patel DD, Liao HX, Bressler PB, et al. Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection. *J Clin Invest*. 1999; 103(4): 453-60.
 104. Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol*. 2004; 5:133–139.
 105. Wallet MA, Rodriguez KA, Yin L, et al. Microbial translocation induces persistent macrophage activation unrelated to HIV-1 levels or T cell activation following therapy. *AIDS*. 2010; 24(9): 1281–1290.
 106. Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Cortot A, Colombel JF. Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1995; 108:1396–1404.
 107. Souza DG, Vieira AT, Soares AC et al. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. *J Immunol*. 2004; 173: 4137–46.
 108. Cicalese L, Billiar TR, Rao AS, Bauer AJ. Interaction between ischemia/reperfusion-induced leukocyte emigration and translocating bacterial enterotoxins on enteric muscle function. *Transplant. Proc*. 1997; 29: 1815.
 109. Sorkine P, Szold O, Halpern P et al. Gut decontamination reduces bowel ischemia-induced lung injury in rats. *Chest* 1997; 112: 491.
 110. Lemaire LCJM, van Lanschot JJB, Stoutenbeek CP et al. Bacterial translocation in multiple organ failure: cause or phenomenon still unproven. *Br. J. Surg*. 1997; 84: 1340–50.
 111. Steinberg SM. Bacterial translocation: what it is and what it is not. *Am. J. Surg*. 2003; 186: 301–5.

112. Yeh DC, Wu CC, Ho WM et al. Bacterial translocation after cirrhotic liver resection: a clinical investigation of 181 patients. *J. Surg. Res.* 2003; 111: 209–14.
113. Deitch EA. Multiple organ failure. *Ann. Surg.* 1992; 216: 117–34.
114. Cooke KR, Olkiewicz K, Erickson N, Ferrara J. The role of endotoxin and the innate immune response in the pathophysiology of acute graft versus host disease. *J. Endotoxin Res.* 2002; 8: 441–448.
115. Mush D, Jashinski H, Lack N, Hummel S et al. Risk stratification in women with gestational diabetes according to and beyond current WHO criteria. *Horm Met Res* 2015; in press.
116. Bergenhenegouwen L, Ensing S, Ravelli A, JelleSchaaf J et al. Subsequent pregnancy outcome after preterm breech delivery, a population based cohort study. *J Mat Neo Med* 2015; in press.
117. Emanuel M, Butt S. Frequency and factors leading to recurrent pre-eclampsia. *J Park Med Assoc.* 2015; 65(11):1173-1177.
118. Kourtis AT, Ibegbu CC, Wiener J, et al. Role of intestinal mucosal integrity in HIV transmission to infants through breast-feeding: The BAN study. *The Journal of Infectious Diseases.* 2013; 208:653–61.
119. Tan Q, Xu H, Xu F, et al. Survival, distribution, and translocation of *Enterococcus faecalis* and implications for pregnant mice. *FEMS Microbiol.* 2013; 349 32–39.
120. Tsuda Y, Shigematsu K, Kobayashi M, Herndon DN & Suzuki F. Role of polymorphonuclear neutrophils on infectious complications stemming from *Enterococcus faecalis* oral infection in thermally injured mice. *J Immunol.* 2008; 180: 4133–4138.
121. López M, Figueras F, Coll O, Goncé A et al. Inflammatory markers related to microbial translocation among HIV-infected pregnant women: a risk factor of preterm delivery. *J. Inf Diseases* 2015;1-9.
122. Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, et al. Evidence of participation of soluble CD14 in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity and intra-amniotic inflammation in term and preterm gestations. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2002; 12:304–12.
123. Gardella C, Hitti J, Martin TR, Ruzinski JT, Eschenbach D. Amniotic fluid lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 as mediators of the inflammatory response in preterm labor. *Am J ObstetGynecol*2001; 184:1241–8.
124. Martinez-Lopez DG, Funderburg NT, Cerissi A, et al. Lipopolysaccharide and soluble CD14 in cord blood plasma are associated with prematurity and chorioamnionitis. *Pediatr Res* 2014; 75:67–74.

Capítulo 22



II. CAPÍTULO 2

CD14 solúvel como marcador de translocação microbiana e citocinas em gestantes infectadas pelo HIV

Manfio VM¹, Tasca KI¹, Gatto M¹, de Assis Gollim M², Souza LR¹

¹Departamento de Doenças Tropicais – Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP- São Paulo

²Laboratório de citometria de fluxo do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP- São Paulo

Introdução

Atualmente, cerca de 70% das grávidas que vivem com HIV no mundo recebem tratamento antirretroviral (TARV), levando à significativa redução no risco de transmissão vertical, que é de, aproximadamente, 60%.¹ Como o vírus infecta várias células do sistema de defesa, especialmente os linfócitos T CD4+, a progressão para a aids é marcada por um comprometimento imunológico grave, que leva à imunossupressão.²

O tecido linfoide associado à mucosa intestinal (GALT) abriga a maioria dos linfócitos T CD4+ do organismo, característica que o torna extremamente susceptível à infecção e replicação do HIV.^{3,4} O GALT contém abundância de células epiteliais, imunoglobulinas e outras células do sistema imunológico, que atuam como barreira para o conteúdo luminal, tais como, bactérias e endotoxinas. Entretanto, na infecção pelo HIV, a depleção intensa de linfócitos T promove alteração na homeostasia deste microambiente. Em consequência, a barreira epitelial danifica-se e produtos microbianos migram da luz intestinal para a corrente sanguínea.⁵⁻⁷

Estes produtos microbianos podem levar à expressão acentuada de marcadores de ativação, inflamação e coagulação.^{6,8,9} Alguns estudos na infecção pelo vírus da imunodeficiência símia demonstraram que, o aumento da translocação microbiana estava diretamente relacionado com o risco de doenças cardiovasculares, pois foram observados altos níveis de lipopolissacarídeo (LPS) e D-dímeros, em macacos infectados e que desenvolveram essas comorbidades.^{9,10} Volpe et al.¹¹ observaram em usuários de drogas infectados pelo HIV, níveis elevados de CD14 solúvel (sCD14), fator de necrose tumoral α

(TNF- α), e interferon γ (IFN- γ) e, níveis séricos diminuídos de anticorpos do *core* da endotoxina (EndoCAb), como resultados da translocação microbiana. Além disso, acredita-se que o aumento nos níveis de LPS e sCD14 em infectados, contribui com o aparecimento de algumas comorbidades relacionadas ou não à aids, tais como, demência, disfunções endoteliais, maior risco de doenças cardiovasculares, trombofilia e doenças ósseas.¹¹⁻¹⁶

O CD14 é um receptor multifuncional, exposto na superfície de monócitos e macrófagos, induzido pelo aumento nos níveis de LPS.¹⁷ Quando o LPS liga-se ao CD14 presente na membrana, ou em sua forma solúvel, ocorre ativação do fator de transcrição NF- κ B com produção intensa de citocinas inflamatórias.^{18,19} Além do aumento destes biomarcadores, estudos de Vesterbacka et al.²⁰ e Sandler et al.²¹ observaram, em indivíduos infectados pelo HIV, níveis elevados de proteínas de ligação de ácidos graxos intestinais (iFABP), liberadas a partir da morte dos enterócitos, o que também estaria associado à translocação microbiana.

Dados recentes de López et al.²² mostraram o envolvimento da translocação microbiana, na ocorrência de partos prematuros em gestantes infectadas pelo HIV. Os autores observaram também que, no primeiro trimestre da gravidez, níveis aumentados de sCD14 tiveram relação com partos prematuros e abortos espontâneos, mesmo em gestantes sob TARV durante a gravidez. Porém, quando os autores avaliaram estes biomarcadores no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos das mães infectadas e não infectadas, não observaram diferenças.

Embora venham sendo estudadas estratégias com a finalidade de prevenir o dano do GALT, são escassos os ensaios clínicos que indicam administração de antibióticos, drogas anti-inflamatórias ou suplementação simbiótica-probiótica associadas à TARV, na intenção de prevenir a translocação microbiana.^{5,21} Além disso, a avaliação da translocação tem sido pouco investigada em gestantes, especialmente, naquelas infectadas pelo HIV, sendo que, a abordagem das complicações gestacionais também são escassas, principalmente quanto à possível relação delas com mecanismos e componentes da ativação imune e inflamação crônica, processos comumente observados na população infectada pelo vírus.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o marcador plasmático, sCD14, como preditor de translocação microbiana, bem como, citocinas do perfil inflamatório em gestantes e não gestantes, infectadas ou não pelo HIV.

Métodos

Desenho do estudo: Foram estudadas 30 mulheres, divididas em três grupos (G), assim constituídos: (G1) - 12 gestantes infectadas pelo HIV, (G2) - 10 gestantes não infectadas pelo HIV e (G3) - 08 mulheres não gestantes e infectadas pelo HIV.

O critério de inclusão para os dois primeiros grupos foi ser gestante. Para as mulheres que constituíram G1 e G3, houve um critério adicional, ter diagnóstico confirmado de infecção pelo HIV. Para as gestantes que constituíram G2, a inclusão no estudo foi de forma pareada, quanto à idade gestacional do G1 e sem diagnóstico de infecção pelo HIV, o que foi confirmado pela consulta dos resultados de exames sorológicos realizados durante o pré-natal. Para o G3 foram incluídas mulheres infectadas pelo HIV e não gestantes, com idades dentro da faixa reprodutiva. Foram excluídas as mulheres com diagnóstico de câncer, de doenças autoimunes, transplantadas de órgãos, imunossuprimidas e em uso de corticoides.

