

YARA MARIA FRANCO MORENO

**PROLIFERAÇÃO CELULAR E CITOCINAS BCG
ESPECÍFICOS EM CRIANÇAS COM AIDS:**

efeito de suplementos nutricionais

CAMPINAS

2007

YARA MARIA FRANCO MORENO

**PROLIFERAÇÃO CELULAR E CITOCINAS BCG
ESPECÍFICOS EM CRIANÇAS COM AIDS:
efeito de suplementos nutricionais**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente, na área de concentração em Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Marluce dos Santos Vilela

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Tadeu Nolasco da Silva

CAMPINAS

Unicamp

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M815p Moreno, Yara Maria Franco
Proliferação celular e citocinas BCG específicos em crianças com
AIDS: efeito de suplementos nutricionais / Yara Maria Franco Moreno.
Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientadores : Maria Marluce dos Santos Vilela, Marcos Tadeu
Nolasco da Silva

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Proteínas. 2. HIV(Vírus). 3. Nutrição. 4. Imunologia. 5.
Citocinas. 6. Suplementos dietéticos. I. Vilela, Maria Marluce dos
Santos. II. Silva, Marcos Tadeu Nolasco da. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : BCG-specific lymphoproliferation and cytokine production
in children with AIDS: effects of nutritional supplements**

Keywords: . Proteins
 . HIV (Vírus)
 . Nutrition
 . Immunology
 . Cytokines
 . Dietary Supplements

Área de concentração : Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente

**Banca examinadora: Prof^a. Dr^a. Maria Marluce dos Santos Vilela
Prof^o. Dr^o. Ronei Luciano Mamoni
Prof^o. Dr^o. Francisco Maugeri Filho
Prof^o. Dr^o. Adérson Omar Mourão Cintra Damião
Prof^a. Dr^a. Maria Célia Cervi**

Data da defesa: 31-08-2007

Banca Examinadora da tese de Doutorado

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela

Co-Orientador:

Prof. Dr. Marcos Tadeu Nolasco da Silva

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Maria Marluce dos Santos Vilela

2. Prof.(a). Dr(a). Francisco Maugeri Filho

3. Prof.(a). Dr(a). Ronei Luciano Mamoni

4. Prof.(a). Dr(a). Maria Célia Cervi

5. Prof.(a). Dr(a). Adérson Omar Mourão Cintra Damião

Curso de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 2007

DEDICATÓRIA

*Dedico aos meus amados pais, Manuel e Aparecida,
que sempre me amaram, apoiaram e
se dedicaram incondicionalmente para
que eu concretizasse esta etapa.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido que este trabalho não fosse apenas uma tese, mas um meio para que eu encontrasse o meu Caminho.

À querida Professora Marluce Vilela, agradeço pela orientação, incentivo e paciência. Seu carinho, amizade e ensinamentos me fizeram avançar e, por muitas vezes, alterar meus sentimentos e atitudes.

Ao Professor Marcos Nolasco, pelo incentivo, amizade e valioso auxílio ao longo desses anos.

Às crianças e seus responsáveis por transformarem um desejo em realidade.

À querida **amiga** Taís Mazzola, ao meu lado desde o início, obrigada pelo apoio, incentivo, correções, companhia e alegria. Palavras não traduzem a imensa gratidão pela sua amizade!

Ao meu amado Leandro, pelo **amor** e apoio incondicionais.

À Vanessa Akemi, pela sua dedicação, incentivo e acima de tudo, amizade.

Às amigas e companheiras de muitas horas do laboratório Maria Helena, Simone, Eliane, Tati, Bia e Vanessa pelo auxílio e apoio desde o início até a entrega dos bonecos.

À Simone Ferreira e Milton, obrigada por estarem sempre à disposição.

Aos queridos amigos do CIPED, Jussara, Silvana, Edgar e Caru, por terem me socorrido em muitas horas.

Aos funcionários da Seção de Coleta da Patologia Clínica do HC e, em especial, à Dona Elza Severino, pela paciência e delicadeza durante as coletas de sangue.

Ao Serviço Social DST/AIDS, em especial a Márcia, Camila e Cintia e, a equipe de Enfermagem do Ambulatório de Pediatria, Márcia, Edna, Maria do Carmo, Renata e Kazuko.

A equipe de médicos e residentes do Ambulatório de Imunodeficiência Secundária, em especial, Dra. Andrea, Dra. Patrícia, Dra. Adyléia, Dra. Paola, Dr. Danilo.

Ao Ronei Mamoni e ao Rômulo de Oliveira, pelos auxílios nos protocolos de ELISA.

À minha irmã Maraísa, por ter me acompanhado e apoiado com sua primorosa amizade desde o início.

Aos meus amados irmãos de caminho Sandra, Renata, Irene, Paula, Ana Ariel, Marcela, Olívia, Pedro Afonso, Andréa e Milton muito obrigada por todo o carinho e vibrações.

À família Ferreira, em especial à Nilza e Detinha por terem me acolhido.

À Nestlé pela doação dos suplementos alimentares.

À FAPESP pela bolsa e financiamento concedidos.

A todos os meus amigos que diretamente ou não me incentivaram e contribuíram para esta jornada.

Muito Obrigada!

*Se eu pudesse deixar algum presente à você, deixaria aceso o
sentimento de amar a vida dos seres humanos.
A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora.
Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.
A capacidade de escolher novos rumos.
Deixaria para você, se pudesse, o respeito aquilo que é indispensável.
Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação.
E, quando tudo mais faltasse, um segredo:
o de buscar no interior de si mesmo a resposta e
a força para encontrar a saída.*

(Mahatma Gandhi)

	PÁG.
RESUMO	<i>xxxix</i>
ABSTRACT	<i>xlili</i>
1- INTRODUÇÃO	47
1.1- Imunonutrição	49
1.2- Pré-bióticos	49
1.3- Leite bovino: componentes e propriedades funcionais fisiológicas	54
1.3.1- Efeitos Funcionais Fisiológicos das Proteínas e Peptídeos do Soro de Leite Bovino.....	57
1.3.2- Mecanismos de modulação.....	65
1.4- AIDS	66
1.4.1- Resposta à Vacinação.....	68
1.4.2- Resposta Imune Celular.....	69
1.4.3- Produção de Citocinas.....	72
1.4.4- Sistema Imune de Mucosa.....	74
1.4.5- Glutathione.....	75
1.4.6- Estado Nutricional na AIDS.....	77
2- OBJETIVOS	79
2.1- Objetivo Geral	81
2.2- Objetivos Específicos	81
3- HIPÓTESES	83

4- MÉTODOS.....	87
4.1- Delineamento do Estudo.....	89
4.2- População.....	89
4.3- Suplementos Alimentares.....	90
4.4- Suplementação Alimentar.....	93
4.5- Avaliação Nutricional.....	94
4.5.1- Antropometria e Composição Corporal.....	94
4.5.2- Ingestão Alimentar.....	95
4.6- Avaliação Imunológica.....	96
4.6.1- Coleta das Amostras Biológicas.....	96
4.6.2- Hemograma.....	96
4.6.3- Contagem Absoluta dos Linfócitos T.....	96
4.6.4- Fenotipagem dos Linfócitos T.....	97
4.6.5- Proliferação Linfocitária.....	99
4.6.6- Dosagem de Citocinas em Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico.....	102
4.6.7- Dosagem de Anticorpos Anti-HBs.....	103
4.6.8- Glutathione Eritrocitária.....	103
4.6.9- Quantificação da Carga Viral.....	104
4.7- Avaliação Clínica.....	104
4.7.1- Ocorrência de Infecções Associadas.....	104
4.8- Aspectos Éticos.....	105
4.9- Análise Estatística.....	105

5- RESULTADOS.....	107
5.1- Caracterização da População.....	109
5.2- Avaliação Nutricional.....	111
5.2.1- Antropometria e Composição Corporal.....	111
5.2.2- Ingestão Alimentar.....	116
5.3- Avaliação Imunológica.....	119
5.3.1- Parâmetros Hematológicos.....	119
5.3.2- Contagem Absoluta de Linfócitos T.....	122
5.3.3- Fenotipagem dos Linfócitos T.....	123
5.3.4- Proliferação linfocitária.....	125
5.3.5- Produção de Citocinas em Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico.....	133
5.3.6- Título de anticorpos Anti-HBs.....	140
5.3.7- Glutathione Eritrocitária.....	141
6- DISCUSSÃO.....	143
7- CONCLUSÕES.....	163
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	169
9- ANEXO.....	203
10. APÊNDICE.....	217

LISTA DE ABREVIATURAS

AAB	Área Adiposa do Braço
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AMB	Área Muscular do Braço
AZT	Zidovudina
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BSA	Albumina Bovina Sérica
CDC	Center for Diseases Control and Prevention
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
CMV	Citomegalovírus
ConA	Concanavalina A
DTNB	5,5'-Dithiobis (2-Ácido Nitrobenzóico)
EBV	Epstein-Barr Vírus
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FOS	Fruto-Oligossacarídeos
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue
Gh	Hormônio do Crescimento
GMP	Glicomacropéptido
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione Oxidada
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
HBs-Ag	Antígeno de Hepatite B
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus - 1
HPV	Human Papiloma Virus
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M

IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
IP	Inibidor de Protease
ITRN	Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos
ITRNN	Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Análogos de Nucleosídeos
LPS	Lipopolissacárideo
MEIA	Metodologia de Enzimaimunoensaio de Micropartículas
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
NAC	N-Acetil-Cisteína
NASBA	Nucleic Acid Sequence Based Assay
NCHS	National Center for Health Statistics
NFκB	Fator Nuclear de Transcrição κ B
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVA	Ovoalbumina
PB	Perímetro Braquial
PCSE	Prega Cutânea Subescapular
PCT	Prega Cutânea do Tríceps
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Forbol Miristil Acetato
PPD	Derivado Proteico Purificado
PVC	Policloreto de Vinila
PWN	Mitógeno <i>Pokeweed</i>
RDA	Recommended Dietary Allowances
ROI	Intermediários Reativos de Oxigênio
SBF	Soro Bovino Fetal
TCM	Triglicerídeos de Cadeia Média
TCR	Receptor de Células T
TLR	Toll-Like Receptors
TREC	Linfócitos T Recém-Emigrados do Timo

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Proteínas do soro de leite bovino e principais funções fisiológicas descritas.....	55
Tabela 2- Peptídeos derivados de proteínas do soro de leite bovino e suas funções fisiológicas descritas.....	56
Tabela 3- Composição centesimal e distribuição energética dos suplementos alimentares fornecidos às crianças infectadas pelo HIV-1.....	92
Tabela 4- Características das crianças infectadas pelo HIV-1 antes da suplementação alimentar.....	110
Tabela 5- Ingestão alimentar de energia, proteína, cálcio e ferro e distribuição percentual dos macronutrientes em crianças infectadas pelo HIV-1 no início e final de ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).....	118
Tabela 6- Adequação da Ingestão Alimentar segundo recomendações propostas pela RDA (1989) em crianças infectadas pelo HIV-1 no início (Tempo 1) e final (Tempo 2) de ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).....	118
Tabela 7- Parâmetros hematológicos de crianças expostas ao HIV-1 infectadas e não infectadas pelo HIV-1.....	119

Tabela 8-	Parâmetros hematológicos em crianças infectadas pelo HIV-1 no início (Tempo 1) e final (Tempo 2) de ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).....	121
Tabela 9-	Distribuição de títulos anti-HBs de crianças expostas ao HIV-1 infectadas e não infectadas, após 3 doses da vacina de hepatite B.....	141

	PÁG.
Figura 1- Figura representativa da análise, por citometria de fluxo, da fenotipagem dos linfócitos T de sangue periférico de crianças expostas e infectadas pelo HIV-1. Após a seleção das células $CD3^+$, os eventos foram analisados por tamanho e complexidade (FS e SS) e, as subpopulações de linfócitos T $CD4^+$, $CD4^+CD45RO^+$, $CD8^+$, $CD8^+CD45RO^+$, e $TCR\delta\gamma^+$ foram avaliadas.....	98
Figura 2- Figura representativa da análise, por citometria de fluxo, da proliferação linfocitária de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas (controle) e estimuladas por BCG e PHA de crianças infectadas pelo HIV-1.....	101
Figura 3- Escores Z dos índices antropométricos peso/idade, altura/idade e IMC de crianças infectadas pelo HIV-1 no início da suplementação alimentar contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).....	112
Figura 4- Escores Z do perímetro braquial (PB), prega cutânea do tríceps (PCT), prega cutânea subescapular (PCSE), área muscular do braço (AMB), área adiposa do braço (AAB) e somatório de pregas cutâneas (ΣPC) de crianças infectadas pelo HIV-1 no início da suplementação alimentar contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).....	113

Figura 5-	Escores Z dos índices antropométricos peso/idade, altura/idade e IMC de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).....	114
Figura 6-	Escores Z do perímetro braquial (PB), prega cutânea do tríceps (PCT), prega cutânea subescapular (PCSE), área muscular do braço (AMB), área adiposa do braço (AAB) e somatório de pregas cutâneas (Σ PC) de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).....	115
Figura 7-	Contagem absoluta de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ (células/mm ³) em crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico)..	123
Figura 8-	Percentual de linfócitos T $CD4^+$, $CD4^+CD45RO^+$, $CD8^+$, $CD8^+CD45RO^+$ e TCR $\gamma\delta$ no sangue periférico de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não infectadas.....	124
Figura 9-	Percentual de linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$ e TCR $\gamma\delta$ no sangue periférico de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).....	125

Figura 10-	Proliferação linfocitária espontânea, estimulada por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), após seis dias de cultura de células mononucleares de sangue periférico, de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não infectadas.....	126
Figura 11-	Percentual de linfoblastos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e TCR $\gamma\delta$ após seis dias de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimulada, estimulada por BCG ou por fitohemaglutinina de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não infectadas.....	128
Figura 12-	Proliferação linfocitária espontânea, estimulada por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), após seis dias de cultura de células mononucleares de sangue periférico, de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).....	130
Figura 13-	Percentual de linfoblastos específicos para BCG após seis dias de cultura de células mononucleares de sangue periférico, de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).....	131
Figura 14-	Percentual de linfoblastos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e TCR $\gamma\delta$ após seis dias de cultura de células mononucleares de sangue periférico espontânea, estimulada por BCG ou fitohemaglutinina (PHA) de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).....	132

Figura 15-	Concentração de TNF- α nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas, estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não infectadas.....	133
Figura 16-	Concentração de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas, estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não infectadas.....	134
Figura 17-	Concentração de IL-10 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas, estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não infectadas.....	135
Figura 18-	Concentração de IL-4 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas, estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não infectadas.....	136
Figura 19-	Concentração de TNF- α nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas, estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).....	137

Figura 20-	Concentração de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas, estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).....	138
Figura 21-	Concentração de IL-10 (pg/mL) nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas, estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).....	139
Figura 22-	Concentração de IL-4 (pg/mL) nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas, estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).....	140
Figura 23-	Concentração de GSH reduzida em eritrócitos (mg/dL) de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não infectadas.....	141
Figura 24-	Concentração de GSH reduzida em eritrócitos (mg/dL) de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).....	142

RESUMO

As crianças infectadas pelo HIV-1 despertam preocupações especiais em relação à nutrição e ao estado de saúde, pois os efeitos imunossupressores da infecção as colocam em situação de grande risco para complicações infecciosas e déficits no estado nutricional. O desenvolvimento de estratégias que visem a recuperação do estado nutricional e o estímulo da resposta imunológica é de grande interesse para indivíduos que se encontram imunodeprimidos. A suplementação alimentar com as proteínas do soro de leite bovino é reconhecida como efetiva em estimular o sistema imunológico, pelo aumento da síntese de glutathione. Esse antioxidante se encontra reduzido nos indivíduos infectados pelo HIV-1 e correlaciona-se com a progressão da AIDS.

Com o objetivo de conhecer a influência da suplementação alimentar oral com suplementos contendo proteínas de soro de leite bovino, nativas, hidrolisadas ou enriquecidas com pré-bióticos, sobre o estado nutricional, composição corporal e sistema imune inato e adaptativo em crianças infectadas pelo HIV-1, foi realizado ensaio clínico, prospectivo, duplo-cego, com crianças, entre 2 a 16 anos de idade que receberam suplemento nutricional oral contendo proteínas do soro de leite bovino hidrolisadas, nativas ou enriquecidas com pré-bióticos ao longo de três meses. O estado nutricional foi determinado pelo ganho de peso, crescimento e ingestão alimentar; a composição corporal, através do perímetro braquial e pregas cutâneas. A avaliação do sistema imune compreendeu a caracterização da imunidade celular, avaliada pela fenotipagem dos linfócitos T ($CD4^+$, $CD8^+$ e gama-delta), proliferação linfocitária específica para o BCG e, produção de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-4) em sobrenadantes de cultura além da determinação de glutathione nos eritrócitos. O grupo de comparação, para a avaliação imunológica, foi composto por crianças expostas mas não infectadas pelo HIV-1 com idade entre 2 a 10 anos. Não foi observada influência da suplementação alimentar sobre o estado nutricional ou sobre a composição corporal. Em relação a imunidade celular, observou-se aumento da proliferação específica para o BCG no grupo que recebeu o suplemento enriquecido com pré-bióticos e, aumento da proliferação linfocitária e produção de IFN- γ específicos para o BCG no grupo que recebeu o suplemento com proteínas nativas. Sendo assim, pode-se concluir que a suplementação alimentar com proteínas do soro de leite bovino ou pré-bióticos podem ter ação moduladora do sistema imune.

ABSTRACT

Special concerns have arisen in regard to HIV-1 infected children about their nutritional and health status due to the immunosuppressive effects. The development of strategies for improvement in the nutritional status and immune response is of great interest for immunocompromised patients. Nutritional supplementation with whey proteins is recognized as stimulating the immune system to increase glutathione synthesis. The levels of this antioxidant are reduced in HIV-1 infected individuals and are correlated with disease progression.

With the objective of investigating the influence of oral supplementation with bovine whey proteins (native, hydrolyzed or enriched with prebiotics) on nutritional status, body composition, and innate and adaptive immune system in a group of HIV-1 infected children, between 2 and 16 years old, a prospective, double-blind clinical trial was conducted. During the experiment, children received oral whey proteins supplement for 3 months. The nutritional status was assessed by weight gain, growth and food intake while midarm circumference and skinfold thickness were used to determine body composition. The immune system was evaluated by the percentual of CD4⁺, CD8⁺ and gamma-delta T lymphocytes, BCG-specific lymphoproliferation and cytokine (TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-4) production on supernatant cultures and glutathione levels. Data were submitted to statistical analysis. The control group was composed of HIV-exposed but non-infected children. Oral supplementation did not influence nutritional status or body composition, but BCG-specific lymphoproliferation was enhanced in the group that received prebiotic enriched supplement. An increase of BCG-specific lymphoproliferation and IFN- γ production was observed in the native whey protein supplemented group. These data suggest that nutritional supplementation with native or prebiotic enriched bovine whey proteins increase the BCG memory response in HIV-infected children.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Imunonutrição

A pesquisa e prática em Nutrição, nos últimos 20 anos, têm dirigido seu foco de maneira significativa para aspectos de manutenção da saúde. Atualmente, a nutrição visa melhorar as funções fisiológicas, bem como as psicológicas, de cada indivíduo, de maneira a assegurar seu bem estar e saúde e, ao mesmo tempo, minimizar os riscos de desenvolver doenças ao longo da vida. Nesse contexto, a ingestão de alimentos funcionais tem sido proposta (Roberfroid, 2002).

Um alimento pode ser considerado funcional se demonstrar, de maneira satisfatória, que interfere benéficamente em, pelo menos, uma função fisiológica, contribuindo para o bem estar, saúde ou redução de risco de uma doença (Roberfroid, 2002).

A modulação do sistema imune através da ingestão de alimentos funcionais é uma estratégia atrativa e não invasiva de otimizar a imunidade e melhorar a saúde. Tem sido mostrado que vários tipos de dietas e suplementos são capazes de modular as funções do sistema imune, e seus componentes bioativos têm sido propostos para constituir a base de produtos alimentares funcionais imunomoduladores.

Os estudos têm se focado no papel de componentes específicos da dieta que podem modular o sistema imune. Os nutrientes mais utilizados para as pesquisas em imunonutrição são os ácidos graxos ômega-3, aminoácidos (arginina, taurina, glutamina e cisteína), micronutrientes (selênio, zinco), pré-bióticos e probióticos (López-Varela et al., 2002; Singh et al., 2002). A seguir, serão abordados dois alimentos com propriedades funcionais, os pré-bióticos e as proteínas do soro de leite bovino.

1.2- Pré-bióticos

A microbiota intestinal é um ecossistema complexo que abriga uma estimativa de 10^{14} micróbios que representam entre 400 a 500 diferentes espécies. O cólon contém a maior densidade e diversidade de microorganismos. Existe ao redor de 10^{10} a 10^{11} microorganismos por grama de conteúdo colônico. Os principais gêneros encontrados no

cólon são *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Bacillus*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* e *Ruminococcus* (Fanaro et al., 2003).

Um pré-biótico é um ingrediente seletivamente fermentado que permite alterações específicas, tanto na composição e/ou na atividade da microbiota intestinal que confere benefícios para a saúde e bem estar do hospedeiro (Roberfroid, 2007).

Os critérios necessários para classificar um ingrediente como pré-biótico são: (1) resistência à acidez gástrica, à hidrólise por enzimas de mamíferos e à absorção intestinal; (2) fermentação pela microbiota intestinal e, (3) estímulo seletivo do crescimento e/ou atividade das bactérias que contribuem para a saúde e bem estar (Roberfroid, 2007).

Na maioria dos casos, os pré-bióticos estimulam o crescimento e a atividade de bifidobactérias e lactobacilos. Fruto-oligossacarídeos (FOS), galacto-oligossacarídeos, gluco-oligossacarídeos, isomalto-oligossacarídeos, xilo-oligossacarídeos, inulina e lactulose são exemplos de pré-bióticos (López-Varela et al., 2002; Ouwehand et al., 2002; Duggan et al., 2003; Morais e Jacob, 2006).

Os FOS podem ser naturalmente encontrados na alcachofra, aspargos, cebola, escarola e banana e, estimulam o crescimento de bifidobactérias em indivíduos saudáveis (Lindsay et al., 2006).

Estudos experimentais e clínicos demonstram que as ações fisiológicas dos pré-bióticos incluem efeitos sobre a microbiota intestinal, efeitos laxativos, aumento da absorção de sais minerais (cálcio e magnésio), imunomodulação, efeitos sobre o metabolismo lipídico e ação anticarcinogênica (Gibson, 1999; Scholz-Ahrens et al., 2001; Guigoz et al., 2002; Nyman, 2002; Roberfroid, 2002; Roller et al., 2003; Boehm et al., 2004; Langlands et al., 2004; Bruzzese et al., 2006).

As propriedades nutricionais dos pré-bióticos estão relacionadas às alterações fisiológicas que ocorrem no hospedeiro através de interações micróbio-micróbio, hospedeiro-micróbio ou hospedeiro-metabólitos bacterianos. Acredita-se que os metabólitos bacterianos, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), propiônico, acético e butírico sejam os principais efetores dos efeitos benéficos observados (Van Loo, 2004).

O ácido butírico é o principal substrato energético para a mucosa do cólon e parece ter ação protetora em doenças do cólon tais como colite ulcerativa e câncer. A proporção de ácidos propiônico e acético parece interferir benéficamente no metabolismo de lipídios e carboidratos. O aumento da formação dos AGCC também pode levar à diminuição do pH que, por sua vez, pode estimular a absorção intestinal de minerais no cólon e aumentar o fluxo sanguíneo. Além disso, é capaz de suprimir *in vitro* a atividade do fator de transcrição nuclear kappa B (NFκB), mecanismo chave para as respostas inflamatórias (Nyman, 2002; Okada et al., 2006).

A microbiota intestinal normalmente associada ao sistema imune associado à mucosa intestinal (GALT, gut-associated lymphoid tissue) representam a primeira linha de defesa contra vários patógenos potenciais. A microbiota ativa a imunidade inespecífica e a resposta imune humoral, além de modular as reações de hipersensibilidade. No GALT ocorrem o reconhecimento e apresentação do antígeno para a construção de uma resposta imune, seja para desenvolver proteção, tolerância ou doença (Gibson, 1999; Fanaro et al., 2003).

O sistema imune associado à mucosa pode ser considerado o maior órgão imunológico. Por um período variável após o nascimento, o GALT encontra-se funcionalmente imaturo e a permeabilidade intestinal transitoriamente aumentada. Com isso, há um aumento da carga antigênica que pode causar uma transferência aberrante de antígenos o que levará à sensibilização. A microbiota intestinal desempenha efeito benéfico sobre a permeabilidade intestinal através da provisão de estímulos potentes para a construção e ampliação da barreira mucosa e da manutenção de um estado normal de inflamação latente ao longo da vida.

A evidência de que o GALT evolui através da colonização bacteriana suporta o conceito de que a microbiota intestinal é um componente essencial na defesa imune de mucosa. O impacto da microflora se estende através do intestino. Há a hipótese que um ecossistema intestinal saudável direciona o desenvolvimento do sistema imune de mucosa humoral e celular durante a infância (Miniello et al., 2003).

As principais funções do GALT são a exclusão de antígenos e prover tolerância aos antígenos, uma vez que todos os componentes alimentares e a microflora intestinal são em princípio, antígenos. Essa tolerância é decorrente da supressão de células de um padrão do tipo “T-helper 1 (Th1)” pela interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10) e fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) quando expostos a baixas concentrações de antígenos. Altas doses causam anergia clonal, as células T encontram-se em estado celular de não responsividade o qual as torna incapazes de secretar interleucina 2 (IL-2) ou de proliferar (Ouwehand et al. 2002).

As bifidobactérias fazem parte da defesa do intestino grosso contra a invasão de organismos patogênicos pela sua capacidade de secretar peptídeos que inibem o crescimento de patógenos. Além disso, são capazes de induzirem, *in vitro*, respostas imuno regulatórias de células dendríticas de mucosa (Gibson, 1999; Lindsay et al., 2006).

Na criança, a microbiota intestinal tem papel relevante no desenvolvimento do sistema imune. Os oligossacarídeos presentes no leite humano atuam como receptores análogos inibindo a adesão de patógenos na superfície epitelial e interagem diretamente com as células do GALT, prevenindo doenças alérgicas e infecciosas (Ouwehand et al., 2002; Boehm et al., 2004; Corkins, 2005).

A adição de galacto-oligossacarídeos e fruto-oligossacarídeos (FOS) às fórmulas infantis resulta em uma flora intestinal semelhante à observada em crianças sob aleitamento materno (Boehm et al., 2004).

A maioria das informações a respeito dos efeitos dos pré-bióticos sobre o sistema imune é proveniente de ensaios experimentais. As observações gerais são que o consumo de inulina aumenta a capacidade fagocítica dos macrófagos e a produção de IgA secretória (Van Loo, 2004).

Guigoz et al. (2002) ao estudarem os efeitos da suplementação com pré-bióticos em adultos e idosos, confirmaram a influência positiva da suplementação com fruto-oligossacarídeos sobre a população de bifidobactérias, e observaram diminuição da expressão e secreção de IL-6 por células mononucleares de sangue periférico.

A suplementação com 15 g de FOS, por dia, em pacientes com doença de Crohn ativa reduziu a atividade da doença além de, resultar em uma alteração imuno regulatória na atividade das células dendríticas, com um aumento na proporção de células dendríticas positivas para interleucina 10 (IL-10) e aumento da expressão de receptores tipo toll (TLR, toll-like receptors) 4 (TLR-4) e 2 (TLR-2) (Lindsay et al., 2006). Os autores desta pesquisa, hipotetizam que o efeito observado seja dependente do efeito bifidogênico dos FOS atuando via TLR ou outros receptores de reconhecimento de padrão molecular (Lindsay et al., 2006). A interação entre as bifidobactérias e os receptores de reconhecimento de padrão molecular pode ocorrer com a própria célula dendrítica ou em outro local com um efeito indireto sobre a célula dendrítica. Além disso, o ácido butírico pode influenciar a maturação e produção de citocinas, *in vitro*, das células dendríticas, alterando o balanço da produção entre interleucina 12 (IL-12) e IL-10, em favor desta (Millard et al., 2002). A sinalização via TLR é geralmente associada ao início da resposta inflamatória e há evidências que os TLRs desempenhem um papel protetor no intestino, uma vez que a ativação dos TLRs pela microbiota comensal parece ser essencial para a homeostasia intestinal e proteção contra lesão. Entretanto, os mecanismos pelos quais os pré-bióticos regulam a expressão dos TLR pelas células dendríticas ainda devem ser esclarecidos (Rakoff-Nahoum et al., 2004).

Em ratos foram observadas modificações na carcinogênese e no estímulo GALT (Guigoz et al., 2002). Roller et al. (2003) conduziram ensaio experimental em ratos com suplementação diária de inulina enriquecida com oligofrutose e demonstraram aumento da concentração de imunoglobulina A secretória (IgA-s) e da produção de interleucina 10 (IL-10) e interferon gama (IFN- γ) pelas placas de Peyer sugerindo que os pré-bióticos e seus metabólitos tenham efeito estimulatório do GALT.

Apesar de ainda esparsos, estudos clínicos têm avaliado a potencial aplicação de pré-bióticos como agentes imunomoduladores ou anti-infecciosos. Em ensaio clínico duplo-cego, controlado por placebo conduzido com crianças saudáveis, entre 7 e 9 meses de idade, com o objetivo de avaliar o efeito do consumo de cereal enriquecido com oligofrutose e inulina sobre a resposta à vacinação de sarampo observou-se que, após a

vacinação houve aumento significativo de imunoglobulina G (IgG) anti sarampo (Firmansyah et al 2000).

Duggan et al., (2003) conduziram em Lima, Peru, dois ensaios clínicos consecutivos, randomizados, cegos e controlados, nos quais ofereceram cereais enriquecidos com pré-bióticos a crianças com diarreia aguda. No primeiro ensaio foram avaliados os efeitos da suplementação com oligofrutose visando a prevenção da diarreia aguda. No segundo ensaio, adicionou-se zinco ao pré-biótico. Participaram do primeiro ensaio 282 crianças e do segundo, 369 crianças. O número médio de dias com diarreia (aproximadamente 10) observado foi o mesmo para as crianças foram alimentadas com pré-biótico, pré-biótico com zinco ou com cereais não suplementados.

Em estudo multicêntrico com pré-escolares observou-se que o consumo de inulina resultou na redução da incidência de febre por diarreia e de ausências à escola (Saavedra e Tschemia, 2002).

1.3- Leite bovino: componentes e propriedades funcionais fisiológicas

O leite bovino é uma secreção polifásica da glândula mamária que contém, aproximadamente, 5% de lactose, 3,2% de proteína, 4% de lipídios e 0,7% de sais minerais. Representa rica fonte de nutrientes essenciais e moléculas biologicamente ativas. A fração do soro, em particular, contém vários componentes protéicos com atividade imunomoduladora (Séverin e Wenshui, 2005).

Os concentrados de proteínas do soro são subprodutos do processamento comercial do leite, como na obtenção da caseína e na manufatura do queijo. As proteínas do soro de leite não são coaguladas por ácido e são resistentes à ação da quimosina. Compreendem aproximadamente 20% do total das proteínas lácteas e possuem o potencial de serem transformadas em ingredientes imunomoduladores para alimentos funcionais (Séverin e Wenshui, 2005).

As proteínas do soro de leite são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo. São consideradas como proteínas de metabolização rápida pela sua capacidade de estímulo à síntese de proteínas sanguíneas e teciduais, o que as torna de grande utilidade para situações de estresse metabólico (Boire et al., 1997; Dangin et al., 2001).

As principais proteínas presentes no soro de leite bovino são a β -lactoglobulina, α -lactalbumina, imunoglobulinas, lactoferrina, albumina bovina sérica e lisozima, as quais serão brevemente descritas a seguir. As principais proteínas presentes no soro, suas características e principais funções fisiológicas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1- Proteínas do soro de leite bovino e principais funções fisiológicas descritas.

Proteína	Massa molecular (kDa)	Concentração (g/L)		Função fisiológica
		Leite Bovino	Leite Humano	
Proteínas totais		6,3	67,3	
β -Lactoglobulina	18,3	3,2		Carreador de retinol, conjuga ácidos graxos, ação antioxidante
α -Lactalbumina	14,1	1,2	1,9	Síntese de lactose, carreador de cálcio, imunomodulação, anticarcinogênico
Imunoglobulinas (IgA, IgM e IgG)	160 a 900	0,7	1,3	Proteção imunológica
BSA	66,2	0,4		
Lactoferrina	86,1	0,1	1,5	Ação antimicrobiana e antiviral, antioxidante, imunomodulação, absorção de ferro, anticarcinogênico
Lactoperoxidase	77	0,03		Ação antimicrobiana
GMP		1,2		Ação antimicrobiana e antiviral, bifidogênica
Lisozima	15	0,0004	0,1	Ação antimicrobiana, efeito sinérgico com imunoglobulinas e lactoferrina

Fonte: Adaptado de Shah (2000); Pang et al., (2006), Korhonen e Pihlanto, (2006). **BSA**: albumina bovina sérica, **GMP**: glicomacropéptido.

O soro de leite contém vários peptídeos que se encontram naturalmente presentes ou que são parte da sequência primária das proteínas. Essas sequências peptídicas podem ser liberadas no intestino durante a digestão ou podem também ser obtidas *in vitro* (Gauthier et al., 2006).

Os métodos mais utilizados para a obtenção dos peptídeos provenientes das proteínas do soro de leite são: hidrólise enzimática por enzimas digestivas, fermentação do leite a partir de culturas proteolíticas, proteólise por enzimas derivadas de microorganismos ou plantas, ou ainda, combinações entre esses métodos (Korhonen e Pihlanto, 2006).

A hidrólise enzimática das moléculas de proteína é o método mais comum de obtenção dos peptídeos. Enzimas digestivas, como a pepsina e tripsina, entre outras, e combinações enzimáticas de diferentes proteinases, como alcalase, quimotripsina, pancreatina, pepsina e termolisina, além de enzimas provenientes de bactérias e fungos, são amplamente utilizadas (Korhonen e Pihlanto, 2006). Na Tabela 2 encontram-se descritos alguns peptídeos provenientes de proteínas do soro de leite bovino.

Tabela 2- Peptídeos derivados de proteínas do soro de leite bovino e suas funções fisiológicas descritas.

Proteína	Fragmento	Sequência peptídica	Nome	Função fisiológica
α -Lactalbumina	50 – 53	Tyr-Gly-Leu-Phe	α -Lactorfina	Agonista opióide, inibidor da ECA
β -Lactoglobulina	102 – 105	Tyr-Leu-Leu-Phe	β -Lactorfina	Estimulação ileal não opióide
	142 – 148	Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg	-	Inibidor da ECA
	146 – 149	His-Ile-Arg-Leu	β -Lactotensina	Contração ileal
BSA	399 – 404	Tyr-Gly-Phe-Gln-Asp-Ala	Serorfina	Opióide
	208 – 216	Ala-Leu-Lys-Ala-Trp-Ser-Val-Ala-Arg	Albutensina A	Contração ileal, inibidor da ECA
Lactoferrina	17 – 42	Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Glu-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe	Lactoferricina	Antimicrobiana
		Tyr-Leu-Gly-Ser-Gly-Tyr	Lactoferroxina-A	Opióide

Fonte: Adaptado de Korhonen e Pihlanto, (2006), Shah (2000);. **BSA**: albumina bovina sérica. **ECA**: enzima conversora de angiotensina.

Ensaio experimentais realizados com o intuito de comprovar a atividade biológica das proteínas do soro verificaram que alguns concentrados de soro de leite são capazes de melhorar a função imune celular, impulsionar a produção de anticorpos e regredir o desenvolvimento tumoral (Séverin e Wenshui, 2005). A seguir serão abordadas algumas das propriedades imunomoduladoras de algumas proteínas e peptídeos do soro de leite bovino.

1.3.1- Efeitos Funcionais Fisiológicos das Proteínas e Peptídeos do Soro de Leite Bovino

Muitos estudos com a finalidade de conhecer o efeito *in vitro* e *in vivo* das proteínas isoladas (β -lactoglobulina, α -lactalbumina, lactoferrina e lactoperoxidase) ou de misturas protéicas (concentrados e isolados protéicos de soro de leite) sobre a modulação da proliferação linfocitária têm sido realizados. Porém, poucos estudos avaliam os efeitos dos peptídeos, naturalmente presentes ou obtidos por hidrólise enzimática. A seguir serão abordados alguns estudos sobre os efeitos imunomoduladores das proteínas do soro de leite bovino, bem como, dos concentrados protéicos.

β -Lactoglobulina

A β -lactoglobulina é uma proteína globular de massa molecular de 18,3 kDa, que corresponde a, aproximadamente, 50% do conteúdo protéico do soro. Apesar de se conhecer muito sobre a estrutura e a funcionalidade da β -lactoglobulina, pouco se conhece sobre seu papel fisiológico. Sugere-se que seja responsável pelo transporte da vitamina A ao longo do trato digestivo em recém nascidos Também foi descrito efeito protetor na destruição térmica do ácido ascórbico em solução aquosa, que pode ser decorrente de efeito antioxidante proveniente de grupo tiol na proteína (Simpson e Nicholas, 2002; Marshal, 2004; Sgarbieri, 2005).

A adição de uma mistura comercial da β -lactoglobulina purificada, contendo as variantes A e B, às culturas de linfócitos de baço de ratos estimulou a proliferação celular.

A digestão da β -lactoglobulina com pepsina, tripsina, quimotripsina ou pancreatina, por longo período, estimulou a atividade mitogênica da β -lactoglobulina, suportando a hipótese que os peptídeos possam ser responsáveis por essa atividade (Wong et al., 1998).

A proliferação de esplenócitos também parece ser estimulada por peptídeos obtidos por focalização isoeletrica de fração da β -lactoglobulina hidrolisada por tripsina e quimotripsina. Entretanto, a hidrólise por *Lactobacillus paracasei*, suprime esse estímulo (Prioult et al., 2004).

Em relação a produção de anticorpos, a adição de β -lactoglobulina a culturas de esplenócitos de ratos aumentou a produção de IgM, porém esse efeito foi abolido quando hidrolisada por tripsina (Wong et al., 1998).

Prioult et al., (2004) demonstraram que peptídeos ácidos, obtidos por focalização isoeletrica de fração da β -lactoglobulina hidrolisada por tripsina e quimotripsina, estimularam a produção de IFN- γ *in vitro*. Adicionalmente, a hidrólise dessa fração peptídica, com *Lactobacillus paracasei* aumenta a produção IL-10 e diminui a secreção de IFN- γ e IL-4.

α -Lactalbumina

A α -lactalbumina é uma metaloproteína de 14,1 kDa, que representa entre 20 a 25% das proteínas do soro. É rica em lisina, leucina, treonina, triptofano e cistina. Sua principal atividade biológica é a de modular a síntese de lactose na glândula mamária (Marshall, 2004; Sgarbieri, 2005).

Albumina bovina sérica

A albumina bovina sérica (BSA) é uma proteína globular de 66,2 kDa, que representa aproximadamente 10 a 15% das proteínas do soro. Apresenta composição e propriedades físicas semelhantes às da albumina do soro de sangue bovino. Sabe-se que é

fonte de aminoácidos essenciais, porém pouco se sabe sobre suas potenciais funções fisiológicas (Marshall, 2004; Sgarbieri, 2005).

Lactoferrina

A lactoferrina é uma glicoproteína ligadora de ferro com 86,1 kDa. Corresponde entre 1 a 2% das proteínas do soro. É um antioxidante não enzimático encontrado tanto no soro do leite quanto no colostro. A lactoferrina bovina é homóloga à lactoferrina humana (Séverin e Wenshui, 2005; Marshall, 2004; Sgarbieri, 2005).

Foi demonstrado que a lactoferrina desempenha importante papel na modulação da resposta imune pela sua habilidade em interagir com moléculas alvo e células. Os efeitos anti-inflamatórios da lactoferrina têm sido demonstrados através pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e pela regulação das citocinas anti-inflamatórias. Além disso, lactoferrina pode estimular, direta ou indiretamente, a resposta imune (*in vivo* ou *in vitro*) pela regulação da proliferação, diferenciação e ativação tanto das células B quanto das T (Hartog et al., 2007).

Ao estudar o papel terapêutico da lactoferrina e, seus efeitos sobre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias, em modelo de colite induzida experimentalmente, observou-se que a administração oral de lactoferrina atenuou a colite induzida por dextran-sulfato de sódio de maneira dose-dependente, refletida pela melhora do índice clínico de atividade da doença, contagem de leucócitos e concentração de hemoglobina e atividade da mioleperoxidase. A redução da inflamação em resposta a lactoferrina foi correlacionada a indução significativa de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, e da redução significativa na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e interleucina 1 β e IL-6, logo, os autores concluíram que a administração oral de lactoferrina exerce atividade protetora contra o desenvolvimento de colite em ratos via modulação do sistema imune e correção do desbalanço de citocinas, apresentando um potencial como agente terapêutico para doenças inflamatórias intestinais (Togawa et al., 2002).

O acréscimo de lactoferrina a culturas celulares estimula a produção de interleucina 8 (IL-8) pelos leucócitos polimorfonucleares humanos e suprime a secreção de IL-6 em linhagem de monócitos (THP-1) estimulada por LPS (Shinoda et al., 1996; Mattsby-Baltzer et al., 1996).

Também foi demonstrado que a lactoferrina apresenta efeito inibidor da proliferação de linfócitos de baço de ratos (Miyauchi et al., 1997; Mercier et al., 2004). A digestão enzimática da lactoferrina, por mistura de tripsina e quimotripsina, suprime o efeito inibidor (Mercier et al., 2004). A digestão por pepsina promove a proliferação de linfócitos B e das células da placa de Peyer, porém reduz a proliferação induzida por mitógeno, sugerindo ação estimulatória e supressora dos peptídeos obtidos por ação da pepsina (Miyauchi et al., 1997).

A hidrólise da lactoferrina por pepsina aumenta a produção de IgM, IgG e IgA em culturas de esplenócitos de ratos e a produção de IgA pelas células da placa de Peyer (Miyauchi et al., 1997) e, sua administração oral aumenta os níveis de IgA anti-toxina colérica no intestino e bile de camundongos (Miyauchi et al., 1997).

A lactoferrina apresenta atividade antiviral sobre citomegalovírus, herpes simples tipo 1 e 2, influenza, vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), hepatite B, C e G, papiloma vírus humano (HPV), alfavírus, rotavírus, enterovírus, poliovírus, adenovírus, hantavírus, echovírus e calicivírus felino. Um dos mecanismos propostos para as propriedades antivirais da lactoferrina baseia-se na sua interação com os receptores na superfície celular, tais como glicosaminoglicanas que são os sítios de ligação para vários vírus. Outro mecanismo baseia-se na sua capacidade de se ligar diretamente às partículas virais inibindo a sua adsorção às células alvo (Kilara e Panyam, 2003; Séverin e Wenshui, 2005; Pan et al., 2006, Ammendolia et al., 2007).

Em relação ao HIV-1, tanto a lactoferrina bovina quanto a humana são potentes inibidores da infecção *in vitro* e a bovina é considerada um agente inibidor mais potente. A ação da lactoferrina contra o HIV-1 ocorre na fase inicial da infecção, provavelmente durante a adsorção do vírus à célula-alvo, sendo que interações eletrostáticas parecem desenvolver importante papel no contato entre as partículas virais do HIV-1 e as células do hospedeiro (Pan et al., 2006).

Outra atividade que a lactoferrina, bem como o peptídeo derivado da ação da pepsina, a lactoferricina, desempenham é a atividade bacteriostática e bactericida contra vários microorganismos. Seu espectro antimicrobiano inclui bactérias Gram-positivas,

Gram-negativas e fungos. É capaz de inibir o crescimento de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus stearotheophilus* e *Bacillus subtilis* sendo que seu efeito antimicrobiano se dá, principalmente, pela sua capacidade de quelar ferro, privando os microorganismos que o requerem, da sua fonte de nutrientes (Séverin e Wenshui, 2005).

A lactoferrina também possui capacidade de promover a atividade fagocítica de neutrófilos humanos e esse efeito parece não ser abolido pela hidrólise com pepsina (Miyauchi et al., 1998).

Imunoglobulinas

As imunoglobulinas constituem uma família de proteínas de elevado peso molecular que apresentam propriedades físicas, químicas e imunológicas diversas. Aparecem em elevada concentração no colostro e transmitem imunidade passiva aos recém-nascidos. As imunoglobulinas encontradas no soro de leite são a IgG (aproximadamente 160 kDa), IgA (aproximadamente 400 kDa) e IgM (aproximadamente 900 kDa).

Glicomacropéptido

O glicomacropéptido (GMP) é derivado da precipitação enzimática, por ação da quimosina, da kappa-caseína (κ -caseína), representa entre 10 a 15% das proteínas do soro. Esta fração protéica é rica em aminoácidos de cadeia ramificada e com baixas concentrações de aminoácidos de cadeia aromática, fenilalanina, triptofano e tirosina (Causey e Thomson, 2003; Marshall, 2005).

O GMP inibe a resposta proliferativa em resposta a mitógenos de esplenócitos de ratos, células da placa de Peyer de coelhos e, aumenta a reposta proliferativa em linhagem celular U937 (Otani et al., 1992; 1995; Otani e Monnai, 1993; Li e Mine, 2004).

A digestão do GMP com proteases acarretam em variações do efeito supressor. Li e Mine (2004) observaram que a digestão por pepsina melhora significativamente a proliferação celular em linhagem celular U937. A suplementação dietética com GMP em

camundongos resultou em aumento da resposta proliferativa de esplenócitos em resposta ao estímulo com concanavalina A (ConA) (Otani e Monnai, 1993; Otani et al., 1995; Monnai et al., 1998).

A produção de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro parece ser suprimida pelo acréscimo de GMP às culturas de esplenócitos de ratos e sua administração oral a camundongos suprime os níveis séricos de anticorpos IgG específicos para ovoalbumina (OVA) (Otani et al., 1995; Monnai et al., 1998).

A adição de concentrado protéico de soro de leite, rico em GMP, às culturas de esplenócitos de camundongos estimuladas com Con-A suprimiu a produção de interleucina 4 (IL-4) e IFN- γ e, após a digestão enzimática com pepsina e pancreatina, esse efeito foi parcialmente abolido (Cross e Gill, 1999). Isoladamente, o GMP induz produção de interleucina 1 (IL-1) em macrófagos de camundongos e em linhagem de macrófagos (P388D1) (Monnai e Otani, 1997; Otani e Monnai, 1995).