O período de estudo foi de novembro de 2014 a março de 2015. Todas as participantes pertencentes ao G1 e G3 eram acompanhadas no Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAEI-DAM), do Complexo “FMB-UNESP”. As participantes do G2 faziam pré-natal no ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das clínicas da FMB-UNESP.

A coleta dos dados sócio-demográficos foi realizada pela própria pesquisadora por meio de entrevista utilizando ficha padronizada e previamente testada, contendo informações sobre idade no momento da inclusão no estudo, idade gestacional, número de gestações prévias, tempo de infecção pelo HIV, uso e duração de TARV. Dados de contagens de T CD4+, *nadir* de T CD4+, carga viral plasmática (CV) do HIV no momento da inclusão no estudo foram coletados dos prontuários médicos.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMB–UNESP (nº 855.423/2014) e todas as voluntárias concordaram em participar, com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Preparo das amostras: foram coletados 15 mL de sangue de cada participante em dois tubos com anticoagulante (EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético, da marca BD-*Becton, Dickinson and Company*®), destinados à realização das dosagens de citocinas e do marcador de translocação microbiana, sCD14. Após a coleta, o material foi refrigerado e encaminhado imediatamente para o Laboratório Experimental de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, da

FMB–UNESP, onde as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. O plasma foi aliquoteado e estocado em *freezer* -80°C, até a realização dos testes laboratoriais.

Dosagem das Citocinas- IL-17, IL-10, IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12p70: foram realizadas pela técnica de citometria de fluxo (CBA–*cytometric bead array*), utilizando o *Human Inflammation CBA Kit* (BD, 551811) de acordo com as indicações do fabricante. A escolha da técnica se deveu à pequena quantidade de sangue necessária para sua realização, quando comparadas ao ensaio imunoenzimático (ELISA) convencional. O princípio da técnica de CBA baseia-se no uso de até seis populações de microesferas com diferentes intensidades de fluorescência e, cada população foi sensibilizada com anticorpos de captura específicos para as citocinas de interesse. A intensidade de fluorescência, a partir do citômetro de fluxo, indicou a quantidade de citocinas presente nas amostras. Julgou-se necessário fazer, em conjunto com as amostras, padrões contendo concentrações conhecidas de cada citocina, para a curva e leitura com os limites de detecção respectivos. Os resultados foram obtidos em pg/mL.

Dosagem do sCD14: foi dosado no plasma pelo método ELISA, que se conduziu de acordo com as especificações do fabricante, utilizando o kit comercial *Human sCD14 (R&D Quantikine® ELISA DC140)*. A absorbância foi lida no espectrofotômetro, em comprimento de onda de 450 nm e, à partir das densidades óticas da amostra e curva, foram calculados os níveis de sCD14 em pg/mL. O limite de detecção foi 125 pg/ml.

Análise estatística dos resultados: foi executada respeitando os pressupostos determinados pelos resultados, características e comportamento das variáveis do estudo. O banco de dados foi construído no programa *Microsoft Office Excel 2010*. Foram utilizados para as variáveis não paramétricas, Distribuição Gamma e, para as paramétricas, Anova seguido de Tukey-Kramer. As diferenças significativas foram consideradas quando os valores de *p* foram menores ou iguais a 0,05. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *SAS for Windows*, versão 9.2, com o auxílio dos profissionais do escritório de apoio à pesquisa da instituição (EAP/FMB).

Resultados

Para compor o G1, gestantes infectadas pelo HIV, foram incluídas tanto as mulheres que já estavam sob TARV há mais tempo, quanto as que a introduziram durante o pré-natal, quando três delas receberam o diagnóstico da infecção. O grupo com menor idade foi o G1, $28\pm 5,5$ anos, enquanto a maior foi observada no G3, 37 ± 6 anos, apresentando diferença entre eles ($p < 0,0009$). A CV das pacientes de G1 estava indetectável em sete delas, sendo que a média, quando detectada, foi de 25.670 ± 23.500 cópias/mL e, apenas, uma voluntária de G3 encontrava-se com CV detectável, 18.392 cópias/mL. Todas as mulheres infectadas estavam sob TARV no momento da inclusão do estudo, e o tempo de tratamento para G1 e G3 foi de 33 ± 40 e 81 ± 56 meses, respectivamente. (Tabela 1)

Tabela 1. Caracterizações clínico-demográficas e laboratoriais das 30 mulheres estudadas.

Variáveis	G1 n=12	G2 n= 10	G3 n=8	Valor de p
Idade (\bar{x} , anos)	$28\pm 5,5^{*3}$	$31\pm 2,5$	$37\pm 5,8$	<0,05
Idade gestacional (\bar{x} , semanas)	$25\pm 7,9$	$24\pm 9,5$	-	NS
1º trimestre (n)	1	2	-	NS
2º trimestre (n)	4	2	-	NS
3º trimestre (n)	7	6	-	NS
Número de gestações (\bar{x})	$2\pm 1,5$	$1\pm 0,4$	-	NS
Parto prematuro (n)	Nenhum	Nenhum	-	NS
T CD4+ e CV (\bar{x})				
Células T CD4+/mm ³	601 ± 340	-	583 ± 173	NS
Nadir de T CD4+/mm ³	$441\pm 258^{*3}$	-	196 ± 138	<0,05
CV indetectável (n)	7	-	7	NS
CV detectável (n)	5	-	1	NS
Diagnóstico e TARV				
Tempo de diagnóstico (\bar{x} , meses)	63 ± 71	-	114 ± 56	NS
IP (n)	12	-	5	-
ITRNN (n)	-	-	3	-
Tempo de TARV (\bar{x} , meses)	33 ± 40	-	84 ± 56	NS

(G1) 12 gestantes infectadas pelo HIV; (G2) 10 gestantes não infectadas, (G3) 8 mulheres infectadas pelo HIV não grávidas; T CD4+: contagem de linfócitos TCD4+, CV: carga viral; TARV: terapia antirretroviral; IP: inibidor da protease; ITRNN: inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos; n: quantidade de pacientes em números. \bar{x} : média. NS: não significativo; * significância entre o/os grupo (os). Teste estatístico: Anova.

As 30 mulheres tiveram a avaliação da translocação microbiana e do perfil inflamatório. As dosagens plasmáticas de sCD14 mostraram-se maiores em G3 (11515 ± 10746) em comparação aos demais grupos G1 (6727 ± 2030) e G2 (5456 ± 769), com

diferença estatística entre o G1 e G3 ($p < 0,02$), e G2 e G3 ($p = 0,002$), conforme mostra a Gráfico 1. A IL-17 foi detectada somente em uma participante, que era pertencente ao G1. Os níveis de IL-10, IL-1 β , TNF- α , IL-12p70 mostraram-se indetectáveis em todas as participantes do estudo (dados não demonstrados). Não se observou diferença estatística para IL-6 e IL-8, Gráfico 2.

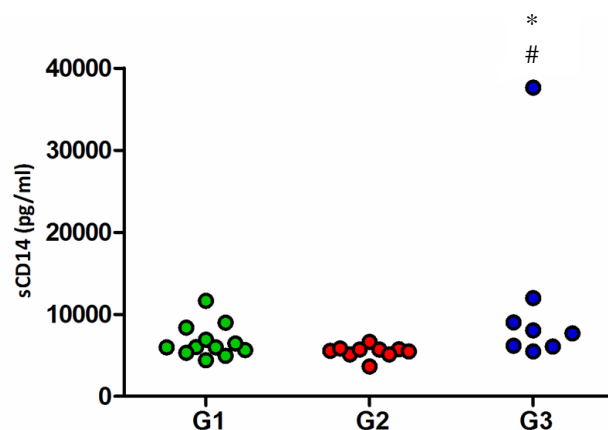


Gráfico 1. Níveis plasmáticos de sCD14 das 30 mulheres estudadas.

(G1) 12 gestantes infectadas pelo HIV, (G2) 10 gestantes não infectadas, (G3) 8 mulheres infectadas pelo HIV não grávidas. sCD14: CD14 solúvel. * G1 e G3 ($p < 0,02$); e # G2 e G3 ($p = 0,002$). Teste Estatístico: Distribuição Gamma.

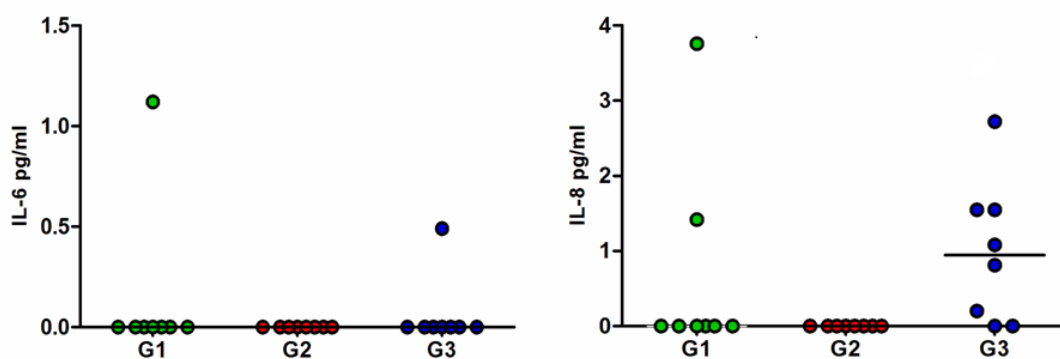


Gráfico 2. Níveis plasmáticos de IL-6 e IL-8 das 30 mulheres estudadas.

(G1) 12 gestantes infectadas pelo HIV, (G2) 1 gestantes não infectadas, (G3) 8 mulheres infectadas pelo HIV não grávidas. Teste estatístico: Distribuição Gamma.