A proliferação e atividade fagocítica de linhagem de células semelhantes a macrófagos humanos (U937) são significativamente estimuladas na presença do GMP. Essa função imunomoduladora pode ser alterada por tratamentos enzimáticos. A digestão com pepsina melhora significativamente a atividade fagocítica, enquanto que a digestão por tripsina não a influencia (Li e Mine, 2004).

Interessantemente, GMP também atua como pré-bióticos, oferecendo substratos que promovem o crescimento de bifidobactérias e a lactoferrina, que promove o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos (Shah, 2000; Causey e Thomson, 2003).

Outras proteínas

A lisozima é uma enzima anti-microbiana, de 15 kDa, encontrada no colostro e leite humano e bovino. Sua concentração no colostro e no leite é ao redor de 0,14 a 0,7 e 0,07 a 0,6 mg/mL respectivamente. O perfil de aminoácidos da lisozima bovina difere da encontrada no leite humano e na clara de ovo (Shah, 2000; Vannini et al., 2004).

A lactoperoxidase, hemoproteína com massa molecular de 77 kDa, representa de 0,5 a 1,0% das proteínas do soro de leite. Na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) catalisa a oxidação do tiocianato (SCN₂) gerando um produto intermediário com propriedades antimicrobianas, principalmente contra *Salmonella* e *Streptococcus* patogênicos. A sua concentração no colostro e leite é, respectivamente, ao redor de 11 ± 45 mg/mL e 13 ± 30 mg/mL (Shah, 2000; Sgarbieri, 2005; Marshal, 2004).

Concentrados de Proteínas do soro de leite bovino

Isolado protéico de soro de leite microfiltrado possui capacidade de estimular a proliferação induzida por mitógeno de linfócitos de baço de ratos e a digestão enzimática com mistura de tripsina e quimotripsina reduz a estimulação (Mercier et al., 2004).

Outros estudos mostram que a adição de concentrados protéicos do soro às culturas de linfócitos de ratos suprime a proliferação linfocitária estimulada por mitógenos ou aloantígeno (Torre e Oliver, 1989; Barta et al., 1991; Cross e Gill, 1999).

Entretanto, o fracionamento protéico através de focalização isoeletrica gera frações peptídicas que estimulam em maior grau a proliferação linfocitária quando comparadas a hidrolisados não fracionados. Este estudo *in vitro* sustenta a hipótese que alguns peptídeos de baixa massa molecular, com número aumentados de grupamentos ionizáveis, com grupamentos hidrofóbicos expostos e peptídeos neutros/básicos do soro de leite, são efetivos na estimulação da proliferação linfocitária (Mercier et al., 2004).

Em camundongos, a suplementação com concentrado protéico de soro de leite por 8 semanas, aumentou a resposta proliferativa de esplenócitos à ConA (Rutherford-Markwick et al., 2005).

A administração oral de proteínas do soro hidrolisadas por pancreatina não resultou em alterações da proliferação linfocitária, estimulada por ConA, fitohemaglutinina (PHA) ou lipopolissacáride (LPS) em camundongos (Bounous e Kongshavn, 1982). Entretanto, após imunização com o Bacilo de Calmette Guérin (BCG) uma semana antes do sacrifício, foi observado aumento da proliferação induzida por mitógeno (Bounous e Kongshavn, 1982).

A administração oral de proteínas do soro de leite nativas aumenta a produção de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro (Bounous et al., 1988; 1989; Bounous e Gold, 1991, Wong e Watson, 1995), anti-ovoalbumina e da IgA secretória biliar (Constantino et al., 1989). A digestão dessas proteínas por pancreatina parece não interferir na produção de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro (Bounous e Kongshavn, 1982).

Não apenas a lactoferrina apresenta atividade antiviral, mas também o concentrado de proteínas do soro de leite. Em ensaio com camundongos alimentados previamente com concentrado de proteínas do soro de leite e, posteriormente infectados com rotavírus murino, observou-se que, embora a dieta prévia não tenha reduzido a carga viral, a proporção de animais com níveis elevados de vírus nas fezes era menor no grupo que recebeu o concentrado protéico (Wolber et al., 2005).

A capacidade de estimular a fagocitose de macrófagos do peritônio foi aumentada em todas as frações protéicas derivadas da ação da tripsina, α -quimotripsina, pepsina ou pancreatina sobre proteínas do soro, como α -lactalbumina, β -lactoglobulina e BSA (Biziulevicius et al., 2006).

Em culturas de células, a adição de proteínas do soro de leite bovino nativas aumentou os níveis de glutathione (GSH) em linhagens celulares de feocromocitoma (PC12), após exposição aguda a etanol, e em cultura de células mononucleares de sangue periférico (Dallas et al., 2000; Tseng et al., 2006).

Há poucos estudos clínicos que demonstram a ação das proteínas do soro de leite sobre o sistema imune. A ingestão de um concentrado de proteínas do soro de leite nativas (20g/dia) durante 3 meses, por adultos jovens com fibrose cística, resultou em aumento de 46,6% da GSH linfocitária (Grey et al., 2003). Aumento significativo dos níveis de GSH após ingestão de concentrado protéico de soro de leite também foi descrito por Lothian et al. (2000) em relato de caso de paciente com doença obstrutiva aérea.

Em adultos infectados pelo HIV-1 a ingestão de concentrado de proteínas de soro do leite nativas (45 g/dia) aumentou significativamente a GSH plasmática em 15 dias e esse efeito se manteve após 6 meses de ingestão (Micke et al., 2001, 2002).

Adicionalmente, a ingestão de 39 g/dia, por 3 meses, resultou em aumento da GSH linfocitária (Bounous et al., 1993).

Em crianças com AIDS, a ingestão de concentrado protéico de soro de leite nativo aumentou a GSH nos linfócitos, após 6 meses, e nos eritrócitos, após 4 meses, além de diminuir a morbidade relacionada à doença (Baruchel et al. 1998, Moreno et al., 2006).

Quando hidrolisadas, as proteínas do soro de leite, inibem a produção de peróxido de lipídios de maneira diferente; quanto maior a massa molecular das frações protéicas, maior sua atividade antioxidante (Tang et al., 2000 apud Pihlanto 2006). O mesmo ocorre para a inibição das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, da sigla em inglês, thiobarbituric acid reactive substance) onde frações com massa molecular superior a 45 kDa apresentam maior inibição (Peña-Ramos et al., 2001). A capacidade antioxidante dessas frações protéicas está relacionada à prevalência de histidina e aminoácidos hidrofóbicos (Pihlanto, 2006).

Entretanto, genericamente, não são observadas relações entre o grau de hidrólise e a atividade antioxidante para diferentes concentrados de proteína de soro de leite hidrolisadas (Pihlanto, 2006).

1.3.2- Mecanismos de modulação

Muitas das alegações de propriedades funcionais fisiológicas dos componentes bioativos do soro de leite foram observados em estudos *in vitro*, com modelos animais ou em estudos com humanos; entretanto ainda devem ser caracterizados os mecanismos pelos quais essas substâncias bioativas direcionam a regulação da imunidade.

Os possíveis mecanismos estimulatórios das proteínas do soro de leite bovino sobre o sistema imune parecem estar relacionados com sua estrutura primária rica em aminoácidos sulfurados, cisteína e grupamentos glutamil-cisteína, precursores da síntese de GSH. Esse poder imunoestimulante parece se estender à síntese de IgA secretória no trato

gastrointestinal e às inter-relações imunológicas entre a microbiota intestinal e o hospedeiro (Bounous et al., 1988; 1989; 1993; Constantino et al., 1989; McIntosh et al., 1995).

A GSH é um tripeptídeo (γ -glutamil-cistinil-glicina) hidrossolúvel de vital importância na proteção celular contra estresse oxidativo, uma vez que é o principal antioxidante intracelular e co-fator de várias enzimas antioxidantes. Possui ação direta como antioxidante na remoção dos peróxidos produzidos durante o metabolismo de toxinas exógenas e do estresse oxidativo. Além disso, mantém outros antioxidantes celulares nas suas formas reduzidas e algumas enzimas antioxidantes nos seus estados reduzidos e ativos (Chantry et al., 1999, McDermid et al., 2002).

É encontrada praticamente em todas as células e sua síntese depende da disponibilidade de seus precursores cisteína e glutamincisteína. A provisão dietética de cisteína livre, entretanto, parece ter efeito limitado na elevação dos níveis teciduais de GSH e, em altas concentrações, pode se tornar tóxica. Um modo mais efetivo de suplementar esses aminoácidos se dá via fonte protéica rica em cisteína, como a encontrada no soro de leite bovino (Bounous et al., 1988; McIntosh et al., 1995; Stella e Postaire, 1995).

Há indícios que a GSH e enzimas associadas desempenhem um papel na imunidade celular. Níveis de GSH em células apresentadoras de antígeno desempenham um papel na direção da resposta para um padrão do tipo “T-helper 1 (Th1)” ou “T-helper 2 (Th2)” (Townsend et al., 2003).

1.4- AIDS

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é decorrente da infecção pelo HIV. O HIV possui a capacidade de subverter a resposta imunológica normal e induzir à disfunção imunológica crônica e progressiva, tornando o indivíduo vulnerável às infecções e doenças consumptivas que podem levá-lo à morte (Davison e Nicoll, 1997).

A maioria das crianças infectadas pelo HIV adquirem a infecção das suas mães através de transmissão perinatal (Wara et al., 1993). A aquisição do HIV durante o nascimento, momento no qual o sistema imunológico ainda não está maduro, resulta em

uma interação vírus-hospedeiro diferente da que ocorre nos adultos (Mc Closkey et al., 2004).

Na infecção perinatal, a progressão rápida é mais freqüente do que nos adultos e acomete entre 10 e 25% das crianças infectadas. Nestas crianças, as manifestações clínicas graves surgem nos primeiros dois anos de vida em consequência do intenso comprometimento do timo, depleção de linfócitos T CD4⁺ além de hipo ou agamaglobulinemia (Blanche, 1989, Rubini, 1999, Feeney et al., 2003).

A progressão intermediária e a lenta ocorrem em 75 a 90% das crianças que permanecem sem depleção significativa da população de linfócitos TCD4⁺ e sem manifestações clínicas da AIDS por 8 ou mais anos após a infecção (Blanche, 1989, Rubini, 1999).

Na criança, a progressão da infecção pelo HIV está associada ao aumento da carga viral e anormalidades quantitativas e qualitativas da imunidade celular, que se caracterizam pela redução da função do timo, do número e função dos linfócitos T CD4⁺, da resposta linfoproliferativa e desregulação da produção de citocinas, todos mais pronunciados nos estágios mais avançados da doença (Wilson et al., 2000; Resino et al., 2001; 2004; Blazevic et al., 2001; Trabattoni et al., 2002; Feeney et al., 2003; Rutstein et al., 2005).

A viremia, em crianças, se mantém elevada por um longo período. Após os 3 a 5 anos de idade ocorre redução da carga viral para os níveis observados nos adultos (Dickover et al., 1994; De Rossi et al., 1996; Feeney et al., 2003; Rutstein et al., 2005).

Muitas das crianças infectadas pelo HIV-1 têm sobrevivido à infância, tornando-se adolescentes e adultos jovens devido ao tratamento com a terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART - highly active antiretroviral therapy), cuja meta tem sido estabilizar e reconstituir a função imune e suprimir ao máximo a replicação viral (Mc Closkey et al., 2004; Rutstein et al., 2005).

Inicialmente, a terapia anti-retroviral baseava-se em monoterapia com zidovudina (AZT), entretanto sua eficácia tinha curto prazo, sendo necessária associação de

drogas. Após o surgimento de novos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos (ITRN), a terapia dupla, constituída pela associação de dois ITRN, foi recomendada. (Englund et al., 1997; McKinney et al., 1998; Paediatric European Network for Treatment of AIDS 1998). Os inibidores da protease (IP), disponibilizados para crianças em 1997, conferiram novas perspectivas para o tratamento da AIDS, pois seu uso no esquema terapêutico demonstrou maior duração da resposta terapêutica, com maior recuperação do número de linfócitos T CD4⁺ e maior redução da carga viral (Englund et al., 1997; Essajee et al., 1999; Gibb 2000). Após a introdução dos inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN), surgiu a terapia tríplice, formada por dois ITRN e um IP ou dois ITRN e um ITRNN, que modificou a evolução da AIDS, aumentando a expectativa de vida de adultos e crianças (Englund et al., 1997; Gibb 2000; Gibb et al., 2000; Martino et al., 2000).

Uma terapia anti-retroviral bem sucedida tem como benefícios controle da viremia, aumento da contagem de linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico e outras evidências de reconstituição imunológica, que pode se traduzir em diminuição da morbidade e mortalidade. Entretanto, pode ocorrer uma restauração incompleta do sistema imune, tornando crítica a questão se essa nova população de células T é totalmente funcional ou não (Knox et al., 2006; Ching et al., 2007; Mc Closkey et al., 2004).

Sendo assim, vários estudos têm sido conduzidos com a finalidade de avaliar a capacidade funcional e características, a longo prazo, da recuperação imune na infecção pelo HIV-1 que ocorrem no sistema imune de crianças infectadas pelo HIV-1 após o início da HAART.

1.4.1- Resposta à Vacinação

Sabe-se que crianças infectadas pelo HIV-1 que receberam vacinas de rotina apresentam menor magnitude da resposta de anticorpos em relação às crianças saudáveis, além disso, apresentam um declínio nos títulos de anticorpos mais rápido, mesmo após o

uso de HAART (Watanaveeradej et al., 2002; Melvin e Mohan 2003; Ching et al., 2007; Montoya et al., 2007).

Zacarelli-Filho et al. (2007) ao avaliarem a produção de anticorpos antígeno-específico para tétano, difteria, sarampo, rubéola e hepatite B em crianças infectadas pelo HIV-1 previamente vacinadas, observaram respostas relativamente fracas, provavelmente em decorrência de um baixo percentual de células T de memória.

1.4.2- Resposta Imune Celular

No estudo de Resino et al. (2004), após 1 ano de HAART, foi observado aumento de células T $CD4^+$ o qual se correlacionava positivamente com aumento dos valores de linfócitos T recém-emigrados do timo (TREC) e valores de T $CD8^+$ *naïve* similares ao observado no grupo controle.

Ao contrário do observado na população adulta, os pacientes pediátricos tendem a apresentar uma expansão preferencial de células T *naïve* após o início de uma HAART bem sucedida. Além disso, nas crianças o restabelecimento da contagem de linfócitos T $CD4^+$ é mais rápido do que nos adultos (Van Rossum et al., 2001; Zacarelli-Filho et al., 2007).

Em adultos infectados pelo HIV, as alterações da contagem de células T $CD4^+$ (a partir dos valores iniciais) após o início da HAART têm valor prognóstico significativo mesmo em pacientes com supressão incompleta da replicação viral (carga viral acima de 500 cópias/ml) (Moore et al., 2006).

Acredita-se que a reconstituição das células T ocorra tanto pela melhora da timopoiese, provavelmente mais operante em crianças mais novas, quanto pela expansão periférica do *pool* de células T existentes, o que provavelmente ocorre em crianças mais velhas. Sendo assim, a reconstituição das células T através da timopoiese está associada ao aumento de células T $CD45RA^+$, enquanto que a expansão periférica está associada às células T $CD45RO^+$ (Van Rossum et al., 2001; Resino et al., 2004).

As células T $\gamma\delta$ residem no epitélio ou mucosa mas também circulam no sangue periférico onde representam entre 0,5 a 15% dos linfócitos T circulantes. Na mucosa gastrointestinal, provêm grande contribuição ao sistema imune associado à mucosa desempenhando importante papel na primeira linha de defesa contra vírus, bactérias e fungos (Imlach et al., 2003; Poles et al., 2003; Alfano e Poli, 2005).

Os primeiros estudos sugerindo uma ligação entre as células T TCR $\gamma\delta$ e micobactéria foram publicados em 1989 quando Janis et al. (1989) descreveram aumento nas células T TCR $\gamma\delta$ em linfonodos de camundongo B10 imunizados com adjuvante completo de Freund. Simultaneamente, foi demonstrado aumento nas células T CD4⁺, CD8⁺ nos pulmões de camundongos Balb/c após a exposição para antígeno derivado protéico purificado (PPD) aerolisado da *Micobacterium tuberculosis* (Augustin et al., 1989). Naquele mesmo ano O'Brien et al., (1989) determinaram um grande painel de hibridomas de células T TCR $\gamma\delta$ que reagiam com o PPD e, a maioria carregava TCR V γ 1/V δ 6. A reatividade destes hibridomas $\gamma\delta$ e as células T TCR $\gamma\delta$ ativadas com adjuvante completo de Freund não foi bloqueada por anticorpos anti MHC classe I e classe II.

Paralelo aos estudos em camundongos, foi estabelecida associação entre micobactéria e resposta das células T TCR $\gamma\delta$ humana. Evidência direta da capacidade da *Micobacterium tuberculosis* em ativar as células T TCR $\gamma\delta$ foi demonstrada por estudos de Kabelitz et al. (1990) os quais determinaram que a maioria das células T TCR $\gamma\delta$ do sangue periférico proliferavam em resposta à preparação de bacilo morto da *Micobacterium tuberculosis*. A subpopulação de T TCR $\gamma\delta$ predominante carregava TCR V γ 9/V δ 2 originado de uma subpopulação T TCR $\gamma\delta$ encontrada no sangue periférico de adultos (Kabelitz et al., 1990).

Por citometria de fluxo, a análise do lavado broncoalveolar e no sangue, o número de células TCR $\gamma\delta$ V γ 9/V δ 2 de pacientes com tuberculose pulmonar estava substancialmente diminuído em comparação a pessoas saudáveis e pacientes com doenças granulomatosas pulmonares não relacionadas. As células TCR $\gamma\delta$ V γ 9/V δ 2 em pacientes com tuberculose foram refratárias à estimulação *in vitro* pelos antígenos da *Micobacterium*

tuberculosis. Estes resultados demonstram forte correlação entre a ausência ou perda de células TCR $\gamma\delta$ V γ 9/V δ 2 e manifestações da doença, consistente com a hipótese de que as células TCR $\gamma\delta$ V γ 9/V δ 2 desempenham um papel na imunidade protetora para o *Micobacterium tuberculosis*. Os mesmo investigadores demonstraram a resposta refratária das células TCR $\gamma\delta$ nos pacientes com tuberculose em decorrência ao aumento da morte celular induzida pelo antígeno através da via Fas-Fas Ligante (Li et al., 1998).

Essas células, que parecem ligar a resposta imune inata à adquirida, influenciam a diferenciação e proliferação das células do epitélio gastrointestinal e o desenvolvimento das células B produtoras de IgA, desempenham papel na liberação de citocinas, principalmente Th1, apresentam efeitos citolíticos, particularmente contra células infectadas com patógenos intracelulares, e exercem papel na tolerância oral (Poles et al., 2003; Imlach et al., 2003; Girardi, 2006).

Diferentes patógenos induzem a expansão das subpopulações específicas das células T $\gamma\delta$. A expansão das células V δ 2 ocorre durante infecção por micobactérias, *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes*, Epstein-Barr vírus (EBV), *Plasmodium*, *Leishmania* e *Salmonella*, enquanto que a expansão da células V δ 1 tem sido descrita durante a infecção por *Borrelia burgdorferi*, citomegalovírus (CMV) e HIV-1 (Poles et al., 2003).

A infecção pelo HIV inibe a atividade citolítica das células T $\gamma\delta$, bem como sua capacidade de proliferar e produzir citocinas Th1 em resposta ao estímulo com *Mycobacterium tuberculosis* (Alfano e Poli, 2005). O diminuição da produção de IFN- γ pelas células T $\gamma\delta$ correlaciona-se à diminuição do número das células T CD4⁺ mas não com os níveis de viremia plasmática e foi associado negativamente às células produtoras de IL-4 e IL-10 (Alfano e Poli, 2005).

Poles et al. (2003) ao estudarem o impacto da infecção pelo HIV-1 sobre as populações dos T $\gamma\delta$ na periferia e mucosa, demonstraram que a infecção está associada à expansão da população V γ 1 e contração da V γ 2 na mucosa e periferia. Essas alterações são

observadas na infecção aguda e persistem através da fase crônica com aparente reversão durante a HAART.

Em relação à proliferação linfocitária, sabe-se que a infecção pelo HIV prejudica a linfoproliferação a mitógenos, antígenos e aloantígenos antes que a depleção de células T CD4⁺ ocorra (Peruzzi et al., 2002; Resino et al., 2003). Resino et al. (2004) observaram que, após um ano de HAART os valores de linfoproliferação de crianças infectadas ao mitógeno *pokeweed* (PWN) foi comparável ao do grupo controle. Sendo assim, acredita-se que a replicação viral seja a principal causa da disfunção imune (Peruzzi et al., 2002; Resino et al., 2004). A melhora da função linfoproliferativa em crianças após o início da HAART também foi observada frente a outros estímulos com anti-CD3 associado ao anti-CD28 e enterotoxina estafilocócica B (Van Rossum et al., 2001; Mc Closkey et al., 2004).

1.4.3- Produção de Citocinas

As citocinas desempenham papel essencial na determinação da magnitude e natureza das respostas imunes direcionadas pelos antígenos e, na patogênese da infecção pelo HIV. Possuem efeito sobre a replicação do HIV e inversamente, nos indivíduos infectados, o HIV interfere na produção de citocinas. Tem sido relatado aumento da produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , TGF- β , interleucina-12 (IL-12) e interleucina 15 (IL-15). A produção ótima dessas citocinas são essenciais não apenas para a defesa inata aos patógenos mas também, para a indução, amplificação e manutenção da imunidade específica (Hober et al., 1999; Ahmad et al., 2002; Ramalingam et al., 2005).

Muitos estudos sugerem que a infecção pelo HIV-1 pode se tornar progressiva quando a produção de citocinas são direcionadas de uma predominância Th1 para uma predominância Th2/Th0 a qual se caracteriza pelo declínio da produção de interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12) e IFN- γ e, pelo aumento da produção de IL-4, IL-6 e IL-10 o que permite a replicação viral. Esse direcionamento é menos acentuado nos estágios assintomáticos e, se torna mais grave com o desenvolvimento dos sinais clínicos e sintomas

da infecção pelo HIV (Hober et al., 1999; Wilson et al., 2000; Ahmad et al., 2002; Ramalingam et al., 2005).

A produção de citocinas Th1 e Th2 tem sido investigada em estudos com crianças infectadas pelo HIV-1, na maioria com finalidade de considerar associações com a progressão da doença. Similarmente ao observado em adultos infectados, na população pediátrica, a infecção pelo HIV tende a estar associada a declínios nas citocinas Th1 e elevação nas citocinas Th2, embora esses perfis não sejam consistentemente observados, uma vez que dependem dos métodos utilizados para a mensuração da produção das citocinas (Kuhn et al., 2001).

Algumas citocinas, tais como, a IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ desempenham um papel bimodal na infecção pelo HIV (Alfano e Poli, 2005).

A IL-4 desempenha importante papel no desenvolvimento da natureza da resposta imune. As células T naïve liberam IL-4 que atua como principal fator de crescimento autócrino para a expansão e ativação das células Th2 que secretam IL-4, IL-5 e IL-6. As citocinas Th2 inibem o desenvolvimento das células Th1 e, conseqüentemente, as respostas imunes mediadas por células. Em relação à infecção pelo HIV, a IL-4 pode diferentemente regular a expressão dos co-receptores para a entrada viral CXCR4 (estímulo) e CCR5 (inibição) (Alfano e Poli, 2005).

A IL-10 é uma citocina secretada, principalmente, pelas células dendríticas e células Th2. Inibe a produção das citocinas proinflamatórias, quimiocinas e a expressão de moléculas co-estimulatórias de células dendríticas e, por isso, inibe a ativação das células T (Alfano e Poli, 2005).

Os efeitos da IL-10 sobre o HIV são dependentes da sua concentração. *In vitro*, têm sido descritos efeitos inibitórios e indutores da replicação viral. A inibição da replicação viral foi correlacionada à prevenção da síntese e liberação de TNF- α e IL-6 endógenas. Entretanto, baixas concentrações de IL-10 resultam na estimulação da replicação viral em monócitos esse efeito, tem sido correlacionado à cooperação com a liberação de TNF- α e IL-6 (Alfano e Poli, 2005).

A interleucina-7 (IL-7) é importante para o desenvolvimento e manutenção da homeostasia dos linfócitos T. No timo, é produzida principalmente pelas células epiteliais locais. Evidências indicam que o contato entre os timócitos e essas células são cruciais tanto para a indução da replicação viral quanto para a proteção dos timócitos da apoptose decorrente da indução da expressão de Bcl-2. (Alfano e Poli, 2005).

In vivo, tem sido observada elevação da IL-7 tanto em indivíduos infectados quanto em crianças expostas ao HIV mas não infectadas. O que sugere que a exposição ao HIV ou a passagem das proteínas virais pela placenta pode perturbar a timopoiese. Há correlação entre os níveis circulantes de IL-7, a perda de células T CD4⁺ e viremia plasmática em adultos (Alfano e Poli, 2005; Resino et al., 2005).

A redução da viremia pela HAART é capaz de reverter a supressão de IL-2 e IFN- γ e, ao mesmo tempo, reduzir a produção de IL-4 e IL-10 (Meira et al., 2004).

Em crianças, após o início da HAART, observa-se que a produção diminuída de TNF- α e IFN- γ em resposta ao estímulo com PHA alcança níveis semelhantes ao observado no grupo controle (Resino et al., 2004).

1.4.4- Sistema Imune de Mucosa

Muitas das infecções oportunistas que acometem os indivíduos infectados pelo HIV envolvem agentes infecciosos que normalmente são checados pelas barreiras mucosas. Entretanto, enquanto muitas das doenças que definem a AIDS podem ser atribuídas à perda da imunidade de mucosa e se manifestam apenas anos após a aquisição do HIV. Muitas das alterações patológicas, tanto estruturais quanto imunológicas, ocorrem na superfície de mucosa desde o início da infecção pelo HIV. Além disso, citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-8 têm sido implicadas na patologia de doenças inflamatórias intestinais. Em relação à enteropatia causada pelo HIV, ativação imunológica local parece desempenhar um papel direcionador, uma vez que altos níveis de mediadores pro-inflamatórios tais como β -quimiocinas IL-6, IL-10 e IFN- γ são encontrados na lâmina própria do cólon de indivíduos infectados pelo HIV. Além disso, o grau de

inflamação no trato gastrointestinal correlaciona-se à replicação viral (Brenchley e Douek, 2007).

Análise fenotípica das células T CD4⁺ do trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis mostram que a maioria das células T do tecido mucoso expressam CCR5 e são bastante permissivas a infecções *in vitro*. Os esquemas antiretrovirais disponíveis reduzem a carga viral plasmática a níveis indetectáveis, resultando em aumento de células T CD4⁺ no sangue periférico. Expecula-se que a replicação viral possa ser diminuída através do organismo e que a reconstituição das células T CD4⁺ observadas no sangue podem espelhar as que se encontram em outros sítios anatômicos. Alguns estudos sobre a enteropatia decorrente da infecção pelo HIV mostram que o vírus desempenha papel central na patologia do trato gastrointestinal e que a HAART pode melhorar a enteropatia (Brenchley e Douek, 2007).

O achado de que 60% das células T CD4⁺ do trato gastrointestinal são infectadas pelo HIV *in vivo* sugere que seja um reservatório de grande magnitude (Brenchley e Douek, 2007).

1.4.5- Glutathione

Indivíduos infectados pelo HIV-1, tanto adultos quanto crianças, apresentam níveis de tióis ácido-solúveis, em particular, a cisteína e a GSH no plasma, leucócitos, eritrócitos e tecido epitelial pulmonar, diminuídos e essa diminuição está relacionada ao estágio da infecção (Quay et al., 1992; Baruchel et al., 1994; Herzenberg et al., 1997; Rodriguez et al., 1998; Jahoor et al., 1999, McDermid et al., 2002).

Pacientes infectados pelo HIV-1 apresentam níveis elevados de glutamato plasmático, o qual inibe competitivamente o sistema de captação de cistina (forma na qual se encontra 90% da cisteína extracelular) pelas células, resultando na limitação de substratos para a síntese de GSH (Sen, 1997). Além disso, os produtos decorrentes da peroxidação lipídica, que aumentam com a progressão da doença, diminuem o conteúdo de

aminoácidos sulfurados, cisteína e metionina, no organismo, uma vez que estes são os mais suscetíveis à oxidação (Staal, 1997).

A produção excessiva de intermediários reativos de oxigênio (ROI), tais como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, pode estar relacionada ao aumento da ativação de leucócitos polimorfonucleares durante infecções ou influenciada pelos efeitos pro-oxidantes do TNF- α produzido pelos macrófagos ativados durante o curso da infecção pelo HIV. As ROI podem destruir as pontes dissulfeto dos ácidos graxos poliinsaturados, levando à peroxidação lipídica resultando em maior dano celular (Allard et al., 1998).

Pacientes infectados pelo HIV apresentam níveis de superóxido dismutase e atividade da glutathione peroxidase aumentada em relação aos indivíduos não infectados (Allard et al., 1998).

A deficiência de antioxidantes nos indivíduos infectados pelo HIV é, provavelmente, decorrente de um aumento da utilização dos micronutrientes antioxidantes devido ao aumento do estresse oxidativo mais do que pela ingestão alimentar inadequada ou má-absorção (Allard et al., 1998).

Estudos *in vitro* mostram que a redução dos níveis intracelulares de GSH diminui a sobrevivência e altera as funções das células T, além de aumentar a replicação do HIV-1, sugerindo uma associação entre a deficiência de GSH e progressão da doença (Herzenberg et al., 1997; Sandstrom et al., 1998; Jahoor et al., 1999).

A depleção da GSH aumenta a produção *in vitro* de TNF- α e a diminuição entre 10 a 30% nos níveis intracelulares de GSH é capaz de suprimir completamente a resposta proliferativa dos linfócitos T (Aukrust e Miller, 1999; Aukrust et al., 2003)

Foi demonstrado que níveis diminuídos de GSH ativam o NF κ B levando a uma cascata de eventos de transdução de sinais que permitem a replicação viral. Ainda, sabe-se que níveis diminuídos de GSH podem contribuir para a indução da apoptose nos linfócitos T CD4⁺ e, são acompanhados por um aumento da fragmentação do DNA nos linfócitos, indicativo de apoptose. (Townsend et al., 2003)

Esses fatores combinados sugerem que a manutenção e restauração dos níveis de GSH têm efeito terapêutico potencial para os indivíduos infectados pelo HIV-1 (Townsend et al., 2003). *In vitro*, foi demonstrado que a N-acetil-cisteína (NAC), agente doador de cisteína, inibiu a replicação do HIV estimulada pelo TNF- α ou pelo forbol miristil acetato (PMA) em cultura de células infectadas pelo HIV. Em estudos realizados por Herzenberg et al. (1997), a restauração dos níveis de tiol das células T pela suplementação com NAC, esteve associada a maior sobrevida dos pacientes (Roederer et al., 1990).

1.4.6- Estado Nutricional na AIDS

Além do acometimento do sistema imunológico, a infecção pelo HIV-1 interfere no estado nutricional. A maioria das crianças infectadas por transmissão vertical apresenta deficiência do crescimento logo após o nascimento (Agostoni et al., 1998; Leandro-Merhi et al., 2001).

Saavedra et al. (1995), observaram que crianças infectadas pelo HIV-1 apresentavam crescimento e ganho de peso constantemente abaixo da mediana dos padrões de referência propostos pelo *National Center for Health Statistics* (NCHS, 1977), porém essa deficiência não alterou o perímetro cefálico.

No Estudo Colaborativo Europeu (*European Collaborative Study*) observou-se que a altura e o peso não se associam significativamente os principais efeitos da infecção pelo HIV-1 no nascimento; entretanto, as diferenças entre crianças infectadas e não infectadas aumentam com a idade. As crianças infectadas eram mais baixas e leves do que as não infectadas (*European Collaborative Study*, 2003).

O padrão de crescimento observado nas crianças infectadas assintomáticas foi similar ao observado nas crianças com sintomas leves ou moderados. Entretanto, as crianças com sintomas graves apresentam comprometimento do crescimento em todas as idades (*European Collaborative Study*, 2003). A HAART tem influência positiva sobre o crescimento de crianças infectadas pelo HIV-1 (Verweel et al., 2002).

A carga viral elevada e sintomas relacionados à infecção pelo HIV-1 são as principais causas que levam ao déficit do crescimento. Outros possíveis mecanismos são a ingestão inadequada, a diminuição na absorção dos nutrientes (má-absorção de carboidratos), a desregulação metabólica, como a diminuição do hormônio do crescimento (gH), (Saavedra et al., 1995; Mannick et al., 1996; Johann-Liang et al., 2000; Arpadi et al., 2000; *European Collaborative Study* 2003).

Os primeiros estudos sobre a composição corporal de pacientes infectados pelo HIV-1 sugeriam que a perda de peso associada à infecção se caracterizaria pela diminuição do tecido muscular e economia do tecido adiposo. Estudos recentes têm encontrado resultados consistentes mostrando que a perda de peso é dependente da composição corporal padrão (Mulligan e Bloch, 1998; Canals e Soler, 1999).

Em relação à influência da terapia anti-retroviral sobre a composição corporal, a maioria dos pacientes apresenta ganho de peso. As principais alterações observadas são na distribuição da gordura, manifestada clinicamente pelo aumento da circunferência abdominal ou afinamento dos braços, pernas e face. Segundo Kotler et al. (1999), essas alterações não são decorrentes apenas da terapia anti-retroviral, mas também da sobrecarga viral, podendo ser uma manifestação de hipercortisolismo crônico.

Segundo Canals e Soler (1999), a ingestão calórica encontra-se diminuída ao redor de 36% em pacientes infectados pelo HIV-1. A inadequação na ingestão de nutrientes também foi observada por Castetbon et al. (1997), em estudo realizado em Abidjan, África, onde foram utilizadas como parâmetro, as recomendações propostas pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 1995).

Atualmente o principal foco de atenção aos indivíduos infectados pelo HIV-1 é dar sustentabilidade à prevenção primária e controlar o impacto da AIDS sobre a saúde. A nutrição constitui um imenso potencial para prevenir a gravidade da infecção pelo HIV, através de práticas de educação de saúde pública e também de intervenção. Recentemente foi mostrado que a suplementação com um concentrado de proteínas do soro de leite, rico em aminoácidos sulfurados como fonte para gerar GSH poderia ser uma estratégia para modificar o curso da infecção pelo HIV na criança (Moreno et al, 2006).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Caracterizar o estado nutricional e a resposta celular para a vacina *Bacilo de Calmette Guérin* (BCG) em crianças infectadas pelo HIV-1, sob HAART, antes e 3 meses após a introdução de suplemento alimentar contendo proteínas do soro de leite bovino nativas, hidrolisadas ou enriquecidas com pré-bióticos.

2.2- Objetivos Específicos

1. Caracterizar a memória imunológica para a vacina BCG de crianças infectadas pelo HIV-1.
2. Avaliar a influência da suplementação alimentar com proteínas do soro de leite bovino, nativas, hidrolisadas ou enriquecidas com pré-bióticos sobre:
 - a adequação da ingestão energética;
 - o restabelecimento do estado nutricional;
 - o sistema antioxidante da glutathiona;
 - a proliferação de linfócitos T e a sua produção de citocinas em resposta à BCG;
 - a evolução virológica e imunológica da AIDS, avaliada pela carga viral e contagem de TCD4⁺.

3- HIPÓTESES

As hipóteses de estudo, enunciadas na forma de hipótese alternativa, são:

1. A suplementação alimentar contendo proteínas do soro de leite bovino nativas possui ação sobre o sistema imune de crianças infectadas pelo HIV-1.
2. A suplementação alimentar contendo proteínas do soro de leite bovino hidrolisadas possui ação sobre o sistema imune de crianças infectadas pelo HIV-1.
3. A suplementação alimentar contendo proteínas do soro de leite bovino enriquecidas com pré-bióticos possui ação sobre o sistema imune de crianças infectadas pelo HIV-1.
4. A suplementação alimentar oral é capaz de melhorar o estado nutricional de crianças com AIDS.
5. A suplementação alimentar oral é capaz de melhorar a evolução virológica e imunológica de crianças infectadas pelo HIV-1.

4- MÉTODOS

4.1- Delineamento do Estudo

Ensaio clínico prospectivo, duplo-cego, com duração de 3 meses, conduzido entre julho de 2006 a junho de 2007.

Foram realizadas duas avaliações nutricionais e imunológicas, no início da intervenção (Tempo 1) e no final da intervenção (Tempo 2).

4.2- População

Inicialmente foram selecionadas 52 crianças infectadas pelo HIV-1 sob seguimento clínico no Serviço de Imunodeficiência Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), localizada na cidade de Campinas, no estado de São Paulo, Brasil.

Os critérios de inclusão dos pacientes foram:

- idade entre 2 e 18 anos,
- ambos os gêneros,
- infecção por transmissão vertical,
- pertencentes às categorias clínicas A, B ou C e categorias imunológicas 2 ou 3 (CDC, 1994),
- com boa aderência à terapia HAART há pelo menos 6 meses,
- vacinado com a BCG e três doses de hepatite B,
- não estar sob terapia com gamaglobulina endovenosa,
- sem manifestações clínicas de alergia às proteínas do leite bovino, intolerância à lactose ou de doença inflamatória intestinal crônica.

Posteriormente, essas crianças foram convidadas para participar do ensaio clínico de suplementação alimentar e destas, 40 iniciaram o estudo.

O grupo de comparação, para a avaliação imunológica, foi composto por 11 crianças expostas verticalmente ao HIV-1 e não infectadas, cujos critérios de inclusão foram:

- idade entre 2 e 10 anos,
- ambos os gêneros,
- vacinado com a BCG e três doses de hepatite B.

4.3- Suplementos Alimentares

Foram ofertados três suplementos alimentares calóricos e protéicos. Os suplementos diferiram quanto à estrutura das proteínas (nativas ou hidrolisadas) e ao acréscimo de fruto-oligossacarídes e inulina a um dos suplementos. A composição centesimal dos suplementos alimentares encontra-se na Tabela 3.

O conteúdo protéico do suplemento Hidrolisado (**Peptamen® Júnior**, Nestlé Suisse S.A. Konolfingen, Suíça) é composto apenas por proteínas do soro de leite bovino hidrolisadas por tripsina. Quanto ao conteúdo de carboidratos, 77% é proveniente de polissacarídes e 23% de sacarose. Triglicerídeos de cadeia média (TCM) correspondem a 60% das fontes de gordura, as outras fontes são: 24% de óleo de soja, 7% de óleo de girassol, 6% de lecitina de soja e, 3% de gordura láctea.

Os ingredientes que compõem o suplemento hidrolisado são: proteínas de soro do leite hidrolisadas, maltodextrina, sacarose, amido, TCM, óleo de soja, óleo de girassol, lecitina de soja, fosfato de cálcio, fosfato de potássio, fosfato de sódio, vitaminas (vitamina C, taurina, vitamina E, vitamina PP, ácido pantotênico, betacaroteno, vitamina B₆, vitamina B₁, vitamina B₂, vitamina A, ácido fólico, biotina, vitamina D e vitamina K), cloreto de potássio, cloreto de sódio, minerais (zinco, ferro, manganês, cobre, cromo, selênio, molibdênio e iodo), bitartarato de colina, cloreto de magnésio, L-Carnitina e aromatizante.

O conteúdo protéico do suplemento Nativo (**Nutren® Júnior**, Nestlé Suisse S.A. Konolfingen, Suíça) é composto por 50% de caseinato de potássio e 50% de proteínas do soro de leite. As fontes de carboidratos presentes neste suplemento são: maltodextrina (66%) e sacarose (34%). Em relação às fontes de gordura, o suplemento Nativo é composto por óleo de girassol (41%), óleo de canola (25%), TCM (20%), óleo de milho (7%), lecitina de soja (5%) e, gordura láctea (2%).

Os ingredientes que compõem o suplemento Nativo são: proteínas do soro do leite, caseinato de potássio, sacarose, maltodextrina, xarope de milho, óleo de girassol, óleo de canola, TCM, óleo de milho, lecitina de soja, fosfato de potássio, citrato de cálcio, carbonato de cálcio, fosfato de sódio, cloreto de cálcio, vitaminas (vitamina A, betacaroteno, vitamina D, vitamina E, vitamina K, vitamina C, vitamina B₁, vitamina B₂, niacina, vitamina B₆, ácido fólico, ácido pantotênico, biotina e taurina), bitartarato de colina, cloreto de magnésio, minerais (zinco, ferro, cobre, cromo, molibdênio e iodo), L-Carnitina e aromatizante.

O conteúdo protéico do suplemento Pré-biótico (**Nutren® Fibras**, Nestlé Suisse S.A. Konolfingen, Suíça) é composto por 50% de caseinato de potássio e 50% de proteínas do soro de leite. As fontes de carboidratos presentes neste suplemento são: polissacarídeos (82%) e sacarose (18%). Em relação às fontes de gordura, o suplemento Pré-biótico é composto por óleo de canola (50%), TCM (25%), óleo de milho (16%) e, lecitina de soja (6%). Como fonte de pré-bióticos, o suplemento é composto por fibras da parte interna e externa de ervilha e frutooligossacarídeos.

Os ingredientes que compõem o suplemento Pré-biótico são: caseinato de potássio, proteína do soro hidrolisada, maltodextrina, xarope de milho, sacarose, óleo de canola, fibra de ervilha, frutooligossacarídeos, TCM, óleo de milho, lecitina de soja, fosfato de sódio, fosfato de potássio, vitaminas (vitamina C, vitamina PP, vitamina E, ácido pantotênico, vitamina B₆, vitamina A, vitamina B₁, ácido fólico, biotina, vitamina D, vitamina K, vitamina B₁₂), cloreto de magnésio, carbonato de cálcio, bitartarato de colina, cloreto de cálcio, minerais (ferro, cobre, zinco, cromo e molibdênio), L-Carnitina, acidulante ácido cítrico e aromatizante.

Tabela 3- Composição centesimal e distribuição energética dos suplementos alimentares fornecidos às crianças infectadas pelo HIV-1.

Nutrientes	Suplemento Alimentar		
	Hidrolisado ¹	Nativo ²	Pré-biótico ³
Energia (kcal)	460 / 253 ⁴	470 / 258,5	430 / 249,4
Carboidratos (g)	63 / 34,65	62 / 34,1	54 / 31,32
Proteínas (g)	14 / 7,7	14 / 7,7	17 / 9,86
Gorduras totais (g)	17 / 9,35	18 / 9,9	16 / 9,28
Gorduras saturadas (g)	11 / 6,05	5 / 2,75	5 / 2,9
Colesterol (mg)	20 / 11	15 / 8,25	0 / 0
Fibra alimentar (g)	0 / 0	0 / 0	7 / 4,06
Cálcio (mg)	417 / 229,35	417 / 229,35	290 / 168,2
Ferro (mg)	4,6 / 2,53	4,7 / 2,585	5,2 / 3,016
Sódio (mg)	300 / 165	220 / 121	380 / 220,4
Potássio (mg)	615 / 338,25	500 / 275	540 / 313,2
Cloreto (mg)	370 / 203,5	370 / 203,5	515 / 298,7
Fósforo (mg)	278 / 152,9	278 / 152,9	290 / 168,2
Magnésio (mg)	53 / 29,15	53 / 29,15	115 / 66,7
Iodo (µg)	41 / 22,55	37 / 20,35	43 / 24,94
Cobre (mg)	0,37 / 0,20	0,37 / 0,20	0,6 / 0,348
Zinco (mg)	4,60 / 2,53	4,7 / 2,58	6 / 3,48
Manganês (mg)	0,55 / 0,30	0,23 / 0,12	1,16 / 0,67
Selênio (µg)	14 / 7,7	12 / 6,6	17 / 9,86
Molibdênio (µg)	30 / 16,5	16 / 8,8	52 / 30,16
Cromo (µg)	11 / 6,05	12 / 6,6	17 / 9,86
Vitamina A (µg RE)	210 / 115,5	350 / 192,5	520 / 301,6
Vitamina D (µg)	4,60 / 2,53	4,7 / 2,58	3 / 1,74
Vitamina E (mg α TE)	4,60 / 2,53	4,6 / 2,53	8 / 4,64
Vitamina K (µg)	18 / 9,9	19 / 10,45	21 / 12,18
Vitamina C (mg)	37 / 20,35	37 / 20,35	60 / 34,8
Tiamina (B1) (mg)	0,46 / 0,25	0,28 / 0,15	0,86 / 0,49
Riboflavina (B2) (mg)	0,46 / 0,25	0,37 / 0,20	1 / 0,58
Niacina (PP) (mg)	2,7 / 1,48	2,8 / 1,54	12 / 6,96
Vitamina B6	0,37 / 0,20	0,37 / 0,20	1,7 / 0,98
Ácido Fólico (µg)	91 / 50,05	93 / 51,15	230 / 133,4
Ácido Pantotênico (mg)	1,40 / 0,77	1,4 / 0,77	6 / 3,48
Vitamina B12 (µg)	0,7 / 0,38	0,7 / 0,385	3,4 / 1,97
Biotina (µg)	16 / 8,8	7 / 3,85	170 / 98,6
Colina (mg)	110 / 60,5	120 / 66	190 / 110,2
Taurina (mg)	37 / 20,35	37 / 20,35	34 / 19,72
L-Carnitina (mg)	18 / 9,9	19 / 10,45	34 / 19,72
Distribuição Energética			
Proteína (%)	12	12	16
Carboidrato (%)	54	53	50
Gordura (%)	34	35	34

Fonte: Manual produtos Nestlé, <http://www.nestle.com.br/healthcarenutrition/htm/manual/manual.pdf>. ¹ nome comercial **Peptamen® Júnior** (Nestlé Suisse S.A. Konolfingen, Suíça), ² nome comercial **Nutren® Júnior** (Nestlé Suisse S.A. Konolfingen, Suíça), ³ nome comercial **Nutren® Fibras** (Nestlé Suisse S.A. Konolfingen, Suíça), ⁴ Valores referentes à dose ofertada para cada paciente.

Em relação à apresentação dos suplementos, todos os produtos foram fornecidos em latas contendo 400 g dos produtos em pó.

As latas dos suplementos foram devidamente embaladas com laminados de policloreto de vinila (PVC) auto-adesivo, coloridos e opacos (Vulcan Material Plástico Ltda, Rio de Janeiro, Brasil), por indivíduos que não participaram da seleção e distribuição dos suplementos às crianças.

4.4- Suplementação Alimentar

Após a seleção, a população foi dividida aleatoriamente em três grupos distintos. Ao primeiro grupo foi oferecida suplementação alimentar oral com o suplemento Hidrolisado, ao segundo grupo, foi oferecido o suplemento alimentar contendo Nativo e, ao terceiro grupo foi oferecido o suplemento alimentar Pré-biótico.

Os suplementos alimentares foram administrados ao longo de 3 meses, uma ou duas vezes ao dia, conforme a tolerância da criança, em horários que não coincidissem com a terapia anti-retroviral. Os responsáveis foram cuidadosamente orientados quanto à diluição (7 medidas, fornecidas pelo fabricante que correspondiam a 58g do suplemento Pré-Biótico e a 55g para o Hidrolisado e o Nativo). A ingestão foi reavaliada mensalmente.

A oferta dos suplementos baseou-se no seu conteúdo calórico, uma vez que resultados anteriores mostraram que a população estudada apresentava um déficit mediano de 200 calorias diárias, segundo recomendações propostas pelo *Recommended Dietary Allowances* (RDA, 1989). Sendo assim, por questões referentes à padronização do fornecimento dos produtos a quantidade de suplemento oferecida correspondeu à 250 mL de produto preparado que equivalia em média a 250 kcal. Em relação a suplementação com pré-biótico, foi ofertada 3,75 g por dia.

A suplementação foi imediatamente interrompida nos casos nos quais as crianças apresentaram manifestações de intolerância gastrointestinal.

A avaliação nutricional e a imunológica foram realizadas no início da suplementação alimentar e, ao final das 12 semanas, conforme descrição a seguir.

4.5- Avaliação Nutricional

4.5.1- Antropometria e Composição Corporal

Determinadas pela obtenção do peso, altura, perímetro braquial, pregas cutâneas do tríceps e subescapular, conforme brevemente descrito a seguir.

A medida do peso foi realizada em balança digital vertical (Personal Line[®], Filizola, São Paulo, SP, Brasil), com aproximação de 0,1 kg. As crianças estavam vestindo roupas leves e sem sapatos. A altura foi obtida em estadiômetro de madeira, o qual possuía régua graduada em centímetros (aproximação de 0,1 cm). A técnica adotada para a coleta das medidas baseou-se nas recomendações propostas pelo *Anthropometric Standardization Reference Manual* (Lohman et al., 1988).

Com os dados do peso e altura foi calculado o índice de massa corporal (IMC) que é a relação entre o peso e o quadrado da altura (kg/m^2).

Os escores Z dos índices antropométricos peso/idade, altura/idade e do IMC foram calculados utilizando os dados de referência propostos pelo National Center for Health Statistics (NCHS, 2000), conforme a seguinte relação:

$$\text{escore } Z = \frac{\text{valor individual medido} - \text{valor da média do padrão de referência}}{\text{desvio padrão da população de referência (NCHS)}}$$

Os escores Z foram calculados com o programa Siscred (*Siscred* - Sistema para Análise de Dados Antropométricos desenvolvido por Morcillo, Lemos-Marini e Guimarey, 2003, Campinas, SP, Brasil).

Para verificar a presença ou não da desnutrição energético-proteica, bem como sua gravidade, foi adotada a seguinte classificação para os índices antropométricos: normal (escore Z entre 1 a -1), leve (escore Z entre -1,1 a -2), moderada (escore Z entre -2,1 a 3) e, grave (escore Z inferior a -3) (Organização Mundial da Saúde – OMS, 1995).

A composição corporal foi determinada pela obtenção do perímetro braquial e das pregas cutâneas.

O perímetro braquial foi obtido com fita métrica não extensível, milimetrada de acordo com o procedimento descrito em Lohman et al. (1988).

As pregas cutâneas do tríceps e subescapular foram medidas com um compasso de dobras cutâneas *Lange* (*Lange Skinfold Caliper, PAT NO. 3,008,239; Beta Technology Incorporated Cambridge, Maryland, USA*) (Kotler et al. 1999) conforme procedimento descrito em Lohman et al. (1988). A tomada das pregas foi efetuada sob forma de rodízio com três repetições visando diminuir o erro de medição. O valor adotado foi o da média aritmética entre as medidas tomadas (Vasconcelos, 1995).

Com os valores obtidos da prega cutânea do tríceps e o perímetro braquial foram calculadas a área muscular do braço (AMB) e a área adiposa do braço (AAB) segundo fórmulas propostas por Frisancho (1989).

O somatório das pregas cutâneas foi determinado utilizando-se os valores das pregas cutâneas do tríceps, bíceps, subscapular e suprailíaca (Frisancho, 1993).

Os escores Z do perímetro braquial, das pregas cutâneas do tríceps e subescapular, do somatório de pregas cutâneas, da área muscular braquial e área gordurosa braquial foram calculados utilizando como valores de referência descritos por Frisancho (1993) com o mesmo programa utilizado para calcular os escores Z dos índices antropométricos.

O estado nutricional e a composição corporal foram avaliados antes da intervenção e no encerramento do ensaio clínico.

4.5.2- Ingestão Alimentar

A ingestão energética e a protéica foram estimadas através do inquérito alimentar Recordatório 24 horas.

Foi solicitado aos responsáveis pelos participantes o registro do consumo alimentar. No registro, deveriam ser descritos todos os alimentos ingeridos durante três dias semanais típicos, sendo um dia pertencente ao final de semana e dois durante a semana (Pichard et al. 1998; Johann-Liang et al. 2000).

Os cálculos nutricionais foram realizados a partir do Programa de Apoio à Nutrição® (v. 1.5, 2002, Departamento de Informática em Saúde, DIS, UNIFESP/EPM, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP) e a sua adequação foi avaliada pela RDA (1989) ajustadas para gênero e idade.

4.6- Avaliação Imunológica

4.6.1- Coleta das Amostras Biológicas

Foram coletados 20 mL de sangue venoso periférico por técnicas padrão em tubos adequados para cada procedimento realizado, no período da manhã, preferencialmente em jejum, sendo tomados cuidados a fim de evitar a hemólise das amostras.

As coletas foram realizadas na Seção de Coleta da Patologia Clínica do Hospital das Clínicas, UNICAMP.

4.6.2- Hemograma

Foi realizado a partir de 0,5mL de sangue periférico coletado em tubo com EDTA (Vacuette®, Greiner, Americana, SP, Brasil), na Seção de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas, UNICAMP.

A contagem de células global e diferencial realizada no aparelho Cobas-Argos 5 Diff, Roche Diagnostics. A confirmação e a caracterização das anormalidades celulares foram realizadas em esfregaços de sangue corados com May-Grünwald, e a contagem, em microscópios Zeiss.

4.6.3- Contagem Absoluta dos Linfócitos T

A contagem de células da subpopulação de linfócitos T CD4+ e CD8+ foi realizada por citometria de fluxo, no laboratório de AIDS do Hospital de Clínicas da Unicamp (FACS Count® Becton Dickson & CO, Rutherford, NJ).

4.6.4- Fenotipagem dos Linfócitos T

Foi realizada a partir de 500 μ L de sangue periférico total coletado em frasco com EDTA (Vacuette, Brasil).

Primeiramente, 100 μ L de sangue total foram incubados com anticorpos monoclonais de camundongo anti-CD3-PC5, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC ou anti-CD45RO-PE e anti-TCR pan $\gamma\delta$ -PE (Beckman-Coulter, EUA) por 20 minutos a 4°C, protegidos da luz. A seguir, as hemáceas foram lisadas com uma solução de cloreto de amônio (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 10mM e EDTA 4Na 37mg/L). Após lavagem com tampão de lavagem (PBS acrescido de 1% de soro bovino fetal inativado pelo calor e 0,1% de azida sódica), as células foram ressuspensas no mesmo tampão e a leitura foi realizada em citômetro de fluxo Coulter XL-MCL (Beckman-Coulter, EUA). Foram adquiridos 20.000 eventos para posterior análise no programa computacional *EXPO* 1.0 (Beckman-Coulter, Flórida, EUA) conforme descrito na Figura 1.

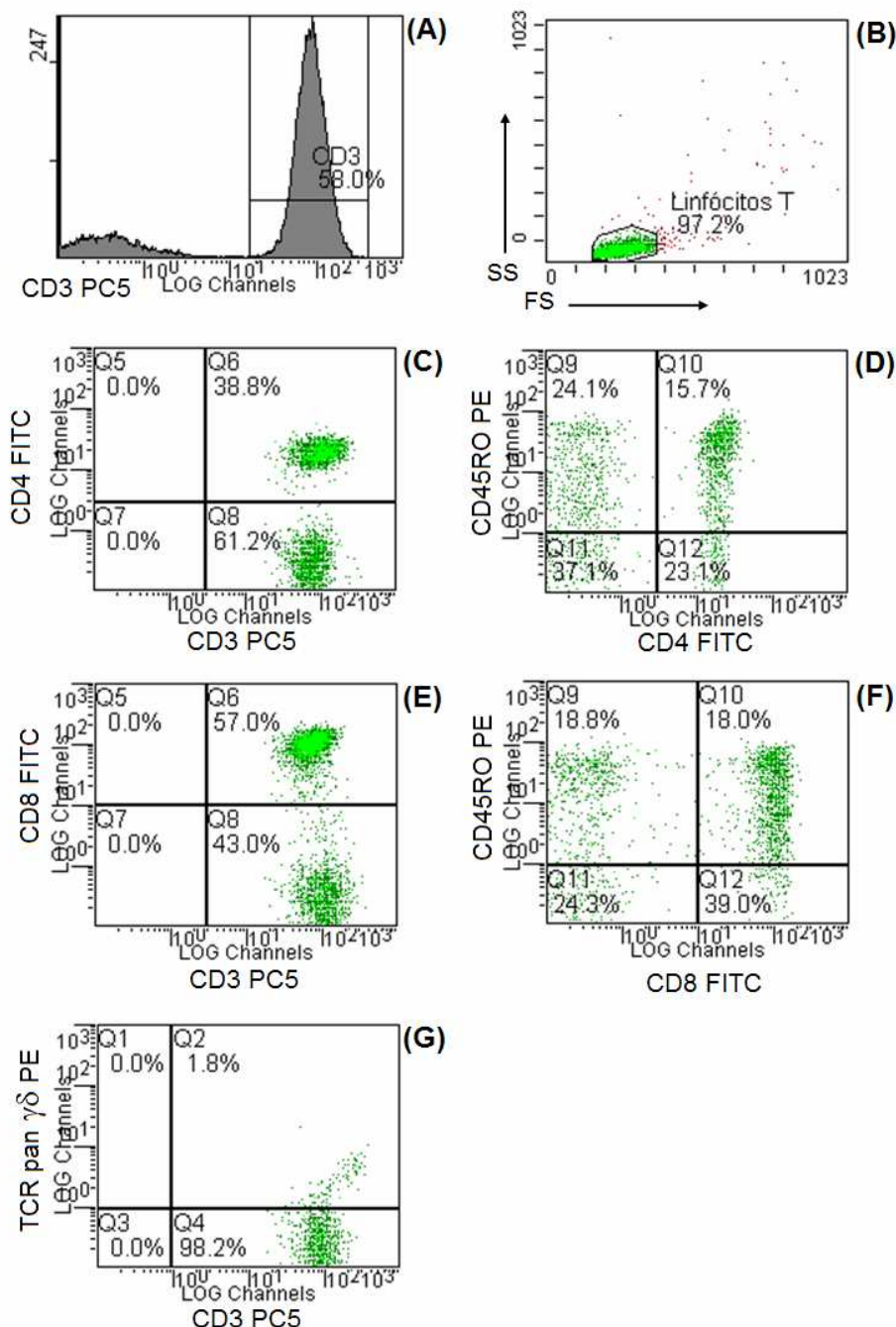


Figura 1- Figura representativa da análise, por citometria de fluxo, da fenotipagem dos linfócitos T de sangue periférico de crianças expostas e infectadas pelo HIV-1. Após a seleção das células $CD3^+$ (A), os eventos foram analisados por tamanho e complexidade (FS e SS) (B) e, as subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ (C), $CD4^+CD45RO^+$ (D), $CD8^+$ (E), $CD8^+CD45RO^+$ (F), e $TCR\delta\gamma^+$ (G) foram avaliadas.

4.6.5- Proliferação Linfocitária

O ensaio de proliferação foi realizado a partir de 18 mL de sangue total periférico coletado em tubo heparinizado (Vacuette, Brasil), modificado do protocolo de Gaines *et al.* (1996).

A fitohemaglutinina (PHA), na concentração de 7,5 µg/mL (Sigma, EUA), foi utilizada como controle positivo; o meio de cultura completo (meio RPMI 1640 (Sigma, EUA), acrescido de 1% de glutamina (Sigma, EUA), 0,1% de gentamicina e 10% de soro AB humano (Sigma, EUA) inativado como controle negativo. A vacina de BCG Moreau Rio de Janeiro liofilizada (Instituto Butantan, SP, Brasil), após reconstituída com meio RPMI 1640, foi usada na concentração ótima de 5×10^5 UFC/mL.

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas através da centrifugação com um gradiente de densidade, Ficoll-Hypaque 17-1440-02 (Amersham Biosciences, EUA), por 20 minutos a 1800 rpm, com posterior lavagem e ressuspensão em meio de cultura completo RPMI.

As células foram cultivadas na concentração de 1×10^6 células/mL em placas de poliestireno de 96 poços com fundo arredondado (Nuclon, NUNC™, Dinamarca) em incubadora (CH-33M, Hitachi, Japão) a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ durante seis dias.

A suspensão de células recuperada, aproximadamente 1 mL, foi incubada com 50 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 20mM por 15 minutos, para desfazer possíveis agregados celulares (Sigma, EUA) e lavada com solução de lavagem (solução salina tamponada com fosfato, com 2% de soro bovino fetal (SBF) inativado pelo calor (Nutricell, SP, Brasil) e 0,1% de azida sódica) a 2200 rpm à temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, a suspensão foi incubada com 20 µL de imunoglobulina G humana (Bläusiegel, Alemanha), para bloquear os sítios Fc e, em seguida, incubada com anticorpos anti-CD3 (conjugado ao fluorocromo cooperativo ficoeritrina -PC5), anti-CD4 (conjugado a ficoeritrina - RD1), anti-CD8 (conjugado a isotiocianato de fluoresceína - FITC) (Beckman Coulter, EUA) e anti-CD3-PC5 (Beckman Coulter, EUA) e

anti-TCR pan $\gamma\delta$ (conjugado a ficoeritrina - PE) (Immunotech, Beckman Coulter, France), por 20 minutos, em ambiente escuro a 4°C. Após centrifugação com tampão de lavagem a 2200rpm, foi efetuada a leitura no citômetro de fluxo Coulter XL-MCL (Beckman-Coulter, EUA).

A leitura das amostras foi realizada com aquisição de 25.000 a 50.000 eventos. Os resultados obtidos foram armazenados em arquivos FCS II e posteriormente analisados com o auxílio do programa computacional *EXPO* 1.0 (Beckman-Coulter, Flórida, EUA).

Após estabelecer a região (*gate*) de células CD3⁺, os linfócitos pequenos (*resting lymphocytes*) e blásticos foram identificados por observação em *forward* (tamanho celular) e *side light* (complexidade interna) *scatters*. As regiões foram inicialmente otimizadas e após utilizadas para todas as análises (Figura 2).

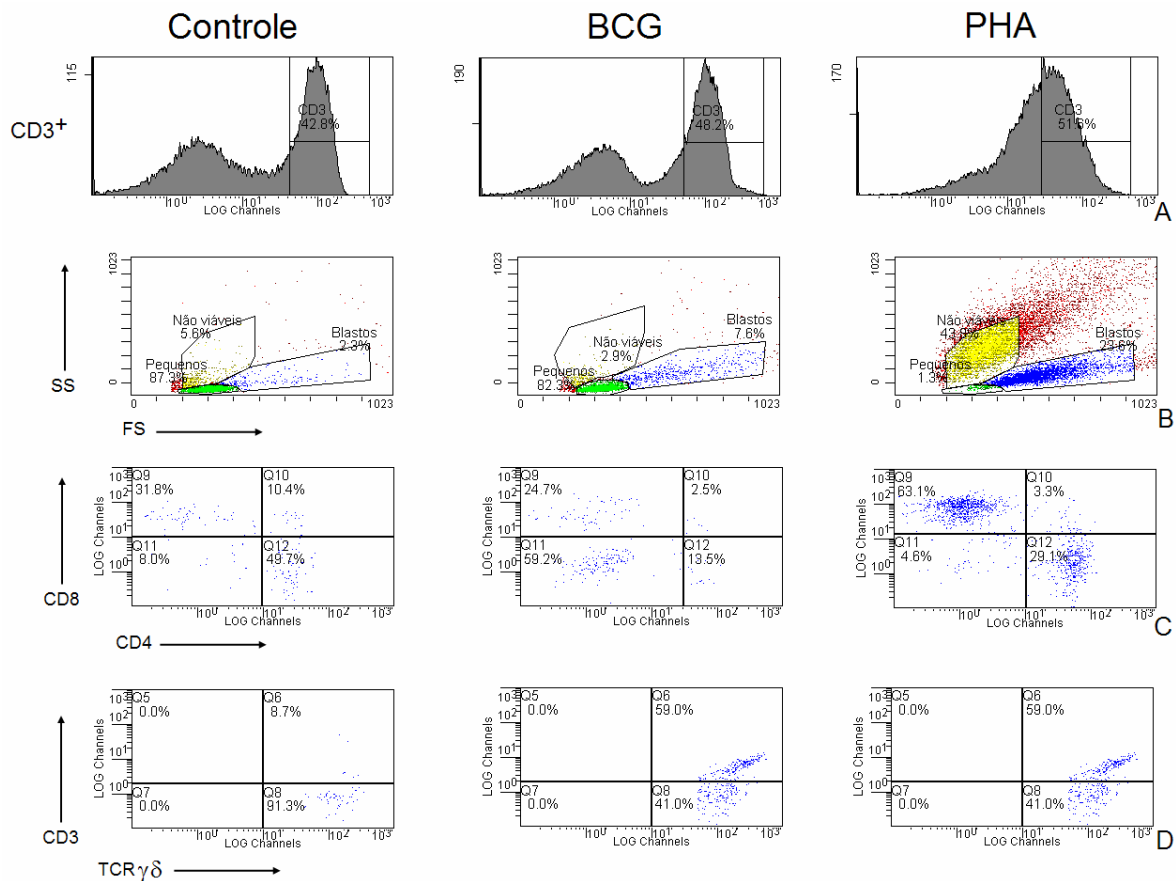


Figura 2- Figura representativa da análise, por citometria de fluxo, da proliferação linfocitária de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas (controle) e estimuladas por BCG e PHA de crianças expostas e infectadas pelo HIV-1. Após a seleção das células CD3⁺ (A), os eventos foram analisados por tamanho e complexidade (FS e SS) e, os linfócitos pequenos (resting) e linfoblastos foram separados (B). As subpopulações de linfócitos T (CD4⁺, CD8⁺ e TCRγδ⁺) foram avaliadas nos linfoblastos (C, D).

A proliferação linfocitária (percentual de linfoblastos específicos) foi medida pelo percentual de células blásticas CD3⁺ conforme descrito a seguir. O percentual de blastos específicos para o BCG e a PHA foram calculados através da subtração entre os valores dos percentuais de linfoblastos observados nas culturas estimuladas e os valores dos percentuais de linfoblastos observados nas culturas não estimuladas.

$$\text{Proliferação Linfocitária} = \frac{\text{células no gate de blastos}}{\text{células no gate de blastos} + \text{células no gate de linfócitos}} \times 100\%$$

4.6.6- Dosagem de Citocinas em Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico

A partir da cultura de CMSP, conforme protocolo acima descrito, a análise da produção de citocinas no sobrenadante foi realizada da seguinte maneira.

As células, na concentração de 2 x 10⁶ células/mL, foram cultivadas em placas de poliestireno de 96 poços com fundo arredondado (Nuclon, NUNCTM, Dinamarca) em incubadora (CH-33M, Hitachi, Japão) a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas.

Os antígenos foram utilizados nas mesmas concentrações descritas no ensaio de proliferação linfocitária. O sobrenadante de cultura foi armazenado a –80°C até a realização do ensaio de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

Para as dosagens de Interferon gama (IFN-γ), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-α), Interleucina 10 (IL-10) e Interleucina 4 (IL-4) foram utilizados Kits comerciais (DuoSet, RD Systems, EUA). Os ensaios foram realizados em placas MultiSorp (Nunc, Dinamarca) conforme os protocolos do fabricante. Brevemente, as placas foram incubadas com anticorpos de captura e, após bloqueio, submetidas à incubação com amostras e diluições do padrão recombinante do *Kit*. Em seguida, incubadas com anticorpos de detecção, conjugados à biotina. A incubação seguinte ocorre com uma solução de streptoavidina conjugada à peroxidase. A revelação da reação foi feita com peróxido de

hidrogênio e 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB) e a interrupção ocorreu com a adição de H₂SO₄ 2N. A leitura foi realizada em 450 nm. O limite de detecção de IFN- γ , TNF- α e IL-4 foi de 15,6 pg/mL e o de IL-10 foi de 46,9pg/mL.

Em todos os ensaios foi estabelecida uma curva padrão com gráfico de dispersão no qual a variável X foi a densidade óptica obtida nas leituras e Y, a concentração das citocinas. A equação da figura do gráfico foi gerada através de uma linha de tendência polinomial, e aceitas apenas quando o r^2 fosse maior que 0,98. Para este cálculo foi utilizado o programa Microsoft Excel versão 2002 (Microsoft Corporation, EUA). As amostras e pontos da curva padrão foram realizados em duplicata. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.6.7- Dosagem de Anticorpos Anti-HBs

As amostras foram coletadas em tubo seco (Vacuette, Brasil), centrifugadas, aliquotadas, identificadas e armazenadas em freezer a -80°C até o processamento dos testes imunoenzimáticos (MEIA, metodologia de enzimaímunoensaio de micropartículas) utilizando o reagente comercial padronizado (AUSAB, Abbott Laboratories, Alemanha).

A dosagem de anticorpos anti-HBs foram realizadas na Seção de Imunologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas, UNICAMP.

Os títulos geométricos de anti-HBs foram expressos em micro unidades internacionais por mililitro (mUI/mL). A soroproteção foi definida de acordo com a literatura como títulos iguais ou acima de 10 mUI/mL (André, 1990).

4.6.8- Glutathiona Eritrocitária

A concentração de GSH reduzida nos eritrócitos foi determinada por espectrofotometria através do método de Beutler et al. (1986) modificado por Penna (1995).

Os eritrócitos de sangue periférico, coletados em todos com EDTA (Vacuette, Brasil), foram lisados com água destilada e, em seguida, as proteínas presentes foram desnaturadas com solução de ácido metafosfórico glacial (1,67g/100mL). Após

incubação por 5 minutos, a solução foi filtrada em papel filtro Whatman n.1. Foi acrescentado a 1 mL do filtrado, 4 mL de fosfato de sódio 0,3M. Após leitura em espectrofotômetro a 412 nm (DO1), foi adicionado 100 µL de solução de 5,5'-dithiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) e, obtida uma segunda densidade ótica (DO2).

As densidades óticas foram obtidas, em duplicata, no espectrofotômetro (Beckman-Coulter DU-70, Fullerton, EUA).

A concentração percentual da GSH nos eritrócitos foi calculada através da seguinte fórmula:

$$GSH \text{ (mg / dL)} = \frac{DO2 - DO1 \times 31040}{\text{hematócrito}}$$

Onde: o valor 31040 é o coeficiente de extinção molar do DTNB reduzido pela GSH (13600) multiplicado pelas diluições.

4.6.9- Quantificação da Carga Viral

As amostras para a quantificação do HIV-RNA (carga viral) no sangue periférico foram coletadas em tubo com EDTA (Vacuette, Brasil) e, a determinação da carga viral foi realizada no Laboratório de AIDS, Hospital de Clínicas, UNICAMP.

A metodologia para a quantificação da carga viral foi o ensaio de amplificação baseado na sequência de ácido nucléico (*nucleic acid sequence based assay* – NASBA, NUCLISENS™ HIV-1 QT), produzido pela Organon Teknika.

4.7- Avaliação Clínica

4.7.1- Ocorrência de Infecções Associadas

Foi avaliada no acompanhamento dos retornos clínicos, através do diagnóstico realizado pelos profissionais do Serviço de Imunodeficiência Pediátrica do Hospital de Clínicas da, UNICAMP, Campinas, SP.

4.8- Aspectos Éticos

O ensaio clínico apresentava operações independentes que possuíam relevância do ponto de vista ético. Sendo elas, solicitação de ingestão diária, por um período de 3 meses, de um suplemento alimentar; solicitação da avaliação do estado nutricional através de exames físicos e antropométricos e inquéritos alimentares; e coleta de amostras de sangue, com intervalo de 3 meses visando a caracterização da resposta imune e a avaliação do estado nutricional. Essas práticas têm sido amplamente mencionadas na literatura corrente.

Os pais ou representantes legais das crianças foram informados sobre os objetivos e os métodos que seriam empregados através de uma carta de informação (**Anexo**). Uma vez cientes da natureza dos procedimentos e desconfortos aos quais as crianças seriam submetidas, com capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação, foi solicitado que os responsáveis assinassem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, Campinas, SP (292/2000) e obedeceu às recomendações para pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos propostas pela Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

4.9- Análise Estatística

Os dados foram organizados e analisados com o programa *SPSS® for Windows, version 7.5.1.* (SPSS Inc., 1989 – 1996, EUA).

As análises descritivas das variáveis foram apresentadas como mediana (valores mínimo e máximo).

A comparação da avaliação imunológica entre as crianças expostas ao HIV infectadas e as não infectadas foi realizada através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Em relação à suplementação alimentar, as possíveis diferenças entre os tempos nos grupos foram calculadas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon e as diferenças entre os tempos (Tempo 2 e Tempo 1) foram calculadas com o teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

As figuras foram feitas no Software *GraphPad Prism, version 4.0* (GraphPad Software, EUA).

5- RESULTADOS

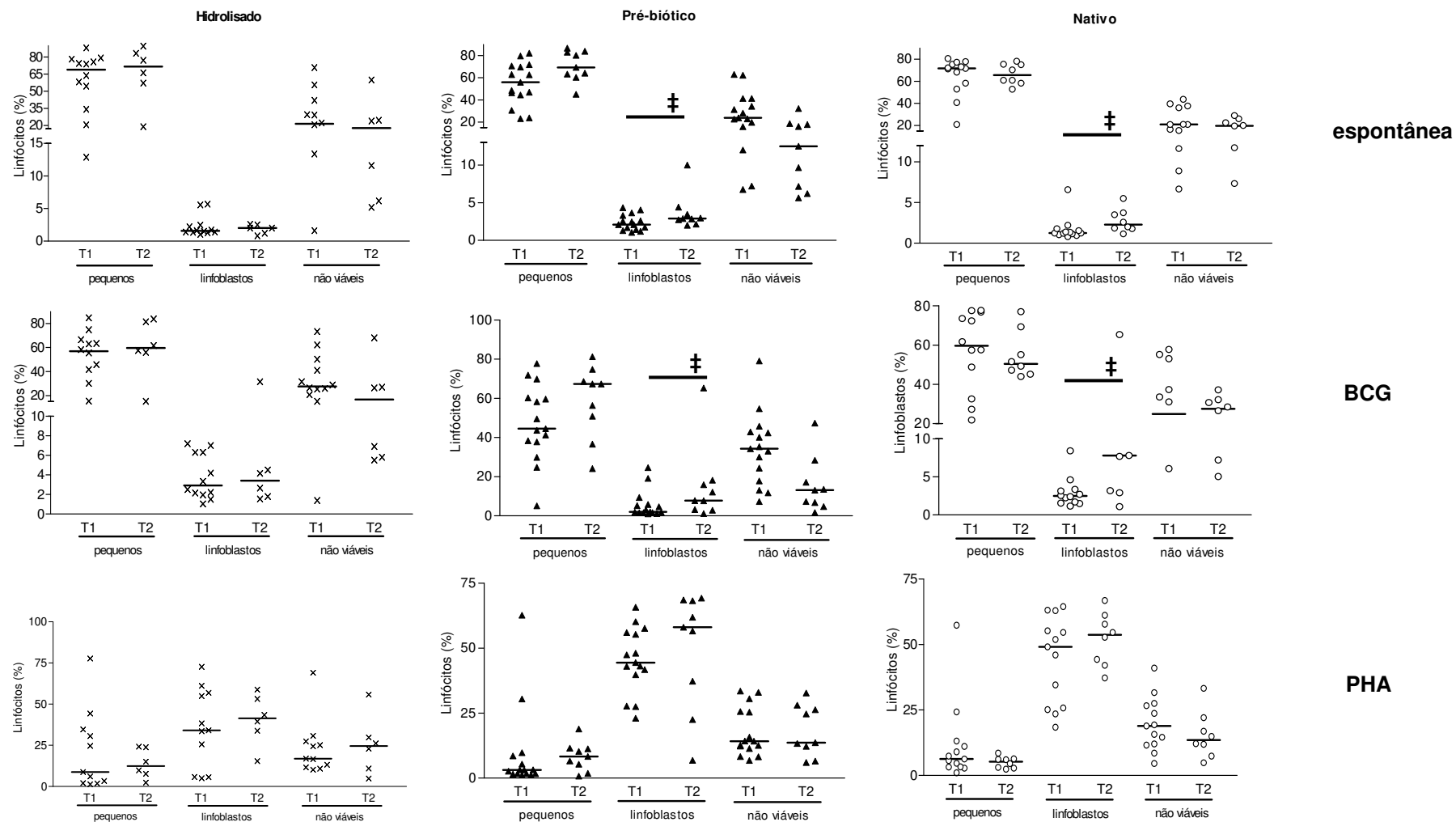


Figura 12- Proliferação linfocitária espontânea, estimulada por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), após seis dias de cultura de células mononucleares de sangue periférico, de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado) (×), nativas (Nativo) (O) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico) (▲). (‡ Diferença significativa entre Tempo 1 e 2, $p < 0,05$, Teste de Wilcoxon).

5.1- Caracterização da População

De julho de 2006 a junho de 2007, quarenta crianças infectadas pelo HIV-1, por transmissão vertical, com idade mediana de 8,52 (2,50 a 16,07) anos iniciaram o ensaio clínico de intervenção nutricional. As crianças foram aleatoriamente distribuídas nos grupos de suplementos alimentares.

Quanto à categoria clínica e imunológica, segundo classificação proposta pelo CDC (1994), a maioria das crianças apresentava sintomas moderados ou graves e supressão imunológica moderada ou grave (76,92%). A maioria das crianças (77,5%) apresentava bom controle virológico (carga viral abaixo de 10.000 cópias/mL) (Ching et al. 2007). As características clínicas, imunológicas e virológicas, bem como, os esquemas anti-retrovirais dos grupos no início do ensaio clínico encontram-se na Tabela 4.

O grupo Hidrolisado foi inicialmente composto por 12 crianças, das quais apenas 6 finalizaram o estudo. Todos os casos de desistência foram pelo mesmo motivo, a palatabilidade do suplemento.

Das 15 crianças que iniciaram o ensaio clínico no grupo Pré-biótico, 9 concluíram. Em cinco casos, o motivo da desistência foi o sabor. Uma criança abandonou o seguimento porque a sua mãe faleceu.

Em relação ao grupo Nativo, 12 crianças iniciaram o estudo, destas, 8 concluíram. Neste grupo uma criança desistiu pelo sabor do produto, outra apresentou vômitos, e duas abandonaram o seguimento clínico e não conseguimos localizá-las.

Foram oferecidas alternativas para a administração do suplemento (sucos de fruta, achocolatado, gelatina ou outros alimentos da preferência da criança) a fim de garantir a ingestão.

Não houve mudança na terapia anti-retroviral durante o estudo.

As medianas do logaritmo da carga viral, no início do ensaio clínico, foram 2,78 (1,7 a 4,69) no grupo Hidrolisado, 3,52 (1,7 a 4,21) no grupo Pré-biótico e 3,07 (1,7 a 5,13) no grupo Nativo, sem diferença entre os grupos ($p = 0,631$).

Nenhuma criança apresentou infecção associada à AIDS no período do ensaio clínico.

Tabela 4- Características das crianças infectadas pelo HIV-1 antes da suplementação alimentar.

Características		Grupo		
		Hidrolisado (n=12)	Pré-biótico (n=15)	Nativo (n=12)
Idade (anos)		8,01 (3,03 - 10,34) ¹	8,61 (2,49 - 11,52)	9,21 (5,96 - 16,07)
Genero (masc./fem.)		(4 / 8)	(9 / 6)	(6 / 6)
Início dos Sintomas (meses)		7 (1 - 36)	6 (1 - 84)	6 (1 - 48)
Categoria Clínica Imunológica²	A2	0	1	1
	A3	0	1	0
	B1	1	1	3
	B2	5	5	5
	B3	3	3	0
	C1	0	1	0
	C2	1	0	1
	C3	2	3	2
Terapia Anti- retroviral³	2 ITRN + 1 IP	9	11	8
	2 ITRN + 1 IP+ 1 ITRNN	1	1	2
	2 ITRN + 1 ITRNN	2	3	2
Carga Viral	Indetectável	3	3	5
	50 < cv < 10 ⁴ (cópias/ml)	5	10	4
	10 ⁴ < cv < 10 ⁵ (cópias/ml)	3	2	2
	10 ⁵ < cv (cópias/ml)	1	0	1
Linfócitos T	CD4 ⁺	784 (250 - 1403)	682 (310 - 3480)	1054,5 (351 - 1736)
	CD8 ⁺	818,5 (647 - 2221)	1745 (879 - 2933)	1198,5 (509 - 2323)
	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0,81 (0,21 - 1,75)	0,45 (0,11 - 1,19)	0,645 (0,15 - 2,04)

¹ mediana (mínimo e máximo). ² **Categoria Imunológica - 1:** ausência de supressão, **2:** supressão moderada (15%<CD4⁺<25%) e **3:** supressão grave (CD4⁺<15%). **Categoria Clínica - A** sintomas leves, **B:** sintomas moderados e **C:** sintomas graves (CDC, 1994). ³ **IP:** Inibidores da Protease, **ITRN:** Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo, **ITRNN:** Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Análogos de Nucleosídeo. **n:** número de crianças

Após três meses de suplementação alimentar, as medianas das diferenças entre os tempos da carga viral, em logaritmo, foram -0,22 (-1,1 a 0) no grupo Hidrolisado, 0,2 (-0,1 a 0,5) no grupo Pré-biótico e 0,09 (0 a 0,9) no grupo Nativo, sem diferença significativa.

5.2- Avaliação Nutricional

5.2.1- Antropometria e Composição Corporal

No início do estudo não foi observada diferença nos escores Z dos índices antropométricos peso/idade, altura/idade e do IMC entre os grupos. As medianas dos escores Z dos parâmetros antropométricos encontram-se na Figura 3.

De acordo com a classificação do estado nutricional proposta pela OMS (1995), 12 crianças estavam com desnutrição leve (4 no grupo Hidrolisado, 3 no Pré-biótico e 5 no Nativo) e 6 com desnutrição moderada (3 no grupo Hidrolisado, 2 no Pré-biótico e 1 no Nativo) e 1 com desnutrição grave (grupo Nativo). Em relação à altura, 14 crianças apresentavam déficit estatural (4 no grupo Hidrolisado, 4 no Pré-biótico e 5 no Nativo), 3 baixa estatura moderada (1 em cada grupo) e 1 baixa estatura grave (grupo Hidrolisado).

Quanto ao IMC, 15 crianças apresentaram o escore Z entre -1DP e -2DP (5 do grupo Hidrolisado, 2 do Pré-biótico e 3 no Nativo) e 7 crianças apresentaram escore Z menor do que -2DP (3 do grupo Pré-biótico e 2 do Nativo).

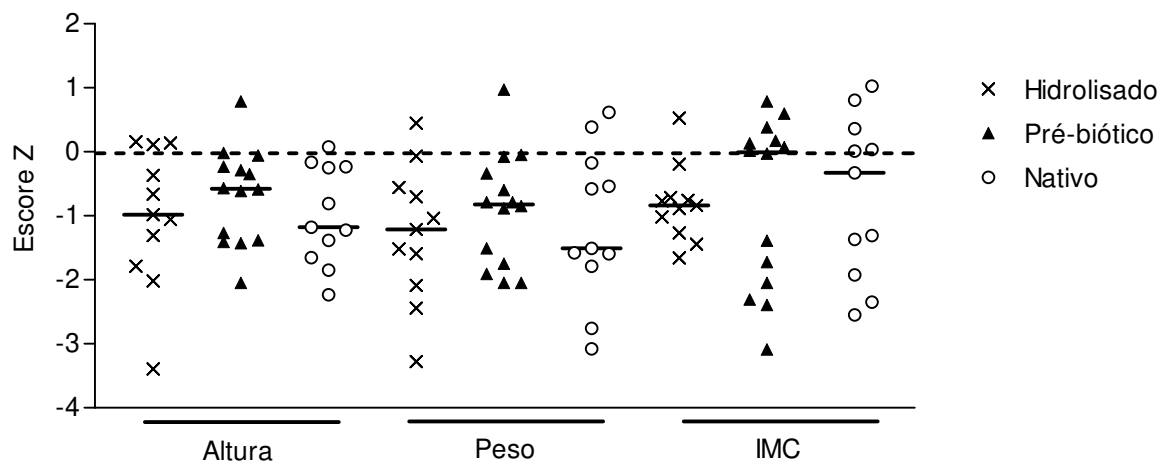


Figura 3- Escores Z dos índices antropométricos peso/idade, altura/idade e IMC de crianças infectadas pelo HIV-1 no início da suplementação alimentar contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado) (×), nativas (Nativo) (○) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico) (▲).

No início do estudo, foram observadas diferenças em alguns parâmetros da composição corporal. O escore Z mediano da prega cutânea do tríceps estava significativamente maior no grupo Pré-biótico, cuja mediana observada foi -0,10 (-2,03 a 0,67) em comparação ao grupo Hidrolisado, mediana de -1,22 (-2,24 a 0) e, mediana de -0,55 (-2,37 a 0,27) no grupo Nativo. A mediana da área adiposa do braço estava significativamente reduzida no grupo Hidrolisado ($p = 0,040$), mediana de -1,48 (-2,3 a -0,61). A mediana da área adiposa do braço observada no grupo Pré-biotico foi -0,79 (-2,11 a 0,29) e no grupo Nativo foi -0,53 (-,53 a 0,25) (Figura 4). Os demais parâmetros eram comparáveis entre os grupos.

A análise dos parâmetros que estimam a gordura corporal mostra que a maioria das crianças (62,5%) apresentava déficit do perímetro braquial (abaixo de -1DP). Em relação ao parâmetro que estima a massa muscular, a maioria das crianças (65%) apresentava déficit na área muscular do braço (abaixo de -1DP) e 30% apresentavam esse parâmetro significativamente diminuído (abaixo de -2DP).

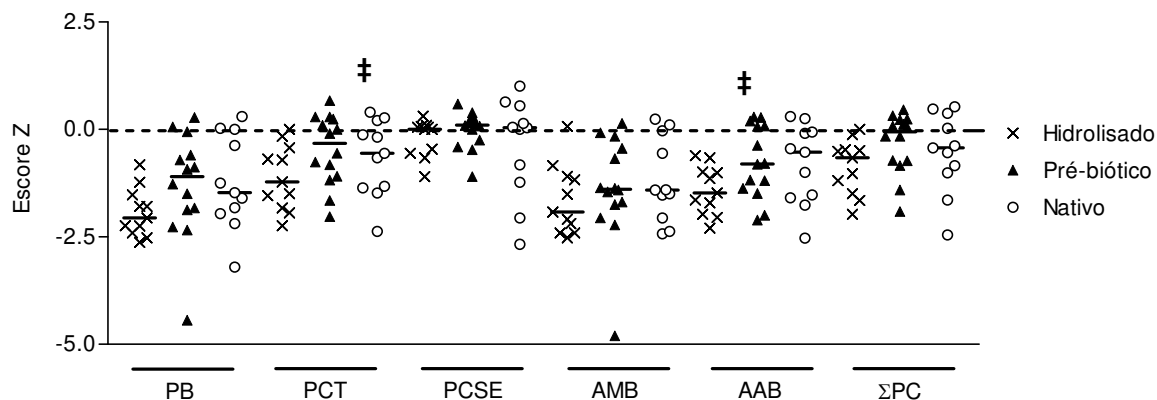


Figura 4- Escores Z do perímetro braquial (PB), prega cutânea do tríceps (PCT), prega cutânea subescapular (PCSE), área muscular do braço (AMB), área adiposa do braço (AAB) e somatório de pregas cutâneas (Σ PC) de crianças infectadas pelo HIV-1 no início da suplementação alimentar contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado) (×), nativas (Nativo) (○) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico) (▲) (‡ $p < 0,05$ Teste de Mann-Whitney).

A suplementação alimentar por três meses não influenciou os escores Z dos índices antropométricos altura/idade e peso/idade e, conseqüentemente o escore Z do IMC (Figura 5).

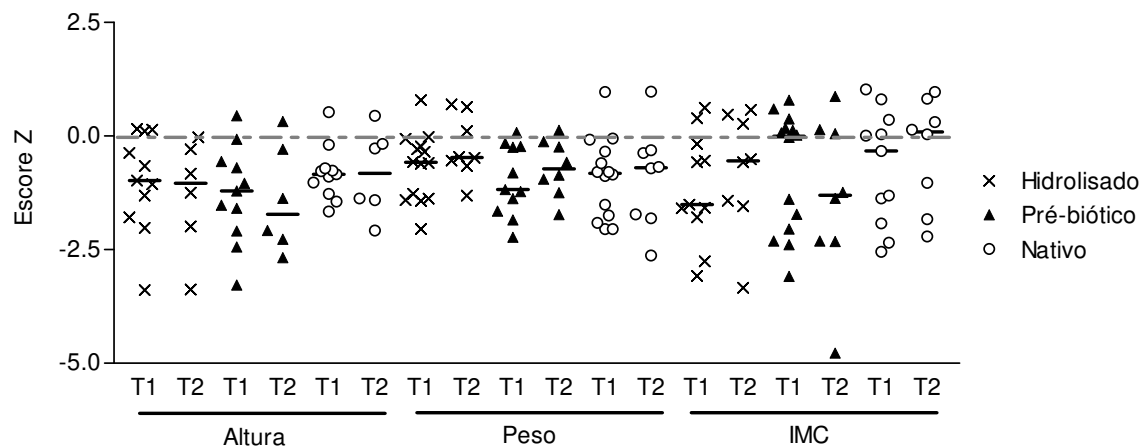


Figura 5- Escores Z dos índices antropométricos peso/idade, altura/idade e IMC de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado) (×), nativas (Nativo) (○) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico) (▲).

Em relação à composição corporal, houve melhora significativa do escore Z do perímetro braquial entre os tempos no grupo Hidrolisado ($p = 0,046$) (Figura 6A). Houve significância nas diferenças entre os grupos ($p < 0,001$), sendo maior no grupo Hidrolisado.

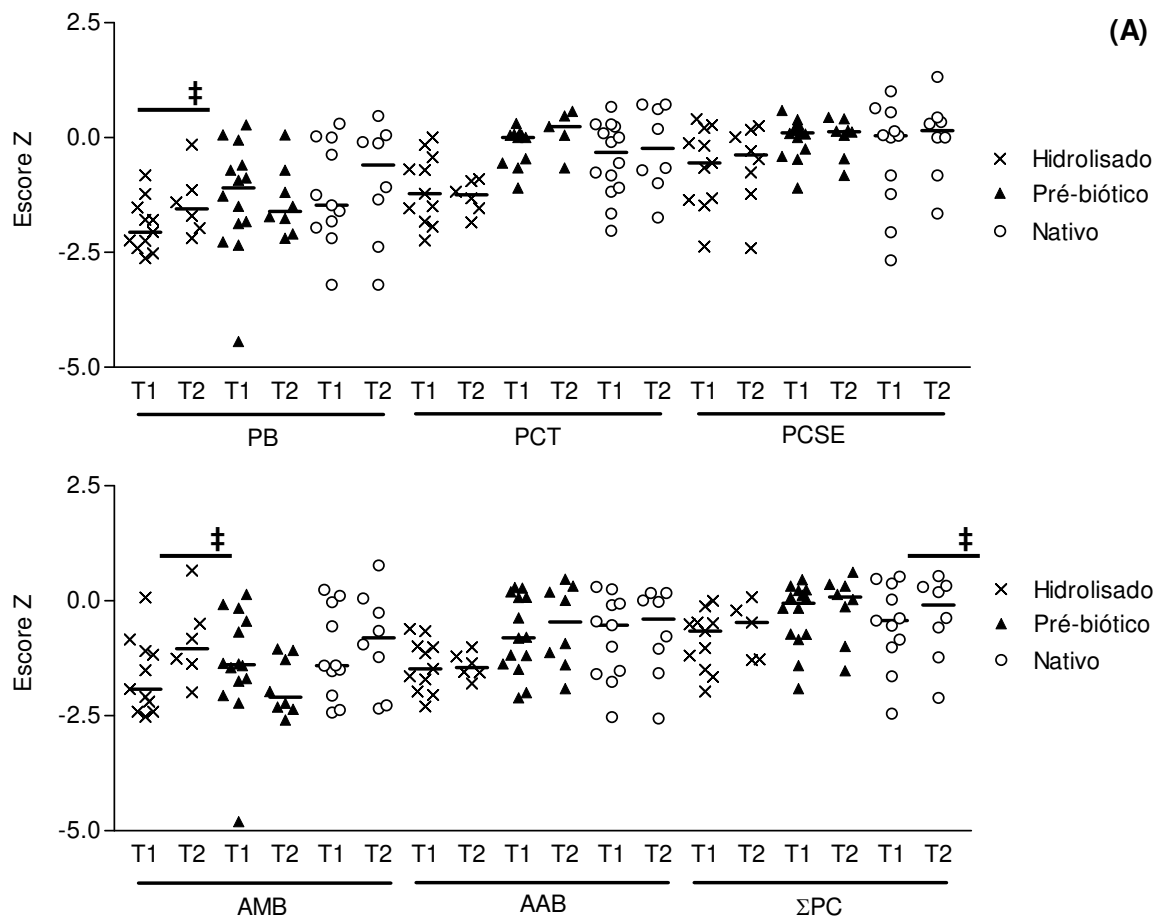


Figura 6- Escores Z do perímetro braquial (PB), prega cutânea do tríceps (PCT), prega cutânea subescapular (PCSE) (A), área muscular do braço (AMB), área adiposa do braço (AAB) e somatório de pregas cutâneas (Σ PC) (B) de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado) (×), nativas (Nativo) (○) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico) (▲). (‡ Diferença significativa entre Tempo 1 e 2, $p < 0,05$, Teste de Wilcoxon).