Discussão

A translocação microbiana está associada com a persistente ativação imune apresentada pelas pessoas infectadas pelo HIV, mesmo naquelas sob TARV.²³ Além disso, essa ativação pode ser reflexo, também, da replicação viral residual em células latentes e outros reservatórios do organismo.²⁴ Este processo leva a um estado de inflamação crônica sistêmica, o que contribui com a evolução mais rápida da doença e com o desenvolvimento de comorbidades não associadas à aids,²⁵⁻²⁷ também, muito comuns nesta população.

Poucos trabalhos avaliam o envolvimento da translocação microbiana na gestação. No presente estudo, que avaliou um destes marcadores, foi possível observar aumento nos níveis de sCD14 em todos os grupos avaliados. No entanto, este aumento foi mais evidente no grupo de mulheres não gestantes, o que poderia sugerir perfil protetor nas gestantes, justificado pelas alterações imunológicas decorrentes da gestação.^{28,29}

Lópes et al.,²² em publicação recente, também relataram aumento nos níveis de sCD14 em grávidas infectadas pelo HIV. Estes autores mostraram, inclusive, que este aumento poderia estar relacionado às causas de parto prematuro, apesar de não ter havido complicações para os recém-nascidos. No presente estudo, não foi avaliada diferença entre os trimestres gestacionais, porém, a média da idade gestacional foi de 25 semanas sendo que, não houve ocorrência de partos prematuros nas gestantes infectadas. Estes mesmo autores observaram maiores níveis de sCD14 no primeiro trimestre de gestação sugerindo que tal marcador, neste período, poderia ser um preditor do parto prematuro. Este aspecto foi observado, também, por outros autores^{30,31} que relataram aumento nos níveis de proteína ligante de lipopolissacarídeo (LBP) e sCD14 no líquido amniótico de mulheres em trabalho de parto prematuro.

Kourtis et al.³² em estudo com filhos infectados e não infectados pelo HIV, de mães portadoras do vírus, avaliaram a amamentação e o papel da translocação microbiana na aquisição do HIV e observaram maiores níveis de LPS e sCD14 nas crianças infectadas, comparadas às não-infectadas. Entre os marcadores avaliados, o sCD14 foi o preditor de aquisição do HIV via amamentação, podendo sugerir que a permeabilidade intestinal da criança pode favorecer a infecção. Neste mesmo trabalho, maior translocação esteve relacionada, também, ao desmame e à profilaxia com antibióticos, que poderia alterar sua flora e homeostase intestinal. Isto levou ao menor crescimento da criança nos meses analisados, o que reforça a necessidade de outras intervenções durante a amamentação, além

do uso da terapia, tais como uso de probióticos, vacina contra rotavírus, entre outras precauções que pudessem estabilizar tal desequilíbrio.

Está bem estabelecido que a gravidez não acelera a progressão da doença do HIV ou aumenta o risco de mortalidade, porém, apresenta relação com a transmissão perinatal do vírus.³³⁻³⁷ Em um estudo de metanálise observou-se que, entre as mulheres infectadas pelo HIV, as gestantes são as mais conscientes em relação à adesão à terapia e acompanhamento clínico, o que reflete em bom prognóstico, tanto da gravidez quanto da própria infecção.³³ No entanto, a gestação, por si só, caracteriza-se por diversas alterações e está associada com aumento de alguns marcadores inflamatórios.^{30,34,35}

Do ponto de vista imunológico, a manutenção da gestação depende do equilíbrio entre as citocinas, que caracterizam os perfis de resposta imune e se modificam ao longo do período gestacional.³⁸ No primeiro trimestre há resposta imune de perfil Th1, visto que o ambiente torna-se inflamatório para permitir o adequado reparo do epitélio uterino, que sofre alterações devido à implantação do feto. No segundo trimestre, o perfil imunológico passa a ser o Th2, com aumento de citocinas anti-inflamatórias, responsáveis pela manutenção da gestação. No terceiro trimestre e no momento do parto, o perfil Th1 volta a ser predominante na circulação, no tecido placentário e no líquido amniótico.³⁹⁻⁴⁵ Trabalhos recentes vêm sugerindo a participação de outros tipos celulares, as Th17 e T regulatórias (Treg) que participam na equilíbrio das resposta imune durante a gestação.^{45,46}

Richardson et al.²⁹ verificaram maior frequência de subpopulações de Treg em gestantes infectadas pelo HIV no início da gestação comparado às não infectadas, porém, quando avaliada a presença destas células ao fim da gestação, seus níveis estavam diminuídos em relação às não infectadas. Desse modo, apesar desta subpopulação celular não ter sido avaliada no presente estudo, sua participação poderia sugerir dinâmica diferente durante a gravidez em infectadas e não infectadas pelo vírus, e estar relacionada à diminuição da ativação imune nas grávidas infectadas pelo HIV, resultando em melhor estabilidade imunológica.

O perfil de células Th17, predominante no trato gastrointestinal, participa da defesa contra infecções bacterianas, fúngicas e parasitárias, além de estar envolvida na regeneração epitelial e no recrutamento de neutrófilos e células mielóides para o GALT.⁴⁷ Além disso, a perda da população de Th17 e Treg esteve associada à maior ativação imune e menor restauração de T CD4+, apesar do controle virológico estabelecido pelo uso da terapia, sendo

que, tal depleção contribui com o ambiente inflamatório local, que leva ao aumento nos danos epiteliais e favorecem a translocação microbiana.^{5,48}

Os níveis das citocinas aqui estudadas foram extremamente baixos, sendo que várias amostras tiveram valores indetectáveis pela técnica utilizada. Este dado está de acordo com o de Fahley et al.⁴⁹ que, em indivíduos infectados pelo HIV, também, encontraram concentrações mínimas detectadas no plasma, considerando valor “zero”. Por outro lado, outros autores observaram altos níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias em gestantes infectadas pelo HIV e concluíram que a gestação contribui para maior ativação imune nestas mulheres, principalmente em relação às células T CD8+^{23,30,50}.

Apesar da alta frequência de indetectabilidade da IL-17 no presente estudo, apenas em uma paciente dos grupos de gestantes, detectou-se esta citocina e, justamente esta, apresentava a maior CV dentre as gestantes. Isso poderia indicar associação entre CV e IL-17 sendo que, os níveis extremamente baixos desta citocina encontrados neste estudo poderiam ser justificados pelo controle da CV da maioria das pacientes. Nesta mesma linha, estudos relatam que, em pacientes infectados pelo HIV, apesar da supressão virológica pela TARV e níveis diminuídos de mediadores inflamatórios, não há o restabelecimento da população de Th17 no GALT, como os valores anteriores à infecção,⁵¹⁻⁵³ fator que pode contribuir com o aumento nos danos epiteliais.

Michelizi et al.⁵⁴ avaliaram os marcadores de translocação microbiana sCD14, IFABP e do perfil inflamatório, IL-6 e TNF- γ , em indivíduos infectados pelo HIV com colite ulcerativa e observaram que os baixos níveis obtidos destes marcadores indicaram que esta doença, associada à infecção pelo vírus, não piora o ocorrência de translocação microbiana e ativação imune nestes pacientes. Nenhuma significância foi encontrada para os níveis de IL-6 e IL-8 no presente estudo, dado que corresponde aos de Richardson et al.,²⁹ que relataram não haver diferença nos níveis de IL-6 entre gestantes infectadas e não infectadas pelo HIV, no primeiro e último trimestres gestacionais. Uzende et al.⁵⁵ observaram aumento de citocinas inflamatórias em mulheres com pré-eclâmpsia independente da infecção pelo HIV, sendo assim, sugeriram que IL-6 e TNF- α sejam mediadores responsáveis por esse quadro.

Quanto à IL-8, Richardson et al.²⁹ observaram níveis aumentados em gestantes infectadas pelo HIV, no qual os mais altos foram encontrados no início da gestação e os mais baixos ao seu término. Quando os autores compararam os níveis de IL-8 encontrados em gestantes não infectadas, observaram o oposto, ou seja, diminuídos no início e aumentados ao final da gestação, e concluíram que, altos níveis de citocinas inflamatórias na gestante

infectada pelo HIV podem contribuir para aumento da incidência de morbidade materno-fetal. Em outro estudo⁵⁶ observou-se baixos níveis de IL-8 em gestantes saudáveis entre sete e dez semanas de gestação, sugerindo que esta citocina não se relacionava com baixo peso ao nascimento de bebês nascidos na 39ª semana de gestação. No presente estudo, os baixos níveis de IL-8 são considerados esperados, afinal, como a média da idade gestacional foi de 25 semanas, as participantes estariam na fase em que há redução na atividade de perfil inflamatório.

Algumas limitações encontradas aqui requerem observações. Primeiramente, o pequeno tamanho amostral poderia comprometer a confiabilidade dos resultados. Além disso, trata-se de estudo transversal, que não permite, de fato, excluir a influência de algumas variáveis no desfecho, por exemplo, a interferência do tempo de infecção nas mulheres estudadas. Outro fator foi que se avaliou somente um marcador considerado indicador de ocorrência de translocação microbiana, o sCD14. Além disso, a técnica de detecção de citocinas utilizada foi pouco sensível no material estudado.