Em relação aos outros parâmetros que estimam a gordura corporal, foi observado aumento significativo no escore Z do somatório de pregas cutâneas no grupo Nativo ($p = 0,035$). Entretanto, não foram observadas diferenças entre os tempos nos grupos (Figura 6B).

Embora os escores Z da prega cutânea subescapular não se modificaram significativamente entre os tempos nos grupos, foi observada significância entre as diferenças ($p = 0,013$), sendo menor no grupo Pré-biótico (Figura 6A).

O escore Z da área adiposa do braço aumentou significativamente no grupo Hidrolisado ($p = 0,043$). Entretanto, não foram observadas diferenças entre os tempos nos grupos (Figura 6B). Os escores Z da prega cutânea do tríceps e da área muscular do braço, não se alteraram ao longo do tempo (Figura 6A e 6B).

5.2.2- Ingestão Alimentar

A ingestão energética, dos macronutrientes, bem como de cálcio e ferro, encontram-se descritas na Tabela 5. No início do ensaio clínico, não foi observada diferença na ingestão alimentar entre os grupos.

Apenas no grupo Nativo foi observado aumento significativo da ingestão energética ($p = 0,036$). Embora não significativo, houve aumento mediano da ingestão de energia no grupo Pré-Biótico.

Na avaliação da distribuição percentual dos macronutrientes, segundo proposto pela DRI (2003) onde a ingestão de carboidrato deve fornecer entre 45 a 65% das calorias ingeridas, a de proteínas, entre 10 a 35% e a de gordura entre 20 a 35%, as medianas da distribuição percentual dos macronutrientes estavam adequadas com exceção da mediana da contribuição percentual de gorduras no Tempo 2 do grupo Hidrolisado. A suplementação alimentar não alterou a distribuição percentual dos macronutrientes nos grupos Hidrolisado e Nativo. No grupo Pré-biótico houve aumento significativo no percentual de gordura ($p = 0,043$) (Tabela 5). Entretanto, como os suplementos alimentares fornecem a mesma quantidade de gorduras, esse aumento provavelmente não é decorrente da ingestão alimentar.

Quanto aos micronutrientes avaliados, o grupo Nativo apresentou aumento significativo na ingestão de cálcio. A ingestão de ferro não foi influenciada pela suplementação alimentar (Tabela 5).

Tabela 5- Ingestão alimentar de energia, proteína, cálcio e ferro e distribuição percentual dos macronutrientes em crianças infectadas pelo HIV-1 no início e final de ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).

Ingestão Alimentar	Grupo	Tempo 1	Tempo 2	P ²
Energia (kcal/kg)	Hidrolisado	82,62 (42,65 - 136,30) ¹	60,83 (58,09 - 85,43)	0,273
	Pré-biótico	83,14 (52,78 - 121,83)	94,8 (70,07 - 194,36)	0,500
	Nativo	82,66 (47,37 - 121,50)	88,31 (46,06 - 113,22)	0,036
Proteína (g/kg)	Hidrolisado	2,62 (1,47 - 7,08)	3,34 (2,66 - 3,48)	0,465
	Pré-biótico	3,31 (2,43 - 6,95)	5,43 (2,05 - 8,04)	0,345
	Nativo	3,19 (2,38 - 5,16)	3,28 (2,72 - 5,51)	0,208
Cálcio (mg)	Hidrolisado	688,05 (112,96 - 1381,37)	548,89 (425,94 - 831,63)	0,273
	Pré-biótico	787,9 (407,07 - 1625,22)	885,64 (439,12 - 1651,88)	0,345
	Nativo	892,4 (471,90 - 1476,02)	1155,9 (811,27 - 1561,86)	0,012
Ferro (mg)	Hidrolisado	11,4 (5,86 - 35,65)	10,05 (9,68 - 14,74)	0,465
	Pré-biótico	18,3 (5,68 - 35,36)	20,03 (12,21 - 49,32)	0,500
	Nativo	17,5 (11,26 - 34,86)	16,96 (13,90 - 29,56)	0,263
Distribuição % Macronutrientes				
Proteína	Hidrolisado	14,93 (12,01 - 21,35)	19,62 (16,32 - 23,24)	0,465
	Pré-biótico	18,04 (12,90 - 22,82)	19,33 (11,71 - 24,57)	0,686
	Nativo	16,21 (14,62 - 22,12)	17,77 (12,66 - 23,67)	0,779
Carboidratos	Hidrolisado	50,98 (36,20 - 66,58)	55,12 (49,97 - 57,00)	0,715
	Pré-biótico	56,38 (42,83 - 62,87)	50,56 (36,94 - 62,58)	0,080
	Nativo	52,38 (48,47 - 63,07)	46,7 (37,45 - 63,62)	0,401
Gordura	Hidrolisado	28,17 (18,96 - 43,21)	42,90 (34,42 - 46,75)	0,068
	Pré-biótico	27,36 (15,33 - 37,28)	31,48 (21,61 - 38,75)	0,043
	Nativo	28,95 (22,90 - 38,25)	34,53 (22,24 - 38,94)	0,263

¹Mediana (mínimo e máximo), ²Valor de p Teste de Wilcoxon.

Em relação às recomendações de ingestão alimentar propostas pela RDA (1989), a qual não leva em consideração a infecção, no início do estudo, 64,86% das crianças apresentavam ingestão energética entre 75 a 125% da adequação pela RDA (1989). Analisando a adequação da ingestão energética pelos grupos, 30% das crianças do grupo Hidrolisado, 80% do Pré-biótico e 75% do Nativo apresentavam ingestão de energia adequada.

Considerando insuficiente uma ingestão energética inferior a 75% do recomendado pela RDA (1989), 24,32% das crianças apresentavam ingestão de energia inadequada. No grupo Hidrolisado, 50% das crianças apresentavam ingestão energética inadequada. No grupo Pré-biótico, 13,3% das crianças apresentavam ingestão energética insuficiente e, no grupo Nativo, 16,66%. As medianas das adequações da ingestão de energia, proteína, cálcio e ferro encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6- Adequação da Ingestão Alimentar segundo recomendações propostas pela RDA (1989) em crianças infectadas pelo HIV-1 no início (Tempo 1) e final (Tempo 2) de ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).

% de Adequação Percentual	Grupo	Tempo 1	Tempo 2	P ²
Energia	Hidrolisado	71,83 (41,59 - 173,78) ¹	68,94 (59,56 - 85,69)	0,273
	Pré-biótico	93,37 (67,36 - 125,42)	110,01 (78,68 - 195,91)	0,345
	Nativo	98,79 (61,79 - 157,95)	115,22 (85,89 - 143,52)	0,025
Proteína	Hidrolisado	195,35 (102,69 - 645,02)	252,02 (190,55 - 326,40)	0,273
	Pré-biótico	240 (116,93 - 391,76)	349,03 (230,18 - 450,28)	0,500
	Nativo	244,96 (166,32 - 480,04)	287,89 (217,31 - 453,01)	0,208
Cálcio	Hidrolisado	75,13 (14,12 - 172,67)	68,61 (53,24 - 103,95)	0,273
	Pré-biótico	89,44 (31,31 - 203,15)	82,15 (54,89 - 151,12)	0,345
	Nativo	91,04 (49,86 - 147,40)	112,39 (91,28 - 140,63)	0,012
Ferro	Hidrolisado	92,29 (58,63 - 356,53)	100,50 (96,80 - 147,40)	0,465
	Pré-biótico	143,75 (56,86 - 294,70)	200,35 (122,13 - 411,03)	0,686
	Nativo	149,72 (95,94 - 348,61)	161,02 (117,96 - 246,33)	0,263

¹Mediana (mínimo e máximo), ²Valor de p Teste de Wilcoxon.

Em relação à elevada ingestão protéica observada, mediana de 195,35% no grupo Hidrolisado, 240% no grupo Pré-biótico e 244,96% no grupo Nativo, os resultados observados são similares aos resultados observados previamente em um grupo de crianças sob seguimento clínico no mesmo Ambulatório (Moreno, 2002). A suplementação alimentar não influenciou a ingestão protéica em nenhum grupo.

No início do estudo, 43,24% das crianças apresentavam consumo insuficiente de cálcio (40% das crianças do grupo Hidrolisado e do grupo Pré-biótico e 50% do grupo Nativo). Após a suplementação alimentar esse percentual reduziu para 29,41%.

5.3- Avaliação Imunológica

5.3.1- Parâmetros Hematológicos

O valor mediano de hemoglobina observado nas crianças infectadas não diferiu do das crianças não infectadas (Tabela 7).

No início do ensaio clínico, o valor mediano de hemoglobina foi 12,35 (11,4 a 13,1) g/dL no grupo Hidrolisado, 12,4 (11,2 a 15,6) g/dL no grupo Pré-biótico e 13,4 (11,1 a 14,8) g/dL no grupo Nativo. Nenhuma criança apresentou valores de hemoglobina abaixo de 9,0 g/dL (Englund et al. 1996). A suplementação nutricional não influenciou as medianas de hemoglobina (Tabela 7).

Tabela 7- Parâmetros hematológicos em crianças expostas ao HIV-1 infectadas e não infectadas.

Parâmetro	Infectadas (n=51)	Não infectadas (n=11)	P ²
Hemoglobina (g/dL)	12,5 (10,2 - 15,6) ¹	13,3 (11,9 - 14)	0,077
Hematócrito (%)	37,55 (31,6 - 45,9)	38 (30,1 - 41,6)	0,363
Leucócitos (células x 10 ⁹ /L)	6,54 (3,92 - 7,93)	7,9 (4,95 - 9,46)	0,069
Linfócitos (células x 10 ⁹ /L)	2,93 (1,13 - 8,26)	2,64 (1,95 - 4,89)	0,743
Linfócitos (%)	46,3 (10,9 - 68,1)	35,2 (28,8 - 58,5)	0,036
Plaquetas (células x 10 ⁹ /L)	287 (85 - 430)	288 (243 - 499)	0,168

¹Mediana (mínimo e máximo), ²Valor de p Teste de Mann-Whitney (comparação entre os grupos).

Em relação às plaquetas, não foram observadas diferenças entre as crianças infectadas e não infectadas (Tabela 8).

No início do ensaio clínico os valores medianos das plaquetas encontravam-se normais, acima de 150.000 células/mm³, (Williams et al., 1995) nos três grupos. Não foram observadas diferenças entre os tempos nos grupos (Tabela 8).

O número de leucócitos não foi influenciado pela suplementação alimentar, inicialmente seus valores medianos eram 5,63 (4,25 a 11,06) células $\times 10^9/L$ no grupo Hidrolisado, 7,37 (4,94 a 7,93) células $\times 10^9/L$ no grupo Pré-Biótico e 6,36 (3,92 a 10,8) células $\times 10^9/L$ no grupo Nativo.

Em relação ao número de linfócitos, foi observado aumento significativo no grupo Hidrolisado ($p = 0,046$) (Tabela 8).

Tabela 8- Parâmetros hematológicos em crianças infectadas pelo HIV-1 no início (Tempo 1) e final (Tempo 2) de ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).

Parâmetro	Grupo	Tempo 1	Tempo 2	P ²	Diferença	P ³
Hemoglobina (g/dL)	Hidrolisado	12,35 (11,4 - 13,1) ¹	12,25 (11,2 - 14,1)	0,753	-0,1 (-1,2 - 1)	0,560
	Pré-biótico	12,4 (11,2 - 15,6)	11,7 (10,8 - 14,3)	0,858	-0,1 (-1,5 - 2,5)	
	Nativo	13,4 (11,1 - 14,8)	13,3 (11 - 15)	0,308	0,2 (-1,4 - 1,4)	
Hematócrito (%)	Hidrolisado	36,5 (32,6 - 39,1)	36,05 (31,8 - 41)	0,833	0 (-2,1 - 4,5)	0,442
	Pré-biótico	37,6 (33,9 - 45,9)	34,8 (32,6 - 40,6)	0,514	-0,6 (-5,5 - 6,1)	
	Nativo	38,05 (33,2 - 43,8)	38,9 (34 - 43,9)	0,327	0,75 (-5 - 4,2)	
Plaquetas (células $\times 10^9/L$)	Hidrolisado	308,5 (192 - 378)	224 (114 - 409)	0,225	-21 (-147 - 79)	0,576
	Pré-biótico	278,5 (175 - 430)	285 (173 - 340)	0,678	12 (-105 - 95)	
	Nativo	271,5 (149 - 369)	235 (169 - 288)	0,674	-7 (-142 - 76)	
Leucócitos (células $\times 10^9/L$)	Hidrolisado	5,63 (4,25 - 11,06)	5,76 (4,31 - 12,2)	0,600	0,19 (-2,52 - 7,52)	0,790
	Pré-biótico	7,375 (4,94 - 7,93)	5,58 (3,9 - 11,08)	0,953	-0,05 (-2,93 - 4,12)	
	Nativo	6,365 (3,92 - 10,8)	6,625 (4,5 - 9,27)	0,208	0,7 (-2,21 - 2,46)	
Linfócitos (células $\times 10^9/L$)	Hidrolisado	2,89 (2,07 - 3,45)	3,22 (2,43 - 7,19)	0,046	0,345 (-0,03 - 4,12)	0,062
	Pré-biótico	3,22 (1,13 - 8,26)	2,58 (1,54 - 4,46)	0,594	0,03 (-1,27 - 0,98)	
	Nativo	2,89 (1,72 - 4,71)	2,85 (1,92 - 3,62)	0,484	-0,1 (-0,63 - 0,34)	
Linfócitos (%)	Hidrolisado	46,55 (25,5 - 65,6)	57,8 (39,5 - 65,6)	0,345	4,8 (-6,6 - 17,9)	0,222
	Pré-biótico	44,65 (10,9 - 60)	46,2 (33,7 - 60)	0,813	4,1 (-23 - 23)	
	Nativo	48,35 (34,1 - 68,1)	42,05 (28,1 - 59,4)	0,208	-7,95 (-24,1 - 11,7)	

¹Mediana (mínimo e máximo), ² Valor de p Teste de Wilcoxon (comparação entre Tempo 1 e Tempo 2),

³ Valor de p Teste de Kruskal-Wallis (comparação entre os grupos da diferença entre Tempo 2 e Tempo 1).

5.3.2- Contagem Absoluta de Linfócitos T

A contagem absoluta de linfócitos foi realizada apenas nas crianças infectadas pelo HIV-1, destas 21,62% apresentavam supressão moderada de linfócitos T CD4⁺. Nenhuma criança apresentava supressão grave de T CD4⁺, ajustada para a faixa etária, segundo classificação proposta pelo CDC (1994).

No início do ensaio clínico, os valores medianos dos linfócitos T CD4⁺ foram 784 (250 a 1403) célulasx10⁶/mm³ no grupo Hidrolisado, 682 (310 a 3480) célulasx10⁶/mm³ no grupo Pré-biótico e 1054,5 (351 a 1736) célulasx10⁶/mm³ no grupo Nativo. A suplementação alimentar não influenciou a contagem de T CD4⁺ (Figura 7).

Em relação à contagem dos linfócitos T CD8⁺, os valores medianos observados foram 818,5 (647 a 2221) célulasx10⁶/mm³ no grupo Hidrolisado, 1745,5 (937 a 2933) célulasx10⁶/mm³ no grupo Pré-biótico e 1198,5 (509 a 2323) célulasx10⁶/mm³ no grupo Nativo. Foi observado aumento significativo na contagem de T CD8⁺ no grupo Hidrolisado (p=0,028) (Figura 7). As diferenças entre os tempos foram significativas entre os grupos (p = 0,004), sendo maior no grupo Hidrolisado.

No início do ensaio clínico 78,37% das crianças apresentaram relação T CD4⁺/CD8⁺ abaixo de 1, o que indica predomínio de T CD8⁺. Os valores medianos observados para a relação CD4⁺/CD8⁺ foram 0,81 (0,21 a 1,75) no grupo Hidrolisado, 0,45 (0,11 a 1,19) no grupo Pré-biótico e 0,64 (0,15 a 2,04). No grupo Pré-biótico foi observado aumento significativo da relação CD4⁺/CD8⁺ (p = 0,039) (Figura 7).

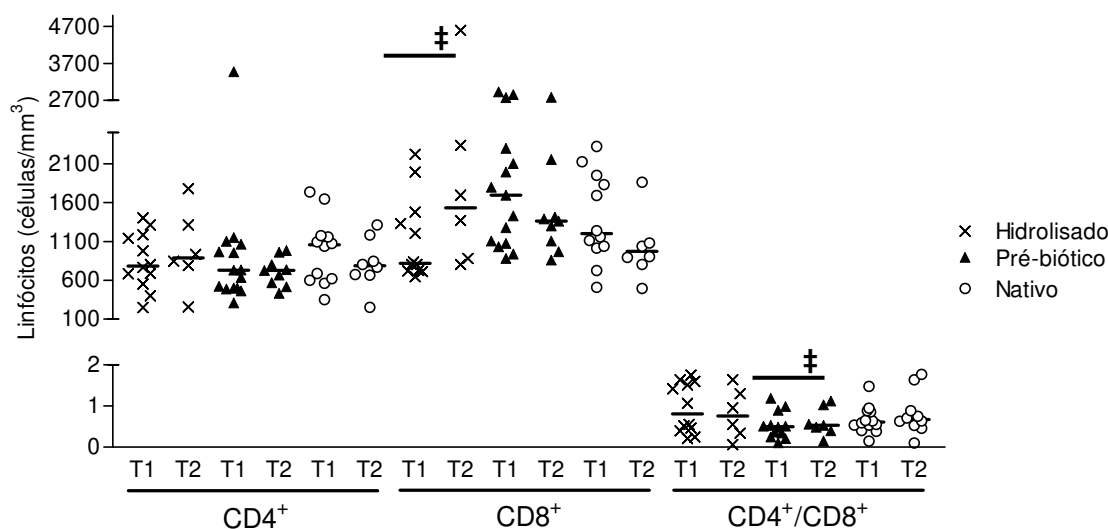


Figura 7- Contagem absoluta de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (células/mm³) em crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado) (×), nativas (Nativo) (○) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico) (▲) (‡ Diferença significativa entre Tempo 1 e 2, $p < 0,05$, Teste de Wilcoxon).

5.3.3- Fenotipagem dos Linfócitos T

O valor mediano dos linfócitos T CD4⁺ observado foi 34,2 (10,4 a 77,2)% nas crianças infectadas e 53,7 (27,4 a 68,1)% nas não infectadas ($p < 0,001$). A mediana dos linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ encontrado nas crianças infectadas foi 12,65 (4,7 a 26,4)% e nas crianças não infectadas foi 21,0 (7,1 a 37,9)% ($p < 0,001$) (Figura 8).

O valor mediano dos linfócitos T CD8⁺ observado foi 57,3 (19,1 a 79,4)% nas crianças infectadas e 34,9 (21,1 a 57,2)% nas não infectadas ($p < 0,001$). A mediana dos linfócitos T CD8⁺CD45RO⁺ encontrado nas crianças infectadas foi 20,9 (5,0 a 68,8)% e, nas crianças não infectadas foi 8,7 (2,2 a 37,1)% ($p = 0,003$) (Figura 8).

Assim como observado na contagem absoluta de linfócitos T, a relação entre os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ encontrava-se diminuída nas crianças. A mediana da relação CD4⁺/CD8⁺ nas crianças infectadas foi 0,60 (0,13 a 4,04) e nas não infectadas 1,55 (0,47 a 3,22) ($p = 0,001$).

Em relação aos linfócitos TCR $\gamma\delta$, nas crianças infectadas valor mediano observado foi 4,5 (1,3 a 13,7)% e nas crianças não infectadas foi 6,9 (3,1 a 19,1)% ($p = 0,014$) (Figura 8).

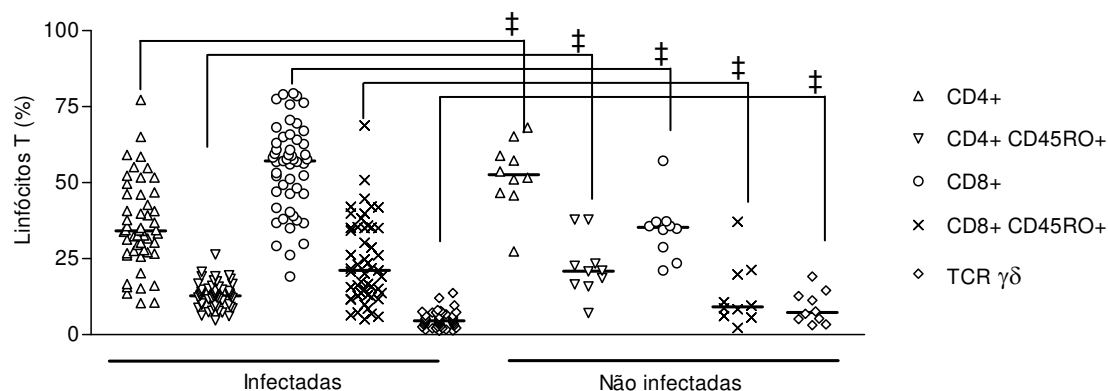


Figura 8- Percentual de linfócitos T $CD4^+$ (Δ), $CD4^+CD45RO^+$ (∇), $CD8^+$ ($\circ$), $CD8^+CD45RO^+$ ($\times$) e TCR $\gamma\delta$ ($\diamond$), no sangue periférico de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não ($\ddagger p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney).

No início do ensaio clínico os valores encontrados para os percentuais das subpopulações de linfócitos T no sangue periférico não diferiram entre os grupos de suplementação alimentar.

Os percentuais das subpopulações de linfócitos T no sangue periférico não foram influenciados pela suplementação alimentar (Figura 9). Entretanto, ao comparar os valores observados ao final da suplementação alimentar (Tempo 2) com os valores observados nas crianças expostas e não infectadas, verificou-se que alguns parâmetros não mais diferiram dos valores das crianças não infectadas no grupo Hidrolisado sendo eles, o percentual de linfócitos T $CD4^+$ ($p = 0,062$), $CD4^+CD45RO^+$ ($p = 0,062$), TCR $\gamma\delta$ ($p = 0,031$) e relação $CD4^+/CD8^+$ ($p = 0,122$). No grupo Nativo, após a suplementação alimentar, o percentual de linfócitos T $CD8^+$ e $CD4^+CD45RO^+$ não diferiram dos valores observados nas crianças não infectadas (respectivamente, $p = 0,05$ e $p = 0,062$).

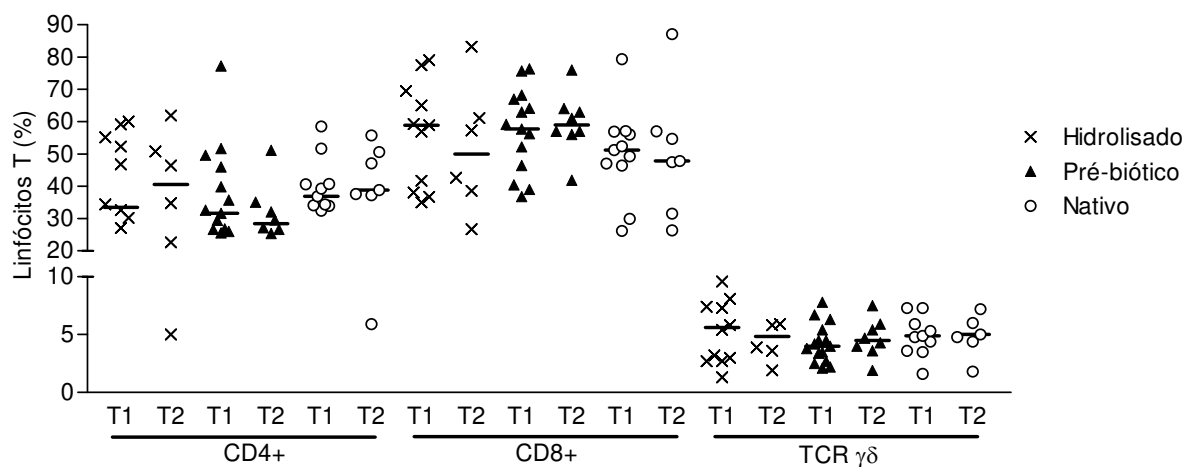


Figura 9- Percentual de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e TCR $\gamma\delta$ no sangue periférico de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado) (×), nativas (Nativo) (○) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico) (▲).

5.3.4- Proliferação linfocitária

Em relação à proliferação das culturas não estimuladas, o percentual de linfócitos pequenos encontrava-se significativamente menor nas culturas das crianças infectadas pelo HIV-1 ($p = 0,019$) e, o percentual de células não viáveis estava significativamente maior em comparação às culturas das crianças não infectadas ($p < 0,001$) (Figura 10).

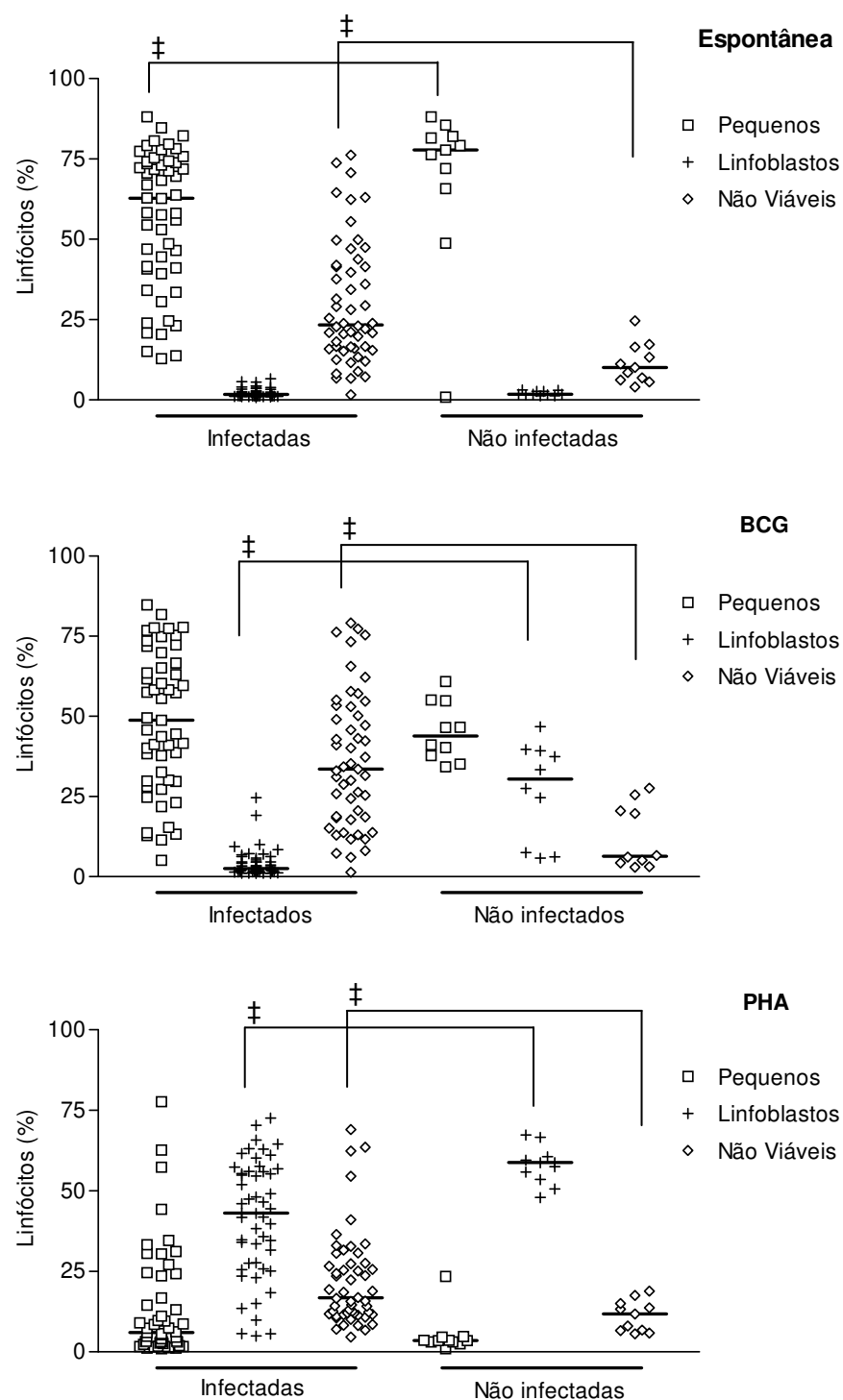


Figura 10- Proliferação linfocitária espontânea, estimulada por BCG ou por fitohemaglutinina (PHA), após seis dias de cultura de células mononucleares de sangue periférico, de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não. ($\ddagger p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney).

Nas culturas estimuladas pelo BCG as medianas dos linfoblastos BCG específicos foram de 1,93 (-1,99 a 34,27)% nas culturas das crianças infectadas e de 37,54 (7,61 a 55,13)% nas culturas das não infectadas ($p < 0,001$). Assim como nas culturas não estimuladas, o percentual de células não viáveis foi significativamente maior ($p < 0,001$) nas culturas das crianças infectadas (Figura 10).

Nas culturas estimuladas pela PHA o percentual de blastos específicos estava significativamente reduzido nas crianças infectadas ($p = 0,037$). Assim como observado na proliferação espontânea e estimulada por BCG, o percentual de células não viáveis foi significativamente maior ($p = 0,008$) nas culturas das crianças infectadas (Figura 10).

O percentual de linfoblastos $CD4^+$ nas culturas não estimuladas estava significativamente reduzido nas culturas das crianças infectadas ($p = 0,005$). Diferentemente do observado nas culturas das crianças não infectadas, não houve predomínio de $CD4^+$ (Figura 11).

Em relação às subpopulações de linfoblastos específicos para o BCG, foi observado predomínio da expansão de TCR $\gamma\delta$. A mediana do percentual de TCR $\gamma\delta$ foi 26,3 (4,4 a 84,1) nas culturas das crianças infectadas e 90,3 (62,7 a 97,8) nas culturas das não infectadas. O percentual de $CD8^+$ específico para BCG estava significativamente maior nas culturas das crianças infectadas (Figura 11).

Nas culturas estimuladas por PHA houve predomínio de $CD4^+$ tanto nas culturas das crianças infectadas quanto na das não infectadas. O percentual de linfoblastos $CD4^+$ e $CD8^+$ estavam significativamente reduzidos (respectivamente, $p = 0,005$ e $0,004$) (Figura 11).

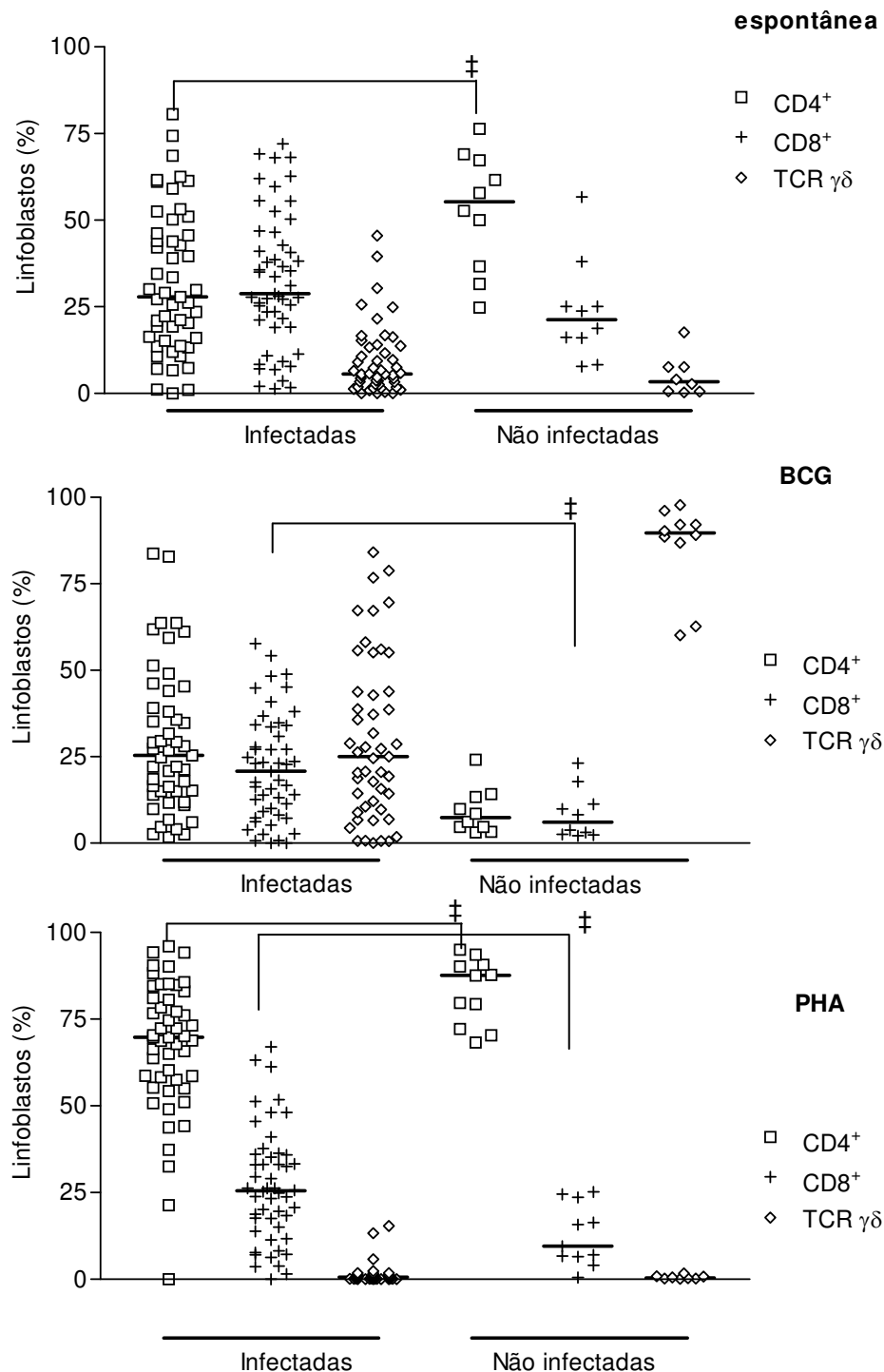


Figura 11- Percentual de linfoblastos CD4⁺ ($\square$), CD8⁺ (+) e TCR $\gamma\delta$ ($\diamond$) após seis dias de cultura de células mononucleares de sangue periférico espontânea, estimulada por BCG ou fitohemaglutinina (PHA) de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não infectadas ($\ddagger p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney).

No início do ensaio clínico, o percentual de proliferação linfocitária, bem como o percentual de subpopulações de linfoblastos nas culturas não estimuladas, estimuladas por BCG ou PHA não diferiram entre os grupos de suplementação alimentar.

Após três meses de suplementação alimentar, foi observado aumento na mediana de linfoblastos nas culturas não estimuladas nos grupos Pré-biótico ($p = 0,038$) e Nativo ($p = 0,017$). Foi observada redução não significativa do percentual mediano de células não viáveis em todos os grupos. Não foi observada significância nas diferenças entre os tempos entre os grupos (Figura 12).

Nas células estimuladas por BCG, foi observado aumento significativo do percentual de linfoblastos específicos para o BCG nos grupos Pré-biótico ($p = 0,008$) e Nativo ($p = 0,018$) (Figura 12 e 13). Assim como observado nas culturas não estimuladas, houve uma redução não significativa nas medianas das células não viáveis (Figura 12). Não foi observada significância nas diferenças entre os tempos entre os grupos.

Em relação à proliferação das células estimuladas por PHA, não foi observada influência da suplementação alimentar (Figura 12).

As subpopulações de linfoblastos nas células não estimuladas e estimuladas por BCG não se modificaram após três meses de suplementação alimentar (Figura 14).

Nas culturas celulares estimuladas por PHA a única diferença observada foi a redução do percentual de linfoblastos $CD4^+$ grupo Hidrolisado ($p = 0,043$) (Figura 14).

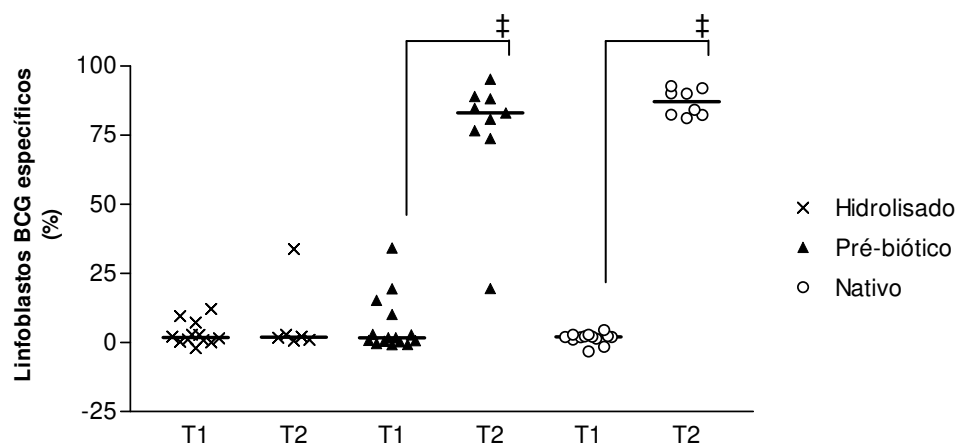


Figura 13- Percentual de linfoblastos específicos para BCG após seis dias de cultura de células mononucleares de sangue periférico, de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolizado) (X), nativas (Nativo) (O) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico) (▲) (‡ Diferença significativa entre Tempo 1 e 2, $p < 0,05$, Teste de Wilcoxon).

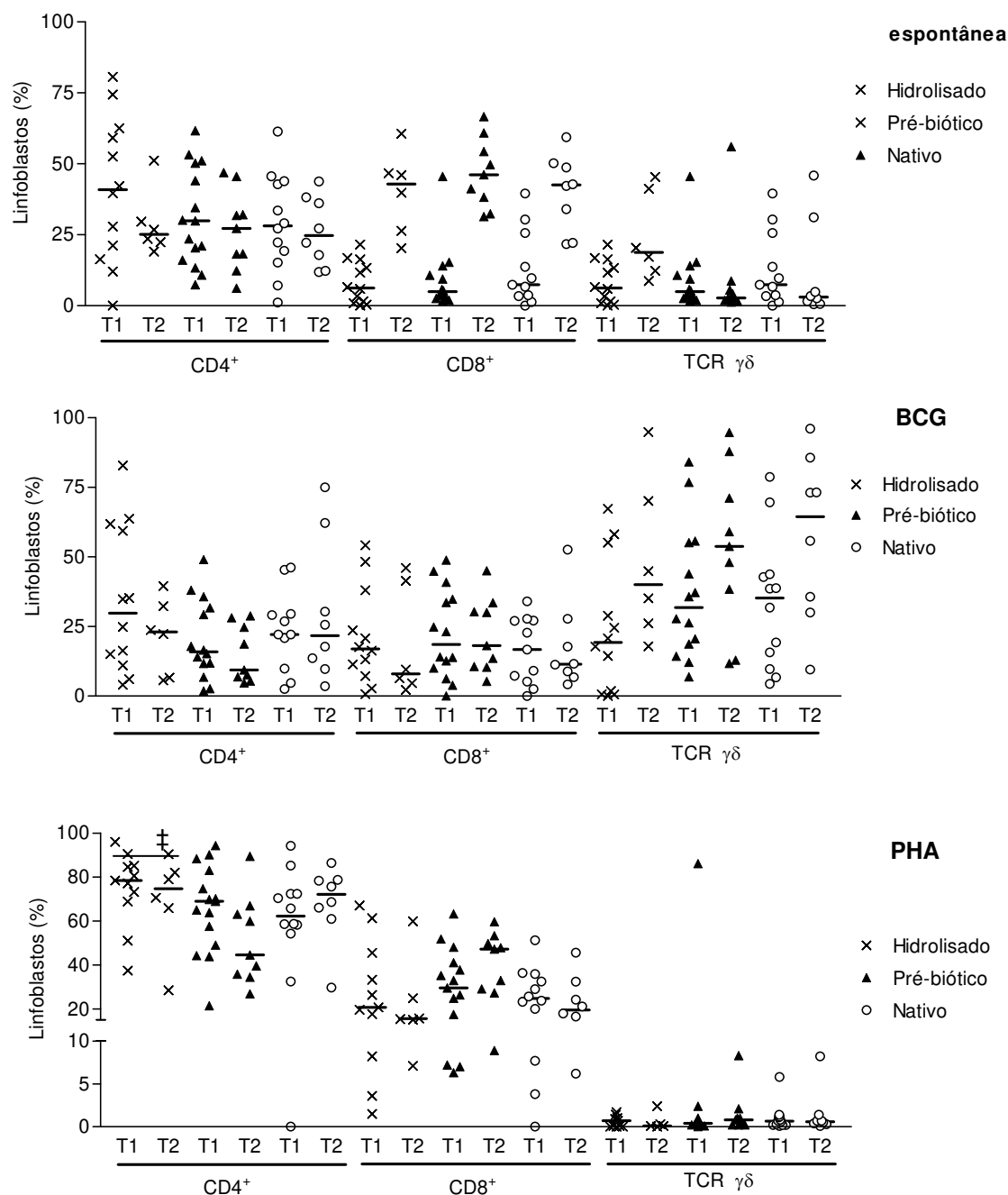


Figura 14- Percentual de linfoblastos CD4⁺, CD8⁺ e TCR γδ após seis dias de cultura de células mononucleares de sangue periférico espontânea, estimulada por BCG ou fitohemaglutinina (PHA) de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado) (×), nativas (Nativo) (○) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico) (▲) (§ Diferença significativa entre Tempo 1 e 2, $p < 0,05$, Teste de Wilcoxon).

5.3.5- Produção de Citocinas em Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico

A concentração mediana da produção espontânea de TNF- α nos sobrenadantes de cultura das crianças infectadas pelo HIV-1 foi 101,43 (indetectável a 2802,08) pg/mL e das não infectadas foi 29,91 (indetectável a 188,80) pg/mL, significativamente elevada nas crianças infectadas ($p = 0,002$). Em contrapartida, nas células estimuladas por BCG, a concentração de TNF- α encontrada nos sobrenadantes das culturas das crianças infectadas, mediana de 2517,25 (199,72 a 22109,54) pg/mL, era menor quando comparadas as concentrações observadas nas culturas das crianças não infectadas, mediana de 6039,67 (2940,45 a 10807,80) ($p = 0,001$). Nas culturas estimuladas por PHA, não foram observadas diferenças entre as crianças infectadas e não infectadas (Figura 15).

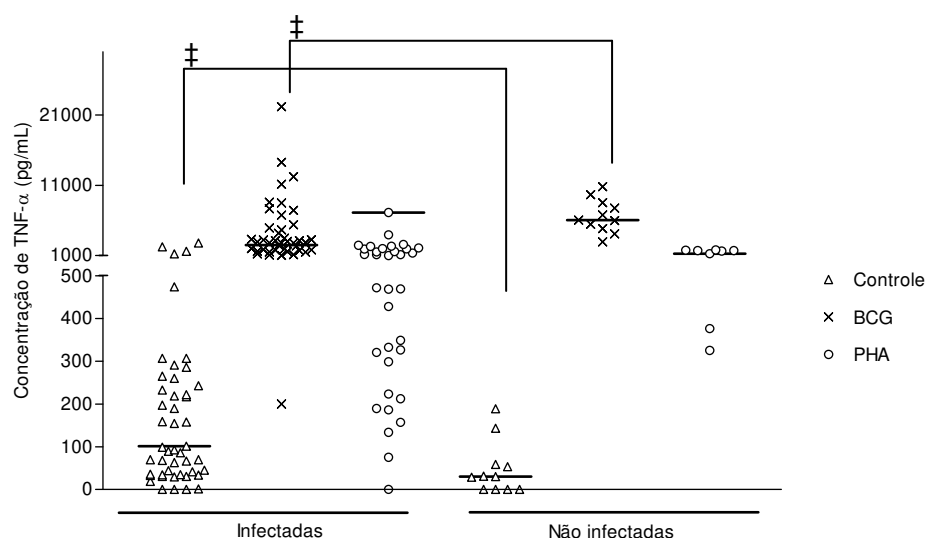


Figura 15- Concentração de TNF- α nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas (Δ), estimuladas por BCG ($\times$) ou fitohemaglutinina (PHA) ($\circ$), por 48 horas, de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não. ($\ddagger p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney).

Em relação ao IFN- γ , a produção espontânea e a estimulada por BCG estavam significativamente reduzidas nos sobrenadantes das culturas das crianças infectadas pelo HIV (respectivamente, $p = 0,034$ e $0,002$). Nas culturas estimuladas com PHA, não foi observada diferença na produção de IFN- γ entre as crianças infectadas pelo HIV ou não (Figura 16).

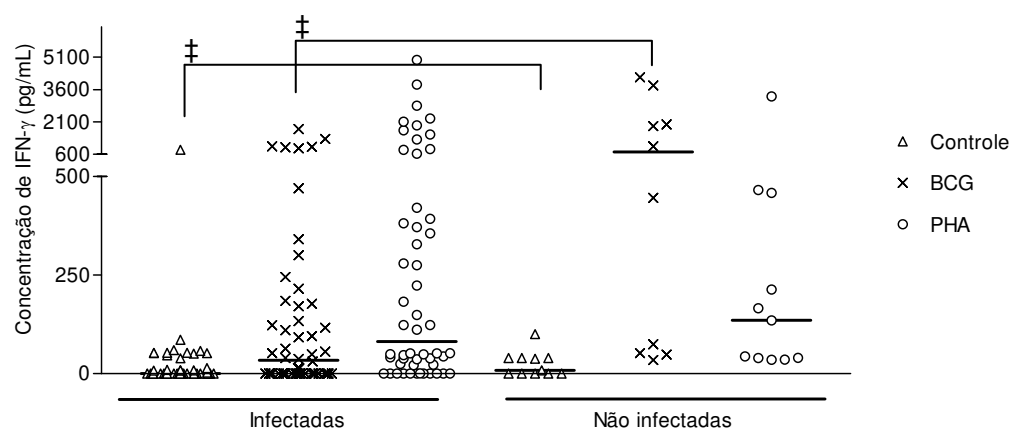


Figura 16- Concentração de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas (Δ), estimuladas por BCG ($\times$) ou fitohemaglutinina (PHA) ($\circ$), de crianças, por 48 horas, expostas ao HIV-1 infectadas ou não ($\ddagger p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney).

A concentração mediana da produção de IL-10, espontânea ou estimulada por BCG, nos sobrenadantes de cultura não diferiram entre as culturas das crianças infectadas ou não infectadas. Nas células estimuladas por PHA, a concentração mediana de IL-10 nos sobrenadantes das culturas das crianças infectadas foi significativamente menor em relação às culturas das não infectadas ($p = 0,001$) (Figura 17).

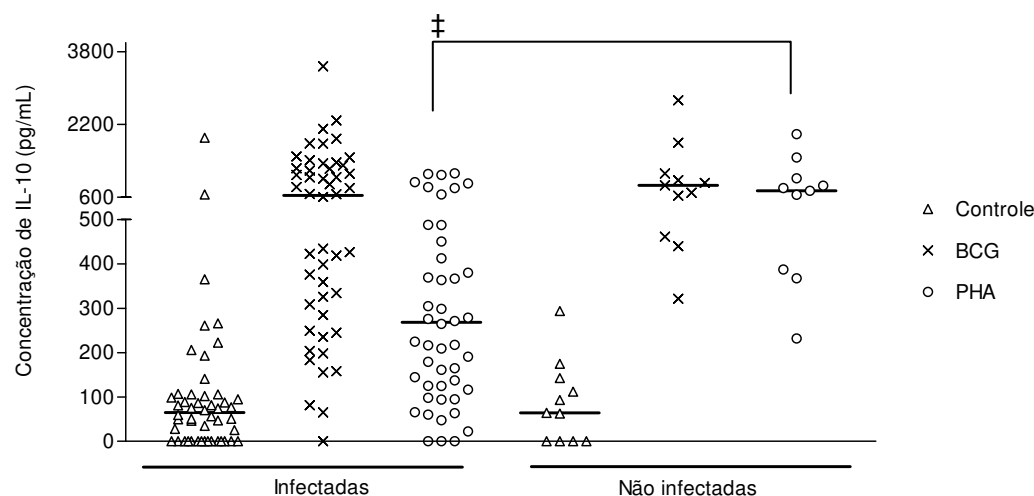


Figura 17- Concentração de IL-10 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas ($\triangle$), estimuladas por BCG ($\times$) ou fitohemaglutinina (PHA) ($\circ$), por 48 horas, de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não. ($\ddagger p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney).

A concentração mediana da produção de IL-4, espontânea, estimulada por BCG ou PHA, nos sobrenadantes de cultura não diferiu entre as cultura das crianças infectadas ou não (Figura 18).

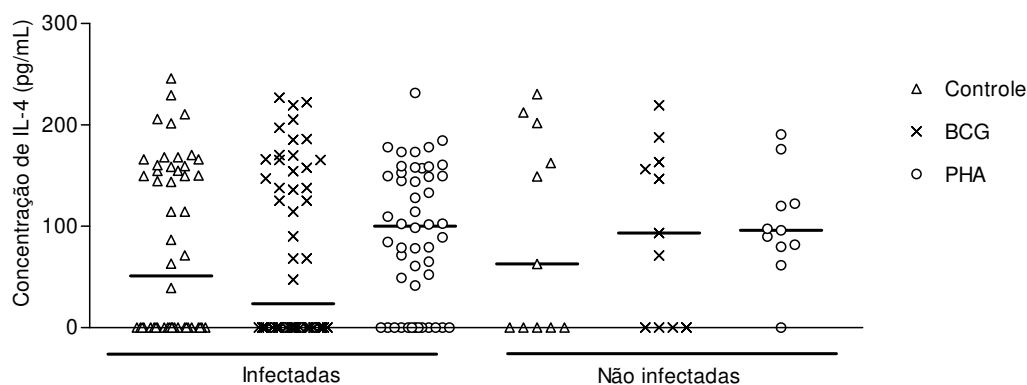


Figura 18- Concentração de IL-4 após 48 horas nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas (Δ), estimuladas por BCG ($\times$) ou fitohemaglutinina (PHA) ($\circ$), por 48 horas, de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não.

No início da suplementação alimentar não foram observadas diferenças entre os grupos nas concentrações de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-4 nos sobrenadantes de culturas das células não estimuladas, estimuladas por BCG ou PHA.

A produção de TNF- α nos sobrenadantes de cultura não foi modificada nas células não estimuladas, estimuladas por BCG ou PHA após a suplementação alimentar o alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas, nativas ou enriquecidas com pré-biótico (Figura 19).

Entretanto, ao comparar as concentrações de TNF- α nos sobrenadantes de cultura das crianças infectadas ao final da suplementação alimentar com os valores observados nos sobrenadantes das culturas das crianças não infectadas observa-se que a produção espontânea de TNF- α , antes aumentada, se equiparou aos valores das crianças não infectadas ($p = 0,355$).

Ao comparar os valores observados ao final da suplementação por grupo, verificou-se que as concentrações de TNF- α nos sobrenadantes das culturas celulares estimuladas com BCG nos grupos Pre-Biótico e Nativo alcançaram valores similares aos observados nas crianças não infectadas (respectivamente, $p = 0,412$ e $p = 0,085$).

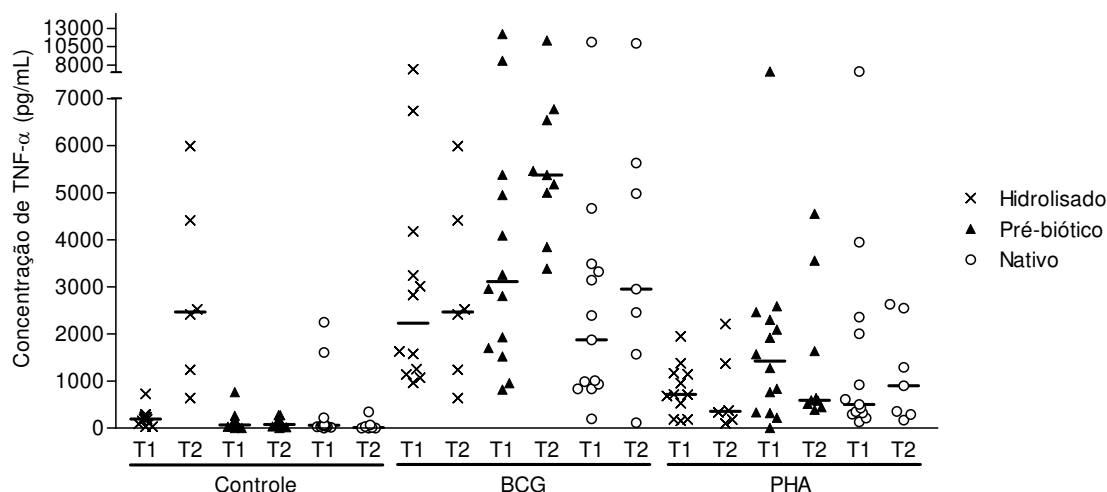


Figura 19- Concentração de TNF- α nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas, estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado) (×), nativas (Nativo) (○) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico) (▲).

Em relação ao IFN- γ , foi observado aumento significativo da sua produção nos sobrenadantes das culturas celulares estimuladas por BCG no grupo Nativo ($p = 0,042$). Nas culturas não estimuladas ou estimuladas por PHA não foram observadas diferenças entre os tempos ou entre os grupos (Figura 20).

Ao comparar as concentrações de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura observou-se que a produção de IFN- γ nas culturas estimuladas com BCG das crianças do grupo Pré-biótico ($p = 0,105$) e Nativo ($p = 0,360$) alcançaram valores similares aos observados nos sobrenadantes das culturas das crianças não infectadas.

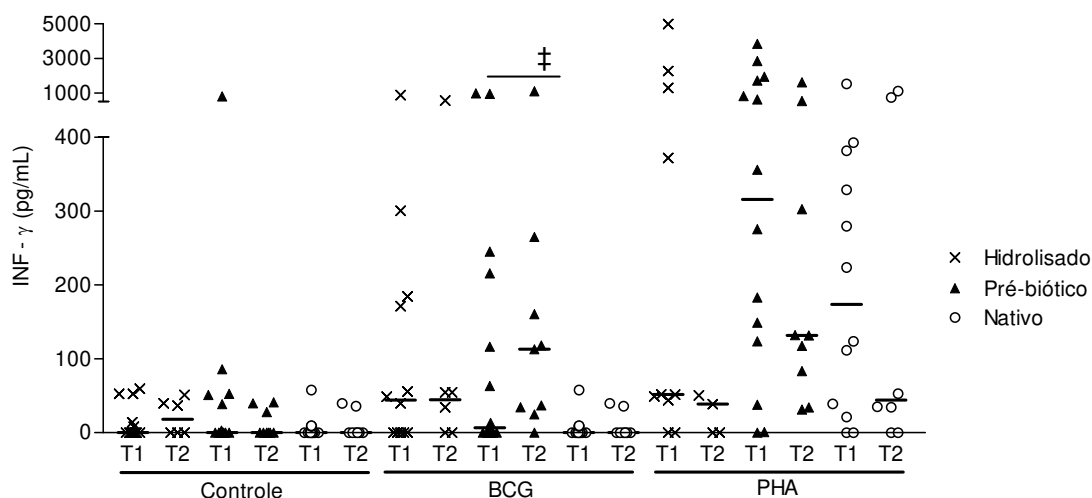


Figura 20- Concentração de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas, estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado) (X), nativas (Nativo) (O) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico) (▲). (‡ Diferença significativa entre Tempo 1 e 2, $p < 0,05$, Teste de Wilcoxon).

A produção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas não estimuladas, estimuladas com BCG ou PHA não foram modificadas após a suplementação alimentar (Figura 21).

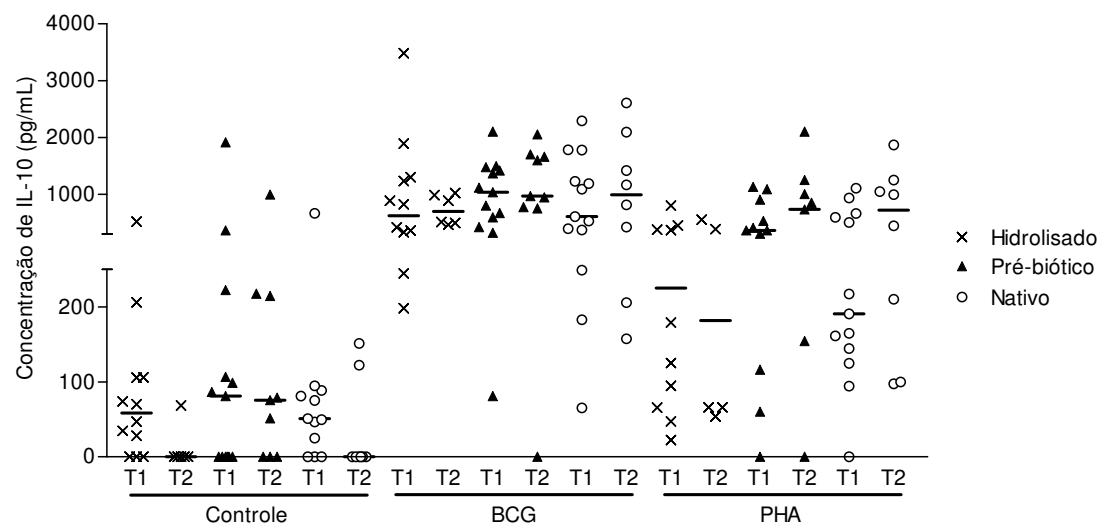


Figura 21- Concentração de IL-10 (pg/mL) em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas, estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado)(×), nativas (Nativo)(○) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico)(▲).

Em relação à produção de IL-4, foi observado aumento significativo na concentração nos sobrenadantes de cultura nas células não estimuladas e estimuladas por BCG no grupo Nativo ($p = 0,043$ para ambas) (Figura 22).

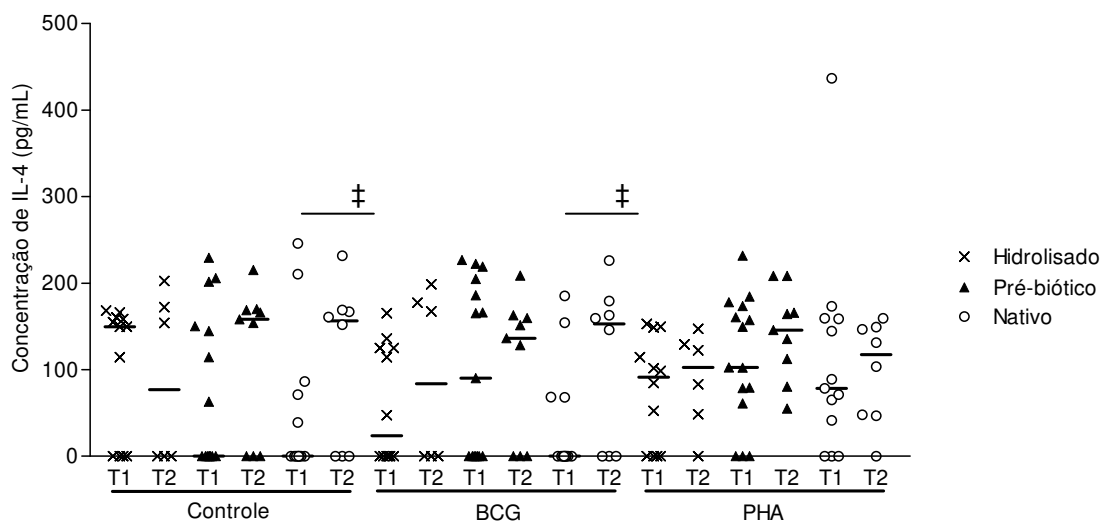


Figura 22- Concentração de IL-4 (pg/mL) nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas, estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado) (×), nativas (Nativo) (○) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico) (▲) (‡ Diferença significativa entre Tempo 1 e 2, $p < 0,05$, Teste de Wilcoxon).

5.3.6- Título de anticorpos Anti-HBs

Os títulos de anticorpos anti-HBs foram dosados em 26 crianças expostas e infectadas pelo HIV e em 6 crianças expostas e não infectadas.

Nas crianças infectadas, não foi observada resposta a HBsAg em 21/26 (80,76%), (título de anti-HBs inferior à 10 UI/mL), enquanto que nas não infectadas 5/6 (83,33%) responderam ao HBsAg. Na Tabela 9 encontram-se descritos os títulos de anticorpos anti-HBs observados.

Tabela 9- Distribuição de títulos de anticorpos anti-HBs de crianças expostas ao HIV-1 infectadas e não infectadas, após 3 doses da vacina de hepatite B.

Exposição ao HIV	Títulos de anti-HBs mUI/ml				
	< 10	10 -- 50	50 -- 100	100 -- 1000	≥ 1000
Infectadas (n = 26)	21 ¹	1	1	1	2
Não infectadas (n = 6)	1	1	1	2	1

¹ número de crianças

5.3.7- Glutathiona Eritrocitária

A concentração mediana da GSH nos eritrócitos das crianças infectadas pelo HIV-1 não diferiu dos valores observados nas crianças soro-reversoras. A mediana da concentração de GSH foi de 68,75 (21,21 a 112,01) mg/dL nas crianças infectadas e de 73,55 mg/dL nas soro-reversoras (Figura 23).

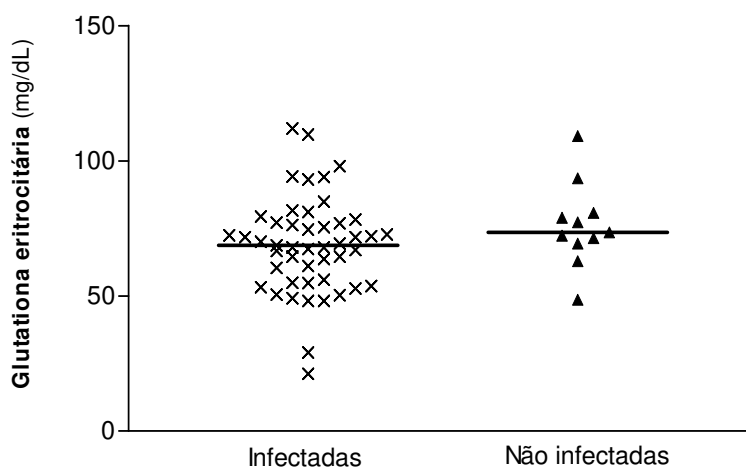


Figura 23- Concentração de GSH em eritrócitos (mg/dL) em crianças infectadas pelo HIV-1 e em crianças expostas, mas não infectadas pelo HIV.

Embora a suplementação alimentar tenha elevado a mediana da concentração da GSH ao longo do tempo nos três grupos, não houve significância (Figura 24).

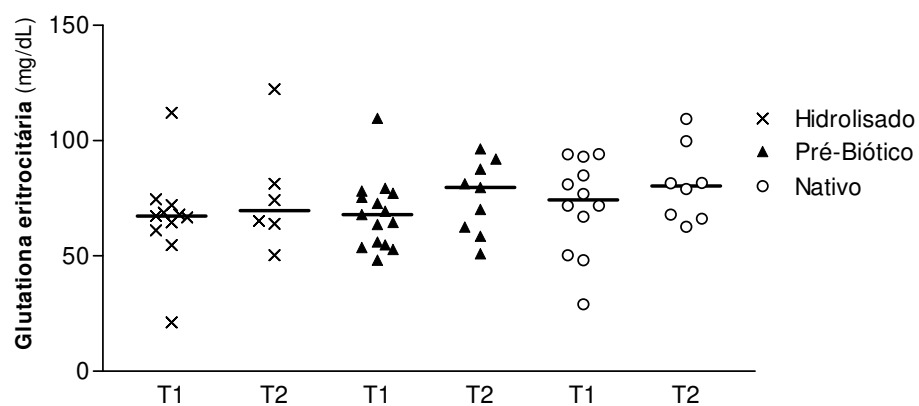


Figura 24- Concentração de GSH reduzida em eritrócitos (mg/dL) de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (T1) e final (T2) da suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado) (×), nativas (Nativo) (○) ou, enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico) (▲) (‡ Diferença significativa entre Tempo 1 e 2, $p < 0,05$, Teste de Wilcoxon).

6- DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados trabalham, principalmente, com os efeitos em curto prazo de três produtos comerciais contendo proteínas do soro de leite bovino, nativas, hidrolisadas ou enriquecidas com pré-bióticos, sobre o estado nutricional, resposta imune celular específica para o BCG e glutatona, em crianças infectadas pelo HIV-1 recebendo terapia anti-retroviral de altamente ativa (HAART).

A falha do crescimento é um aspecto comum das crianças com AIDS (Laue et al., 1990; McKinney e Robertson, 1993; Miller et al., 1993; Nair et al., 1993; Matarazzo et al., 1994; Saavedra et al., 1995; Lepage et al., 1996; Agostoni et al., 1998). Em estudo prévio, foi observado que as alterações do crescimento já se apresentavam nas crianças de 3 meses de idade e que o peso era mais precocemente comprometido do que o comprimento, embora as diferenças não fossem, ainda, significativas. Durante o primeiro ano de vida, as crianças eram proporcionalmente menores em peso e comprimento. O crescimento das crianças infectadas estava gravemente afetado comparado às crianças soro-reversoras expostas às mesmas condições sociais (Leandro-Merhi et al., 2001). Observa-se que a gravidade das manifestações da AIDS está associada com o estado nutricional e com a idade do início dos sintomas. Porém, as mudanças de categorias clínicas do paciente com AIDS sob terapia anti-retroviral não estão associadas com a piora do estado nutricional. Os pacientes que mudaram sua categoria clínica durante o seguimento poderiam ser capazes de manter os mesmos índices nutricionais, peso para idade, altura para idade e peso para altura (Centeville et al., 2005).

No presente estudo, não foi observada influência da intervenção nutricional com suplemento alimentar contendo proteínas do soro do leite bovino sobre os escores Z dos índices antropométricos. Embora isto possa ser interpretado como falta de influência da suplementação sobre o estado nutricional, é mais provável que seja resultante da terapia anti-retroviral prévia, na qual os pacientes pré-tratados já fizeram seu *catch-up* do distúrbio do retardo do crescimento. Outros autores sugerem que a ocorrência da desnutrição nestes pacientes está associada à idade do início dos sintomas, à gravidade da categoria clínica ao diagnóstico, ao aumento das necessidades de ingestão de energia, bem como redução da ingestão, má absorção intestinal e em decorrência de problemas econômicos (Miller et al., 1993; Winter, 1996). A função anormal da glândula tireóide, do eixo da

somatomedina, do metabolismo lipídico e do gasto energético em repouso também podem contribuir para a redução do crescimento (Grunfeld et al., 1992; Grinspoon et al., 1994).

Nesta direção, é relevante observar que as crianças deste estudo apresentavam elevada ingestão protéica, mas baixa ingestão calórica considerando o aumento do aporte calórico sugerido por Miller (2003). Este desbalanceamento tem a sua repercussão documentada nos baixos valores dos escores Z de peso e altura no momento inicial da nossa avaliação nutricional. No entanto, a falha de crescimento nas crianças com AIDS não é causada apenas pela ingestão calórica inadequada, uma vez que o aumento do aporte calórico parece não aumentar a massa corporal magra ou acelerar a taxa de crescimento linear, mas apenas aumentar o peso e a massa de gordura. Neste estudo foi observado que a suplementação por três meses com suplemento contendo proteínas de soro de leite hidrolisadas ou nativas foi capaz de aumentar as reservas de tecido adiposo. Esta influência é revelada pelo aumento do perímetro braquial e área adiposa do braço no grupo que recebeu o suplemento Hidrolisado e pelo aumento do somatório das pregas cutâneas no grupo que recebeu o suplemento Nativo.

Deve ser ressaltado que todas as crianças estavam sob HAART e, a literatura mostra que as crianças tratadas com inibidor da transcriptase reversa análogo ao nucleosídeo apresentam aumento temporário do ganho de peso e da taxa de crescimento linear (Pollack et al., 1996).

Nossos dados de antropometria ainda necessitam de uma análise para verificar a associação entre o crescimento e o ganho de peso observados e, o estágio da infecção pelo HIV-1 e a resposta à HAART. A correlação entre o crescimento e a carga viral está bem estabelecida na literatura (Pollack et al., 1996).

O crescimento parece ser um dos indicadores mais sensíveis da progressão da doença nas crianças com AIDS. Com exceção de três crianças (uma em cada grupo de suplementação alimentar), as demais apresentaram sintomas antes dos dois anos de idade, caracterizando infecção pelo HIV-1 com progressão rápida (De Rossi et al., 1996). A ausência do crescimento pode indicar um pobre prognóstico, mesmo em crianças tratadas com antiretrovirais (Pizzo, 1990; Tovo et al., 1992; McKinney e Wilfert, 1994;

Berhane et al., 1997; Carey et al., 1998; Lindsey et al. 2000). A deficiência do crescimento geralmente precede o declínio na contagem de células TCD4⁺ e o desenvolvimento subsequente de infecções oportunistas (Scott et al., 1989; Brettler et al., 1990). Vários estudos mostraram que o ganho de peso pode ser um importante indicador da eficácia terapêutica da terapia anti-retroviral (Ogino et al., 1993; Mofenson et al., 1993).

Há evidências de que a HAART tem efeito favorável sobre a altura e o peso das crianças infectadas pelo HIV-1, especialmente naquelas em que a terapia leva a uma redução da carga viral de, pelo menos, 1,5 log ou reduz para valores inferiores à 500 cópias/mL e, a um aumento no escore Z das células TCD4⁺ (Verweel et al., 2002).

Ao contrário dos adultos, não se observou aumento do IMC em todas as crianças efetivamente tratadas com a HAART. O IMC aumentou mais nas crianças com estágio avançado de infecção e com o estado nutricional gravemente comprometido ao diagnóstico (Verweel et al., 2002). Estudo recente com crianças infectadas pelo HIV-1 mostrou que o uso do inibidor de protease (IP) leva ao aumento do peso em relação à altura, melhora a massa magra e, no seguimento em longo prazo, tende a aumentar a massa de gordura (Miller et al., 2001). As diferenças do efeito da HAART sobre a composição corporal entre crianças e adultos podem ser atribuídas ao fato de que as crianças ainda estão crescendo e seu metabolismo é diferente, entretanto, são necessárias pesquisas adicionais.

O peso das crianças em uso de HAART, após um ano de terapia, aumenta significativamente; entretanto, esse efeito não é observado na altura. Esta é uma reação normal para correção do *catch-up* do distúrbio do retardo do crescimento, que afeta primeiramente o peso seguido da altura (Prader et al., 1963). Três outros estudos sobre os efeitos da HAART sobre o crescimento em crianças mostraram resultados similares (Melvin et al., 1997; Nadal et al., 1998; Miller et al., 2001).

A maioria dos estudos sobre o crescimento de crianças infectadas pelo HIV-1 inclui crianças com idade inferior a cinco anos de idade. Após os cinco anos, é pouco claro o que acontece no crescimento. As crianças do presente estudo estão nesta faixa etária, portanto não sabemos se o déficit do crescimento é um sintoma independente do HIV-1 ou é decorrente de outros sintomas clínicos ainda não esclarecidos. O Estudo Europeu

Multicêntrico (2003) sobre o crescimento de crianças infectadas pelo HIV-1 mostrou que o seu crescimento é consideravelmente mais lento e que as diferenças entre as crianças infectadas e as expostas, mas não infectadas pelo HIV-1 aumenta com a idade. Os padrões de crescimento das crianças infectadas assintomáticas foram similares aos das crianças com sintomas leves e moderados. Contudo, as crianças gravemente enfermas apresentavam maior comprometimento do crescimento em todas as idades. Este trabalho mostra também que a HAART pode melhorar o peso e, em menor extensão, a altura das crianças gravemente doentes (The European Collaborative Study, 2003).

A falha no crescimento pode afetar a qualidade vida da criança especialmente quando ela alcança a adolescência. Isto deve ser tomado em consideração ao se tomar a decisão do início do tratamento, na mudança dos anti-retrovirais e na intervenção nutricional (The European Collaborative Study, 2003).

Pesquisas adicionais ajudarão a esclarecer o impacto da HAART e da suplementação nutricional sobre o crescimento, principalmente quando considerados os diferentes regimes de tratamento além do momento do início visando otimizar o crescimento das crianças infectadas pelo HIV-1.

Na criança com AIDS, o gasto energético pode estar aumentado e a ingestão calórica diminuída e a presença de diarreia, associada a essas condições, resultará na redução da absorção de nutrientes. Estudos mostram que as deficiências de micronutrientes estão associadas ao curso da infecção pelo HIV e a disfunção imune (Baum et al., 2000; Shor-Posner et al., 2002;).

A infecção pelo HIV-1 causa imunodeficiência progressiva crônica e desregulação imune. Os resultados observados mostram que as crianças infectadas quando comparadas às crianças expostas, mas não infectadas pelo HIV-1 apresentavam os percentuais das células T CD4⁺ e TCR $\gamma\delta$ significativamente reduzidos e o percentual das células T CD8⁺ aumentado.

Embora a simples depleção do principal alvo do HIV, a célula T CD4⁺, possa explicar muito da imunossupressão vista nestes pacientes, existem muitos outros fatores que contribuem para a desregulação imune. A depleção das células T CD4⁺ induz a uma

série de mecanismos homeostáticos que contribuem para a ativação imune e *turnover* celular. Como consequência, haverá maior replicação viral, morte celular e defeitos funcionais em vários órgãos linfóides. Estas mudanças são progressivas e comprometem o processo de homeostasia (McCune, 2001).

Os resultados deste estudo mostram que esta infecção, como qualquer outra infecção viral, provoca uma resposta imune ativa consistindo de resposta $CD4^+$ e $CD8^+$. Ambas aparecem comprometidas e desenvolvem células de memória aberrantes devido a cronicidade da apresentação do antígeno e da variação do genoma viral (Resino et al., 2004). Em nosso estudo, observou-se que as células T $CD4^+$ de memória ($CD4^+CD45RO^+$) estavam reduzidas nas crianças infectadas enquanto que as células T $CD8^+$ de memória ($CD8^+CD45RO^+$) encontravam-se significativamente aumentadas.

Estes defeitos combinados com a capacidade do vírus de escapar de qualquer resposta imune bem sucedida levam a uma resposta imune atenuada, que pode tornar-se exaurida, caracterizada por déficit progressivo do repertório de células T. Além disso, os mecanismos regulatórios negativos que normalmente controlam a resposta imune podem ser ativados diretamente pelo vírus (Resino et al., 2004; Munier e Kelleher, 2007). Os nossos dados mostram que o percentual de linfoblastos estimulados por PHA e os específicos para o BCG encontram-se diminuídos em relação ao observado nas crianças expostas e não infectadas.

Em relação à suplementação alimentar, observou-se que os grupos que receberam os suplementos Nativo e Pré-biótico apresentaram uma recuperação significativa das células de memória para o BCG, avaliada pelo aumento da capacidade proliferativa destas células.

A infecção crônica associada à redução das células T $CD4^+$ e consequente desregulação do sistema imune, observadas na infecção pelo HIV-1, são decorrentes decorrente do tropismo da proteína do envelope viral para a molécula $CD4^+$ e receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4. Estas moléculas agem como receptores e co-receptores, respectivamente, para a entrada do HIV (Munier e Kelleher, 2007).

A desregulação do sistema imune vista neste trabalho é resultado da cronicidade da infecção e da queda progressiva de células T CD4⁺. Contudo há dados da literatura que desafiam este paradigma, mostrando que certos defeitos do sistema imune ocorrem na fase aguda da infecção, ou seja, no momento da resposta imune primária para o HIV-1. Dados referentes à infecção aguda em adultos sugerem que, embora exista uma tentativa de responder à infecção, os defeitos na geração de respostas antivirais efetivas, especialmente a geração de células T CD4⁺ de memória ocorrem dentro de semanas (McCune, 2001).

Quando o número de células T CD4⁺ diminui, ocorrem mudanças na proporção entre as células de memória (CD45RO⁺) e as células T *naïve* (CD45RA⁺). Com a progressão da doença há perda relativa de células T *naïve* (De Martini et al., 1988; Zaunders et al., 1995; Ullum et al., 1997; McCune, 2001, Resino et al., 2004). A causa disto ainda não é clara, pois na infecção *in vitro* são as populações de células de memória quem se mantém e o co-receptor utilizado pelo vírus até a fase tardia da doença é o CCR5, que não é expresso nas células T CD4⁺ *naïve* (Schnittman et al., 1990; Dragic et al., 1996; Deng et al., 1996; Bjorndal et al., 1997; Bleul et al., 1997).

É possível que a ativação crônica, apresentação do antígeno e reativação da infecção crônica resultem em *turnover* de T CD4⁺ de memória e de sua subsequente morte levando ao recrutamento de células *naïves* para o pool de memória com a finalidade de repor estes déficits. Há evidências de progressiva ruptura do repertório do receptor de célula T (TCR) decorrente da infecção progressiva que, por sua vez, reflete falhas do repertório imune por provável depleção ou exaustão clonal (Murray et al., 1998; Connors et al., 1997; Zinkernagel et al. 1994; Pantaleo et al. 1997).

A intervenção com antiretrovirais e interleucina 12 (IL-12) parece não reparar este déficit (Kovacs et al., 1996, 1997). O aumento inicial no número de células T CD4⁺, após o início da terapia anti-retroviral pode ser derivado inteiramente da população de células de memória existente no momento da introdução da terapia. O aumento do número de células *naïve* ocorrerá após vários meses de terapia e então o aumento será modesto com evidência limitada do reparo do repertório, exceto nas crianças nas quais a função tímica ainda é relativamente preservada (Kelleher et al., 1996; Autran et al., 1997; 1999; 2001;

Gea-Banacloche et al., 2000; Kostense et al., 2001; Cohen et al., 2002; Pahwa et al., 2003; Kou et al., 2003; Cossarizza et al., 2004, Resino et al. 2004).

As crianças do nosso estudo, por serem fundamentalmente progressoras rápidas, devem apresentar comprometimento da função tímica uma vez que o HIV-1 interfere em todos os órgãos linfóides.

Mesmo sob prolongada terapia anti-retroviral o número de T CD4⁺ na maioria dos indivíduos não retornou a normalização. Embora mecanismos homeostáticos pareçam ser mobilizados, eles não compensam estes déficits, uma vez que há evidências do comprometimento de vários dos mecanismos homeostáticos. A extensão deste mecanismo regenerativo extra-tímico, nos indivíduos com baixo volume tímico, correlaciona-se com os níveis plasmáticos de IL-7 (Kimmig et al., 2002; Kalayjian et al., 2007).

Esta expressão desregulada, a qual é parcialmente resolvida pela HAART, tem implicações para a geração efetiva de células T específicas para o HIV. Outra possível causa para a falta de recuperação das células T, após a HAART, pode ser a ruptura da arquitetura do linfonodo. Na infecção crônica, há ruptura progressiva da arquitetura do linfonodo resultante da ativação imune e inflamação que leva à deposição de colágeno no tecido linfático e, a fibrose no tecido linfático correlaciona-se à redução da população de células T CD4⁺ (Biberfeld et al., 1987; Pallesen et al., 1987; Schacker et al., 2002).

Dados recentes sugerem que a redução de células T CD4⁺ é mais substantiva dentro da população *naïve* e está em proporção à extensão da deposição de colágeno dentro do tecido linfático (Schacker et al., 2006). Isto sugere que a capacidade de regenerar as células *naïve* na periferia, através de mecanismos como o da IL-7 encontra-se comprometido pela ruptura da microarquitetura na qual esta regeneração poderia ocorrer normalmente.

A regeneração da célula T ocorre pelo balanço entre a expansão e a apoptose. A taxa de *turnover* encontra-se aumentada na infecção pelo HIV-1. Vários estudos mostraram, de forma consistente, que existe uma proliferação celular de TCD4⁺ e CD8⁺ aumentada na infecção pelo HIV-1. A proporção de células T CD4⁺ que se divide está

aumentada entre 3 a 5 vezes em relação a observada em indivíduos saudáveis. Em relação as células T CD8⁺, a proporção encontra-se aumentada entre 5 a 8 vezes (Sachsenberg et al., 1998; Zhang et al., 1998; Hellerstein et al., 1999; Lempicki et al., 2000).

A despeito desta elevada taxa de proliferação, o número de células T CD4⁺ não aumenta e a taxa de produção de novas células T CD4⁺ não é significativamente maior do que a observada nos controles saudáveis, cerca de 10 células/mL/dia, indicando que uma proporção significativa das células em proliferação não completam a divisão ou morrem precocemente (Fleury et al., 2000).

O mesmo argumento pode ser realizado para as células T CD8⁺. A despeito do seu aumento substancial observado na proliferação, o número de T CD8⁺ apenas dobra e seu número total declina progressivamente, em paralelo com a diminuição das células TCD4⁺, na infecção crônica (Fleury et al., 2000).

Em relação à apoptose, encontra-se aumentada nas células T CD8⁺ ativadas, sendo mais elevada do que nas células T CD4⁺ (Groux et al., 1992; Meyaard et al., 1992; Gougeon et al., 1997; Badley et al., 2000).

A morte celular e o aumento do tráfego dos linfócitos para os tecidos nos quais sofrem apoptose pode justificar a falta de acúmulo das subpopulações de células T células na periferia e o seu elevado *turnover* (Boirivant et al., 1996; De Maria et al., 1996).

A ativação e a proliferação das células T não diminuem com a redução da carga viral. A ativação pode ser decorrente do controle natural, como o observado nos pacientes não progressores, ou induzida pela terapia anti-retroviral. O retorno aos níveis normais de ativação e *turnover* ocorre apenas após prolongada intervenção terapêutica efetiva (Zaunders et al., 1999; Fleury et al., 2000).

Enquanto o *turnover* viral desempenha papel significativo na ativação crônica, nem todas as células ativadas são específicas para o HIV-1. Provavelmente, muitas células encontram-se ativadas e proliferando em resposta tanto aos processos de homeostasia, quanto à reativação induzida por outros patógenos quando há falha do controle imune (Murali-Krishna et al., 1998; Scales et al., 2001; Doisne et al., 2004;).

Em relação à função das células T CD4⁺, vários defeitos foram observados no curso da infecção pelo HIV-1. Um dos defeitos mais precoces descritos é o da perda da capacidade proliferativa *in vitro* a antígenos e mitógenos. Esta perda é progressiva e ocorre em conjunção à depleção do número de T CD4⁺, bem como, da sua capacidade em sintetizar interleucina 2 (IL-2) em resposta a estímulos (Lane et al., 1985; Wahren et al., 1987; Gurley et al., 1989; Clerici et al., 1989). Foi observado que os indivíduos infectados que mantêm resposta proliferativa *in vitro* para antígenos do HIV apresentam baixos níveis de carga viral (Dyer et al., 1996; 1997; Rosenberg et al., 1997; Wilson et al., 2000). A resposta proliferativa específica para o HIV-1 está presente no início da infecção na maioria dos pacientes, mas logo é perdida (Oxenius et al., 2000; Rosenberg et al., 2000).

O déficit da capacidade proliferativa não é resultante da morte das células proliferativas pelo vírus. Embora a adição de antiretrovirais às culturas celulares não restaure esta atividade linfoproliferativa, a terapia anti-retroviral, no início da infecção, pode resultar na preservação desta atividade (Fidler et al., 2002).

Inicialmente, a perda da resposta proliferativa específica para o HIV era atribuída à perda completa do repertório das células T CD4⁺ específicas. Contudo, novas maneiras de identificar as células T CD4⁺ específicas para o HIV-1, as quais não envolvem proliferação *in vitro*, sugerem que, mesmo nos pacientes não tratados, um número substancial de células T CD4⁺ específicas persiste no processo da doença (Pitcher et al., 1999; McNeil et al., 2001; Iyasere et al., 2003). Contudo, nos indivíduos com carga viral elevada (10⁶ cópias/mL) estas células raramente são detectadas (Boritz et al., 2004; Palmer et al., 2004).

As células específicas para o HIV-1 parecem ter um fenótipo efetor quando julgadas pela produção de citocinas (IL-2, IFN- γ) (Palmer et al., 2004; Scriba et al., 2005). Além disso, parece que a estimulação crônica viral relaciona-se ao aparecimento de células efetoras de vida curta, produtoras de IFN- γ mais do que o *turnover* de células T CD4⁺ de memória. Acredita-se que a produção de IL-2 seja importante para o desenvolvimento de células T CD8⁺ de memória e que estas células sofram rápida expansão em resposta à re-estimulação antigênica (Sallusto et al., 1999).

A perda das células T CD4⁺ de memória é o principal déficit irreversível na infecção pelo HIV-1 crônica, ocorrendo mesmo com a restauração da contagem de T CD4⁺ e diminuição da carga viral decorrentes da terapia anti-retroviral. Contudo, sob certas circunstâncias, a introdução precoce da terapia anti-retroviral é capaz de alterar o fenótipo e a função das células T CD4⁺ específicas para o HIV (Scriba et al., 2005). A suplementação contendo proteínas do soro de leite para as crianças deste estudo foi capaz de aumentar a capacidade proliferativa de T CD3⁺, com predominância de células TCR $\gamma\delta$. Esta modulação foi visível com o produto que continha proteínas nativas e com enriquecido com pré-bióticos.

Uma terapia anti-retroviral bem estruturada é capaz de reduzir a carga viral e levar células T CD4⁺ efectoras à adquirirem características consistentes às células de memória central (aumento da expressão de CCR7, da produção de IL-2 e da proliferação *in vitro*) (Alexander et al., 2003; Elrefaei et al., 2004). Entretanto, a retirada da terapia anti-retroviral aumenta a carga viral e o fenótipo das células específicas para o HIV-1 revertem para um fenótipo efector (Scriba et al., 2005).

O repertório do TCR das células específicas para o HIV-1 parece não variar, sugerindo que, a curto prazo, estas células surgem de células efectoras de memória existentes e não da diferenciação de células *naïve* (Malhotra et al., 2003).

No presente estudo foi observada diminuição no percentual de células TCR $\gamma\delta$ no sangue periférico das crianças infectadas pelo HIV-1. Na infecção pelo HIV há um declínio numérico das subpopulações de linfócitos T $\gamma\delta$ expressando receptores V γ 9/V δ 2 e aumento no número de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ no epitélio gastrointestinal está associado ao aumento da gravidade da doença. Entretanto, informações sobre o efeito da infecção pelo HIV sobre a função das células TCR $\gamma\delta$ e a sua contribuição para a imunodeficiência observada na AIDS ainda são limitadas (Sciammas e Bluestone, 1999; Poccia et al., 1999; Imlach, 2003).

A infecção pelo HIV inibe a atividade citolítica das células T $\gamma\delta$, bem como sua capacidade de proliferar e produzir citocinas Th1 em resposta ao estímulo com *Mycobacterium tuberculosis* (Alfano e Poli, 2005). No presente estudo, observou-se

diminuição do percentual de células TCR $\gamma\delta$ nas culturas de células mononucleares estimuladas com BCG das crianças infectadas pelo HIV -1 em relação às expostas não infectadas.

Embora a suplementação alimentar com os suplementos Nativo e Pré-biótico, por três meses, tenha aumentado a proliferação linfocitária específica para o BCG e que nessa condição a expansão de TCR $\gamma\delta$ seja predominante, o aumento dessa subpopulação de linfócitos T não foi observada.

Como existe uma depleção geral das células T $CD4^+$ no GALT, o aumento relativo no número das células T regulatórias pode ser substancial e comprometer a geração de uma resposta imune efetiva (Mehandru et al., 2004; Guadalupe et al., 2003; 2006; Nilsson et al., 2006). As respostas T citotóxicas estão presentes durante a infecção primária sendo que o início de suas atividades correlaciona-se com o pico da carga viral na infecção primária e sua atividade é o principal determinante da duração do período assintomático da infecção (Borrow et al., 1994; Koup et al., 1994; McMichael e Rowland-Jones, 2001).

Observamos que a suplementação com proteínas do soro de leite bovino enriquecidas com pré-biótico aumentou a relação das células T $CD4^+/CD8^+$. Embora não tenha sido observada mudança significativa na relação $CD4^+/CD8^+$ no grupo Hidrolisado após a suplementação alimentar os valores observados não diferiram dos encontrados nas crianças expostas e não infectadas.

A resposta das células T $CD8^+$ parece ter papel importante no controle viral, uma vez que, na progressão da doença, são observados altos níveis de células T $CD8^+$ ativadas e a extensão desta expansão prediz a evolução da doença independentemente da contagem das células T $CD4^+$ e da carga viral (Liu et al., 1997; Papagno et al., 2004).

Na infecção crônica pelo HIV-1, as células T $CD4^+$ têm expressão aumentada do receptor inibitório *programmed death 1* (PD-1) (regulador negativo de células T ativadas). A expressão do PD-1 nas células T $CD4^+$ e $CD8^+$ correlaciona-se positivamente com a carga viral e negativamente com a contagem de células T $CD4^+$, mostrando

evidência de uma correlação entre a resposta adaptativa das células T e parâmetros de progressão da AIDS. (Day et al., 2006; Trautmann et al., 2006).

O bloqueio desta via de sinalização melhora a resposta proliferativa das células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas para o HIV, além de melhorar a sobrevivência e produção de citocinas das células T CD8⁺ (Day et al., 2006; Trautmann et al., 2006).

A depleção das células T CD8⁺ em macacos infectados pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV) resulta no aumento da carga viral e progressão rápida da doença (Matano et al., 1998; Jin et al., 1999). Assim como nas células T CD4⁺, há evidência para o desenvolvimento disfuncional das células T CD8⁺ específicas para o HIV-1, com distorção do fenótipo de maturação mais voltado para o de célula efetora do que para o de célula de memória (Sallusto et al., 1999; Appay et al., 2000; Champagne et al., 2001; Chen et al., 2001; Ellefsen et al., 2002; Migueles et al., 2002; Lichterfeld et al., 2004; Fuller et al., 2005; Betts et al., 2006). Estes achados sugerem que o desenvolvimento das células T CD8⁺ na presença crônica de uma carga antigênica resulta na exaustão e falha de uma resposta imune efetiva.

No presente estudo foi observado, nas culturas não estimuladas e nas estimuladas por BCG e PHA, percentual aumentado de células não viáveis.

Outros indicadores da desregulação imune incluem os componentes inflamatórios para a progressão da infecção pelo HIV-1. Altos níveis de TNF- α e IL-6 são observados durante a infecção progressiva pelo HIV-1 (Lau et al., 1990; Dezube et al., 1992; Navikas et al., 1995). Em nosso trabalho, foi observado que as crianças infectadas apresentavam produção espontânea de TNF- α aumentada, enquanto que quando as células eram estimuladas com BCG e PHA a produção dessa citocina encontrava-se reduzida. Em crianças, após o início da HAART, observa-se que a produção diminuída de TNF- α e de IFN- γ em resposta ao estímulo com PHA alcança níveis semelhantes ao observado no grupo controle (Resino et al., 2004).

Interessantemente, após três meses de suplementação alimentar, a produção espontânea de TNF- α nos sobrenadantes de cultura atingiram valores semelhantes aos observados nos sobrenadantes de cultura das crianças expostas e não infectadas. Esse

achado foi observado em todos os grupos suplementados. Resultados semelhantes foram observados nos sobrenadantes das culturas estimuladas. nos grupos suplementados com as proteínas nativas ou enriquecidas com pré-bióticos. A produção de TNF- α estimulada por BCG ou por PHA, que se encontravam reduzidas, atingiram valores semelhantes aos das crianças não infectadas.

A concentração de IFN- γ nas células estimuladas por BCG estava reduzida nas crianças infectadas. Lee et al. (1996) testaram a hipótese de que a troca do padrão de citocinas correlaciona-se com a progressão da doença, através da determinação de citocinas em sobrenadantes de cultura de CMSP estimuladas com PHA + PMA. Eles descreveram que as PBMC das crianças progressoras rápidas estimuladas com PHA + PMA produziram significativamente menor quantidade de IL-2 e IFN- γ do que as crianças expostas e não infectadas.

A BCG induz uma produção sequencial de citocinas Th1 e Th2. Inicialmente, entre o primeiro e segundo dia após o estímulo, a resposta é dominada por monocinas e baixa produção de TNF- α e IFN- γ . A partir do quarto e quinto dia, há uma produção marcante de linfocinas Th1, com aproximadamente 6% de células IFN- γ ⁺, 4% de células TNF- α ⁺ e 2% de células IL-2⁺. Mais tardiamente, entre o décimo e décimo segundo dia, é detectada uma resposta Th2 com IL-4, IL-5 e IL-10, enquanto que a síntese de linfocinas Th1 e monocinas declinam. A produção tardia de citocinas Th2, na resposta à BCG, pode refletir a dinâmica no balanço *in vivo*, com função de prevenir a expressão inflamatória exacerbada das citocinas Th1 que poderia acarretar em lesão tecidual (Sander et al. 1995).