Por fim, concluiu-se que a translocação microbiana pode estar presente em mulheres grávidas, de acordo com os altos níveis do marcador sCD14 encontrados aqui, independentemente de serem ou não portadoras do HIV. No entanto, seus níveis foram ainda mais altos nas infectadas não gestantes, mostrando que, tanto as grávidas podem apresentar mecanismos protetores que dificultam a translocação, quanto que o uso de TARV por período superior a cinco anos não foi capaz de diminuir os níveis circulantes desse marcador. Portanto, outros biomarcadores que se associam com inflamação e translocação microbiana devem ser estudados em maior casuística de gestantes portadoras do HIV, na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos e possíveis intervenções profiláticas, que incluam administração de antibióticos, drogas anti-inflamatórias ou suplementação de probióticos associados à TARV, na intenção de melhorar a evolução da gestação e prognóstico da infecção pelo HIV.

Referências

1. UNAIDS. 15 Years, 15 Lessons of Hope from the Aids Response. Global Statistics; 2015.
2. Vaishnav YN, Wong-Staal F. The Biochemistry of Aids. *Annu RevBiochem.* 1991; 60: 577-630.
3. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006; 12(12): 1365-71.

4. McGowan IM, Elliott J et al. Increased HIV-1 mucosal replication is associated with generalized mucosal cytokine activation. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 2004.
5. Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation and HIV disease. *Trends Microbiol.* 2013; 21(1): 6–13.
6. Steele AK, Lee EJ, Vestal B, et al. Contribution of Intestinal Barrier Damage, Microbial Translocation and HIV-1 Infection Status to an Inflammaging Signature. *PLoS ONE.* 2014; 9(5): 1-13.
7. Kristoff J, Haret-Richter G, Ma D, et al. Early microbial translocation blockade reduces SIV-mediated inflammation and viral replication. *J Clin Invest.* 2014; 124(6):2802–2806.
8. Mutlu EA, Keshavarzian A, Losurdo J. A compositional look at the human gastrointestinal microbiome and immune activation parameters in HIV infected subjects. *PlosOne.* 2014; 10(2):1-18 e1003829.
9. Estes JD, Harris LD, Klatt NK, et al. Damaged Intestinal Epithelial Integrity Linked to Microbial Translocation in Pathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infections. *PLoS Pathog.* 2010; 6(8):1-15.
10. Smit-McBride Z, Mattapallil JJ, McChesney M, Ferrick D, Dandekar S. Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4+ T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes. *J. Virol.* 1998; 72:6646–6656.
11. Volpe GE, Ward H et al. Associations of Cocaine Use and HIV Infection with the Intestinal Microbiota, Microbial Translocation, and Inflammation. *Journal of studies on alcohol and drugs.* 2014; 347-357.
12. Brenchley JM, Price DA, Douek DC HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature Immunology.* 2006; 7: 235–239.
13. Ancuta P, Kamat A, Kunstman K, Kim E, Autissier P, Wurcel A, et al. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PLoS ONE* 2008;3: e2516.
14. Sun J, Zheng J, Zhao M, Lee S, Goldstein H. Increased in vivo activation of microglia and astrocytes in the brains of mice transgenic for an infectious R5 human immunodeficiency virus type 1 provirus and for CD4-specific expression of human cyclin T1 in response to stimulation by lipopolysaccharides. *J Virol* 2008; 82:5562–5572.
15. Funderburg N, Mayne E, Sieg S, Asaad R, Jiang W, Kalinowska M, et al. Increased tissue factor expression on circulating monocytes in chronic HIV infection: relationship to in vivo coagulation and immune activation. *Am Soc Hematology.* 2010; 115(2):161-167.
16. Kamat A, Ancuta P, Blumberg RS, Gabuzda D. Serological markers for inflammatory bowel disease in AIDS patients with evidence of microbial translocation. *PlosOne.* 2014; 5(11):1-8 e15533.
17. Schietroma M, Carlei F, Cappelli S, Amicucci G. 2006. Intestinal permeability and systemic endotoxemia after laparotomic or laparoscopic cholecystectomy. *Ann. Surg.* 2006; 243:359–363.
18. Blodget E, Shen C, Aldrovandi G, et al. Relationship between Microbial Translocation and Endothelial Function in HIV Infected Patients. *PLoS ONE.* 2012; 7(8): 1-5.
19. Vassallo M, Mercié P, Cottalorda J, Ticchioni M, Dellamonica P. The role of lipopolysaccharide as a marker of immune activation in HIV-1 infected patients: a systematic literature review. *Virology Journal.* 2012; 9:174.
20. Vesterbacka J, Barquash B, Haggblom A, Nowak P. Effects of Co-Trimoxazole on microbial translocation in HIV-1-infected patients initiating antiretroviral therapy. *AIDS research and human retroviruses.* 2015; 31: 1-7.
21. Sandler NG, Wand H, Roque A et al. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *The Journal of Infectious Diseases.* 2011; 1-11.

22. López M, Figueras F, Coll O, Goncé A et al. Inflammatory markers related to microbial translocation among HIV-infected pregnant women: a risk factor of preterm delivery. *J. Inf Diseases* 2015;1-9.
23. Hunt P, Rodriguez B, Shive C, Clagett B, Funderburg N, Natta MV et al. Gut epithelial barrier dysfunction, inflammation, and coagulation predict higher mortality during treated HIV/AIDS. *J Infect Dis.* 2014, 210(8):1228.
24. Yong MK, Elliott JH, Woolley IJ et al. Low CD4 count is associated with an increased risk of fragility fracture in HIV-infected patients. *J of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 2011 57(3), 205–210.
25. Lichtenstein KA, Armon C, Buchacz K, Chmiel JS, Buckner K, Tedaldi EM et al. Low CD4 T cell count is a risk factor for cardiovascular disease events in the HIV outpatient study. *ClinInf Diseases.* 2010 51(4), 435–447.
26. Tenorio A, Zheng E, Bosch R, Deeks SG, Rodriguez B, Krishnan S et al. Soluble markers of inflammation & coagulation, but not T-cell activation, predict non- AIDS-defining events during suppressive antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2014, 210(8):1248-59.
27. Triant, VA, Regan S, Lee H, Sax PE, Meigs JB. Association of immunologic and virologic factors with myocardial infarction rates in a US healthcare system. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes.*2013, 55(5): 615–619.
28. Mor G. Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127:121-8.
29. Richardson K, Weinberg A. Dynamics of regulatory T-cells during pregnancy: effect of HIV infection and correlations with other immune parameters. *Plos One* 2011; 6(11):1-8 e28172.
30. Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, et al. Evidence of participation of soluble CD14 in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity and intra-amniotic inflammation in term and preterm gestations. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2002; 12:304–12.
31. Gardella C, Hitti J, Martin TR, Ruzinski JT, Eschenbach D. Amniotic fluid lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 as mediators of the inflammatory response in preterm labor. *Am J ObstetGynecol*2001; 184:1241–8.
32. Kourtis AT, Ibegbu CC, Wiener J,et al. Role of intestinal mucosal integrity in HIV transmission to infants through breast-feeding: The BAN study. *The Journal of Infectious Diseases.* 2013; 208:653–61.
33. Calvert C, Ronsmans C. Pregnancy and HIV disease progression: a systematic review and meta-analysis. *Tropical Medicine and International Health* 2015; 20 (2): 122–145.
34. Vimercati A, Greco P Lopalco P et al. Immunological markers in HIV-infected pregnant and non-pregnant women. *Eur J Obs Gyn.* 2000; 37-41.
35. Paal LV, Shafer LA, et al. Effect of pregnancy on HIV disease progression and survival among women in rural Uganda. *Tropical Medicine and International Health.* 2007; 12 (8): 920–928.
36. Lathrop E, Jamieson D, Danel I. HIV and maternal mortality. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 2014; 1-3.
37. Chaouat G et al. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol* 2007; 29:95-113.
38. Makhseed M, Raghupathy R, El-Shazly S, Azizieh F, Al-Harmi JA, Al-Azemi MM. Pro-inflammatory maternal cytokine profile in preterm delivery. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49:308-18.

39. El-Shazly S, Makhseed M, Azizieh F, Raghupathy R. Increased expression of pro-inflammatory cytokines in placentas of women undergoing spontaneous preterm delivery or premature rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52:45-52.
40. Arntzen KJ, Lien E, Austgulen R. Maternal serum levels of interleukin-6 and clinical characteristics of normal delivery at term. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 76:55-60.
41. Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Hum Pathol* 2004; 35:47-54.
42. Von Dadelszen P, Watson RW, Noorwali F, Marshall JC, Parodo J, Farine D, et al. Maternal neutrophil apoptosis in normal pregnancy, preeclampsia, and normotensive intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:408-14.
43. Gustafsson C, Hummerdal P, Matthiesen L, Berg G, Ekerfelt C, Ernerudh J. Cytokine secretion in decidual mononuclear cells from term human pregnancy with or without labour: ELISPOT detection of IFN-gamma, IL-4, IL-10, TGF-beta and TNF-alpha. *J Reprod Immunol* 2006; 71:41-56.
44. Dudley DJ, Collmer D, Mitchell MD, Trautman MS. Inflammatory cytokine mRNA in human gestational tissues: implications for term and preterm labor. *J Soc Gynecol Investig* 1996; 3:328-35.
45. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63:601-10.
46. Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* 2010; 129:147-53.
47. Wang H, Kotler DP. HIV enteropathy and aging: gastrointestinal immunity, mucosal epithelial barrier, and microbial translocation. *Curr Opin HIV AIDS*. 2014; 9:309–316.
48. Favre D, Lederer S, Kanwar B, et al. Critical Loss of the Balance between Th17 and T Regulatory Cell Populations in Pathogenic SIV Infection. *PlosPathogens* 2009; 2(5): e1000295.
49. Fahey JL. Cytokines, Plasma Immune Activation Markers, and Clinically Relevant Surrogate Markers in Human Immunodeficiency Virus Infection. 1998;5(5):597–603.
50. Sachdeva N, Oshima K, Cotter A, Ashman M et al. Analysis of immunological markers associated with pregnancy and HIV-1 infection: relevance in perinatal transmission in HIV-1-infected pregnant women with low plasma viral load. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2008, 60: 264–273.
51. Gordon SN, Cervasi B, Odorizzi P, Silverman R, Aberra F, Ginsberg G, et al. (2010). Disruption of intestinal CD4⁺T cell homeostasis is a key marker of systemic CD4 T cell activation in HIV-infected individuals. *The Journal of Immunology*. 2010 185(9), 5169–5179.
52. Klatt NR, Brenchley JM. Th17 cell dynamics in HIV infection. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 2010,5(2): 135–140.
53. Mavigner M, Cazabat M, Dubois M, L'Faqihi FE, Requena M, Pasquier C, et al. Altered CD3 T cell homing to the gut impairs mucosal immune reconstitution in treated HIV-infected individuals. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012, 122(1), 62–69.
54. Michelini Z, Baroncelli S, Fantauzzi A, Pasquale C et al. Reduced plasma levels of sCD14 and I-FABP in HIV-infected patients with mesalazine-treated ulcerative colitis. *HIV Clin Trials*. 2016 Jan 7:1-6. [Epub ahead of print]

55. Uzende I, Amandi C, Awolola N, Makwe CC. The role of cytokines as inflammatory mediators in preeclampsia. *Pan African Medical Journal*. 2015; 20:219.
56. Georgiou HM, Thio YS, Russell C, Permezel M, Heng YJ, Lee S, Tong S. Association between maternal serum cytokine profiles at 7-10 weeks gestation and birthweight in small for gestational age infants. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 May;204(5):415.e1-415.e12.

Conclusão



III. CONCLUSÃO

Concluiu-se que a translocação microbiana pode estar presente em mulheres grávidas, pela dosagem do marcador sCD14, independentemente de serem ou não portadoras do HIV. No entanto, seus níveis foram mais altos nas infectadas não gestantes, mostrando que, tanto as grávidas podem apresentar mecanismos protetores que dificultam a translocação, quanto que o uso de TARV por período superior a cinco anos não foi capaz de diminuir os níveis circulantes desse marcador. Portanto, outros biomarcadores que se associam com inflamação e translocação microbiana devem ser estudados em maior casuística de gestantes portadoras do HIV, na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos e possíveis intervenções profiláticas, que incluam administração de antibióticos, drogas anti-inflamatórias ou suplementação de probióticos associados à TARV e na intenção de melhorar a evolução da gestação e o prognóstico da infecção pelo HIV.

Anexos



Soluble CD14 as a marker of microbial translocation and cytokines in HIV-infected pregnant women

Manfio VM¹, Tasca KI¹, Gatto M¹, de Assis Gollim M², Souza LR¹

¹Department of Tropical Diseases-Botucatu Medical School – UNESP- São Paulo

²Labotary flow Citometric of Botucatu Medical School- UNESP- São Paulo

Abstract

Introduction: Approximately 39.000.000 million people are living with HIV/AIDS worldwide and 757.042 in Brazil, reported from 1980 to June 2014, and it is estimated 12.000 cases of HIV-infected pregnant women annually. In HIV infection, besides the intense basal CD4+ T lymphocytes depletion, occurs impairment of various epithelial protective mechanisms, factors that contribute to intestinal barrier damages and result in microbial translocation, leading to increased systemic immune activation and chronic inflammation. However, microbial translocation in HIV infection has been poorly investigated during pregnancy, period which women are susceptible to bacterial infections. **Objective:** to study microbial translocation markers and the inflammatory status in HIV-infected pregnant women. **Patients and Methods:** We studied 30 volunteers, 12 HIV-infected pregnant women (G1), 10 HIV-uninfected pregnant women (G2) and 8 HIV-infected nonpregnant women (G3) in the same reproductive age than the other groups. Data were collected regarding age, gestational age (GA), plasma HIV viral load (VL), lymphocyte CD4+ T count and *nadir*. The microbial translocation was evaluated by measurement of plasmatic soluble CD14 (sCD14), performing the immunoenzymatic method (ELISA) and of inflammatory cytokines (IL-17, IL-10, IL-8, IL-1 β , IL-6, IL -12p70 and TNF- α) by flow cytometry (CBA). The parametric statistical analysis was performed using ANOVA followed by Tukey-Kramer post-hoc test, and for non-parametric, Gamma Distribution, considered significant when $p < 0.05$. **Results:** The mean of CD4+ T count, *nadir* and VL were, respectively for G1 601 cells/mm³, 442 cells/mm³ and 25670 copies/mL, and for G3, 583 cells/mm³, 196 cells/mm³ and 2299 copies/mL. The age was different between G1 and G3. Plasmatic levels of cytokines did not differ among groups. High levels of sCD14 were observed in all groups, with statistical difference between G1 (6727 \pm 2030) and G3 (11515 \pm 10746) [$p = 0.02$] and G2 (5256 \pm 769) and G3 [$p < 0.001$]. **Conclusion:** Although there was no difference in the inflammatory state between the groups, all pregnant women showed high levels of sCD14, those HIV-infected and uninfected, however, the HIV-infected non-pregnant women showed the highest values of this marker, suggesting that the pregnancy might influence on translocation mechanisms, changing the plasmatic sCD14 values.

Keywords: microbial translocation, pregnant women, HIV, sCD14, cytokines

Introduction

Currently, around 70% of pregnant women living with HIV worldwide receive combined antiretroviral therapy (cART), leading to significant reduction in the risk of vertical transmission, which represents approximately 60%.¹ As the virus infects various system cells defense, especially CD4+ T cells, the progression to AIDS is marked by a severe immunodeficiency, which leads to immunosuppression.²

The gut-associated lymphoid tissue (GALT) houses the majority of CD4+ T lymphocytes in the body, a feature which makes it extremely susceptible to infection and replication of HIV.^{3,4} GALT contains abundance of epithelial cells, immunoglobulins and other cells of the system immune, which act as a barrier to the luminal contents, such as bacteria and endotoxins. However, in HIV infection, severe depletion of T lymphocytes leads to changes in the homeostasis of the microenvironment. Consequently, the damage to the epithelial barrier and microbial products migrate from the intestinal lumen into the bloodstream.⁵⁻⁷

These microbial products can lead to higher expression of activation markers, inflammation and coagulation.^{6,8,9} Some studies about infection by simian immunodeficiency virus demonstrated that the increase of microbial translocation was directly related to the risk of cardiovascular diseases, it was observed high levels of lipopolysaccharide (LPS) and D-dimer in infected monkeys and developed such comorbidities.^{9,10} Volpe et al.¹¹ observed among HIV- infected drug users, high levels of soluble CD14 (sCD14), tumor necrosis α -factor (TNF- α), interferon γ (IFN- γ), and decreased levels of serum endotoxin core antibodies (EndoCAb), as a result of microbial translocation.

Moreover, it is believed that the increased levels of LPS and sCD14 in infected contributes to the appearance of some comorbidities related or unrelated to AIDS, such as dementia, endothelial dysfunction, increased risk of cardiovascular disease, thrombophilia and bone diseases.¹¹⁻¹⁶ CD14 is a multifunctional receptor exposed on the surface of monocytes and macrophages induced by increased levels of LPS.¹⁷ When the LPS binds to the CD14 present in the membrane or in soluble form, there is activation of the transcription factor NF- κ B with intense production of inflammatory cytokines.^{18,19} Besides the increase of those biomarkers, Vesterbacka et al.²⁰ and Sandler et al.²¹ observed in HIV-infected individuals, high levels of binding proteins of intestinal fatty acids (iFABP), released from the death of enterocytes, the that would also be associated with microbial translocation. López et al.²² showed the involvement of microbial translocation, in the occurrence of preterm births in

HIV-infected pregnant women. The authors also observed that in the first trimester of pregnancy, increased levels of sCD14 were related to preterm births and spontaneous abortions, even in pregnant women under cART during pregnancy. But when the authors assessed these biomarkers in the umbilical cord blood of infants of infected mothers and uninfected found no differences.

Although they are being studied strategies in order to prevent the damage of the GALT, there are few clinical trials that indicate antibiotics, anti-inflammatory drugs or symbiotic-probiotic supplementation associated with cART, intending to prevent microbial translocation.^{5,21} In addition, evaluation of translocation has been little investigated in pregnant women, especially those infected with HIV, and the approach of pregnancy complications are also scarce, especially regarding the possible relationship of these mechanisms and components of the immune activation and chronic inflammation, processes commonly observed in the population infected by the virus. The aim of this study was to assess plasma marker, sCD14, such as microbial translocation predictor as well, cytokines in the inflammatory profile in pregnant and non-pregnant, infected or not by HIV.

Methods

Study design: 30 women were evaluated, divided in the following groups (G): (G1) - 12 HIV-infected pregnant women, (G2) - 10 HIV-uninfected pregnant and (G3) - 08 HIV-infected non-pregnant women.

The inclusion criterion for the first two groups was to be pregnant. For women who constituted G1 and G3, there was an additional criterion, having been diagnosed with HIV infection. For pregnant women who constituted G2, the inclusion in the study was paired form, as to the gestational age of the G1 and undiagnosed HIV infection, which was confirmed by consulting the results of serological tests performed during prenatal care. For G3 women were included HIV-infected and non-pregnant women, aged within the breeding range. Women diagnosed with cancer were excluded, of autoimmune diseases, organ transplantation, immunosuppressed and use of corticosteroids.