Dados obtidos experimentalmente, demonstraram que as células T CD8⁺ de indivíduos vacinados com BCG podem ser ativadas e produzir IFN- γ após estimulação *in vitro* com *M. bovis*. Estes resultados sugerem que as células tipo 1 tenham papel importante nas defesas humanas anti-micobacterianas (Kindler et al., 1989).

A concentração de IFN- γ nas células estimuladas por BCG aumentou após a suplementação alimentar com produto contendo proteínas do soro de leite nativas achado de grande valor uma vez que, o IFN- γ é considerado como a principal citocina induzida pela micobactérias em indivíduos saudáveis (Sander et al., 1995; Anuradha et al., 2007).

A extensão da desregulação do sistema imune focaliza-se em dois tipos de observações clínicas, ambos relacionados à terapia anti-retroviral. A primeira observação clínica é o fenômeno da doença da reconstituição imune, que ocorre em pacientes que iniciam a terapia anti-retroviral em estágio tardio da doença. A doença da reconstituição imune caracteriza-se por uma resposta imune aberrante e exuberante para os patógenos que o indivíduo infectado possui no início da terapia. Associa-se com morbidade e mortalidade significativa (Stone et al., 2001; 2002-a; -b; French et al., 2004).

A segunda observação clínica relaciona-se aos protocolos de intervenção terapêutica que ainda precisam demonstrar a capacidade de controlar a carga viral. Embora esteja claro que existe uma desregulação progressiva da resposta imune com a progressão da doença, a terapia existente corrige parcialmente estes déficits. A estratégia de suplementação com as proteínas do soro de leite para estes pacientes é promissora.

A infecção pelo HIV-1 está associada com nível subnormal de GSH e aumento de GSH foi observado em adultos e crianças infectadas pelo HIV sob terapia anti-retroviral após a suplementação com proteínas do soro de leite bovino. Em crianças, foi observado aumento significativo de 16,14 mg/dL da GSH nos eritrócitos e redução da morbidade, sugerindo que a síntese de GSH interfere na evolução da AIDS. Nos pacientes adultos também foi observado aumento dos níveis de GSH no plasma (Micke et al., 2001; Moreno et al., 2006). Entretanto, ainda falta uma observação em longo prazo para saber se esta eficácia bioquímica das proteínas do soro de leite se traduz em uma evolução mais favorável da AIDS.

Embora não tenha sido observada melhora nos níveis de GSH ou redução da inflamação após 3 meses de suplementação, podemos considerar promissora a observação de que os níveis de produção espontâneas de TNF- α não diferirem dos valores observados nos sobrenadantes de cultura das crianças expostas e não infectadas. Aukrust et al. (2003) observaram que a adição de éster de GSH a culturas de CMSP de pacientes infectado pelo HIV, suprimiram a liberação espontânea de TNF- α nos sobrenadantes de cultura.

Na infecção pelo HIV, a GSH diminui rapidamente e seu declínio continua com a progressão da doença (Buhl et al. 1989). Foi demonstrado que agentes que aumentam o nível intracelular de GSH são capazes de inibir a replicação viral (Kalebic et al., 1991).

Entretanto nossos dados não demonstraram diferenças na concentração de GSH entre as crianças infectadas e expostas e não infectadas pelo HIV-1.

Os mecanismos de ação da GSH não são completamente entendidos. Parece que não é um efeito anti-viral *per se*, mas encontra-se relacionado ao bloqueio do estresse oxidativo, o qual é responsável pela ativação do fator NFκB que implica na transcrição e replicação viral (Staal et al., 1990)

O NFκB é ativado em resposta a várias formas de estresse oxidativo (Mihm et al., 1995). Alternativamente, a GSH pode interferir na fosforilação do complexo IκB/NF-κB (Garaci et al., 1992; Palamara et al., 1995).

A função antioxidante deste tripeptídeo está relacionada à oxidação do grupo tiol de seu resíduo cisteína com formação de dissulfeto (GSSG), a qual volta a ser cataliticamente reduzida para a forma tiol (GSH) pela glutathione redutase. Evidências tem se acumulado sugerindo que o mecanismo redox tem papel fundamental nos eventos celulares tais como a ligação do NFκB e AP-1 ao DNA genômico, à proteína de ligação ao mRNA, e interações com receptores de hormônios (Abate et al., 1990; Schreck et al., 1992).

Relata-se também que o estresse oxidativo ocorre em diferentes infecções virais e um papel anti-viral do NFκB sobre a ativação do gene de transcrição do HIV-1 (Schreck et al., 1991).

As crianças do presente estudo estavam sob HAART e nenhuma apresentou infecção oportunista durante o período de suplementação, o que sugere uma fase estável da infecção pelo HIV-1. Talvez por esta razão os níveis de GSH no eritrócitos não tenham diferido das crianças expostas e não infectadas.

In vivo, foi amplamente demonstrado que a administração de GSH em altas doses ao camundongo infectado reduz os sinais típicos da doença e a carga viral. A importância destes achados também é reforçada pelo fenômeno neurodegenerativo associado ao HIV que pode estar ligado à depleção intracelular de GSH e perda da função mitocondrial. Em consequência, a restauração de ambas, GSH e função mitocondrial, são

possíveis estratégias terapêuticas para retardar a progressão da doença e a demência em pacientes com AIDS. O estado redox tiol intracelular de macrófagos influencia a capacidade de gerar um tipo de resposta Th1 ou Th2, e precisamente, a depleção de GSH inibe a produção de citocinas Th1 ou favorece a Th2. Além disso, as alterações na função imune por causa da depleção de GSH em macrófago podem ter papel em exacerbar a infecção pelo HIV e outras doenças infecciosas (Murata et al., 2002; Fraternale et al., 2003).

Parece concebível que o estresse oxidativo pode ser um fator de controle da infecção pelo HIV. Além disso, um estado antioxidante alterado foi observado no plasma e outros tecidos dos pacientes com AIDS (Eck et al., 1989).

Contudo, ainda está em debate o papel da condição oxidativa na infecção pelo HIV com base nos resultados contraditórios. De fato os níveis de GSH diminuem na infecção pelo HIV-1 (Buhl et al., 1989) e esta diminuição parece afetar preferencialmente a GSH, uma vez que o nível de GSSG nos tecidos de infectados pelo HIV-1 é normal. Pelo contrário outro estudo mostrou aumento de GSSG, como mediador do estresse oxidativo, em linfócitos CD41 (Aukrust et al., 1995).

Tomados em conjunto, nossos resultados mostram modulação do sistema imune celular pela suplementação alimentar com as proteínas do soro de leite bovino em crianças infectadas pelo HIV-1. Esta modulação foi caracterizada pelo aumento da relação dos linfócitos T $CD4^+/CD8^+$, aumento da proliferação específica para o BCG, bem como, a produção de IFN- γ em resposta ao estímulo por BCG. Entretanto, esta modulação foi observada nos grupos suplementados com as proteínas nativas ou enriquecidas com pré-bióticos, sugerindo que a estrutura na qual as proteínas se encontram possa ter relação com os resultados observados.

Embora muitas pesquisas apontem para os efeitos imunomoduladores dos peptídeos provenientes da hidrólise das proteínas do soro de leite, no presente estudo essa ação não foi observada. O método de obtenção dos peptídeos pode ser um dos fatores que contribuíram para esse achado. Há relatos que determinadas enzimas, como a tripsina, reduzem ou suprimem a ação imunomoduladora dos peptídeos (Wong et al., 1998;

Mercier et al., 2004; Prioult et al., 2004). Sendo assim, o método de obtenção dos peptídeos do suplemento Hidrolisado deve ser melhor explorado. Outra questão relevante em relação ao suplemento hidrolisado é o amargor que os seus peptídeos conferem aos produtos que os contém (Pihlanto , 2006). A palatabilidade dos produtos hidrolisados compromete a sua ingestão o que pode prejudicar a avaliação do potencial imunomodulador dos peptídeos provenientes das proteínas do soro de leite bovino.

7- CONCLUSÕES

Concluimos que:

- O estado nutricional das crianças infectadas pelo HIV-1, sob HAART, encontra-se comprometido e a suplementação alimentar, por um período de três meses, com proteínas do soro de leite bovino hidrolisadas ou nativas influenciou as reservas de gordura corporal.
- A imunidade celular das crianças infectadas pelo HIV-1 medida pelo percentual de células T no sangue periférico mostrou depleção de células $CD4^+$, TCR $\gamma\delta$ e $CD45RO^+$ e aumento de células $CD8^+$ em comparação às crianças expostas não infectadas.
- A produção de citocinas no sobrenadante de cultura de células mononucleares das crianças infectadas pelo HIV-1 diferiu da produção das crianças expostas e não infectadas. A produção espontânea de $TNF-\alpha$ estava aumentada e a de $IFN-\gamma$ em resposta ao estímulo com BCG e a de IL-10 em resposta ao estímulo com PHA diminuídas.
- A resposta celular à vacina BCG e a resposta humoral à vacina de hepatite B, das crianças infectadas pelo HIV-1, sob HAART, encontram-se significativamente diminuídas em comparação às crianças expostas não infectadas.
- A suplementação alimentar com proteínas do soro de leite nativas ou enriquecidas com pré-bióticos, por um período de três meses, aumentou a proliferação de linfócitos T em resposta ao BCG. E, a produção de $IFN-\gamma$ em sobrenadantes de cultura em resposta ao BCG foi aumentada pela suplementação contendo proteínas nativas do soro de leite.

Concluimos que a suplementação alimentar com proteínas do soro de leite bovino, nativas, hidrolisadas ou enriquecidas com pré-bióticos em crianças com infecção vertical pelo HIV, sob HAART:

- Influenciou as reservas de gordura corporal;
- Influenciou a imunidade celular avaliada pela melhora na relação dos linfócitos T $CD4^+/CD8^+$; aumento da proliferação linfocitária BCG-específica e aumento da produção de IFN- γ em resposta à BCG.

A suplementação alimentar com proteínas do soro de leite bovino hidrolisadas em crianças com infecção vertical pelo HIV, sob HAART:

- Influenciou o estado nutricional medido pelo aumento do perímetro braquial;
- Influenciou a imunidade celular avaliada pelo aumento número de linfócitos e do percentual de linfócitos T $CD8^+$. Além disso, a produção espontânea de TNF- α atingiu valor semelhante ao observado nas crianças expostas ao HIV e não infectadas.

A suplementação alimentar com proteínas do soro de leite bovino enriquecidas com pré-bióticos em crianças com infecção vertical pelo HIV, sob HAART:

- Influenciou o estado nutricional medido pelo aumento da ingestão de gordura.
- Influenciou a imunidade celular avaliada pelo aumento relação dos linfócitos T $CD4^+/CD8^+$ e pelo aumento da proliferação linfocitária específica para BCG. Ainda, a produção espontânea e a estimulada por BCG de TNF- α e estimulada por BCG de IFN- γ atingiram valores semelhantes aos observados nas crianças expostas ao HIV e não infectadas.

A suplementação alimentar com proteínas do soro de leite bovino nativas em crianças com infecção vertical pelo HIV, sob HAART:

- Influenciou o estado nutricional medido pelo aumento do somatório de pregas cutâneas e da ingestão de cálcio.
- Influenciou a imunidade celular avaliada pelo aumento da proliferação linfocitária específica para BCG; aumento da produção de IL-4 espontânea e resposta à BCG e aumento da produção de IFN- γ em resposta à BCG que, se equiparou aos valores observados nas culturas das crianças expostas e não infectadas pelo HIV. Também, a produção espontânea e estimulada por BCG de TNF- α atingiram valores semelhantes aos observados nas crianças expostas ao HIV e não infectadas.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abate C, Patel L, Rauscher FJ 3rd, Curran T. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 1990, 249(4973):1157–61.

Agostoni C, Riva E, Gianni ML, Silano M, Giovannini M, Zuccotti GV. Anthropometric indicators of human immunodeficiency virus infection in infants with early and late symptoms in the first months of life. *Eur J Pediatr* 1998,157:811–3.

Ahmad R, Sindhu STA, Toma E, Morisset R, Ahmad A. Elevated Levels of Circulating Interleukin-18 in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals: Role of Peripheral Blood Mononuclear Cells and Implications for AIDS Pathogenesis. *J Virol* 2002, 76 (24): 12448–56.

Alexander TH, Ortiz GM, Wellons MF, Allen A, Grace II EJ, Schweighardt B et al. Changes in CD4+ T-cell differentiation phenotype during structured treatment interruption in patients with chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003, 34: 475–81.

Alfano M, Poli G. Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection. *Mol Immunol* 2005, 42: 161–82.

Allard JP, Aghdassi E, Chau J, Salit I, Walmsley S. Oxidative stress and plasma antioxidant micronutrients in humans with HIV infection. *Am J Clin Nutr* 1998, 67:143–7.

Ammendolia MG, Pietrantonio A, Tinari A, Valenti P, Superti F. Bovine lactoferrin inhibits echovirus endocytic pathway by interacting with viral structural polypeptides. *Antiviral Res* 2007, 73: 151–160.

André FE. Overview of a 5-yr clinical experience with a yeast derived hepatitis B vaccine. *Vaccine* 8(Suppl.):S74-S78, 1990.

Anuradha B, Santosh CM, Priya HS, Suman-Latha G, Murthy KJR, Lakshmi VV. Age-related waning of in vitro Interferon- γ levels against r32kDaBCG in BCG vaccinated children. *J Immune Based Ther Vaccines* 2007, 5:8.

Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A et al. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000, 192: 63–75.

Arpadi SM, Cuff PA, Kotler DP, Wang J, Bamji M, Lange M. Growth velocity, fat-free mass and energy intake are inversely related to viral load in HIV-infected children. *J Nutr*. 2000, 130: 2498–502.

Augustin A, Kubo RT, Sim GK. Resident pulmonary lymphocytes expressing the gamma/delta T- cell receptor. *Nature* 1989, (340): 239-241.

Aukrust P, Müller F, Svardal AM, Ueland T, Berge R, Froland SS. Disturbed glutathione metabolism and decreased antioxidant levels in human immunodeficiency virus-infected patients during highly active antiretroviral therapy–potential immunomodulatory effects of antioxidants. *J Infect Dis* 2003, 188:232–38.

Aukrust P, Müller F. Glutathione Redox Disturbances in Human Immunodeficiency Virus Infection: Immunologic and Therapeutic Consequences. *Nutrition* 1999, 15:165-7.

Aukrust P, Svardal AM, Muller F, Lunden B, Berge RK, Ueland PM, Froland SS. *Blood* 1995, 86: 258–67.

Autran B, Carcelain G, Debre P. Immune reconstitution after highly active antiretroviral treatment of HIV infection. *Adv Exp Med Biol* 2001, 495: 205–212.

Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R et al. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 1997, 277: 112–6.

Autran B, Carcelain G, Li TS, Gorochoff G, Blanc C, Renaud M et al. Restoration of the immune system with anti-retroviral therapy. *Immunol Lett* 1999, 66: 207–11.

Badley AD, Pilon AA, Landay A, Lynch DH. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. *Blood* 2000, 96: 2951–64.

Barta O, Barta VD, Crisman MV, Akers RM. Inhibition of lymphocyte blastogenesis by whey. *Am J of Vet Res* 1991, 52, 247-53.

Baruchel S; Bounous G, Gold P. Place for an Antioxidant Therapy in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. Oxidative Stress, Cell Activation and Viral Infection. Basel/Switzerland: Birkhäuser Verlag, 1994

Baruchel S, Bounous G, Olivier R, Viau G, Wainberg MA. Nutriceutical Modulation Of Glutathione With A Humanized Native Milk Serum Protein Isolate, Immunocal™: Application In Aids And Cancer. In: Montagnier L, Olivier R, Pasquier C. Oxidative Stress In Cancer, Aids, And Neurodegenerative Diseases. New York: Marcel Dekker, 1998.

Baum MK, Miguez-Burbano MJ, Campa A, Shor-Posner G. Selenium and interleukins in persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 2000;182 (suppl 1):S69-73.

Berhane R, Bagenda D, Marum L, Aceng E, Ndugwa C, Boschet RJ, et al. Growth failure as a prognostic indicator of mortality in pediatric HIV infection. *Pediatrics*. 1997, 100(1): E7.

Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 2006, 107: 4781–9.

Beutler E. (Ed). *Red Cell Metabolism*. New York: Churchill Livingstone, 1986. 126 p.

Biberfeld P, Ost A, Porwit A, Sandsted B, Pallesen G, Bottiger B et al. Histopathology and immunohistology of HTLV-III/LAV related lymphadenopathy and AIDS. *Acta Pathol Microbiol Sect B Microbiol Immunol (Scandinavia)* 1987, 95: 47–65.

Biziulevicius G A, Kislukhina OV, Kazlauskaite J, Zukaite V. Food-protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: ‘a cause and effect’ theory of bifunctionality. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006, 46: 131–8.

Bjorndal A, Deng H, Jansson M, Fiore JR, Colognesi C, Karlsson A, et al. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* 1997, 71: 7478–87.

Blanche SR, Moscato G. A prospective study of infants born to women seropositive for human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1989, 320:1643-8.

Blazevic V, Jankelevich S, Steinberg SM, Jacobsen F, Yarchoan R, Shearer GM. Highly Active Antiretroviral Therapy in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Children: Analysis of Cellular Immune Responses. *Clin Diag Lab Immunol* 2001, 8 (5): 943–8.

Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 1925–30.

Boehm G, Jelinek J, Knol J, M'Rabet L, Stahl B, Vos P, Garssen J. Prebiotics and Immune Responses. *J Pediatr Gastroenterol Nut* 2004, 39(supplement): 772–3.

Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois J-L, Beaufrère B. Slow and fast dietary proteins differently modulate post-prandial protein secretion. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1997, 94: 14930-5.

Boirivant M, Pica R, DeMaria R, Testi R, Pallone F, Strober W. Stimulated human lamina propria T cells manifest enhanced Fas-mediated apoptosis. *J Clin Invest* 1996, 98: 2616–22.

Boritz E, Palmer BE, Wilson CC. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD4⁺ T cells that proliferate in vitro detected in samples from most viremic subjects and inversely associated with plasma HIV-1 levels. *J Virol* 2004, 78: 12638–46.

Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1994, 68: 6103–10.

Bounous G, Baruchel S, Falutz J, Gold P. Whey Proteins As A Food Supplement In HIV-Seropositive Individuals. *Clin Invest Med* 1993, 16:204-9.

Bounous G, Gold P. The Biological Activity of Undenatured Dietary Whey Proteins: Role of Glutathione. *Clin Invest Med* 1991, 14 (4): 296-309.

Bounous G, Kongshavn G, Gold P. Immunoenhancing Property of Dietary Whey Protein in Mice: Role of Glutathione. *Clin Invest Med* 1989, 12 (3): 154-61.

Bounous G, Kongshavn PAL, Gold P. The Immunoenhancing Property of Dietary Whey Protein Concentrate. *Clinical Clin Invest Med* 1988, 11(4): 271-8.

Brenchley JM, Douek DM. HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunology*. www.nature.com/mi doi:10.1038/sj.mi.2007.1750001

Brettler DB, Forsberg A, Bolivar E, Brewster F, Sullivan J. Growth failure as a prognostic indicator for progression to acquired immunodeficiency syndrome in children with hemophilia. *J Pediatr*. 1990, 117:584–8.

Bruzzese E, Volpicelli M, Squaglia M, Tartaglione A, Guarino A. Impact of prebiotics on human health. *Digestive and Liver Disease* 2006, 38 (Suppl. 2):S283–7

Buhl R, Holroyd K J, Mastrangeli A. et al. Systemic glutathione deficiency in symptom-free HIV-seropositive individuals. *Lancet* 1989, 2: 1294–8.

Canals MJ, Soler FJ. Nutrition and AIDS in the Pediatric Patient: a Review. *Pediatr Nut* 1999, 2: 6-16.

Carey VJ, Yong FH, Frenkel LM, McKinney RE Jr. Pediatric AIDS prognosis using somatic growth velocity. *AIDS*. 1998,12:1361–1369.

Castetbon K, Kadio A, Bondurand A, Boka A, Barouan C, Coulibaly Y, Anglaret X, Msellati P, Malvy D, Dabis F. Nutritional status and dietary intakes in human immunodeficiency virus (HIV)-infected outpatients in Abidjan, Cote D'Ivoire, 1995. *Eur J Clin Nutr* 1997, 51(2): 81-6.

Causey, J., Thomson, K. The whey to intestinal health. *Today's Dietitian* 2003, p. 22-24.

CDC (Center for Diseases Control). 1994 Revised Classification System for Human Immunodeficiency Virus Infection in Children Less than 13 years of age. *MMWR* 1994, 3: 1-19.

Centeville M, Morcillo AM, Barros-Filho AA, Silva MTN, Toro AADC, Vilela MMS. Lack of evidence between nutritional status and change in clinical category in HIV-infected brazilian children. *São Paulo Med J*. 2005,123(2): 62-5.

Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M et al. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8T lymphocytes. *Nature* 2001, 410: 106–11.

Chantry CJ, Rodrigues JL, Febo I, Diaz C, Rodriguez-Orengo JF. Plasma Glutathione Concentrations in Non-infected Infants born from HIV-infected Mothers: Developmental Profile. *P R Health Sci J* 1999, 18 (3): 267-72.

Chen G, Shankar P, Lange C, Valdez H, Skolnik PR, Wu L et al. CD8 T cells specific for human immunodeficiency virus, Epstein–Barr virus, and cytomegalovirus lack molecules for homing to lymphoid sites of infection. *Blood* 2001, 98: 156–164.

Ching N, Deville JG, Nielsen KA, Ank B, Lian S, Wei LS et al. Cellular and humoral immune responses to a tetanus toxoid booster in perinatally HIV-1-infected children and adolescents receiving highly active antiretroviral therapy (HAART). *Eur J Pediatr* 2007, 166(1):51–6.

Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, Boswell RN, Bernstein DC, Mann DL et al. Interleukin-2 production used to detect antigenic peptide recognition by T-helper lymphocytes from asymptomatic HIV-seropositive individuals. *Nature* 1989, 339: 383–5.

Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, Boswell RN, Lucey DR, Via CS et al. Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4⁺ cell numbers and clinical staging. *J Clin Invest* 1989, 84: 1892–1899.

Cohen SJ, Hamann D, Borleffs J, Roos M, Miedema F, Boucher C et al. Reconstitution of naive T cells during antiretroviral treatment of HIV-infected adults is dependent on age. *AIDS* 2002, 16: 2263–6.

Connors M, Kovacs JA, Krevat S, Gea-Banacloche JC, Sneller MC, Flanigan M et al. HIV infection induces changes in CD4⁺ T-cell phenotype and depletions within the CD4⁺ T-cell repertoire that are not immediately restored by antiviral or immune-based therapies. *Nat Med* 1997, 3: 533–40.

Constantino AM, Balzola F, Bounous G. Modificazioni sulle Immunoglobuline A Biliari di Tipo Secretorio in Trofi Nutriti con proteine del Siero di Latte. *Min Diet Gastr*, 1989, 35 (4): 241-5.

Corkins MR. Prebiotics: Do they really change infant intestinal immunity? *J Pediatr Gastroenterol and Nut* 2005, 40 (3):384-5.

Cossarizza A, Poccia F, Agrati C, D'Offizi G, Bugarini R, Pinti M et al. Highly active antiretroviral therapy restores CD4+ Vbeta T-cell repertoire in patients with primary acute HIV infection but not in treatment-naïve HIV+ patients with severe chronic infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004, 35: 213–22.

Cross ML, Gill HS. Modulation of immune function by a modified bovine whey protein concentrate. *Immunol Cell Biol* 1999, 77(4):345–50.

Dallas S, Stempak D, Koren G, Bendayan R, Baruchel S. Whey Protein Concentrate (WPC) Modulation of Lymphocyte Glutathione Levels in Vitro. *Clin Pharmacol & Therap* 2000, 67 (2): PIII 56.

Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodena C, Gachon P, Fauquant J, Callier P, et al. The digestion rate is an independent regulating factor of post prandial protein retention. *Am J Physiol Endocrin Metab* 2001, 280:E340-E8.

Davison K, Nicoll A. The changing global epidemiology of HIV infection and AIDS. *Compendium Disease Report. CDR Review* 1997, 7 (9): 134-6.

Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006, 443: 350–4.

De Maria R, Boirivant M, Cifone MG, Roncaioli P, Hahne M, Tschopp J et al. Functional expression of Fas and Fas ligand on human gut lamina propria T lymphocytes. *J Clin Invest* 1996, 97: 316–22.

De Martini RM, Turner RR, Formenti SC, Boone DC, Bishop PC, Levine AM et al. Peripheral blood mononuclear cell abnormalities and their relationship to clinical course in homosexual men with HIV infection. *Clin Immunol Immunopathol* 1988, 46: 258–71

De Rossi A., Masiero S., Giaquinto C., et al. Dynamics of viral replication in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Clin Invest* 1996,97(2):323-30.

Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996, 381: 661–6.

Dezube BJ, Pardee AB, Beckett LA, Ahlers CM, Ecto L, Allen-Ryan J et al. Cytokine dysregulation in AIDS: in vivo overexpression of mRNA of tumor necrosis factor-alpha and its correlation with that of the inflammatory cytokine GRO. *J Acquir Immun Defic Syndr* 1992, 5: 1099–104.

Dickover RE, Dillon M, Gillette SG, et al. Rapid increases in load of human immunodeficiency virus correlate with early disease progression and loss of CD4 cells in vertically infected infants. *J Infect Dis* 1994, 170:1279-84.

Doisne JM, Urrutia A, Lacabartz-Porret C, Goujard C, Meyer L, Chaix ML et al. CD8+ T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. *J Immunol* 2004, 173: 2410–8.

Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996, 381(6584):667–73.

Dietary Reference Intake: Applications in Dietary Planning. Food and Nutrition Board; 2003.

Duggan C, Penny ME, Hibberd P, Gil A, Huapaya A, Cooper A et al. Oligofructose-supplemented infant cereal: 2 randomized, blinded, community-based trials in Peruvian infants1–3. *Am J Clin Nut* 2003, 77:937-42.

Dyer WB, Geczy AF, Kent SJ, McIntyre LB, Blasdall SA, Learmont JC et al. Lymphoproliferative immune function in the Sydney Blood Bank Cohort, infected with natural nef/long terminal repeat mutants, and in other long-term survivors of transfusion-acquired HIV-1 infection. *AIDS* 1997, 11: 1565–1574.

Dyer WB, Sullivan JS, Geczy AF, Learmont J, McIntyre L. Lymphoproliferative immune function in long-term survivors of transfusion acquired HIV infection. XI International Conference on AIDS, Vancouver 1996, Abstract: 65.

Eck HP, Gmunder H, Hartmann M, Petzoldt D, Daniel V, Droge W. Low concentrations of acid-soluble thiol (cysteine) in the blood plasma of HIV-1-infected patients. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1989, 370:101–8.

Ellefsen K, Harari A, Champagne P, Bart PA, Sekaly RP, Pantaleo G. Distribution and functional analysis of memory antiviral CD8 T cell responses in HIV-1 and Cytomegalovirus infections. *Eur J Immunol* 2002, 32:3756–64.

Elrefaei M, McElroy MD, Preas CP, Hoh R, Deeks S, Martin J et al. Central memory CD4⁺ T cell responses in chronic HIV infection are not restored by antiretroviral therapy. *J Immunol* 2004, 173: 2184–89.

Englund JA, Baker CJ, Raskino C, McKinney RO, Petrie B, Fowler MG, et al., For the AIDS Clinical Trials Group 152 Study Team. Zidovudine, didanosine or both as the initial treatment for symptomatic HIV-infected children. *N Engl J Med.* 1997,336: 1704-12.

Englund JA, Baker CJ, Raskino C, McKinney RO, Lifschitz MH, Petrie B, et al. Clinical and Laboratory Characteristics of a Large Cohort of Symptomatic, Human Immunodeficiency Virus-Infected Infants and Children. *Pediatr Infec Dis J* 1996, 15 (11):1025-36.

Essajee SM, Kim M, Gonzales C, Rigaud M, Kaul A, Chandwani S, et al. Immunologic and virologic responses to HAART in severely immunocompromised HIV-1 infected children. *AIDS.* 1999,13:2523-32.

European Collaborative Study. Height, Weight, and Growth in Children Born to Mothers With HIV-1 Infection in Europe. *Pediatrics* 2003;111:52-60.

Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Pæd* 2003, 441(supplement): 441-8.

Feeney ME, Draenert R, Roosevelt KA, Pelton SI, McIntosh K, Burchett SK et al. Reconstitution of Virus-Specific CD4 Proliferative Responses in Pediatric HIV-1 Infection. *J Immunol* 2003, 171:6968–75.

Fidler S, Oxenius A, Brady M, Clarke J, Cropley I, Babiker A et al. Virological and immunological effects of short-course antiretroviral therapy in primary HIV infection. *AIDS* 2002, 16: 2049–54.

Firmansyah A, Pramita G, Fassler CA, Haschke F, Link-Amster H. Improved humoral immune response to measles vaccine in infants receiving infant cereal with fructooligosaccharides. *J Pediatr Gastroenterol and Nut* 2000, 31: A521.

Fleury S, Rizzardi GP, Chapuis A, Tambussi G, Knabenhans C, Simeoni E et al. Longterm kinetics of T cell production in HIV-infected subjects treated with highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97: 5393–98.

Fraternale A, Casabianca L, Rossi L, Chiarantini GF., Schiavano AT, Palamara E, et al. Erythrocytes as carriers of reduced glutathione (GSH) in the treatment of retroviral infections *J Antimicrob Chem* 2003, 52:551–4.

French MA, Price P, Stone SF. Immune restoration disease after antiretroviral therapy. *AIDS* 2004, 18: 1615–27.

Frisancho, A.R. New norms of upper limb fat and muscles areas for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr* 1989, 34:2540-5.

Frisancho, AR. Anthropometric standards for the assessment of growth and nutritional status. Michigan: University of Michigan Press, 1993. 189 p.

Fuller MJ, Hildeman DA, Sabbaj S, Gaddis DE, Tebo AE, Shang L et al. Cutting edge: emergence of CD127 high functionally competent memory T cells is compromised by high viral loads and inadequate T cell help. *J Immunol* 2005, 174: 5926–30.

Gaines H, Andersson L, Biberfeld G. A new method for measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry. *J Immunol Met* 1996;195:63-72.

Garaci E, Palamara AT, DiFrancesco P et al. Glutathione inhibits replication and expression of viral proteins in cultured cells infected with Sendai virus. *Bioch Bioph Res Communications* 1992, 188:1090–6.

Gauthier SF, Pouliot Y, Saint-Sauveur S. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Int Dairy J* 2006, 16:1315–23.

Gea-Banacloche JC, Martino L, Mican JM, Hallahan CW, Baseler M, Stevens R et al. Longitudinal changes in CD4+ T cell antigen receptor diversity and naive/memory cell phenotype during 9 to 26 months of antiretroviral therapy of HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000, 16: 1877–86.

Gibb DM, Newberry A, Klein N, Rossi A, Grosch-Woener I, Babiker A. Immune repopulation after HAART in previously untreated HIV-1 infected children. Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) Steering Committee. *Lancet* 2000, 355:1331-2.

Gibb DM. A randomized trial evaluating three NRTI regimens with and without nelfinavir in HIV-infected children: 48 week follow-up from the Penta 5 trial. *AIDS* 2000,14 (Suppl 4):58.

Gibson GR. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J Nutr* 1999,129 (S):1438S-41S.

Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, et al. Regulation of Cutaneous Malignancy by $\gamma\delta$ T Cells. *Science* 2001, 294 (5542):605-9.

Girardi M. Immunosurveillance and Immunoregulation by $\gamma\delta$ T Cells. *J Invest Dermatol* 2006, 126: 25–31.

Gougeon ML. Programmed cell death in HIV infection: dysregulation of BCL-2 and Fas pathways and contribution to AIDS pathogenesis. *Psychoneuroendocrinol* 1997, 22 (Suppl 1): S33–9.

Grey V, Mohammed SR, Smountas AA, Bahloul R, Lands LC. Improved glutathione status in young adult patients with cystic fibrosis supplemented with whey protein. *J Cystic Fibr* 2003, 2:195–8.

Grinspoon SK, Donovan DS, Jr, Bilezikian JP. Aetiology and pathogenesis of hormonal and metabolic disorders in HIV infection. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1994, 8: 735–55.

Groux H, Torpier G, Monte D, Mouton Y, Capron A, Ameisen JC. Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* 1992, 175: 331–40.

Grunfeld C, Pang M, Shimizu L, Shigenaga JK, Jensen P, Feingold KR. Resting energy expenditure, caloric intake, and short-term weight change in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Clin Nutr* 1992, 55:455–60.

Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2003, 77: 11708–17.

Guadalupe M, Sankaran S, George MD, Reay E, Verhoeven D, Shacklett BL et al. Viral suppression and immune restoration in the gastrointestinal mucosa of human immunodeficiency virus type 1-infected patients initiating therapy during primary or chronic infection. *J Virol* 2006, 80: 8236–47.

Guigoz Y, Rochat F, Perruisseau-Carrier G, Rochat I, Schiffrin EJ. Effects of oligosaccharide on the faecal flora and nonspecific immune system in elderly people. *Nutr Res* 2002, 22:13–25.

Gurley RJ, Ikeuchi K, Byrn RA, Anderson K, Groopman JE. CD4+ lymphocyte function with early human immunodeficiency virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 1993–97.

Hartog A, Leenders I, Kraan PM, Garssen J. Anti-inflammatory effects of orally ingested lactoferrin and glycine in different zymosan-induced inflammation models: Evidence for synergistic activity. *Int Immunopharmacol* 2007, 7: 1784 – 92.

Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D, Siler S, Papageorgopoulos C, Wieder E, et al. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med* 1999, 5: 83–9.

Herzenberg LA, DeRosa SC, Dubs JG, Roederer M, Anderson MT, Ela SW, Deresinski SC, Herzenberg LA. Glutathione Deficiency is Associated with Impaired Survival in HIV Disease. *PROC NATL ACAD SCI* 1997, 94:1967-72.

Hober, Benyoucef, Chieux, De Groote, DeLa Tribonnière, Bocket et al. Specific Immune Response to Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 in Patients Assessed Through the Production of Interferon- γ and Interleukin-4 in HIV-1 p24-Activated Whole Blood Cultures: Relationship with the Viral Load in Plasma. *Scan J Immunol* 1999, 50 (1): 83–90

Imlach S, Leen C, Bell JE, Simmonds P. Phenotypic analysis of peripheral blood $\gamma\delta$ T lymphocytes and their targeting by human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *Virology* 2003, 305:415-27.

Jahoor F, Jackson A, Gazzard B, Philips G, Sharpstone D, Frazer ME, Heird W. Erythrocyte Glutathione Deficiency in Symptom-Free HIV Infection is Associated with Decreased Synthesis Rate. *American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism* 1999, 276 (1):E205-11.

Janis EM, Kaufmann SHE, Schwartz RH, Pardoll DM: Activation of gamma delta T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1989, 244:713-6.

Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, Gettie A, Blanchard J et al. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med* 1999, 189: 991–8.

Johann-Liang R, O'Neill L, Cervia J, Haller I, Giunta Y, Licholai T, Noel GJ. Energy balance, viral burden, insulin-like growth factor-1, interleukin-6 and growth impairment in children infected with human immunodeficiency virus. *AIDS* 2000,14: 683–90.

Kabelitz D, Bender A, Prospero T, Wesselborg S. Jansen O, Pechhold K. The primary response of human gamma/delta+ T cells to *Mycobacterium tuberculosis* but not by its 65kD heat shock protein. *J Exp Med* 1990, 171:667-79.

Kalayjian RC, Spritzler J, Pu M, Landay A, Pollard RB, Stocker V et al. Distinct mechanisms of T cell reconstitution can be identified by estimating thymic volume in adult HIV-1 disease. *J Infect Dis* 2005, 192:1577–87.

Kalebic T, Kinter A, Poli G, Anderson ME, Meister A, Fauci AS, et al. Suppression of human immunodeficiency virus expression in chronically infected monocytic cells by glutathione, glutathione ester, and N-acetylcysteine. *Proc Natl Acad Sci* 1991, 88:986–90.

Kelleher AD, Carr A, Zaunders J, Cooper DA. Alterations in the immune response of human immunodeficiency virus (HIV)-infected subjects treated with an HIV-specific protease inhibitor, ritonavir. *J Infect Dis* 1996, 173: 321–9.

Kilara A, Panyam D. Peptides from Milk Proteins and Their Properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003, 43(6):607–33.

Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, Laurisch K, Mowes B, Radbruch A et al. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med* 2002, 195:789–94.

Kindler V, Sappino A, Grau G, Piquet P, Vassalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 1989, 56:731–40.

Knox KS, Day RB, Chadi LMK, Hage C, Twigg HL. Functional impairment of CD4 T cells despite normalization of T cell number in HIV. *Cel Immunol* 2006, 242(1):46–51.

Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality *International Dairy J* 2006, 16:945–60.

Kostense S, Raaphorst FM, Joling J, Notermans DW, Prins JM, Danner SA et al. T cell expansions in lymph nodes and peripheral blood in HIV-1-infected individuals: effect of antiretroviral therapy. *AIDS* 2001, 15:1097–1107.

Kotler DP, Rosebaum K, Wang J, Pierson RN. Studies of Body Composition and Fat Distribution in HIV-infected and Control Subjects. *Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999, 20(3):228–37.

Kou ZC, Puhr JS, Wu SS, Goodenow MM, Sleasman JW. Combination antiretroviral therapy results in a rapid increase in T cell receptor variable region beta repertoire diversity within CD45RA CD8T cells in human immunodeficiency virus-infected children. *J Infect Dis* 2003, 187: 385–97.

Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W 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: 4650–55.

Kovacs JA, Baseler M, Dewar RJ, Vogel S, Davey RT, Falloon J et al. Increases in CD4 lymphocytes with intermittent courses of interleukin-2 in patients with human immunodeficiency virus infection, a preliminary study. *N Engl J Med* 1995, 332:567–75.

Kovacs JA, Vogel S, Albert JM, Falloon J, Davey RT, Walker RE et al. Controlled trial of interleukin-2 infusions in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 1996, 335: 1350–6.

Kuhn L, Coutoudis A, Moodley D, Mngqundaniso N, Trabattoni D, Shearer GM et al. Interferon-Gamma and Interleukin-10 Production Among HIV-1–Infected and Uninfected Infants of HIV-1–Infected Mothers. *Pediatr Res* 2001, 50 (3): 412-6.

Lane HC, Depper JM, Green WC, Whalen G, Waldmann TA, Fauci AS. Qualitative analysis of immune function in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1985, 313: 79–84.

Langlands SJ, Hopkins MJ, Coleman N, Cummings JH. Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. *Gut* 2004, 53:1610-6.

Lau AS, Williams BR. The role of interferon and tumor necrosis factor in the pathogenesis of AIDS. *J Exp Pathol* 1990, 5: 111–22.

Laue L, Pizzo PA, Butler K, Cutler GB Jr. Growth and neuroendocrine dysfunction in children with acquired immunodeficiency syndrome. *J Pediatr* 1990,117:541–5.

Leandro-Merhi VA, Vilela MMS, Silva MN, Barros Filho AAA. Características do crescimento de crianças infectadas com o vírus da imunodeficiência humana. *Pediatr São Paulo* 2001, 23(1):17-26.

Lee BN, Lu JG, Kline MW, Paul M, Doyle M, Kozinetz C et al. Type 1 and Type 2 Cytokine Profiles in Children Exposed to or Infected with Vertically Transmitted Human Immunodeficiency Virus. *Clin Diag Lab Immunol* 1996, 3(5): 493-9.

Lempicki RA, Kovacs JA, Baseler MW, Adelsberger JW, Dewar RL, Natarajan V et al. Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4+ and CD8+ T cell turnover in HIV-infected patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:13778–83.

Lepage P, Msellati P, Hitimana DG, et al. Growth of human immunodeficiency type 1-infected and uninfected children: a prospective cohort study in Kigali, Rwanda, 1988 to 1993. *Pediatr Infect Dis J*. 1996;15: 479–85.

Li B, Bassiri H, Rossman MD, Kramer P, Eyuboglu AFO, Torres M, Sada E, Imir T e Carding SR. Involvement of the Fas/Fas Ligand Pathway in Activation-Induced Cell Death of Mycobacteria-Reactive Human gd T Cells: A Mechanism for the Loss of gd T Cells in Patients with Pulmonary Tuberculosis. *J Immunol*, 1998, 161: 1558–67.

Li EWY, Mine Y. Immunoenhancing Effects of Bovine Glycomacropeptide and Its Derivatives on the Proliferative Response and Phagocytic Activities of Human Macrophagelike Cells, U937 *J. Agric. Food Chem*. 2004, 52(9):2704-8.

Lichterfeld M, Kaufmann DE, Yu XG, Mui SK, Addo MM, Johnston MN et al. Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells. *J Exp Med* 2004, 200:701–12.

Lindsay JO, Whelan K, Stagg AJ, Gobin P, Al-Hassi HO, Rayment N, et al. Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut* 2006, 55:348-55.

Lindsey JC, Hughes MD, McKinney RE Jr, et al. Treatment-mediated changes in human immunodeficiency virus (HIV) type 1 RNA and CD4 cell counts as predictors of weight growth failure, cognitive decline and survival in HIV-infected children. *J Infect Dis* 2000;182:1385–93.

Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997, 16:83–92.

López-Varela S, González-Gross M, Marcos A. Functional foods and the immune system: a review. *Eur J Clin Nutr* 2002, 56(suppl 3): S29–33.

Lothian B, Grey V, Kimoff J, Lands LC. Treatment of Obstrutive Airway Disease with a Cysteine Donor Protein Supplement. *Chest* 2000, 117 (3): 914 - 6.

- Malhotra U, Holte S, Zhu T, Delpit E, Huntsbery C, Sette A et al. Early induction and maintenance of Env-specific T-helper cells following human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2003, 77: 2663–74.
- Mannick EE, Udall JN, Kaiser M, Fuchs G, Suskind R. Nutrition and HIV Infection in Children. *Ind J Pediatr* 1996, 63 (5): 615-32.
- Marshal K. Therapeutic Applications of Whey Protein. *Altern Med Rev* 2004, 9(2):136-156.
- Martino M, Tovo PA, Balducci M, Galli L, Gabiano C, Rezza G, et al., Reduction in mortality with availability of antiretroviral therapy for children with perinatal HIV-1 infection. Italian Register for HIV Infection in Children and the Italian National AIDS Registry. *JAMA* 2000, 284:190-7.
- Matano T, Shibata R, Siemon C, Connors M, Lane HC, Martin MA. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/ human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J Virol* 1998, 72: 164–9.
- Matarazzo P, Palomba E, Lala R, et al. Growth impairment, IGF I hyposecretion and thyroid dysfunction in children with perinatal HIV-1 infection. *Acta Paediatr* 1994, 83:1029–34.
- Mattsby-Baltzer I, Roseanu A, Motas C, Elverfors J, Engberg I, Hanson L A. Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pediatr Res* 1996, 40(2): 257–62.
- McCloskey TW, Haridas V, Pontrelli L, Pahwa S. Response to Superantigen Stimulation in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Children Perinatally Infected with Human Immunodeficiency Virus and Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. *Clin Diag Lab Immunol* 2004, 11(5):957–62.
- McCune, J.M. The dynamics of CD4+T-cell depletion in HIV disease. *Nature*. 2001, 410(19 april): 974 – 9.

McDermid JM, Lalonde RG, Gray-Donald K, Baruchel S, Kubow S. Associations Between Dietary Antioxidant Intake and Oxidative Stress in HIV-Seropositive and HIV-Seronegative Men and Women. *J AIDS* 2002, 29(2):158-64.

McIntosh, Regester GO, Leu RKL, Royle PJ, Johnson MA, Grinsted RL, et al. Dairy Proteins protect against Dimethylhydrazine-Induced Intestinal Cancers in Rats. *J Nutr* 1995, 125: 809-16.

McKinney RE Jr, Johnson GM, Stanley K, Yong FH, Keller A, O'Donnell KJ, et al. A randomized study of combined zidovudine/lamivudine versus didanosine monotherapy in children with symptomatic therapy-naïve HIV-1 infection. The Pediatric AIDS Clinical Trials Group 300 Study Team. *J Pediatr* 1998, 133: 500-8.

McKinney RE Jr, Robertson JW. Effect of human immunodeficiency virus infection on the growth of young children. Duke Pediatric AIDS Clinical Trials Unit. *J Pediatr* 1993, 123:579-82.

McKinney RE Jr, Wilfert C. Growth as a prognostic indicator in children with human immunodeficiency virus infection treated with zidovudine. AIDS Clinical Trials Group Protocol 043 Study Group. *J Pediatr* 1994, 125:728-33.

McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. *Nature* 2001, 410: 980-7.

Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4⁺ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004, 200: 761-70.

Meira DA, Souza LR, Calvi SA, Lima CRG, Henriques RMS, Pardini MI, et al. Correlation between Cytokine Serum Levels, Number of CD4⁺ T cells/mm³ and Viral Load in HIV-1 Infected Individuals with or Without Antiretroviral Therapy. *J Venom Anim Toxins Trop Dis* 2004, 10 (3): 293-310.

Melvin AJ, Mohan KM. Response to Immunization With Measles, Tetanus, and Haemophilus influenzae Type b Vaccines in Children Who Have Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Are Treated With Highly Active Antiretroviral Therapy. *Pediatrics* 2003, 111 (6): e641-4.

Melvin AJ, Tamura GS, House JK, et al. Lack of detection of Human Immunodeficiency Virus type 1 in the saliva of infected children and adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1997, 151:228-32.

Mercier A, Gauthier SF, Fliss I. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. *Int Dairy J* 2004, 14:175–83.

Meyaard L, Otto SA, Schuitemaker H, Miedama F. Programmed cell death of T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *Science* 1992, 257: 219.

Micke KM, Beeh JF, Schlaak, Buhl R. Oral supplementation with whey proteins increases plasma glutathione levels of HIV-infected patients. *Eur J Clin Invest* 2001, 31: 171-8.

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.

Mihm S, Galter D, Dröge W. Modulation of transcription factor NF- κ B activity by intracellular glutathione levels and by variations of the extracellular cysteine supply. *FASEB Journal* 1995, 9: 246–52.

Millard AL, Mertes PM, Ittelet D, et al. Butyrate affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. *Clin Exp Immunol* 2002, 130: 245–55.

Miller TL, Awnetwant EL, Evans S, Morris VM, Vazquez IM, McIntosh K. Gastrostomy tube supplementation for HIV-infected children. *Pediatrics* 1995, 96: 696–702.

Miller TL, Evans SJ, Orav EJ, Morris V, McIntosh K, Winter HS. Growth and body composition in children infected with the human immunodeficiency virus-1. *Am J Clin Nutr* 1993, 57(4):588-92.

Miller TL, Mawn BE, Orav EV, Wilk D, Weinberg GA, Nicchitta J, et al. The effect of protease inhibitor therapy on growth and body composition in human immunodeficiency virus type 1-infected children. *Pediatrics*. 2001, 107:E77.

Miller TL. Nutritional aspects of HIV-infected children receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2003, 17(suppl 1):S130–40.

Miniello VL, GE Moro GE, Armenio L. Prebiotics in infant milk formulas: new perspectives. *A Paediatr* 2003, 441 (supplement): 68-76.

Miyauchi H, Kaino A, Shinoda I, Fukuwatari Y, Hayasawa H. Immunomodulatory effect of bovine lactoferrin pepsin hydrolysate on murine splenocytes and Peyer's patch cells. *J Dairy Sci* 1997, 80(10): 2330–39.

Mofenson L, Moye J, Nugent R, Bethel J, Korelitz J. Relation of mortality risk to select pediatric HIV disease progression endpoints (DPE) used in pediatric HIV therapeutic trials [abstract 1123]. Presented at the 33rd Interscience Convention on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, October 1993, New Orleans, LA.

Monnai M, Otani H. Effect of bovine kappa-caseinoglycopeptide on secretion of interleukin-1 family cytokines by P388D1, a line derived from mouse monocyte/macrophage. *Milchwissenschaft* 1997, 52(4):192–6.

Monnai M, Horimoto Y, Otani H. Immunomodificatory effect of dietary bovine kappa-caseinoglycopeptide on serum antibody levels and proliferative responses of lymphocytes in mice. *Milchwissenschaft* 1998, 53:129–132.

Montoya CJ, Toro MF, Aguirre C, Bustamante A, Hernandez M, Arango LP. et al., Abnormal humoral immune response to influenza vaccination in pediatric type-1 human immunodeficiency virus infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2007, 102 (4): 501-8.

Moore DM, Hogg RS, Chan K, Tyndall M, Yip B, Montaner JSG. Disease progression in patients with virological suppression in response to HAART is associated with the degree of immunological response. *AIDS* 2006, 20 (3): 371–377.

Morais MB, Jacob CMA. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice *J Ped* 2006, 82(5 Suppl):S189-97.

Moreno YF, Sgarbieri VC, da Silva MTN, Toro AADC, Vilela MMS. Features of Whey Protein Concentrate Supplementation in Children with Rapidly Progressive HIV Infection. *J Trop Pediatr* 2006, 52(1): 34-38.

Moreno, YMF. Influência das proteínas de soro de leite bovino no estado nutricional, composição corporal e sistema imune em coorte de crianças com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2002.

Mulligan K, Bloch AS. Energy Expenditure and Protein Metabolism in Human Immunodeficiency Virus Infection and Cancer Cachexia. *S Oncol* 1998, 25 (2): 82-91.

Munier ML, Kelleher AD. Acutely dysregulated, chronically disabled by the enemy within: T-cell responses to HIV-1 infection. *Immunol Cell Biol* 2007, 85:6–15.

Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD et al. Counting antigen-specific CD8T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 1998, 8:177–87.

Murata Y, Shimamura T, Hamuro J. The polarization of Th1/Th2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *Int Immunol* 2002, 14: 201–12.

Murray JM, Kaufmann G, Kelleher AD, Cooper DA. A model of primary HIV-1 infection. *Math Biosci* 1998, 154: 57–85.

Nadal D, Steiner F, Cheseaux JJ, Rudin C. Ritonavir promotes increased growth in HIV-infected children. *Paediatric AIDS Group of Switzerland [letter]. AIDS.* 1998, 12: 2356–57.

Nair P, Alger L, Hines S, Seiden S, Hebel R, Johnson JP. Maternal and neonatal characteristics associated with HIV infection in infants of seropositive women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1993,6:298–302.

NCHS - NCHS growth curves for children birth - 18 years. United States, Vital and Health Statistics. Series 1977, 11(165).

National Academy of Sciences. National Research Council. Recommended Dietary Allowances. 10th Edition. Washington, 1989.

Navikas V, Link J, Persson C, Olsson T, Hojeberg B, Ljungdahl A et al. Increased mRNA expression of IL-6, IL10, TNF- α and perforin in blood mononuclear cells in human HIV infection. *J Acq Immun Syndr Hum Retrovirol* 1995, 9:484–9.

NCHS, 2000 - Growth Charts (Developed by the National Center for Health Statistics in collaboration with the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. <http://www.cdc.gov/growthcharts>)

Nilsson J, Boasso A, Velilla PA, Zhang RM, Vaccari M, Franchini V et al. HIV-1 driven regulatory T cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood* 2006, 108: 3808-17.

Nyman, M. Fermentation and bulking capacity of indigestible carbohydrates: the case of inulin and oligofructose. *Br J Nutr* 2002, 87(Suppl 2): S163-8.

O'Brien RL, Happ MP, Dallas A, Palmer E, Kubo R, Born WK: Stimulation of a major subset of lymphocytes expressing T cell receptor gamma delta by an antigen derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 1989, 57:667-74.

Ogino MT, Dankner WM, Spector SA. Development and significance of zidovudine resistance in children infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr*. 1993, 123:1–8.

Okada Y, Tsuzuki Y, Miyazaki J, Matsuzaki K, Hokari R, Komoto S, Kato S, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K, Watanabe T, Miura S. *Propionibacterium freudenreichii* component 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) attenuates dextran sodium sulphate induced colitis by modulation of bacterial flora and lymphocyte homing. *Gut* 2006, 55:681-688.

Otani H, Monnai M. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes by bovine milk k-casein digests. *Food Agr Immunol* 1993, 5:219–29.

Otani H, Monnai M. Induction of an interleukin-1 receptor antagonist-like component produced from mouse spleen cells by bovine kappa-caseinoglycopeptide. *Biosc, Biotech Biochem* 1995, 59(6):1166–8.

Otani H, Monnai M, Hosono A. Bovine k-casein as inhibitor of the proliferation of mouse splenocytes induced by lipopolysaccharide stimulation. *Milchwissenschaft* 1992, 47:512–5.

- Otani H, Monnai M, Kawasaki Y, Kawakami H, Tanimoto M. Inhibition of mitogen-induced proliferative responses of lymphocytes by bovine k-caseinoglycopeptides having different carbohydrate chains. *J Dairy Res* 1995, 62(2): 349–57.
- Ouwehand A, Isolauri E, Salminen S. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *Eur J Nutr* 2002, 41 (supplement): 32-7.
- Oxenius A, Price DA, Easterbrook PJ, O’Callaghan CA, Kelleher AD, Whelan JA et al. Early highly active antiretroviral therapy for acute HIV-1 infection preserves immune function of CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97: 3382–87.
- Paediatric European Network for Treatment of AIDS. A randomized double-blind trial of the addition of lamivudine or matching placebo to current nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor therapy in HIV-infected children: the PENTA-4 trial. *AIDS* 1998, 12:F151-60.
- Pahwa S, Chitnis V, Mitchell RM, Fernandez S, Chandrasekharan A, Wilson CM et al. CD4⁺ and CD8⁺ T cell receptor repertoire perturbations with normal levels of T cell receptor excision circles in HIV-infected, therapy-naïve adolescents. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003, 19: 487–95.
- Palamara AT, Perno CF, Ciriolo MR, Dini L, Balestra E, D’Agostini C, et al. Evidence for antiviral activity of glutathione: in vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *Antiv Res* 1995, 27:237–53.
- Pallesen G, Gerstoft J, Mathiesen L. Stages of LAV/HTLV-3 lymphadenitis 1. Histological and immunological classification. *Scand J Med* 1987, 25: 83–91.
- Palmer BE, Boritz E, Wilson CC. Effects of sustained HIV-1 plasma viremia on HIV-1 Gag-specific CD4⁺ T cell maturation and function. *J Immunol* 2004, 172: 3337–47.
- Pan Y, Lee A, Wan J, Coventry MJ, Michalski WP, Shiell B, Roginski H. Antiviral properties of milk proteins and peptides. *Int Dairy J* 2006, 16:1252–61.
- Pantaleo G, Soudeyns H, Demarest JF, Vaccarezza M, Graziosi C, Paolucci S et al. Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8⁺ T cell clones during primary HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 9848–53.

Papagno L, Spina CA, Marchant A, Salio M, Rufer N, Little S et al. Immune activation and CD8⁺ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol* 2004, 2: E20.

Peña-Ramos EA, Xiong YL. Antioxidative Activity of Whey Protein Hydrolysates in a Liposomal System. *Dairy Sci* 2001, 84: 2577–83.

Penna SP. Níveis de glutathiona reuzida e atividade da catalase, superóxido dismutase e glicose-6-fosfato desidrogenase em indivíduos expostos ao vapor de mercúrio. [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 1995.

Peruzzi M, Azzari C, Galli L, Vierucci A, De Martino M. Highly active antiretroviral therapy restores in vitro mitogen and antigen-specific T lymphocyte responses in HIV-1 perinatally infected children despite virological failure. *Clin Exp Immunol* 2002, 128: 365–71.

Pichard C, Sudre P, Narsegard V, Yerly S, Slosman DO, Delley V, Perrin L, Hirschel B, Swiss HIV cohort study. A Randomized double-blind controlled study os 6 months of oral nutritional supplementation with arginine and W-3 fatty acids in HIV-infected patients. *AIDS* 1998, 12 (1): 53-63.

Pihlanto A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int Dairy J* 2006, 11: 1306-14.

Pizzo PA. Treatment of human immunodeficiency virus-infected infants and young children with dideoxynucleosides. *Am J Med*. 1990, 88: 16S–19S.

Poccia F, Battistini L, Cipriani B, et al. Phosphoantigen-reactive Vgamma 9 Vdelta 2 T lymphocytes suppress in vitro human immunodeficiency virus type 1 replication by cell-released antiviral factors including CC chemokines. *J Infect Dis* 1999, 180: 858–61.

Poles MA, Barsoum S, Yu W, Yu J, Sun P, Daly J, et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Induces Persistent Changes in Mucosal and Blood $\gamma\delta$ T Cells despite Suppressive Therapy. *J Virol* 2003, 77(19):10456–67.

Pollack H, Kuchiu A, Cowan L, et al. Neurodevelopment, growth and viral load in HIV-infected infants. *Brain Behav Immunol* 1996, 10: 298–312.

Prader A, Tanner JM, Von Harnach GA. Catch-up growth following illness or starvation: an example of developmental canalization in man. *J Pediatr* 1963, 62:646–59.

Priault G, Pecquet S, Fliss I. Stimulation of interleukin-10 production by acidic beta-lactoglobulin-derived peptides hydrolyzed with *Lactobacillus paracasei* NCC2461 peptidases. *Clin Diag Lab Immunol* 2004, 11(2):266–71.

Quay B, Malinverni R, Lauterburg BH. Glutathione Depletion in HIV-infected Patients: Role of Cysteine Deficiency and Effect of Oral N-acetylcysteine. *AIDS* 1992, 6 (8): 815-9.

Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004,118: 229–41.

Ramalingam S, Kannangai R, Vijayakumar TS, Mathai D, Abraham OC, Subramanian S, et al. Subtype & cytokine profiles of HIV infected individuals from south India. *Indian J Med Res* 2005, 121:226-34.

Resino S, Correa R, Bellón JM, Munoz-Fernandez, Muñoz-Fernández MA. Preserved immune system in long-term asymptomatic vertically HIV-1 infected children. *Clin Exp Immunol* 2003;132:105–112.

Resino S, Galán I, Pérez A, León Ja, Seoane E, Gurbindo D, Muñoz-Fernández Ma. HIV-infected children with moderate/severe immune-suppression: changes in the immune system after highly active antiretroviral therapy. *Clin Exp Immunol* 2004, 137:570-7.

Resino S, Navarro J, Bellón JM, Gurbindo D, León Ja, Muñoz-Fernández MA. Naïve and memory CD4⁺ T cells and T cell activation markers in HIV-1 infected children on HAART. *Clin Exp Immunol* 2001, 125: 266-73.

Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr*. 2007 137(3 Suppl 2):830S-7S.

Roberfroid, M.B. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *British J Nutr* 2002, 87(Suppl. 2): S139-S143.

Rodriguez JF, Cordero J, Chantry C, et al. Plasma glutathione concentrations in children infected with human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis J* 1998, 17: 236–41.

Roederer M, Staal FJ, Raju PA, Ela SW, Herzenberg LA. Cytokine-stimulated human immunodeficiency virus replication is inhibited by N-acetyl-l-cysteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990, 87:4884–8.

Roller M, Rechkemmer G, Watzl B. Prebiotic Inulin Enriched with Oligofructose in Combination with the Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* Modulates Intestinal Immune Functions in Rats¹. *J Nutr* 2004, 134:153–6.

Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, Phillips MN, Wilkes BM, Eldridge RL et al. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 2000, 407: 523–6.

Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA et al. Vigorous HIV-1-specific CD4⁺ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 1997, 278: 1447–50.

Rubin NP. Alterações Imunológicas em Crianças com Infecção pelo HIV. *J Ped* 1999, 75 (3): 147-8.

Rutherford-Markwick KJ, Johnson D, Martin L, Cross ML, Gill HS. Modified milk powder supplemented with immunostimulating whey protein concentrate (IMUCARE) enhances immune function in mice. *Nutr Res* 2005, 25:192–203.

Rutstein RM, Gebo KA, Flynn PM, Fleishman JA, Sharp VL, Siberry GK, et al. Immunologic Function and Virologic Suppression Among Children With Perinatally Acquired HIV Infection on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Med Care* 2005, 43 (9): suppl.

Saavedra JM, Henderson RA, Perman JA, Hutton N, Livingston RA, Yolken RH. Longitudinal assessment of growth in children born to mothers with human immunodeficiency virus infection. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1995, 149:497–502.

Saavedra JM, Tschernia A. Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications. *British Journal of Nutrition* 2002, 87(supplement):241-6.

Sachsenberg N, Perelson AS, Yerly S, Schockmel GA, Leduc D, Hirschel B et al. Turnover of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen. *J Exp Med* 1998, 187:1295–303.

Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999, 401:708–12.

Sander B, Skansen-Saphir U, Damm O, Hakansson L, Andersson J, Andersson U. Sequential production of Th1 and Th2 cytokines in response to live bacillus Calmette-Guerin. *Immunol* 1995, 86: 512-8.

Sandstrom PA, Murray J, Folks TM, Diamond AM. Antioxidant Defenses Influence HIV-1 Replication and Associated Cytopathic Effects. *Free Rad Biol Med* 1998, 24(9): 1485-91.

Scales D, Ni H, Shaheen F, Capodici J, Cannon G, Weissman D. Nonproliferating bystander CD4⁺ T cells lacking activation markers support HIV replication during immune activation. *J Immunol* 2001, 166: 6437–43.

Schacker TW, Brenchley JM, Beilman GJ, Reilly C, Pambuccian SE, Taylor J et al. Lymphatic tissue fibrosis is associated with reduced numbers of naive CD4⁺ T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Vaccine Immunol* 2006, 13: 556–60.

Schacker TW, Nguyen PL, Beilman GJ, Wolinsky S, Larson M, Reilly C et al. Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. *J Clin Invest* 2002, 110: 1133–39.

Schnittman SM, Lane HC, Greenhouse J, Justment JS, Baseler M, Fauci AS. Preferential infection of CD4⁺ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 6058–62.

Scholz-Ahrens KE, Schaafsma G, van den Heuvel EG, Schrezenmeier J. Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am J Clin Nutr* 2001, 73 Suppl 2: 459S–64S

Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* 1992, 17(4):221–37.

Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991, 10(8):2247–58.

Sciammas R, Bluestone JA. TCR gamma delta cells and viruses. *Microbes Infection*. 1999,1:203–12.

Scott GB, Hutto C, Makuch RW, et al. Survival in children with perinatally acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*. 1989, 321:1791–96.

Scriba TJ, Zhang H-T, Brown HL, Oxenius A, Tamm N, Fidler S et al. HIV-1-specific CD4+ T lymphocyte turnover and activation increase upon viral rebound. *J Clin Invest* 2005, 115: 443–50.

Sen CK. Nutritional Biochemistry of Cellular Glutathione. *Nutritional Biochem* 1997, 8:660-72.

Séverin S, Wenshui X. Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2005, 45(7):645 – 56. June 2007. DOI: 10.1080/10408690490911756

Sgarbieri VC. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. *Braz J Food Technol* 2005, 8(1): 43-56.

Shah NP. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Br J Nutr* 2000,84 (Suppl. 1): S3-10.

Shinoda I, Takase M, Fukuwatari Y, Shimamura S, Koller M, König W. Effects of lactoferrin and lactoferricin on the release of interleukin 8 from human polymorphonuclear leukocytes. *Biosc, Biotech Bioch* 1996, 60(3):521–3.

Shor-Posner G, Miguez MJ, Pineda LM, Rodriguez A, Ruiz P, Castillo G, et al. Impact of selenium status on the pathogenesis of mycobacterial disease in HIV-1-infected drug users during the era of highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002, 29:169-73.

Simpson KJ, Nicholas KR. The comparative biology of whey proteins. *J Mammary Gland Biol Neop* 2002, 7:313-26.

Singh R, Gopalan S, Sibal A. Immunonutrition. *Indian J Pediatr* 2002; 69(5): 417-9.

Staal FJT. Glutathione and HIV infection: reduced reduced, or increased oxidized? *Eur J Clin Invest* 1997, 28(3): 194-6.

Staal F J, Roederer M, Herzenberg L A. et al. (1990). Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor κ B and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc Nat Ac Sci, USA* 87, 4884–8.

Stella VE, Postaire E. Évaluation de L'Effet Protecteur Antiradicalaire d'un Lactosérum Multi fermenté en Doses Répétées chez le Rat. *CRSB* 1995, 189:1191-7.

Stone SF, Price P, Brochier J, French MA. Plasma bioavailable interleukin-6 is elevated in human immunodeficiency virus-infected patients who experience herpesvirus-associated immune restoration disease after start of highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2001, 184: 1073–7.

Stone SF, Price P, Keane NM, Murray RJ, French MA. Levels of IL-6 and soluble IL-6 receptor are increased in HIV patients with a history of immune restoration disease after HAART. *HIV Med* 2002, 3:21–7 -a.

Stone SF, Price P, Tay-Kearney ML, French MA. Cytomegalovirus (CMV) retinitis immune restoration disease occurs during highly active antiretroviral therapy-induced restoration of CMV-specific immune responses within a predominant Th2 cytokine environment. *J Infect Dis* 2002, 185:1813–7 -b.

Suzuki T, Yamauchi K, Kawase K, Tomita M., Kiyasawa I, Okongi S. Collaborative bacteriostatic activity of bovine lactoferrin with lysozyme against *E. coli* 0111. *Agri Biol Chem* 1989, 53:1705– 6.

The European Collaborative Study. Height, Weight, and Growth in Children Born to Mothers With HIV-1 Infection in Europe. The European Collaborative Study. *Pediatrics* 2003, 111:52-60.

Togawa Ji, Nagase H, Tanaka K, Inamori M, Nakajima A, Ueno N, Saito T, Sekihara H. Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2002, 17 (12):1291.

Torre PM, Oliver SP. Suppression of mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells by bovine mammary secretions. *J Dairy Sci* 1989, 72:219-27.

Tovo PA, de Martino M, Gabiano C, Capello N, D'Elia R, Loy A, et al. Prognostic factors and survival in children with perinatal HIV-1 infection. The Italian Register for HIV Infections in Children. *Lancet* 1992, 339:1249–53.

Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* 2003, 57:145–55.

Trabattoni D, Caputo SI, Biasin M, Seminari E, Di Pietro M, Ravasi G, Mazzotta F, Maserati R, Clerici M. Modulation of Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Specific Immune Response by Using Efavirenz, Nelfinavir, and Stavudine in a Rescue Therapy Regimen for HIV-Infected, Drug-Experienced Patients. *Clin Diag Lab Immunol* 2002, 9 (5):1114-8.

Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature Medicine* 2006, 12 (10): 1198-1202.

Tseng YM, Lin SK, Hsiao JK, Chen IJ, Lee JH, Wu SH, Tsai LY. Whey protein concentrate promotes the production of glutathione (GSH) by GSH reductase in the PC12 cell line after acute ethanol exposure. *Food and Chem Toxicol* 2006, 44:574–8.

Ullum H, Lepri AC, Victor J, Skinhoj P, Phillips AN, Pedersen BK. Increased losses of CD4⁺CD45RA⁺ cells in late stages of HIV infection is related to increased risk of death: evidence from a cohort of 347 HIV-infected individuals. *AIDS* 1997, 11:1479–85.

Van Loo JAE. Prebiotics Promote Good Health: The Basis, the Potential, and the Emerging Evidence. *J Clin Gastroenterol* 2004,38(supplement):S70 –5.

Van Rossum AMC, Scherpbier HJ, Van Lochem EG, Pakker NG, Slieker WA, Wolthers KC, et al. Therapeutic immune reconstitution in HIV-1-infected children is independent of their age and pretreatment immune status. *AIDS* 2001;15:2267–75.

Vannini L, Lanciotti R, Baldi D, Guerzoni ME. Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *Int J Food Microbiol* 2004, 94:123–35.

Vasconcelos FAG. Avaliação Nutricional de Coletividades: textos de apoio didático. Florianópolis: Ed. da UFSC, 1995. 154 p

Verweel G, Van Rossum AMC, Hartwig NG, Wolfs TFW, Scherpbier HJ, Groot R. Treatment With Highly Active Antiretroviral Therapy in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Children is Associated with a Sustained Effect on Growth Pediatrics 2002,109:25.

Wahren B, Morfeldt-Mansson L, Biberfeld G, Moberg L, Sonnerborg A, Ljungman P et al. Characteristics of the specific cell-mediated immune response in human immunodeficiency virus infection. J Virol 1987, 61: 2017–23.

Wara DW, Luzuriaga K, Martin NL, Sullivan JL, Bryson YJ. Maternal transmission and diagnosis of HIV during infancy. Ann N Y Acad Sci 1993, 693:14–9.

Watanaveeradej V, Samakoses R, Kerdpanich A, Aree C, Nitayabhan S, Viputtikul K, Sukwit S, Simasathie S. Antibody response to hepatitis B vaccine in infants of HIV-positive mothers. Int J Infec Dis 2002, 6:240-1.

Williams WJ, Morris MW, Nelson DA. Examination of the blood. In: Beutler E (Ed). Hematology. 5 ed, New York: Williams; 1995. p.8-45. V. 1.

Wilson JD, Imami N, Watkins A, Gill J, Hay P, Gazzard B et al. Loss of CD4+ T cell proliferative ability but not loss of human immunodeficiency virus type 1 specificity equates with progression to disease. J Infect Dis 2000, 182: 792–8.

Winter H. Gastrointestinal tract function and malnutrition in HIV-infected children. J Nutr 1996,126(10 Suppl):2620S-22S.

Wolber FM, Broomfield AM, Fray L, Cross ML, Dey D. Supplemental Dietary Whey Protein Concentrate Reduces Rotavirus-Induced Disease Symptoms in Suckling Mice. J Nutr 2005, 135:1470–4.

Wong CW, Watson DL. Immunomodulatory Effects of Dietary Whey Proteins in Mice. J Dairy Res 1995, 62:359-68.

Wong KF, Middleton N, Montgomery M, Dey M, Carr R I. Immunostimulation of murine spleen cells by materials associated with bovine milk protein fractions. *J Dairy Sci* 1998, 81(7), 1825–32.

Zaccarelli-Filho CA, Ono E, Machado DM, Brunialti M, Succi RCM,1 Reinaldo Salomão R, et al. HIV-1-Infected Children on HAART: Immunologic Features of Three Different Levels of Viral Suppression. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2007, 72B:14–21.

Zaunders J, Carr A, McNally L, Penny R, Cooper DA. Effects of primary HIV-1 infection on subsets of CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *AIDS* 1995, 9: 561–6.

Zaunders J, Ip S, Munier ML, Kaufmann D, Suzuki K, Brereton C et al. Infection of CD127+ (interleukin-7 receptor+) CD4+ cells and overexpression of CTLA-4 are linked to loss of antigen-specific CD4 cells during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2006, 80: 10162–72.

Zaunders JJ, Cunningham PH, Kelleher AD, Kaufmann GR, Jaramillo AB, Wright R et al. Potent antiretroviral therapy of primary human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) infection: partial normalization of T lymphocyte subsets and limited reduction of HIV-1 DNA despite clearance of plasma viremia. *J Infect Dis* 1999, 180: 320–9.

Zhang ZQ, Notermans DW, Sedgewick G, Cavert W, Wietgreffe S, Zupancic M et al. Kinetics of CD4+ T cell repopulation of lymphoid tissues after treatment of HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95: 1154–59.

Zinkernagel RM, Hengartner H. T-cell-mediated immunopathology versus direct cytolysis by virus: implications for HIV and AIDS. *Immunol Today* 1994, 15: 262–8.

9- ANEXO

Critério CDC (1994) adaptado em menores de treze (13) anos de idade

Será considerado como caso de aids, para fins de vigilância epidemiológica, todo indivíduo com menos de treze (13) anos de idade que apresentar evidência laboratorial da infecção pelo HIV e alguma evidência de imunodeficiência.

Como evidência da infecção pelo HIV para fins de vigilância epidemiológica (**Quadro 5**), são considerados testes de triagem para detecção de anticorpos: ELISA, EIA, MEIA e ensaio imunoenzimático por quimioluminiscência. São considerados testes confirmatórios: imunofluorescência indireta, imunoblot, *Western Blot*, teste de amplificação de ácidos nucleicos, PCR e NASBA.

Como evidência de imunodeficiência, faz-se necessária uma contagem de linfócitos T CD4+ menor do que o esperado para a idade **e/ou** o diagnóstico de pelo menos duas (2) doenças, sinais ou sintomas indicativos de aids de caráter leve (**Quadro 6**) ou uma (1) de caráter moderado/grave, em correspondência às Categorias da Classificação Clínica dos *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 1994).

São doenças, sinais ou sintomas indicativos de AIDS de **caráter leve**:

1. Aumento crônico das parótidas;
2. Dermatite persistente;
3. Esplenomegalia;
4. Hepatomegalia;
5. Linfadenopatia;
6. Infecções persistentes ou recorrentes de vias aéreas superiores (otite média ou sinusite).

São doenças, sinais ou sintomas indicativos de AIDS de **caráter moderado**:

1. Anemia por mais de 30 dias;
2. Candidose oral resistente ao tratamento persistindo por mais de dois (2) meses em maiores de seis (6) meses de idade;
3. Diarréia recorrente ou crônica;
4. Febre persistente com duração superior a um (1) mês;
5. Gengivo-estomatite herpética recorrente com mais de dois episódios em um (1) ano;
6. Hepatite;
7. Herpes zoster, com pelo menos dois (2) episódios distintos ou mais de um dermatomo acometido;
8. Infecção por citomegalovírus iniciada antes de 1 mês de idade;
9. Leiomiossarcoma;
10. Miocardiopatia;
11. Nefropatia;
12. Neutropenia por mais de 30 dias;
13. Nocardiose;
14. Pneumonia linfóide intersticial;
15. Toxoplasmose iniciada antes de 1 mês de idade;
16. Trombocitopenia por mais de 30 dias;
17. Tuberculose pulmonar;
18. Varicela disseminada.

São doenças, sinais ou sintomas indicativos de AIDS de **caráter grave**:

1. Candidose de esôfago;
2. Candidose de traquéia, brônquios ou pulmão;
3. Citomegalovirose em qualquer outro local que não seja, fígado, baço ou linfonodos em maiores de um (1) mês de idade; como a retinite por citomegalovírus.
4. Criptococose extrapulmonar;
5. Criptosporidiose com diarreia persistindo por um período superior a um (1) mês;
6. Encefalopatia determinada pelo HIV;
7. Herpes simples em brônquios, pulmões ou trato gastrointestinal;
8. Herpes simples mucocutâneo, por um período superior a um (1) mês em crianças com mais de um (1) mês de idade;
9. Histoplasmose disseminada (localizada em quaisquer órgãos que não seja exclusivamente em pulmão ou linfonodos cervicais/hilares);
10. Infecções bacterianas graves e recorrentes (pelo menos 2 episódios no intervalo de 2 anos, confirmados bacteriologicamente): sepse, pneumonia, meningite, osteoartrites, abscessos em órgãos internos;
11. Isosporidiose intestinal crônica, por um período superior a um (1) mês;
12. Leucoencefalopatia multifocal progressiva (vírus JC, um poliomavírus);
13. Linfoma não-Hodgkin de células B (fenótipo imunológico desconhecido) e outros linfomas dos tipos histológicos, linfoma maligno de células grandes ou pequenas não clivadas (tipo Burkitt ou não-Burkitt) ou Linfoma maligno imunoblástico sem outra especificação (termos equivalentes: sarcoma imunoblástico, linfoma maligno de células grandes ou linfoma imunoblástico);
14. Linfoma primário do cérebro;
15. Pneumonia por *Pneumocystis carinii*;
16. Qualquer micobacteriose disseminada em órgãos outros que não o pulmão, pele ou linfonodos cervicais/hilares (exceto tuberculose ou hanseníase);
17. Sarcoma de Kaposi;
18. Sepse recorrente por bactérias do gênero *Salmonella* (não tifóide);
19. Síndrome de Emaciação (AIDS Wasting Syndrome)
20. Toxoplasmose cerebral em crianças com mais de um (1) mês de idade.

Evidência laboratorial de imunodeficiência: Contagem de linfócitos T CD4+ de acordo com a idade da criança

A evidência laboratorial de imunodeficiência é determinada quando a contagem absoluta ou percentual de linfócitos T CD4+ for menor do que a esperada para a idade atual.

QUADRO 5

CONTAGEM DE LINFÓCITOS T CD4+ DEFINIDORA DE IMUNODEFICIÊNCIA DE ACORDO COM A IDADE

FAIXA ETÁRIA	CONTAGEM TOTAL E PERCENTUAL
Inferior a 12 meses	<1.500 células por mm ³ (< 25%)
1 a 5 anos	<1.000 células por mm ³ (< 25%)
6 a 12 anos	<500 células por mm ³ (< 25%)

A contagem de linfócitos T CD4+ definida em cada faixa etária acima corresponde aos graus de imunodepressão moderada/grave definidos na classificação dos CDC.

QUADRO 6

DOENÇAS, SINAIS OU SINTOMAS INDICATIVOS DE AIDS DE CARÁTER LEVE

DOENÇAS, SINAIS OU SINTOMAS	DESCRIÇÃO
Aumento crônico das parótidas	Aumento uni ou bilateral das parótidas por tempo superior a duas semanas, afastadas causas comuns dessa condição (cálculo ou estenose de ducto e parotidite epidêmica – caxumba).
Dermatite persistente	Dermatite persistente caracterizada por lesões eczematosas localizadas ou generalizadas de evolução crônica, lesões pápulo-vesiculosas disseminadas sem etiologia definida ou micoses superficiais de evolução crônica resistentes ao tratamento habitual.
Esplenomegalia	Baço com tamanho superior ao esperado para a idade.
Hepatomegalia	Fígado com tamanho superior ao esperado para a idade
Linfadenopatia	Linfadenomegalia maior do que 0,5 cm em mais de duas (2) cadeias diferentes.
Infecções persistentes ou recorrentes de vias aéreas superiores (otite média ou sinusite)	Sinusite/otite crônicas com duração superior a 2 meses, ou 3 ou mais episódios recorrentes em 1 ano.

* É necessário a presença de duas ou mais das condições acima descritas para que se caracterize como indicativa de aids.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Critérios de definição de casos de aids em adultos e crianças./ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. Brasília : Ministério da Saúde, 2003. 50p. il. – (Série Manuais n.º 60).

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro, por livre e espontânea vontade, que permito a participação de, _____, com idade de ____ anos e HC de n° _____ que se encontra sob responsabilidade de _____, com idade de ____ anos, com o RG de n°. _____, residente na Rua _____, cujo grau de parentesco é _____, na pesquisa intitulada ***“Influência da Suplementação Alimentar sobre o Estado Nutricional e a Imunidade Celular de Crianças com AIDS”***, projeto de tese de doutorado da aluna Yara Maria Franco Moreno, promovido pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, sob co-orientação do Prof. Dr. Marcos Tadeu Nolasco da Silva e orientação da Prof.^a Dr.^a Maria Marluce dos Santos Vilela.

Esta pesquisa tem o objetivo de através da suplementação alimentar com pré-bióticos, recuperar ou manter o estado nutricional e conhecer a sua influência sobre a imunidade celular.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos a serem utilizados durante o estudo, tais como:

- a) entrevista com profissional das áreas de nutrição e medicina;
- b) coleta de 20 ml de sangue para a realização de exames;
- c) exames antropométricos (peso, altura, pregas cutâneas);
- d) ingestão do suplemento alimentar que for proposto;
- e) fornecimento de informações referentes à ingestão alimentar.

Comprometo-me a oferecer o suplemento alimentar fornecido, bem como, seguir às orientações recebidas quanto ao seu uso, tendo a garantia de receber resposta a qualquer pergunta e, esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados à pesquisa e a suplementação alimentar.

Estou ciente que não receberei remuneração em troca da participação, que os dados obtidos serão mantidos em sigilo, que posso deixar de participar da pesquisa no momento em que desejar e, que a desistência não influenciará no atendimento que venho recebendo.

De acordo,

Responsável pelo Participante: _____

Yara Maria Franco Moreno (telefone 19 91469944): _____

Prof. Dr. Marcos Tadeu Nolasco da Silva (telefone 19 35218973): _____

Prof.^a Dr.^a Maria Marluce dos S. Vilela (telefone 19 35218963): _____

Campinas, ____ de _____ de _____.

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas- UNICAMP: 19-35218936.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro, por livre e espontânea vontade, que permito a participação de, _____, com idade de ____ anos e HC de n° _____ que se encontra sob responsabilidade de _____, com idade de ____ anos, com o RG de n°. _____, residente na Rua _____, cujo grau de parentesco é _____, como grupo de comparação na pesquisa intitulada ***“Influência da Suplementação Alimentar sobre o Estado Nutricional e a Imunidade Celular de Crianças com AIDS”***, projeto de tese de doutorado da aluna Yara Maria Franco Moreno, promovido pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, sob co-orientação do Prof. Dr. Marcos T. Nolasco da Silva e orientação da Profª Drª Maria Marluce dos Santos Vilela.

Esta pesquisa tem o objetivo de, através da suplementação alimentar com com pré-bióticos, recuperar ou manter o estado nutricional e conhecer a sua influência sobre a imunidade celular.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos a serem utilizados durante o estudo, tais como:

- a) entrevista com profissional das áreas de nutrição e medicina;
- b) coleta de 20 ml de sangue para a realização de exames;

Estou ciente que não receberei remuneração em troca da participação, que os dados obtidos serão mantidos em sigilo, que posso deixar de participar da pesquisa no momento em que desejar e, que a desistência não influenciará no atendimento que venho recebendo.

De acordo,

Responsável pelo Participante: _____

Yara Maria Franco Moreno (telefone 19 91469944): _____

Prof. Dr. Marcos Tadeu Nolasco da Silva (telefone 19 35218973): _____

Prof.ª Dr.ª Maria Marluce dos S. Vilela (telefone 19 35218963): _____

Campinas, ____ de _____ de _____.

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas- UNICAMP: 19-35218936.

Ficha de Coleta de Dados

IDENTIFICAÇÃO

Nome:

Data de nascimento:

Nome do responsável:

Telefone de contato:

Procedência e endereço:

HC:

Idade: a m

CLASSIFICAÇÃO CDC (1994)

A ()

B ()

C ()

1 ()

2 ()

3 ()

HISTÓRIA CLÍNICA

Idade início dos sintomas (meses):

Início da terapia antiretroviral:

Terapia antiretroviral:

Outros medicamentos em uso:

Suplementação polivitaminica/mineral: Sim () Não () Qual:

Tempo de uso:

ANTROPOMETRIA

	1º Consulta	2º Consulta	3º Consulta
Data			
Idade			
peso (kg)			
altura (cm)			
IMC (kg/m ²)			
CB (cm)			
C. Punho (cm)			
PCT (mm)			
PCB (mm)			
PCSe (mm)			
PCSi (mm)			
PCAb (mm)			
CMB (cm)			
AMB (cm ²)			
AAB (cm ²)			
z-escore P/I			
z-escore A/I			
z-escore P/A			
z-escore IMC			
z-escore CB			
z-escore PCT			
z-escore CMB			
z-escore AMB			
Dx Nutricional			

ANAMNESE ALIMENTAR: RECORDATÓRIO 24 HORAS

1º Consulta

2º Consulta

3º Consulta

ESTIMATIVA DA INGESTÃO ALIMENTAR

Ingestão Alimentar	1º Consulta	2º Consulta	3º Consulta
Data			
Energia (kcal)			
Calorias/kg			
Recomendado RDA (1989) (kcal)			
Adequação RDA (1989) (%)			
Recomendado (Miller e Garg, 1998) (kcal)			
Adequação Miller e Garg (1998) (%)			
Proteína (g)			
Proteína (g/kg)			
Recomendado RDA (1989) (g/kg)			
Adequação RDA (1989) (%)			
Recomendado (Miller e Garg, 1998) (g/kg)			
Adequação Miller e Garg (1998) (%)			
Distribuição % dos Macronutrientes			
Proteína (%)			
Carboidratos (%)			
Gorduras (%)			
Ingestão Micronutrientes			
Ferro			
Cálcio			

EXAMES LABORATORIAIS

Exames	1º Consulta	3º Consulta
data		
<i>Hemograma</i>		
Hemoglobina (g/dL)		
Hematócrito (%)		
Plaquetas (fl)		
Leucócitos (cél/mm ³)		
Linfócitos (cél/mm ³)		
<i>Carga viral (cópias/mL)</i>		
<i>Fenotipagem de linfócitos T (%)</i>		
CD3		
CD4		
CD8		
CD45RO		
<i>Proliferação Linfocitária a BCG</i>		
linfócitos pequenos (%)		
CD4 (%)		
CD8 (%)		
TCRγδ		
linfoblastos (%)		
CD4 (%)		
CD8 (%)		
TCRγδ		
células não viáveis (%)		
% linfoproliferação		
<i>Citocinas</i>		
TNF-α (pg/mL)		
IFN-γ (pg/mL)		
IL-10 (pg/mL)		
IL-4 (pg/mL)		
<i>Glutathione eritrocitária (g/dL)</i>		
<i>anticorpo Anti-HBs (mUI/mL)</i>		

AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DO SUPLEMENTO ALIMENTAR

Data	Suplemento ingerido?	Se não, por que?	Peso	Observações

Trabalhos apresentados em congressos

- **Moreno YF**, Chaves DA, Lima SCBS, Vilela MMS, Silva MTN. Lymphocyte Proliferation Analysis (LPA) by Flow Cytometry (FC): Comparison between Whole-Blood (WB) and Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Culture Methods In: XII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular e IX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Biologia Celular, 2004, Campinas.
- Souza PHVA, Toro AAD, **Moreno Y F**, Lima SCBS, Vilela MMS, Mazon SB, Aoki FH, Ribeiro JD, Ribeiro MAGO, Ravetti CVL, Silva MTN. Pulmonary Function in HIV-infected Brazilian Children and Adolescents with Chronic Interstitial Pneumonitis In: 15th European Respiratory Society Congress, 2005, Copenhagen. European Respiratory Journal. , 2005. v.26. p.166s -
- Souza PHVA, Toro AAD, Moreno Y F, Lima SCBS, Vilela MMS, Silva MTN Pulmonary Function in HIV-Infected Brazilian Children and Adolescents with Chronic with Interstitial Pneumonitis In: VI Simpósio Brasileiro de Pesquisa em HIV/AIDS, 2005, Ouro Preto
- Mazzola TN, Da Silva MTN, **Moreno YF**, Lima SCBS, Carniel EF, Morcillo AM, Antonio MARGM, Zanolli ML, Aranha Netto A, Facchini FP, Blotta HM & Vilela MMS. T-cell proliferation in Brazilian infants vaccinated with BCG alone or in combination with hepatitis B, apresentado em New Approaches to Vaccine Development - from bench to the field, de 8 a 10 de setembro de 2005, em Berlim, Alemanha.
- Mazzola TN, Da Silva MTN, **Moreno YF**, Lima SCBS, Carniel EF, Morcillo AM, Antonio MARGM, Zanolli ML, Aranha Netto A, Facchini FP, Blotta HM, Raw I & Vilela MMS. T-cell proliferation in Brazilian infants vaccinated with BCG alone or in combination with hepatitis B, apresentado sob a forma de pôster no XXX Congresso Brasileiro de Imunologia, de 23 a 27 de outubro de 2005, em São Pedro, SP.
- Da Silva MTN, **Moreno YF**, Mazzola TN, Lima SCBS, Carniel EF, Morcillo AM, Antonio MARGM, Zanolli ML, Aranha Neto A, Facchini FP, Blotta HM, Raw I & Vilela MMS. Flow cytometry-based T-cel proliferation assay in the evaluation of responses to vaccines, apresentado sob a forma de pôster no 1º Simpósio Internacional de Imunodeficiências Primárias, de 27 a 29 de outubro de 2005, em São Paulo, SP.

- Mazzola TN, **Moreno YF**, Da Silva MTN, Lima SCBS, Carniel EF, Morcillo AM, Antonio MARGM, Zanolli ML, Aranha Netto A, Facchini FP, Blotta MHSL, Raw I & Vilela MMS. Expansão de células TCR gamadelta⁺ em lactentes imunizados ao nascer com as vacinas BCG isolada ou em combinação com Hepatite B, apresentado oralmente na seção TOP 5 do 10º Congresso Brasileiro e 6º Congresso Latino-americano de Alergia e Imunologia em Pediatria e 1º Simpósio Internacional sobre o Lactente Sibilante, de 27 a 30 de maio de 2006, em Porto Alegre, RS.

- Mazzola TN, **Moreno YF**, Da Silva MTN, Lima SCBS, Carniel EF, Morcillo AM, Antonio MARGM, Zanolli ML, Aranha Netto A, Facchini FP, Blotta MHSL, Raw I & Vilela MMS. Padrão TH1 de citocinas em lactentes imunizados com a vacina BCG isolada ou em combinação com Hepatite B, apresentado sob a forma de pôster no 10º Congresso Brasileiro e 6º Congresso Latino-americano de Alergia e Imunologia em Pediatria e 1º Simpósio Internacional sobre o Lactente Sibilante, de 27 a 30 de maio de 2006, em Porto Alegre, RS.

- Mazzola TN, **Moreno YF**, Da Silva MTN, Lima SCBS & Vilela MMS. Memória imunológica para a vacina BCG em lactentes com e sem exposição vertical ao HIV, apresentado sob a forma de pôster no 10º Congresso Brasileiro e 6º Congresso Latino-americano de Alergia e Imunologia em Pediatria e 1º Simpósio Internacional sobre o Lactente Sibilante, de 27 a 30 de maio de 2006, em Porto Alegre, RS.

- Mazzola TN, **Moreno YF**, Da Silva MTN, Carniel EF, Raw I & Vilela MMS. Resposta celular de lactentes imunizados ao nascer com as vacinas BCG isolada ou em combinação com hepatite B, apresentado oralmente no 33º Congresso Brasileiro de Pediatria, de 06 a 11 de outubro de 2006, em Recife, PE.

- Mazzola TN, **Moreno YF**, Da Silva MTN, Lima SCBS, Zorzeto TQ & Vilela MMS. Imunidade celular reduzida para a vacina BCG em lactentes com exposição vertical ao HIV e não infectados, apresentado em forma de pôster no 33º Congresso Brasileiro de Pediatria, de 06 a 11 de outubro de 2006, em Recife, PE.

- Mazzola TN, Da Silva MTN, **Moreno YF**, Lima SCBS, Zorzeto TQ & Vilela MMS. Low expansion of BCG primed T-cells following BCG vaccination in uninfected infants born to HIV-infected mothers, apresentado sob a forma de pôster no XXXI Congresso Brasileiro de Imunologia, de 22 a 25 de outubro de 2006, em Búzios, RJ.

- **Moreno YF**, Mazzola TN, Lima SCBS Da Silva MTN & Vilela MMS. Efeito imunomodulador das proteínas do soro de leite bovino em culturas de células mononucleadas de sangue periférico (CMSP), apresentado sob a forma de pôster no 14º Congresso Latinoamericano de Nutrição, de 12 a 16 de novembro de 2006, em Florianópolis, SC.

- Mazzola TN, **Moreno YF**, Da Silva MTN, Lima SCBS, Zorzeto, TQ & Vilela MMS. Resposta imune celular para a vacina BCG em lactentes com exposição vertical ao HIV e não infectados, apresentado sob a forma de pôster no VI São Paulo Research Conference - II Mecanismos de Infecção e Vacinas, de 27 a 29 de novembro de 2006, em São Paulo, SP.

- **Moreno YF**, Mazzola TN, Lima SCBS, Silva MTN, Damiao A & Vilela MMS. Cytokine Secretion Inhibition by Bovine Whey Protein Concentrates in Bacillus Calmette-Guérin-stimulated Peripheral Blood Mononuclear Cells Cultures, apresentado oralmente no Clinical Nutrition Week - American Society for Parenteral & Enteral Nutrition, de 28 a 31 de Janeiro de 2007, Phoenix, Arizona, EUA.

- **Moreno YF**, Mazzola TN, Oya V, Silva MTN, Damiao A & Vilela MMS. Immunomodulatory Effects of Bovine Whey Protein Concentrates in Bacillus Calmette-Guérin-stimulated Cultures of Peripheral Blood Mononuclear Cells from HIV-infected Children, apresentado oralmente no Clinical Nutrition Week - American Society for Parenteral & Enteral Nutrition, de 28 a 31 de Janeiro de 2007, Phoenix, Arizona, EUA.

10- APÊNDICE

Tabela 1: Características das crianças expostas ao HIV-1 infectadas e não infectadas.