The study period was from November 2014 to March 2015. All participants belong to G1 and G3 were attended in the Specialized Ambulatory Service of Infectious Diseases "Domingos Alves Meira" (SAEI-DAM), "FMB-UNESP" Complex. The participants of G2 did prenatal care in the clinic of Gynecology and Obstetrics of Clinical Hospital of the FMB-UNESP.

The collection of demographic data was performed by the researcher through interviews using a standardized form and previously tested, containing information on age at the time of enrollment, gestational age, number of previous pregnancies, time of HIV infection, use and duration of cART. CD4 + T counts data, *nadir* CD4 + T cells, plasma viral load (VL) of HIV at inclusion in the study were collected from medical records.

This project was approved by the Ethics Research Committee of FMB-UNESP (No. 855423/2014) and all volunteers agreed to participate, provided written informed consent.

Sample processing: were collected 15 ml of blood from each participant in two tubes with anticoagulant (EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid, the brand BD-Becton, Dickinson and Company®), intended to implement the cytokine dosages and marker microbial translocation, sCD14. After collection, the material was cooled and forwarded immediately to the Experimental Laboratory of Infectious and Parasitic Diseases, the FMB-UNESP, where the samples were centrifuged at 1500 rpm for 15 minutes at room temperature. The plasma was aliquoted and stored in a freezer at -80 ° C until the laboratory tests.

Cytokines assay: IL-17, IL-10, IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12p70: were performed by the technique of flow cytometry (CBA-citometric bead array) using Human Inflammation CBA kit (BD 551,811) according to the manufacturer's instructions. The choice of technique was due to the small amount of blood necessary for its realization compared to enzyme-linked immunosorbent assay conventional (ELISA) . The principle of CBA technique is based on the use of up to six populations of microspheres with different fluorescent intensities, and each population was sensitized with specific capture antibodies to cytokines of interest. The fluorescence intensity from the flow cytometer, the indicated amount of cytokines present in the samples. It was felt necessary to make, together with the samples, standards, containing known concentrations of each cytokine to the curve and reading with their respective detection limits. The results were obtained in pg/mL.

Measurement of sCD14: plasma was measured by ELISA, which was conducted according to the manufacturer's specifications, using the commercial kit Human sCD14 (R & D Quantikine® ELISA DC140). Absorbance was read in a spectrophotometer at wavelength of 450 nm, and from the optical densities of the sample and curve, the sCD14 levels were calculated as pg/mL. The detection limit was 125 pg / ml.

Statistical analysis: was performed respecting the presuppositions determined by the results, characteristics and behavior of the study database. The variables is built in Microsoft Office Excel 2010 program was used for non-parametric variables, Gamma distribution and for parametric, ANOVA followed by Tukey-Kramer. The differences were considered significant when p values of $\leq 0,05$. All analyzes were performed using SAS for Windows, version 9.2, with the help of back office professionals to research the institution (EAP / FMB).

Results

To compound the G1, HIV-infected pregnant women, both were included women who were already on cART for longer, as those introduced during the prenatal, when three of them received the diagnosis of infection. The group with the lowest age was the G1, 28 ± 5.5 years, while the highest was observed in G3, 37 ± 6 years, presenting difference between them ($p < 0.0009$). The VL of G1 patients had undetectable in seven of them, and the average, when detected, was 25670 ± 23500 copies/mL and only a voluntary G3 presented VL detectable, 18392 copies/mL. All infected women were on cART at the time of study entry, and the treatment time for G1 and G3 was 33 ± 40 and 81 ± 56 months, respectively. (Table 1)

Table 1. Demographic, clinical and laboratory characterization of the 30 women studied.

Variable	G1 n=12	G2 n= 10	G3 n=8	P value
age (\bar{x} , year)	28±5,5	31±2,5* ³	37±5,8	<0,05
gestacional age (\bar{x} , week)	25±7,9	24±9,5	-	NS
1° trimester (n)	1	2	-	NS
2° trimester (n)	4	2	-	NS
3° trimester (n)	7	6	-	NS
number of pregnancies (\bar{x})	2±1,5	1±0,4	-	NS
preterm birth (n)	None	None	-	NS
CD4+ T e VL (\bar{x})				
CD4+ T cells/mm ³	601±340	-	583±173	NS
CD4+ T nadir/mm ³	441±258* ³	-	196±138	<0,05
Undetectable VL (n)	7	-	7	NS
Detectable VL (n)	5	-	1	NS
Diagnosis e ART				
infection time (\bar{x} , month)	63±71	-	81±56	NS
PI(n)	12	-	5	-
NNRTI (n)	-	-	3	-
during cART (\bar{x} , month)	33±40	-	81±56	NS

G1: 12 HIV-infected pregnant women, G2:10 pregnant HIV-uninfected, G3: 8 nonpregnant HIV-seropositive women, VL: viral load, cART: antiretroviral therapy, PI: protease inhibitors, NNRTI: non-nucleoside analogue reverse transcriptase, NS: no significance, *significant difference between the specified groups, (\bar{x}): mean, n: numbers of patients. Test: ANOVA

The 30 women had the assessment of microbial translocation and inflammatory profile. Plasma levels of sCD14 were higher in G3 (11515±10746) compared to the other groups G1 (6727±2030) and G2 (5456±769), with statistical difference between G1 and G3 ($p < 0.02$) and G2 and G3 ($p = 0.002$), as shown in Figure 1. IL-17 was detected in only one participant who belongs to G1. The levels of IL-10, IL-1 β , TNF- α , IL-12p70 showed to be undetectable in all participants in the study (data not shown). No statistical difference was observed for IL-6 and IL-8, Figure 2.

Fig 1. Plasmatic levels of Scd14

(G1): 12 HIV-infected pregnant women, (G2):10 pregnant HIV-uninfected, (G3): 8 nonpregnant HIV-seropositive women. sCD14: soluble CD14. * G1 and G3 ($p < 0,02$); e # G2 and G3 ($p = 0,002$). Test: Gamma Distribution.

Fig 2. Plasmatic levels of IL-6 and IL-8

(G1): 12 HIV-infected pregnant women, (G2):10 pregnant HIV-uninfected, (G3): 8 nonpregnant HIV-seropositive women. Test: Gamma Distribution.

Discussion

Microbial translocation is associated with persistent immune activation presented by HIV-infected people, even those under cART.²³ In addition, this activation may reflect also the residual viral replication in latent cells and other reservoirs in the body.²⁴ This process leads to chronic systemic inflammation state, which contributes to more rapid progression of the disease and the development of comorbidities not related to AIDS,²⁵⁻²⁷ also very common in this population.

Few studies evaluate the involvement of microbial translocation during pregnancy. In the present study, which of these markers, we observed increase in sCD14 levels in all groups evaluated. However, this increase was more evident in the group of nonpregnant women, which might suggest protective profile in pregnant women, justified by immunological changes resulting from pregnancy.^{28,29} Lopez et al.,²² in a recent publication, also reported increased levels of sCD14 in HIV-infected pregnant. These authors showed even this increase could be related to the causes of preterm birth, although there have been no complications for newborns.

In this study, have not been evaluated differences between the groups trimesters, however, the mean gestational age was 25 weeks and that there was no occurrence of preterm births in pregnant women infected. These same authors found higher levels of sCD14 in the first trimester of pregnancy suggesting that this marker during this period could be a predictor of preterm delivery. This was also observed by other authors^{30,31} who reported increase in binding protein levels of lipopolysaccharide (LBP) and sCD14 in amniotic fluid from women in preterm labor.

Kourtis et al.³² in a study with HIV-infected and uninfected infants of infected mothers, evaluated breastfeeding and the role of microbial translocation in HIV acquisition and observed higher levels of LPS and sCD14 in infected infants compared to non-infected. Among the evaluated markers, the sCD14 was the predictor of acquiring HIV by breastfeeding, and may suggest that intestinal permeability infant may favor infection. In this same study, increased translocation was related also to weaning and antibiotic prophylaxis, which could alter its flora and intestinal homeostasis. This led to lower growth of the child in the months analyzed, which reinforces the need for other interventions during breastfeeding, and the use of therapy, such as probiotics, rotavirus vaccine, among other precautions that could stabilize such imbalance.

It is well established that pregnancy does not accelerate the progression of HIV disease

or increase the risk of mortality, however, is correlated with the perinatal transmission of the virus.³³⁻³⁷ In meta-analysis we found that, among women infected with HIV, pregnant women are more aware with regard to adherence to therapy and clinical follow-up, reflecting in good prognosis, both the pregnancy and the infection itself.³³ However, pregnancy, by itself, is characterized by various changes and is associated with an increase in some inflammatory markers.^{30,34,35} From the immunological point of view, the maintenance of pregnancy depends on the balance between cytokines that characterize the immune response profiles and change throughout the gestational period.³⁸ In the first trimester there Th1 immune response, as the environment becomes inflammatory to allow proper repair of the uterine epithelium, which undergoes changes due to the implementation of the fetus. In the second trimester, the immunological profile becomes the Th2, an increase of anti-inflammatory cytokines, responsible for maintaining pregnancy. The third trimester and at delivery, the Th1 profile is again prevalent in circulation, the placental tissue and amniotic fluid.³⁹⁻⁴⁵ Recent studies have suggested the involvement of other cell types, Th17 and regulatory T (Treg) involved in the balance of the immune response during pregnancy.^{45,46}

Richardson et al.²⁹ found higher frequency of subpopulations of Treg in HIV infected pregnant women in early pregnancy compared to uninfected, however, when the presence of these cells to late of pregnancy, their levels were diminished compared to uninfected. Thus, although this cell subpopulation was not assessed in this study, their participation might suggest different dynamic during pregnancy in infected and not infected by the virus, and be related to decreased immune activation in pregnant HIV-infected, resulting in improved stability immune.

Th17 cell profile, predominantly in the gastrointestinal tract, participates in defense against bacterial, fungal and parasitic infections, as well as being involved in epithelial regeneration and recruitment of neutrophils and myeloid cells to the GALT.⁴⁷ Furthermore, the loss of the population of Th17 and Treg been associated with increased immune activation and lower restoration of CD4 + T cells, despite the virological control established by use of the therapy, and such depletion contributes to the local inflammatory environment which leads to increase in epithelial damage and promote microbial translocation.^{5,48}

The levels of cytokines studied here were extremely low, with several samples had undetectable by the technique used. This is in accordance with the Fahley et al.⁴⁹ that in HIV-infected individuals also found minimal concentrations detected in plasma, considering "zero" value. Moreover, other authors have observed high plasma levels of inflammatory cytokines in

HIV-infected pregnant concluded that most contributes to immune activation in these women, especially in relation to CD8 + T cells.^{23,30,50} Despite the high frequency of detectability IL-17 in this study, only one patient in the pregnant group, and this cytokine was detected rightly this, had the highest VL among pregnant women. This could indicate association between VL and IL-17 and, the extremely low levels of this cytokine found in this study could be justified by controlling the VL of most patients. Along the same lines, studies report that in HIV-infected patients, despite virological suppression by cART and decreased levels of inflammatory mediators, there is the restoration of the population of Th17 in the GALT as the previous values to infection,⁵¹⁻⁵³ factor can contribute to the increase in epithelial damage.

Michelizi et al.⁵⁴ reviewed the markers of microbial translocation sCD14, IFABP and inflammatory profile, IL-6 and TNF- γ , in HIV-infected individuals with ulcerative colitis and found that low levels of these markers obtained indicated that this disease associated to infection by the virus, not worsening the occurrence of microbial translocation and immune activation in these patients. No significance was found for IL-6 and IL-8 levels in this study because it corresponds to Richardson et al.,²⁹ who reported no difference in IL-6 levels between infected pregnant and uninfected the first and last trimesters of pregnancy. Uzende et al.⁵⁵ observed increase of inflammatory cytokines in women with preeclampsia independent of HIV infection, therefore, suggested that IL-6 and TNF- α mediators are responsible for this frame.

Richardson et al.²⁹ observed increased IL-8 levels in HIV-infected pregnant women in which the highest were found in early pregnancy and lower to a close. When the authors compared the IL-8 levels found in uninfected pregnant women, observed the opposite, in other words, reduced at the beginning and increased at the end of gestation and conclude that high levels of inflammatory cytokines in HIV-infected pregnant may contribute to increased incidence of maternal-fetal morbidity. In another estudio⁵⁶ observed low IL-8 levels in healthy pregnant women between seven and ten weeks of pregnancy, suggesting that this cytokine not related to low birth weight of babies born at 39 weeks of gestation. In this study, low levels of IL-8 are considered expected ultimately to the mean gestational age was 25 weeks the participants were at the stage where there is a reduction in the inflammatory profile of activity.

Some limitations found here require observations. First, the small sample size could compromise the reliability of the results. In addition, this cross-sectional study, which does not, in fact, rule out the influence of some variables on the outcome, for example, interference from the time of infection in the women studied. Another factor was that we evaluated only a marker

considered indicator of the occurrence of microbial translocation, the sCD14. Furthermore, cytokine detection technique has low sensitivity in the material studied.

Finally, it was concluded that the microbial translocation may be present in pregnant women, according to the high levels of sCD14 marker found here, whether or not with HIV. However, their levels were even higher in non-infected pregnant women, showing that both pregnant may have protective mechanisms that hinder translocation, as the use of antiretroviral therapy for more than five years was not able to decrease circulating levels of this marker. Therefore, other biomarkers that are associated with inflammation and microbial translocation should be studied in larger samples of HIV-infected pregnant women in an attempt to elucidate the mechanisms involved and potential prophylactic interventions, including antibiotics, anti-inflammatory drugs or probiotics supplementation associated with cART, intending to improve the evolution of pregnancy and the prognosis of HIV infection.

References

1. UNAIDS. 15 Years, 15 Lessons of Hope from the Aids Response. Global Statistics; 2015.
2. Vaishnav YN, Wong-Staal F. The Biochemistry of Aids. *Annu RevBiochem.* 1991; 60: 577-630.
3. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006; 12(12): 1365-71.
4. McGowan IM, Elliott J et al. Increased HIV-1 mucosal replication is associated with generalized mucosal cytokine activation. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 2004.
5. Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation and HIV disease. *Trends Microbiol.* 2013; 21(1): 6–13.
6. Steele AK, Lee EJ, Vestal B, et al. Contribution of Intestinal Barrier Damage, Microbial Translocation and HIV-1 Infection Status to an Inflammaging Signature. *PLoS ONE.* 2014; 9(5): 1-13.
7. Kristoff J, Haret-Richter G, Ma D, et al. Early microbial translocation blockade reduces SIV-mediated inflammation and viral replication. *J Clin Invest.* 2014; 124(6):2802–2806.
8. Mutlu EA, Keshavarzian A, Losurdo J. A compositional look at the human gastrointestinal microbiome and immune activation parameters in HIV infected subjects. *PlosOne.* 2014; 10(2)1-18 e1003829.
9. Estes JD, Harris LD, Klatt NK, et al. Damaged Intestinal Epithelial Integrity Linked to Microbial Translocation in Pathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infections. *PLoS Pathog.* 2010; 6(8):1-15.
10. Smit-McBride Z, Mattapallil JJ, McChesney M, Ferrick D, Dandekar S. Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4+ T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes. *J. Virol.* 1998; 72:6646–6656.
11. Volpe GE, Ward H et al. Associations of Cocaine Use and HIV Infection with the Intestinal Microbiota, Microbial Translocation, and Inflammation. *Journal of studies on alcohol and drugs.* 2014; 347-357.
12. Brenchley JM, Price DA, Douek DC HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature Immunology.* 2006; 7: 235–239.

13. Ancuta P, Kamat A, Kunstman K, Kim E, Autissier P, Wurcel A, et al. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PLoS ONE* 2008;3: e2516.
14. Sun J, Zheng J, Zhao M, Lee S, Goldstein H. Increased in vivo activation of microglia and astrocytes in the brains of mice transgenic for an infectious R5 human immunodeficiency virus type 1 provirus and for CD4-specific expression of human cyclin T1 in response to stimulation by lipopolysaccharides. *J Virol* 2008; 82:5562–5572.
15. Funderburg N, Mayne E, Sieg S, Asaad R, Jiang W, Kalinowska M, et al. Increased tissue factor expression on circulating monocytes in chronic HIV infection: relationship to in vivo coagulation and immune activation. *Am Soc Hematology*. 2010; 115(2):161-167.
16. Kamat A, Ancuta P, Blumberg RS, Gabuzda D. Serological markers for inflammatory bowel disease in AIDS patients with evidence of microbial translocation. *PlosOne*. 2014; 5(11):1-8 e15533.
17. Schietroma M, Carlei F, Cappelli S, Amicucci G. 2006. Intestinal permeability and systemic endotoxemia after laparotomic or laparoscopic cholecystectomy. *Ann. Surg.* 2006; 243:359–363.
18. Blodget E, Shen C, Aldrovandi G, et al. Relationship between Microbial Translocation and Endothelial Function in HIV Infected Patients. *PLoS ONE*. 2012; 7(8): 1-5.
19. Vassallo M, Mercié P, Cottalorda J, Ticchioni M, Dellamonica P. The role of lipopolysaccharide as a marker of immune activation in HIV-1 infected patients: a systematic literature review. *Virology Journal*. 2012; 9:174.
20. Vesterbacka J, Barquash B, Haggblom A, Nowak P. Effects of Co-Trimoxazole on microbial translocation in HIV-1-infected patients initiating antiretroviral therapy. *AIDS research and human retroviruses*. 2015; 31: 1-7.
21. Sandler NG, Wand H, Roque A et al. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011; 1-11.
22. López M, Figueras F, Coll O, Goncá A et al. Inflammatory markers related to microbial translocation among HIV-infected pregnant women: a risk factor of preterm delivery. *J. Inf Diseases* 2015;1-9.
23. Hunt P, Rodriguez B, Shive C, Clagett B, Funderburg N, Natta MV et al. Gut epithelial barrier dysfunction, inflammation, and coagulation predict higher mortality during treated HIV/AIDS. *J Infect Dis*. 2014, 210(8):1228.
24. Yong MK, Elliott JH, Woolley IJ et al. Low CD4 count is associated with an increased risk of fragility fracture in HIV-infected patients. *J of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 2011 57(3), 205–210.
25. Lichtenstein KA, Armon C, Buchacz K, Chmiel JS, Buckner K, Tedaldi EM et al. Low CD4 T cell count is a risk factor for cardiovascular disease events in the HIV outpatient study. *Clin Inf Diseases*. 2010 51(4), 435–447.
26. Tenorio A, Zheng E, Bosch R, Deeks SG, Rodriguez B, Krishnan S et al. Soluble markers of inflammation & coagulation, but not T-cell activation, predict non- AIDS-defining events during suppressive antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2014, 210(8):1248-59.
27. Triant, VA, Regan S, Lee H, Sax PE, Meigs JB. Association of immunologic and virologic factors with myocardial infarction rates in a US healthcare system. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2013, 55(5): 615–619.
28. Mor G. Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127:121-8.

29. Richardson K, Weinberg A. Dynamics of regulatory T-cells during pregnancy: effect of HIV infection and correlations with other immune parameters. *Plos One* 2011; 6(11):1-8 e28172.
30. Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, et al. Evidence of participation of soluble CD14 in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity and intra-amniotic inflammation in term and preterm gestations. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2002; 12:304–12.
31. Gardella C, Hitti J, Martin TR, Ruzinski JT, Eschenbach D. Amniotic fluid lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 as mediators of the inflammatory response in preterm labor. *Am J ObstetGynecol*2001; 184:1241–8.
32. Kourtis AT, Ibegbu CC, Wiener J, et al. Role of intestinal mucosal integrity in HIV transmission to infants through breast-feeding: The BAN study. *The Journal of Infectious Diseases*. 2013; 208:653–61.
33. Calvert C, Ronsmans C. Pregnancy and HIV disease progression: a systematic review and meta-analysis. *Tropical Medicine and International Health* 2015; 20 (2): 122–145.
34. Vimercati A, Greco P, Lopalco P et al. Immunological markers in HIV-infected pregnant and non-pregnant women. *Eur J Obs Gyn*. 2000; 37-41.
35. Paal LV, Shafer LA, et al. Effect of pregnancy on HIV disease progression and survival among women in rural Uganda. *Tropical Medicine and International Health*. 2007; 12 (8): 920–928.
36. Lathrop E, Jamieson D, Danel I. HIV and maternal mortality. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2014; 1-3.
37. Chaouat G et al. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol* 2007; 29:95-113.
38. Makhseed M, Raghupathy R, El-Shazly S, Azizieh F, Al-Harmi JA, Al-Azemi MM. Pro-inflammatory maternal cytokine profile in preterm delivery. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49:308-18.
39. El-Shazly S, Makhseed M, Azizieh F, Raghupathy R. Increased expression of pro-inflammatory cytokines in placentas of women undergoing spontaneous preterm delivery or premature rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52:45-52.
40. Arntzen KJ, Lien E, Austgulen R. Maternal serum levels of interleukin-6 and clinical characteristics of normal delivery at term. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 76:55-60.
41. Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Hum Pathol* 2004; 35:47-54.
42. Von Dadelszen P, Watson RW, Noorwali F, Marshall JC, Parodo J, Farine D, et al. Maternal neutrophil apoptosis in normal pregnancy, preeclampsia, and normotensive intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:408-14.
43. Gustafsson C, Hummerdal P, Matthiesen L, Berg G, Ekerfelt C, Ernerudh J. Cytokine secretion in decidual mononuclear cells from term human pregnancy with or without labour: ELISPOT detection of IFN-gamma, IL-4, IL-10, TGF-beta and TNF-alpha. *J Reprod Immunol* 2006; 71:41-56.
44. Dudley DJ, Collmer D, Mitchell MD, Trautman MS. Inflammatory cytokine mRNA in human gestational tissues: implications for term and preterm labor. *J Soc Gynecol Investig* 1996; 3:328-35.
45. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63:601-10.

46. Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* 2010; 129:147-53.
47. Wang H, Kotler DP. HIV enteropathy and aging: gastrointestinal immunity, mucosal epithelial barrier, and microbial translocation. *Curr Opin HIV AIDS*. 2014; 9:309–316.
48. Favre D, Lederer S, Kanwar B, et al. Critical Loss of the Balance between Th17 and T Regulatory Cell Populations in Pathogenic SIV Infection. *PlosPathogens* 2009; 2(5): e1000295.
49. Fahey JL. Cytokines, Plasma Immune Activation Markers, and Clinically Relevant Surrogate Markers in Human Immunodeficiency Virus Infection. 1998;5(5):597–603.
50. Sachdeva N, Oshima K, Cotter A, Ashman M et al. Analysis of immunological markers associated with pregnancy and HIV-1 infection: relevance in perinatal transmission in HIV-1-infected pregnant women with low plasma viral load. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2008, 60: 264–273.
51. Gordon SN, Cervasi B, Odorizzi P, Silverman R, Aberra F, Ginsberg G, et al. (2010). Disruption of intestinal CD4⁺T cell homeostasis is a key marker of systemic CD4 T cell activation in HIV-infected individuals. *The Journal of Immunology*. 2010 185(9), 5169–5179.
52. Klatt NR, Brenchley JM. Th17 cell dynamics in HIV infection. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 2010,5(2): 135–140.
53. Mavigner M, Cazabat M, Dubois M, L'Faqihi FE, Requena M, Pasquier C, et al. Altered CD3 T cell homing to the gut impairs mucosal immune reconstitution in treated HIV-infected individuals. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012, 122(1), 62–69.
54. Michelini Z, Baroncelli S, Fantauzzi A, Pasquale C et al. Reduced plasma levels of sCD14 and I-FABP in HIV-infected patients with mesalazine-treated ulcerative colitis. *HIV Clin Trials*. 2016 Jan 7:1-6. [Epub ahead of print]
55. Uzende I, Amandi C, Awolola N, Makwe CC. The role of cytokines as inflammatory mediators in preeclampsia. *Pan African Medical Journal*. 2015; 20:219.
56. Georgiou HM, Thio YS, Russell C, Permezel M, Heng YJ, Lee S, Tong S. Association between maternal serum cytokine profiles at 7-10 weeks gestation and birthweight in small for gestational age infants. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 May;204(5):415.e1-415.e12.

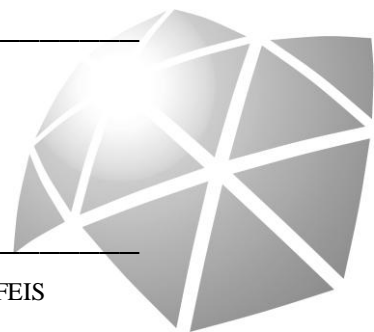
ANEXO I. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PARTICIPAÇÃO EM TRABALHO CIENTÍFICO

Tendo sido satisfatoriamente informado sobre o estudo **“Avaliação da translocação microbiana em gestantes infectadas pelo HIV”**, que tem por objetivo analisar gestantes soropositivos para o HIV e são atendidas no Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira”, eu, _____, **concordo** em participar do mesmo, respondendo às questões da entrevista por tempo estimado de 10 minutos e submetendo-me a exame de coleta de amostra de 15 mL de sangue, em apenas 1 (um) momento, para realização de exames laboratoriais, afim de contribuir com a pesquisa. Tenho ciência de que esse material colhido poderá ser reutilizado em futuros estudos, depois de aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, que este estudo é de responsabilidade da farmacêutica e mestranda Vanessa Martinez Manfio, sob orientação da Profa. Adjunta Lenice do Rosário de Souza, do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem. Fui informada que as informações serão utilizadas, exclusivamente, pelas pesquisadoras, que manterão sigilo sobre minha identidade, e que as mesmas estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas. A coleta de amostra de sangue pode causar um leve desconforto no local da picada, podendo apresentar edema por uns dias, porém, não é prejudicial para as voluntárias. Sei também que **posso retirar este consentimento a qualquer hora sem prejuízo do meu atendimento neste Serviço**. Em caso de dúvida adicional, poderei entrar em contato com o CEP da FMB/UNESP, através do telefone: (14) 38801609.

Botucatu, _____ de _____ de 20__

Assinatura do voluntário

Vanessa – Farmacêutica UNESP/FEIS



Lenice do Rosário de Souza;
End: Rua Salim Kahil,470/803, Vila Nogueira, Botucatu
Tel: 14 38821395; E-mail: lsouza@fmb.unesp.br

Vanessa Martinez Manfio
End: Miguel catarino n 339 jd panorama, Botucatu
Tel: 14 7223003 Email: vanessamanfio@hotmail.com

ANEXO II (TCLE para o grupo GC)

Tendo sido satisfatoriamente informado sobre o estudo “**Avaliação da translocação microbiana em gestantes infectadas pelo HIV**”, que tem por objetivo analisar gestantes soropositivos para o HIV e são atendidas no Serviço de Ambulatórios Especializados e Infectologia “Domingues Alves Meira”, eu, _____, **soronegativa para HIV, concordo** em participar do mesmo, **como grupo controle**, respondendo às questões da entrevista por tempo estimado de 10 minutos e submetendo-me a exame de coleta de amostra de 15 mL de sangue, em apenas 1 (um) momento, para realização de exames laboratoriais, afim de contribuir com a pesquisa. Tenho ciência de que esse material colhido poderá ser reutilizado em futuros estudos, depois de aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, que este estudo é de responsabilidade da farmacêutica e mestrandia Vanessa Martinez Manfio, sob orientação da Profa. Adjunta Lenice do Rosário de Souza, do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem. Fui informada que as informações serão utilizadas, exclusivamente, pelas pesquisadoras, que manterão sigilo sobre minha identidade, e que as mesmas estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas. A coleta de amostra de sangue pode causar um leve desconforto no local da picada, podendo apresentar edema por uns dias, porém, não é prejudicial para as voluntárias. Este grupo tem por finalidade comparar gestantes não infectadas pelo HIV com gestantes infectadas pelo HIV. Sei também que **posso retirar este consentimento a qualquer hora sem prejuízo do meu atendimento neste Hospital**. Em caso de dúvida adicional, poderei entrar em contato com o CEP da FMB/UNESP, através do telefone: (14) 38801609.

Botucatu, _____ de _____ de 20__

Assinatura do voluntário

Vanessa – Farmacêutica UNESP/FEIS

Lenice do Rosário de Souza;
End: Rua Salim Kahil,470/803, Vila Nogueira, Botucatu
Tel: 14 38821395; E-mail: lsouza@fmb.unesp.br

Vanessa Martinez Manfio
End: Miguel catarino n 339 jd panorama, Botucatu
Tel: 14 7223003 Email: vanessamanfio@hotmail.com