Características		Exposição ao HIV-1	
		Infectadas	Não Infectadas
	Idade (anos)	8,6 (2,4 - 16,0)	6,0 (2,7 - 10,2)
	Genero (masc./fem.)	(27 / 26)	(5/6)
	Início dos Sintomas (meses)	8 (1 - 84)	
Categoria Clínica e Imunológica	A1	1	
	A2	4	
	A3	1	
	B1	7	
	B2	16	
	B3	6	
	C1	1	
	C2	4	
	C3	8	
	N1	1	
	N2	1	
Terapia Antiretroviral	1ITRN+1ITRNN+1IP	1	
	2ITRN	1	
	2ITRN+1IP	33	
	2ITRN+1IP+1ITRNN	4	
	2ITRN+1ITRNN	8	
Carga Viral	cv < 10 ⁴ (cópias/ml)	35	
	10 ⁴ < cv < 10 ⁵ (cópias/ml)	14	
	10 ⁵ < cv (cópias/ml)	1	
Linfócitos T	CD4 ⁺ (células/mm ³)	774,5 (250 - 3480)	
	CD8 ⁺ (células/mm ³)	1304 (509 - 3858)	
	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0,545 (0,11 - 2,14)	
n		50	11

n: número de crianças

Tabela 2: Parâmetros hematológicos e concentração de glutatona eritrocitária em crianças expostas ao HIV-1 infectadas e não infectadas.

Parâmetro	Exposição ao HIV-1		Valor de p ²
	Infectadas	Não Infectadas	
Glutathione (mg/dL)	69,6 (21,21 - 255,04) ¹	73,55 (48,61 - 109,20)	0,320
Hemoglobina (g/dL)	12,5 (10,2 - 15,6)	13,3 (11,9 - 14)	0,077
Hematócrito (%)	37,55 (31,6 - 45,9)	38 (30,1 - 41,6)	0,363
Leucócitos (células $\times 10^9/L$)	6,545 (3,92 - 793)	7,9 (4,95 - 9,46)	0,069
Linfócitos (células $\times 10^9/L$)	2,93 (1,13 - 8,26)	2,64 (1,95 - 4,89)	0,743
Linfócitos (%)	46,3 (10,9 - 68,1)	35,2 (28,8 - 58,5)	0,036
Plaquetas (células $\times 10^9/L$)	287 (85 - 430)	288 (243 - 499)	0,168
n	50	11	

n: número de crianças, ¹: mediana (mínimo e máximo), ² valor de p Teste de Mann-Whitney.

Tabela 3: Percentual de linfócitos T CD4⁺, CD4⁺CD45RO⁺, CD8⁺, CD8⁺45RO⁺ e TCR $\gamma\delta$ no sangue periférico de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não infectadas.

Linfócitos T	Exposição ao HIV-1		Valor de p ²
	Infectadas	Não infectadas	
CD4 ⁺	34,2 (10,4 - 77,2) ¹	53,70 (27,40 - 68,10)	< 0,001
CD4 ⁺ CD45RO ⁺	12,65 (4,70 - 26,40)	21,0 (7,10 - 37,90)	< 0,001
CD8 ⁺	57,35 (19,10 - 79,40)	34,9 (21,1 - 57,2)	< 0,001
CD8 ⁺ CD45RO ⁺	20,90 (5,00 - 68,80)	8,70 (2,20 - 37,10)	0,003
CD4 ⁺ / CD8 ⁺	0,60 (0,13 - 4,04)	1,55 (0,47 - 3,22)	0,001
TCR $\gamma\delta$	4,55 (1,30 - 13,70)	6,90 (3,10 - 19,10)	0,014
n	52	11	

n: número de crianças, ¹: mediana (mínimo e máximo), ² valor de p Teste de Mann-Whitney.

Tabela 4: Proliferação linfocitária percentual espontânea, estimulada por BCG ou por fitohemaglutinina (PHA), após seis dias de cultura de células monocleares de sangue periférico de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não infectadas.

Estímulo	Exposição ao HIV-1		Valor de p ²
	Infectadas	Não infectadas	
Controle	Pequenos 62,77 (12,9 - 88,1) ¹	78,5 (48,75 - 88,1)	0,019
	Linfoblastos 1,7 (0,8 - 6,6)	1,75 (1,25 - 3,1)	0,497
	Não Viáveis 23,4 (1,6 - 76,2)	9,32 (4 - 24,65)	< 0,001
BCG	Pequenos 47,3 (5,1 - 84,8)	43,85 (34,25 - 60,9)	0,527
	Linfoblastos 2,45 (1,05 - 24,65)	30,42 (5,8 - 46,75)	< 0,001
	Não Viáveis 33,925 (1,4 - 79,1)	6,37 (2,95 - 27,65)	< 0,001
	Blasto Específico 1,93 (-1,99 - 34,27)	37,54 (7,61 - 55,13)	< 0,001
PHA	Pequenos 5,85 (1 - 77,7)	3,55 (2,5 - 23,45)	0,119
	Linfoblastos 43,8 (4,95 - 72,6)	58,15 (47,95 - 67,4)	0,003
	Não Viáveis 16,75 (4,6 - 69)	9,92 (5,6 - 17,5)	0,008
	Blasto Específico 82,35 (0,65 - 96,7)	91,67 (63,45 - 94,1)	0,037
n	51	10	

n: número de crianças, ¹: mediana (mínimo e máximo), ²valor de p Teste de Mann-Whitney.

Tabela 5: Percentual de linfoblastos $CD4^+$, $CD8^+$ e TCR $\gamma\delta$ após seis dias de cultura de células monocleares de sangue periférico espontânea, estimulada por BCG ou por fitohemaglutinina (PHA), de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não infectadas.

Condição	Linfócitos T	Exposição ao HIV-1		Valor de p²	
		Infectadas	Não infectadas		
Controle	Pequenos	CD4⁺	58,6 (14 - 89,9)¹	71,9 (66,6 - 88,7)	0,003
		CD8⁺	36,3 (7,2 - 77,5)	19,5 (4,2 - 28,4)	0,001
		γδ	0,8 (0 - 64,1)	1,9 (0 - 5)	0,338
	Linfoblasto	CD4⁺	25,6 (1,1 - 74,4)	59,75 (31,6 - 76,4)	0,005
		CD8⁺	27,7 (1,4 - 69,1)	21,3 (7,8 - 38)	0,117
		γδ	5,5 (0 - 45,5)	3,35 (0,3 - 17,6)	0,147
BCG	Pequenos	CD4⁺	53,7 (15,5 - 83)	29,5 (8 - 76,3)	0,001
		CD8⁺	33,5 (2,5 - 76,2)	9,9 (3,1 - 27,8)	0,008
		γδ	0,6 (0 - 60,8)	1,6 (0 - 19,9)	< 0,001
	Linfoblasto	CD4⁺	18,5 (1,8 - 61,9)	8,5 (3,1 - 24,1)	0,642
		CD8⁺	13,1 (0 - 48,9)	3,8 (2,1 - 17,8)	0,001
		γδ	26,3 (4,4 - 84,1)	90,3 (62,7 - 97,8)	0,986
PHA	Pequenos	CD4⁺	60,8 (0 - 100)	88,6 (58,3 - 98,1)	0,030
		CD8⁺	20 (0 - 79,7)	3,3 (0,3 - 23,9)	0,007
		γδ	1,4 (0 - 86,5)	0,2 (0 - 7,7)	0,227
	Linfoblasto	CD4⁺	68,9 (0 - 96)	87,8 (68,3 - 95)	0,005
		CD8⁺	24,9 (0 - 63,2)	7 (0,5 - 25,2)	0,004
		γδ	0,7 (0,1 - 86,1)	0,3 (0 - 1,7)	0,278
n		51	10		

n: número de crianças, ¹: mediana (mínimo e máximo), ²: valor de p Teste de Mann-Whitney.

Tabela 6: Concentração de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-4 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas, estimuladas por BCG ou por fitohemaglutinina (PHA) por 48 horas, de crianças expostas ao HIV-1 infectadas ou não infectadas.

Citocina (pg/mL)	Condição Experimental	Exposição ao HIV-1		Valor de p ²
		Infectadas	Não infectadas	
TNF- α	Controle	101,43 (indetectável - 2802,08) ¹	29,91 (indetectável - 188,82)	0,002
	BCG	2517,25 (199,72 - 22199,54)	6039,67 (2940,45 - 10807,80)	< 0,001
	PHA	715,64 (indetectável - 7132,50)	1276,50 (325,48 - 1820,39)	0,362
INF- γ	Controle	indetectável (indetectável - 807,80)	23,28 (indetectável - 100,48)	0,034
	BCG	33,95 (indetectável - 1772,09)	708,20 (34,76 - 4163,77)	0,002
	PHA	81,83 (indetectável - 4979,79)	89,51 (35,06 - 3293,02)	0,730
IL-10	Controle	64,76 (indetectável - 1911,66)	64,26 (indetectável - 293,85)	0,894
	BCG	639,07 (indetectável - 3480,35)	861,05 (321,61 - 2735,52)	0,320
	PHA	268,08 (indetectável - 1131,11)	741,56 (231,80 - 1989,31)	0,001
IL-4	Controle	51,16 (indetectável - 245,86)	62,87 (indetectável - 230,38)	0,620
	BCG	23,70 (indetectável - 226,78)	93,25 (indetectável - 219,25)	0,493
	PHA	100,20 (indetectável - 437,05)	96,17 (indetectável - 190,65)	0,741
n		50	11	

n: número de crianças, ¹: mediana (mínimo e máximo), : ²valor de p Teste de Mann-Whitney.

Tabela 7: Características das crianças infectadas pelo HIV-1 antes da suplementação alimentar .

Características		Grupo		
		Hidrolisado (n=12)	Pré-biótico (n=15)	Nativo (n=12)
	Idade (anos)	8,01 (3,03 - 10,34) ¹	8,61 (2,49 - 11,52)	9,21 (5,96 - 16,07)
	Genero (masc./fem.)	(4 / 8)	(9 / 6)	(6 / 6)
	Início dos Sintomas (meses)	7 (1 - 36)	6 (1 - 84)	6 (1 - 48)
Categoria Clínica Imunológica²	A2	0	1	1
	A3	0	1	0
	B1	1	1	3
	B2	5	5	5
	B3	3	3	0
	C1	0	1	0
	C2	1	0	1
	C3	2	3	2
Terapia Anti- retroviral³	2 ITRN + 1 IP	9	11	8
	2 ITRN + 1 IP+ 1 ITRNN	1	1	2
	2 ITRN + 1 ITRNN	2	3	2
Carga Viral	Indetectável	3	3	5
	50 < cv < 10 ⁴ (cópias/ml)	5	10	4
	10 ⁴ < cv < 10 ⁵ (cópias/ml)	3	2	2
	10 ⁵ < cv (cópias/ml)	1	0	1
Linfócitos T	CD4 ⁺	784 (250 - 1403)	682 (310 - 3480)	1054,5 (351 - 1736)
	CD8 ⁺	818,5 (647 - 2221)	1745 (879 - 2933)	1198,5 (509 - 2323)
	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0,81 (0,21 - 1,75)	0,45 (0,11 - 1,19)	0,645 (0,15 - 2,04)

¹ mediana (mínimo e máximo). ² **Categoria Imunológica** - 1: ausência de supressão, 2: supressão moderada (15%<CD4⁺<25%) e 3: supressão grave (CD4⁺<15%). **Categoria Clínica** - A: sintomas leves, B: sintomas moderados e C: sintomas graves (CDC, 1994). ³ **IP**: inibidores da Protease, **ITRN**: Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo, **ITRNN**: Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Análogos de Nucleosídeo. **n**: número de crianças

Tabela 8: Escores Z dos índices antropométricos peso/idade, altura/idade e IMC e parâmetros de composição corporal de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (Tempo 1) e final (Tempo 2) do ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).

Índice	Grupo	Tempo 1	Tempo 2	p ²	Diferença ³	p ⁴
Altura	Hidrolisado	-0,98 (-3,39 - 0,16) ¹	-1,25 (-3,38 - -0,03)	0,249	0,03 (-0,14 - 0,08)	0,928
	Pré-biótico	-0,57 (-2,05 - 0,79)	-0,47 (-1,31 - 0,70)	0,441	0,03 (-0,11 - 0,13)	
	Nativo	-1,18 (-2,23 - 0,08)	-0,72 (-1,73 - 0,13)	0,726	0,01 (-0,33 - 0,23)	
Peso	Hidrolisado	-1,21 (-3,28 - 0,45)	-2,08 (-2,68 - 0,32)	0,116	0,57 (-0,08 - 0,82)	0,141
	Pré-biótico	-0,79 (-2,05 - 0,97)	-0,69 (-2,63 - 0,98)	0,401	-0,17 (-0,79 - 0,16)	
	Nativo	-1,51 (-3,08 - 0,62)	-0,54 (-3,34 - 0,58)	0,401	0,23 (-0,08 - 0,57)	
IMC	Hidrolisado	-0,84 (-1,93 - 0,53)	-0,82 (-1,99 - 0,66)	0,345	0,59 (0,34 - 0,83)	0,282
	Pré-biótico	-0,03 (-3,09 - 0,79)	-2,10 (-2,59 - -1,05)	0,575	0 (-1,22 - 2,44)	
	Nativo	-0,33 (-2,55 - 1,03)	-0,80 (-2,34 - 0,77)	0,575	0,10 (-0,92 - 1,15)	
Perímetro Braquial	Hidrolisado	-2,06 (-2,63 - -0,82)	-1,41 (-1,97 - -0,15)	0,046	0,66 (0,38 - 0,71)	0,151
	Pré-biótico	-1,27 (-4,44 - 0,28)	-1,61 (-2,19 - 0,06)	0,498	-0,11 (-0,26 - 2,25)	
	Nativo	-1,47 (-3,2 - 0,30)	-0,60 (-3,2 - 0,47)	0,397	0,145 (-0,71 - 1,35)	
Prega Cutânea do Tríceps	Hidrolisado	-1,22 (-2,24 - 0)	-1,32 (-1,85 - -0,90)	0,686	0,17 (-0,13 - 0,60)	0,163
	Pré-biótico	-0,10 (-2,03 - 0,67)	-0,23 (-1,74 - 0,72)	0,149	-0,02 (-0,58 - 0,11)	
	Nativo	-0,55 (-2,37 - 0,27)	-0,38 (-2,41 - 0,25)	0,262	0,05 (-0,26 - 0,44)	
Prega Cutânea Sub-escapular	Hidrolisado	0 (-1,10 - 0,31)	0,24 (-0,66 - 0,57)	0,068	-0,02 (-0,24 - 0,6)	0,013
	Pré-biótico	0,12 (-1,10 - 0,87)	0,13 (-0,82 - 0,44)	0,069	-0,14 (-0,71 - 0,43)	
	Nativo	0,04 (-2,67 - 1,01)	0,15 (-1,65 - 1,32)	0,091	0,08 (-0,11 - 0,67)	
Somatório de Pregas Cutâneas	Hidrolisado	-0,66 (-1,97 - 0)	-0,47 (-1,29 - 0,08)	0,080	0,19 (0 - 1,15)	0,065
	Pré-biótico	0,05 (-1,91 - 0,77)	0,08 (-1,52 - 0,62)	0,063	-0,12 (-0,72 - 0,18)	
	Nativo	-0,43 (-2,45 - 0,48)	-0,09 (-2,11 - 0,54)	0,035	0,20 (-0,21 - 1,24)	
Área Muscular do Braço	Hidrolisado	-1,92 (-2,52 - 0,07)	-0,27 (-2,08 - 0,45)	0,173	0,25 (-0,15 - 0,59)	0,322
	Pré-biótico	-1,41 (-4,8 - 0,14)	-1,30 (-4,78 - 0,87)	0,889	0 (-1,69 - 0,15)	
	Nativo	-1,41 (-2,43 - 0,24)	0,09 (-2,21 - 0,97)	0,575	0,14 (-0,32 - 0,64)	
Área Adiposa do Braço	Hidrolisado	-1,48 (-2,3 - -0,61)	-1,36 (-1,8 - -1,01)	0,043	0,12 (0 - 0,50)	0,130
	Pré-biótico	-0,79 (2,11 - 0,29)	-0,46 (-1,91 - 0,47)	0,484	-0,02 (-0,56 - 0,25)	
	Nativo	-0,53 (2,53 - 0,25)	-0,39 (-2,56 - 0,17)	0,208	0,09 (-0,24 - 0,98)	

¹: mediana (mínimo e máximo), ²: Valor de p, Teste de Wilcoxon; ³: Diferença entre os tempos (Tempo 2 – Tempo 1);

⁴: Valor de p, Teste de Kruskal Wallis. Número de casos.: Hidrolisado: 6, Pré-Biótico: 9, Nativo: 8.

Tabela 9: Ingestão alimentar de energia, proteína, cálcio e ferro e distribuição percentual dos macronutrientes em crianças infectadas pelo HIV-1 no início e final de ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).

Ingestão Alimentar	Grupo	Tempo 1	Tempo 2	p ²
Energia (kcal/kg)	Hidrolisado	82,62 (42,65 - 136,30) ¹	60,83 (58,09 - 85,43)	0,273
	Pré-biótico	83,14 (52,78 - 121,83)	94,8 (70,07 - 194,36)	0,500
	Nativo	82,66 (47,37 - 121,50)	88,31 (46,06 - 113,22)	0,036
Proteína (g/kg)	Hidrolisado	2,62 (1,47 - 7,08)	3,34 (2,66 - 3,48)	0,465
	Pré-biótico	3,31 (2,43 - 6,95)	5,43 (2,05 - 8,04)	0,345
	Nativo	3,19 (2,38 - 5,16)	3,28 (2,72 - 5,51)	0,208
Cálcio (mg)	Hidrolisado	688,05 (112,96 - 1381,37)	548,89 (425,94 - 831,63)	0,273
	Pré-biótico	787,9 (407,07 - 1625,22)	885,64 (439,12 - 1651,88)	0,345
	Nativo	892,4 (471,90 - 1476,02)	1155,9 (811,27 - 1561,86)	0,012
Ferro (mg)	Hidrolisado	11,4 (5,86 - 35,65)	10,05 (9,68 - 14,74)	0,465
	Pré-biótico	18,3 (5,68 - 35,36)	20,03 (12,21 - 49,32)	0,500
	Nativo	17,5 (11,26 - 34,86)	16,96 (13,90 - 29,56)	0,263
Distribuição % Macronutrientes				
Proteína	Hidrolisado	14,93 (12,01 - 21,35)	19,62 (16,32 - 23,24)	0,465
	Pré-biótico	18,04 (12,90 - 22,82)	19,33 (11,71 - 24,57)	0,686
	Nativo	16,21 (14,62 - 22,12)	17,77 (12,66 - 23,67)	0,779
Carboidratos	Hidrolisado	50,98 (36,20 - 66,58)	55,12 (49,97 - 57,00)	0,715
	Pré-biótico	56,38 (42,83 - 62,87)	50,56 (36,94 - 62,58)	0,080
	Nativo	52,38 (48,47 - 63,07)	46,7 (37,45 - 63,62)	0,401
Gordura	Hidrolisado	28,17 (18,96 - 43,21)	42,90 (34,42 - 46,75)	0,068
	Pré-biótico	27,36 (15,33 - 37,28)	31,48 (21,61 - 38,75)	0,043
	Nativo	28,95 (22,90 - 38,25)	34,53 (22,24 - 38,94)	0,263

¹Mediana (mínimo e máximo), ² Valor de p Teste de Wilcoxon. Número de casos.: Hidrolisado: 6, Pré-Biótico: 9, Nativo: 8.

Tabela 10: Adequação Alimentar segundo recomendações propostas pela RDA (1989) em crianças infectadas pelo HIV-1 no início (Tempo 1) e final (Tempo 2) de ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).

% de Adequação	Grupo	Tempo 1	Tempo 2	p ²
Energia	Hidrolisado	71,83 (41,59 - 173,78) ¹	68,94 (59,56 - 85,69)	0,273
	Pré-biótico	93,37 (67,36 - 125,42)	110,01 (78,68 - 195,91)	0,345
	Nativo	98,79 (61,79 - 157,95)	115,22 (85,89 - 143,52)	0,025
Proteína	Hidrolisado	195,35 (102,69 - 645,02)	252,02 (190,55 - 326,40)	0,273
	Pré-biótico	240 (116,93 - 391,76)	349,03 (230,18 - 450,28)	0,500
	Nativo	244,96 (166,32 - 480,04)	287,89 (217,31 - 453,01)	0,208
Cálcio	Hidrolisado	75,13 (14,12 - 172,67)	68,61 (53,24 - 103,95)	0,273
	Pré-biótico	89,44 (31,31 - 203,15)	82,15 (54,89 - 151,12)	0,345
	Nativo	91,04 (49,86 - 147,40)	112,39 (91,28 - 140,63)	0,012
Ferro	Hidrolisado	92,29 (58,63 - 356,53)	100,50 (96,80 - 147,40)	0,465
	Pré-biótico	143,75 (56,86 - 294,70)	200,35 (122,13 - 411,03)	0,686
	Nativo	149,72 (95,94 - 348,61)	161,02 (117,96 - 246,33)	0,263

¹Mediana (mínimo e máximo), ² Valor de p Teste de Wilcoxon. Número de casos.: Hidrolisado: 6, Pré-Biótico: 9, Nativo: 8.

Tabela 11: Parâmetros hematológicos e concentração de glutathiona eritrocitária em crianças infectadas pelo HIV-1 no início (Tempo 1) e final (Tempo 2) de ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).

Parâmetro	Grupo	Tempo 1	Tempo 2	p ²	Diferença ³	p ⁴
Hemoglobina (g/dL)	Hidrolisado	12,35 (11,4 - 13,1) ¹	12,25 (11,2 - 14,1)	0,753	-0,1 (-1,2 - 1)	0,560
	Pré-biótico	12,4 (11,2 - 15,6)	11,7 (10,8 - 14,3)	0,858	-0,1 (-1,5 - 2,5)	
	Nativo	13,4 (11,1 - 14,8)	13,3 (11 - 15)	0,308	0,2 (-1,4 - 1,4)	
Hematócrito (%)	Hidrolisado	36,5 (32,6 - 39,1)	36,05 (31,8 - 41)	0,833	0 (-2,1 - 4,5)	0,442
	Pré-biótico	37,6 (33,9 - 45,9)	34,8 (32,6 - 40,6)	0,514	-0,6 (-5,5 - 6,1)	
	Nativo	38,05 (33,2 - 43,8)	38,9 (34 - 43,9)	0,327	0,75 (-5 - 4,2)	
Plaquetas (células x 10 ⁹ /L)	Hidrolisado	308,5 (192 - 378)	224 (114 - 409)	0,225	-21 (-147 - 79)	0,576
	Pré-biótico	278,5 (175 - 430)	285 (173 - 340)	0,678	12 (-105 - 95)	
	Nativo	271,5 (149 - 369)	235 (169 - 288)	0,674	-7 (-142 - 76)	
Leucócitos (células x 10 ⁹ /L)	Hidrolisado	5,63 (4,25 - 11,06)	5,76 (4,31 - 12,2)	0,600	0,19 (-2,52 - 7,52)	0,790
	Pré-biótico	7,37 (4,94 - 7,93)	5,58 (3,9 - 11,08)	0,953	-0,05 (-2,93 - 4,12)	
	Nativo	6,365 (3,92 - 10,8)	6,625 (4,5 - 9,27)	0,208	0,7 (-2,21 - 2,46)	
Linfócitos (células x 10 ⁹ /L)	Hidrolisado	2,89 (2,07 - 3,45)	3,22 (2,43 - 7,19)	0,046	0,345 (-0,03 - 4,12)	0,062
	Pré-biótico	3,22 (1,13 - 8,26)	2,58 (1,54 - 4,46)	0,594	0,03 (-1,27 - 0,98)	
	Nativo	2,89 (1,72 - 4,71)	2,85 (1,92 - 3,62)	0,484	-0,1 (-0,63 - 0,34)	
Linfócitos (%)	Hidrolisado	46,55 (25,5 - 65,6)	57,8 (39,5 - 65,6)	0,345	4,8 (-6,6 - 17,9)	0,222
	Pré-biótico	44,65 (10,9 - 60)	46,2 (33,7 - 60)	0,813	4,1 (-23 - 23)	
	Nativo	48,35 (34,1 - 68,1)	42,05 (28,1 - 59,4)	0,208	-7,95 (-24,1 - 11,7)	
Glutathiona (mg/dL)	Hidrolisado	67,31 (21,21 - 112,01)	69,72 (50,31 - 122,33)	0,753	10,33 (-14,19 - 44,01)	0,747
	Pré-biótico	67,12 (48,17 - 109,74)	79,6 (50,88 - 96,47)	0,314	4,16 (-17,04 - 31,59)	
	Nativo	74,33 (29,1 - 94,16)	80,29 (62,67 - 109,49)	0,401	5,32 (-14,08 - 24,57)	

¹: mediana (mínimo e máximo), ²: Valor de p, Teste de Wilcoxon; ³: Diferença entre os tempos (Tempo 2 – Tempo 1); ⁴: Valor de p, Teste de Kruskal Wallis. Número de casos.: Hidrolisado: 6, Pré-Biótico: 9, Nativo: 8

Tabela 12: Contagem absoluta de linfócitos T CD4+ e CD8+ em crianças infectadas pelo HIV-1 no início (Tempo 1) e final (Tempo 2) de ensaio de suplementação alimentar do ensaio com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).

Linfócitos T	Grupo	Tempo 1	Tempo 2	p ²	Diferença ³	p ⁴
CD4 ⁺	Hidrolisado	784 (250 - 1403) ¹	889 (256 - 1779)	0,345	204,5 (-1055 - 593)	0,072
	Pré-biótico	682 (310 - 3480)	726 (430 - 983)	0,314	-67 (-300 - 233)	
	Nativo	1054,5 (351 - 1736)	785,5 (254 - 1311)	0,093	-143,5 (-335 - 72)	
CD8 ⁺	Hidrolisado	818,5 (647 - 2221)	1532 (802 - 4599)	0,028	263,5 (91 - 3797)	0,004
	Pré-biótico	1745,5 (937 - 2933)	1361 (860 - 2785)	0,093	-70 (-618 - 112)	
	Nativo	1198,5 (509 - 2323)	971,5 (495 - 2551)	0,123	-119,5 (-610 - 228)	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Hidrolisado	0,81 (0,21 - 1,75)	0,755 (0,06 - 1,64)	0,345	-0,04 (-1,58 - 0,09)	0,209
	Pré-biótico	0,45 (0,11 - 1,19)	0,53 (0,15 - 1,12)	0,039	0,04 (-0,04 - 1,12)	
	Nativo	0,645 (0,15 - 2,04)	0,73 (0,1 - 1,77)	0,400	0,045 (-0,27 - 0,16)	

¹: mediana (mínimo e máximo), ²: Valor de p, Teste de Wilcoxon; ³: Diferença entre os tempos (Tempo 2 – Tempo 1); ⁴: Valor de p, Teste de Kruskal Wallis. Número de casos.: Hidrolisado: 6, Pré-Biótico: 9, Nativo: 8

Tabela 13: Proliferação linfocitária percentual espontânea após seis dias de cultura de células monocleares de sangue periférico de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (Tempo 1) e final (Tempo2) de ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).

Linfócitos T	Grupo	Tempo 1	Tempo 2	p ²	Diferença ³	p ⁴
Pequenos	Hidrolisado	68,825 (12,9 - 78,2) ¹	71,65 (18,8 - 89,6)	0,249	4,225 (-39,35 - 44,25)	0,687
	Pré-biótico	62,7 (23,15 - 79,65)	69,35 (45 - 86,65)	0,173	13,45 (-17,7 - 46,2)	
	Nativo	71,525 (20,9 - 80,65)	65,675 (52,9 - 78,2)	0,889	0,65 (-24,45 - 37,45)	
Linfoblastos	Hidrolisado	1,45 (1,3 - 5,55)	2 (0,8 - 2,6)	0,917	0,125 (-3,55 - 1,2)	0,118
	Pré-biótico	1,75 (1,05 - 4,35)	2,9 (2 - 10)	0,038	1,4 (-1,5 - 5,65)	
	Nativo	1,3 (0,8 - 1,8)	2,3 (1,15 - 5,5)	0,017	1,375 (-0,1 - 4,15)	
Não viáveis	Hidrolisado	21,3 (13,4 - 70,7)	17,7 (5,2 - 59,9)	0,249	-8,55 (-46,15 - 37,8)	0,516
	Pré-biótico	23 (6,75 - 63,05)	12,5 (5,65 - 32,3)	0,086	-13,1 (-50,55 - 16,4)	
	Nativo	20,92 (8,9 - 43,8)	19,82 (7,35 - 29,05)	0,327	-6,25 (-19,7 - 20,15)	

¹: mediana (mínimo e máximo), ²: Valor de p, Teste de Wilcoxon; ³: Diferença entre os tempos (Tempo 2 – Tempo 1); ⁴: Valor de p, Teste de Kruskal Wallis. Número de casos.: Hidrolisado: 6, Pré-Biótico: 9, Nativo: 8.

Tabela 14: Proliferação linfocitária percentual estimulada por BCG após seis dias de cultura de células monocleares de sangue periférico de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (Tempo 1) e final (Tempo2) de ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).

Linfócitos T	Grupo	Tempo 1	Tempo 2	p ²	Diferença ³	p ⁴
Pequenos	Hidrolisado	56,95 (13,7 - 74,85)	59,67 (15,15 - 83,75)	0,345	20,15 (-43,15 - 43,95)	0,997
	Pré-biótico	43,7 (29,9 - 77,75)	67,35 (24,1 - 81,3)	0,374	9,6 (-23,65 - 37,45)	
	Nativo	57,55 (21,85 - 77,45)	49,3 (43,95 - 77)	0,866	12,6 (-32,3 - 55,1)	
Linfoblastos	Hidrolisado	3,775 (1,5 - 7,2)	3,4 (1,55 - 31,55)	0,753	-1,5 (-3,65 - 28,2)	0,116
	Pré-biótico	2 (1,05 - 24,65)	7,8 (1,1 - 65,3)	0,008	5,8 (0,05 - 40,65)	
	Nativo	2,55 (1,15 - 3,35)	8,95 (4 - 35,65)	0,018	5,525 (0,9 - 33,1)	
Não-viáveis	Hidrolisado	27,35 (15,15 - 73,3)	16,65 (5,5 - 68)	0,249	-18,35 (-46,9 - 42,1)	0,507
	Pré-biótico	33 (11,7 - 54,7)	13,1 (1,65 - 47,35)	0,086	-15,9 (-47,9 - 29,6)	
	Nativo	31,1 (11,7 - 57,75)	28,5 (5,05 - 37,25)	0,128	-9,55 (-24,5 - 26,6)	
Linfoblastos BCG Específicos	Hidrolisado	2,53 (-1,99 - 9,47)	1,91 (0,66 - 33,85)	0,917	-1,34 (-12,16 - 31,70)	0,308
	Pré-biótico	0,73 (-0,31 - 34,27)	6,44 (-4,20 - 69,86)	0,028	4,55 (-3,88 - 35,59)	
	Nativo	2,17 (-1,50 - 4,48)	8,91 (2,43 - 40,55)	0,043	5,72 (-1,21 - 38,38)	

¹: mediana (mínimo e máximo), ²: Valor de p, Teste de Wilcoxon; ³: Diferença entre os tempos (Tempo 2 – Tempo 1); ⁴: Valor de p, Teste de Kruskal Wallis. Número de casos: Hidrolisado: 6, Pré-Biótico: 9, Nativo: 8.

Tabela 15: Proliferação linfocitária percentual estimulada por fitohemaglutinina (PHA) após seis dias de cultura de células monocucleares de sangue periférico de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (Tempo 1) e final (Tempo2) de ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).

Linfócitos T	Grupo	Tempo 1	Tempo 2	p²	Diferença³	p⁴
Pequenos	Hidrolisado	24,65 (1,3 - 44,3)	15,05 (2,3 - 24,1)	0,500	-6,8 (-42 - 22,8)	0,532
	Pré-biótico	3,2 (1,7 - 30,45)	8,35 (0,75 - 18,9)	0,374	3,65 (-11,55 - 9,85)	
	Nativo	6,85 (1 - 13,15)	5,3 (2,4 - 8,55)	0,327	-1,65 (-10,75 - 5,15)	
Linfoblastos	Hidrolisado	33,5 (4,95 - 72,6)	39,4 (15,4 - 58,8)	0,893	9,85 (-15,5 - 28,1)	0,892
	Pré-biótico	44,45 (27,55 - 65,8)	58,1 (6,85 - 69,3)	0,515	13,65 (-43,25 - 24,15)	
	Nativo	54,95 (23,5 - 64,5)	53,7 (37,25 - 66,85)	0,484	3,925 (-25,7 - 32,65)	
Não-viáveis	Hidrolisado	24,35 (10,8 - 69)	22,9 (4,8 - 55,8)	0,893	-6 (-46,1 - 25,1)	0,787
	Pré-biótico	14,3 (8,25 - 33,55)	13,65 (6,05 - 32,8)	0,953	-0,2 (-27,5 - 18,1)	
	Nativo	16,97 (4,6 - 41)	13,525 (4,85 - 33,3)	0,484	-2,65 (-24,1 - 7,3)	
Linfoblastos PHA Específicos	Hidrolisado	41,3 (8,01 - 96,24)	64,84 (51,62 - 94,01)	0,116	35,04 (-27,09 - 52,71)	0,097
	Pré-biótico	88,97 (45,47 - 93,88)	83,11 (19,48 - 95,25)	0,139	-4,83 (-25,98 - 5,92)	
	Nativo	89,35 (59,99 - 96,7)	90,08 (81,23 - 92,76)	0,484	1,42 (-9,52 - 21,24)	

¹: mediana (mínimo e máximo), ²: Valor de p, Teste de Wilcoxon; ³: Diferença entre os tempos (Tempo 2 – Tempo 1); ⁴: Valor de p, Teste de Kruskal Wallis. Número de casos: Hidrolisado: 6, Pré-Biótico: 9, Nativo: 8.

Tabela 16: Percentual de linfoblastos CD4⁺, CD8⁺ e TCR $\gamma\delta$ após seis dias de cultura de células monocleares de sangue periférico espontânea de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (Tempo 1) e final (Tempo 2) de ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).

Linfócitos T	Grupo	Tempo 1	Tempo 2	p ²	Diferença ³	p ⁴	
Pequenos	CD4	Hidrolisado	58,6 (49,5 - 85,1)	65,3 (20,1 - 84,6)	0,249	10,4 (-16,7 - 26,4)	0,031
		Pré-biótico	55,1 (14 - 60,9)	52,55 (18 - 86)	0,441	1,5 (-8,2 - 25,1)	
		Nativo	71 (47,6 - 80,5)	66,2 (48,2 - 79,1)	0,069	-6,4 (-18,8 - 7,7)	
	CD8	Hidrolisado	25,6 (14,2 - 36,3)	31,65 (14 - 60,3)	0,249	-8,7 (-20,7 - 14,2)	0,093
		Pré-biótico	40,1 (32,4 - 77,5)	41,8 (9,8 - 75,8)	0,859	0,1 (-22,6 - 9,5)	
		Nativo	25,2 (16,8 - 50)	28,5 (17,3 - 49,1)	0,208	4,85 (-8,3 - 15,5)	
	$\gamma\delta$	Hidrolisado	3,3 (0,1 - 12)	1,45 (0,5 - 5,4)		1,45 (0,5 - 5,4)	0,694
		Pré-biótico	0,95 (0 - 64,1)	2,4 (0 - 13,4)	0,446	1,1 (-64,1 - 12,3)	
		Nativo	0,8 (0,4 - 1,6)	3,3 (0,3 - 4,7)	0,063	1,3 (-0,5 - 4,3)	
Linfoblastos	CD4	Hidrolisado	42,1 (12 - 74,4)	25,15 (19 - 51,1)	0,249	-8,45 (-29 - 13,2)	0,095
		Pré-biótico	20,7 (7,4 - 53,2)	22,75 (6,1 - 46,9)	0,514	1,9 (-6,3 - 22)	
		Nativo	27,2 (1,1 - 61,4)	27,2 (11,9 - 43,8)	0,237	-6,2 (-17,6 - 26,1)	
	CD8	Hidrolisado	11,4 (7,8 - 27,7)	42,9 (20,3 - 60,6)	0,463	6,75 (-45,6 - 58,9)	0,545
		Pré-biótico	43,75 (8,4 - 69,1)	47,9 (31,4 - 66,6)	0,767	3,2 (-23 - 45,9)	
		Nativo	27,8 (9,2 - 38,2)	42,2 (21,7 - 59,4)	0,093	15,45 (-9,4 - 50,2)	
	$\gamma\delta$	Hidrolisado	5,9 (3,3 - 21,5)	18,8 (8,7 - 45,4)	0,116	18,05 (-4 - 40,3)	0,169
		Pré-biótico	3,45 (1,8 - 45,5)	3,45 (1,3 - 56)	0,484	-1,6 (-36,8 - 53,4)	
		Nativo	13,7 (3,4 - 39,5)	3,4 (0,5 - 45,9)	0,499	-3,45 (-37,9 - 21,4)	

¹: mediana (mínimo e máximo), ²: Valor de p, Teste de Wilcoxon; ³: Diferença entre os tempos (Tempo 2 – Tempo 1); ⁴: Valor de p, Teste de Kruskal Wallis. Número de casos: Hidrolisado: 6, Pré-Biótico: 9, Nativo: 8

Tabela 17: Percentual de linfoblastos CD4⁺, CD8⁺ e TCR $\gamma\delta$ após seis dias de cultura de células monocleares de sangue periférico estimulada por BCG de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (Tempo 1) e final (Tempo 2) de ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).

Linfócitos T	Grupo	Tempo 1	Tempo 2	p ²	Diferença ³	p ⁴	
Pequenos	CD4	Hidrolisado	49,8 (27 - 73,9)	48,6 (11,3 - 65,2)	0,753	0,3 (-57,8 - 33,3)	0,596
		Pré-biótico	42,1 (15,5 - 58)	45,9 (21,3 - 60,2)	0,779	5,8 (-47,4 - 74,9)	
		Nativo	62,2 (21 - 75,9)	22,2 (13 - 61,1)	0,063	-6,1 (-55,5 - 40,5)	
	CD8	Hidrolisado	46,8 (22,4 - 64,6)	26,65 (6,6 - 39,5)	0,075	-19,5 (-51,8 - 17,1)	0,105
		Pré-biótico	37,8 (11,7 - 76,2)	34,7 (7,6 - 71,8)	0,779	4,7 (-44,9 - 40,5)	
		Nativo	30,4 (22,1 - 54,7)	33,7 (3,5 - 64,1)	0,866	5,8 (-30,7 - 18,3)	
	$\gamma\delta$	Hidrolisado		2,15 (0,2 - 8,4)		2,15 (0,2 - 8,4)	0,796
		Pré-biótico	0,5 (0 - 60,8)	1,7 (0 - 26)	0,160	1,4 (-60,8 - 24,2)	
		Nativo	0,7 (0,5 - 2,5)	1,2 (0,3 - 17,4)	0,176	0,95 (-1,8 - 16,7)	
Linfoblastos	CD4	Hidrolisado	20,55 (4 - 59,4)	23 (5,6 - 39,5)	0,600	-0,45 (-35,7 - 23,2)	0,505
		Pré-biótico	11,9 (1,8 - 38)	9,4 (4,7 - 28,8)	0,779	-3,6 (-13,3 - 27)	
		Nativo	22,1 (4,7 - 29,5)	25,6 (3,5 - 75)	0,398	13,05 (-17,4 - 65,1)	
	CD8	Hidrolisado	19,2 (7,2 - 54,2)	7,95 (2,2 - 46)	0,463	-4,45 (-49,6 - 25,1)	0,690
		Pré-biótico	13,9 (3,9 - 48,9)	30 (5,3 - 45)	0,889	-0,9 (-14,6 - 26,1)	
		Nativo	9,1 (0 - 34)	11,3 (4,2 - 27,8)	0,499	-0,75 (-22,7 - 52,6)	
	$\gamma\delta$	Hidrolisado	37,9 (0 - 67,3)	40 (17,9 - 94,9)	0,249	15,85 (-29 - 44,9)	0,449
		Pré-biótico	35,7 (14,3 - 84,1)	53,8 (11,7 - 94,7)	0,441	3,9 (-16,1 - 39,5)	
		Nativo	42,8 (6,7 - 78,8)	73,1 (9,5 - 96,1)	0,176	24,45 (-33,3 - 66,4)	

¹: mediana (mínimo e máximo), ²: Valor de p, Teste de Wilcoxon; ³: Diferença entre os tempos (Tempo 2 – Tempo 1); ⁴: Valor de p, Teste de Kruskal Wallis. Número de casos: Hidrolisado: 6, Pré-Biótico: 9, Nativo: 8

Tabela 18: Percentual de linfoblastos CD4⁺, CD8⁺ e TCR $\gamma\delta$ após seis dias de cultura de células monocucleares de sangue periférico estimulada por fitohemaglutinina (PHA), de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (Tempo 1) e final (Tempo 2) de ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).

Linfócitos T	Grupo	Tempo 1	Tempo 2	p ²	Diferença ³	p ⁴	
Pequenos	CD4 ⁺	Hidrolisado	67,6 (19,4 - 75,8)	78,7 (13,4 - 98,5)	0,686	10,2 (-45,6 - 59,8)	0,215
		Pré-biótico	57,2 (8,1 - 88)	45,6 (19 - 75,8)	0,859	-6 (-43,6 - 48,1)	
		Nativo	56,55 (19,6 - 81,9)	76 (13,1 - 95,9)	0,025	15,9 (-6,5 - 29,5)	
	CD8 ⁺	Hidrolisado	31,4 (1,5 - 68,9)	16,5 (1,3 - 68,2)	0,043	-3,3 (-27,4 - 34,7)	0,159
		Pré-biótico	32,2 (12 - 79,7)	45,95 (18,3 - 69,4)	0,477	6,8 (-35,8 - 42,8)	
		Nativo	32,65 (0,7 - 59,1)	13,15 (1 - 53,8)	0,036	-16,65 (-23 - 10,4)	
	$\gamma\delta$	Hidrolisado	3,4 (1,1 - 4,9)	0,75 (0 - 4,3)		0,75 (0 - 4,3)	0,862
		Pré-biótico	1,6 (0 - 86,5)	2,15 (0 - 6,8)	0,611	0,4 (-86,5 - 6,4)	
		Nativo	1,8 (0 - 9,9)	3,55 (0,2 - 8,5)	0,401	0,7 (-6,5 - 6,1)	
Linfoblastos	CD4 ⁺	Hidrolisado	68,8 (37,4 - 80,6)	79 (28,5 - 90,4)	0,686	5,85 (-11,3 - 70,5)	0,273
		Pré-biótico	66,95 (21,4 - 88,3)	42,05 (26,9 - 66,9)	0,173	-5,8 (-52,5 - 17,9)	
		Nativo	62,2 (32,5 - 94,2)	72,15 (29,7 - 86,4)	0,401	4,55 (-24,6 - 43,2)	
	CD8 ⁺	Hidrolisado	33,3 (17,6 - 61,3)	15,4 (7,1 - 59,9)	0,043	-6,55 (-38,4 - 24,8)	0,319
		Pré-biótico	27,9 (7,2 - 63,2)	47,55 (27,3 - 59,7)	0,214	4,2 (-18,9 - 52,5)	
		Nativo	29,1 (3,8 - 51,3)	19,5 (6,2 - 45,6)	0,327	-6,15 (-34,8 - 14,1)	
	$\gamma\delta$	Hidrolisado	0,7 (0 - 1,7)	0,3 (0 - 2,4)	1,000	0,15 (-1,7 - 1,7)	0,973
		Pré-biótico	0,4 (0,2 - 86,1)	0,9 (0,2 - 8,3)	0,906	0,2 (-84 - 8,1)	
		Nativo	0,65 (0,2 - 1,4)	0,6 (0,1 - 8,2)	1,000	-0,15 (-0,8 - 7,5)	

¹: mediana (mínimo e máximo), ²: Valor de p, Teste de Wilcoxon; ³: Diferença entre os tempos (Tempo 2 – Tempo 1); ⁴: Valor de p, Teste de Kruskal Wallis. Número de casos: Hidrolisado: 6, Pré-Biótico: 9, Nativo: 8

Estabelecimento de um protocolo sobre técnica *in vitro* de proliferação linfocitária antígeno-específica medida por citometria de fluxo.

População e Métodos

Delineamento do Estudo

Ensaio experimental, desenvolvido entre abril de 2003 a setembro de 2004, com os objetivos de estabelecer o método de cultura de linfócitos, determinar antígenos capazes de estimular culturas de células mononucleadas de sangue periférico e de sangue total, titular as concentrações ótimas dos antígenos e do mitógeno utilizados para estimular as culturas.

População

Foram realizadas 39 culturas de células mononucleares de sangue periférico cujos doadores preencheram os seguintes critérios de inclusão: não ter feito uso de antiinflamatórios hormonais ou não hormonais no mês anterior à coleta; não fumantes e não expostos a cigarros no domicílio.

Coleta de sangue

Foram coletados 20 mL de sangue venoso periférico em seringa contendo 0,2 mL de heparina (Liquemine[®], Roche, Rio de Janeiro, RJ) por técnicas padrão.

Antígenos

- **Vacina de BCG** (Bacilo de Calmette-Guérin - Instituto Butantan, São Paulo, SP), ressuspendida em meio de cultura. Foram tituladas concentrações entre 1 a 50×10^5 UFC/ fagócito.
- **Vacina de toxóide tetânico** (Instituto Butantan, São Paulo, SP). As concentrações tituladas foram de 1:20 a 1:80.
- **Vacina de toxóide tetânico isenta de timerosal e hidróxido de alumínio** (gentilmente fornecida pelo Instituto Butantan, São Paulo, SP). Titulou-se concentrações entre 1:10 e 1:100;
- **Suspensão de EBV** (vírus Epstein Barr), gentilmente cedida pelo Laboratório de Biologia Celular, CIPED, FCM, Unicamp, Campinas, SP). Foram utilizadas concentrações entre 1,5 e 200µL de suspensão viral/mL;
- **Vacina de Varicella-Zoster** (OKAVAX, Aventis Pasteur, Lyon, França), gentilmente cedido pelo Núcleo de Vigilância Epidemiológica, HC/Unicamp, Campinas, SP. Foram utilizadas concentrações entre 100 e 400 PFU/mL;
- **Suspensão de HBV** (vírus hepatite B) (Instituto Butantan, São Paulo, SP). Titulada nas concentrações entre 5 a 40 µg/mL;
- **Antígenos de CMV** (citomegalovírus) (Microbix Biosystems, Toronto, Canadá). Os volumes titulados foram 20 e 40µL/mL.

Controles Laboratoriais

- **Controle positivo:** fitohemaglutinina (PHA) (Sigma, Sant Louis, MO, EUA), 7,5 µg/mL;
- **Controle negativo:** meio de cultura completo: solução RPMI 1640 (Sigma, Sant Louis, MO, EUA) com soro bovino fetal inativado (SBF) pelo calor a 10% (Nutricell, Campinas, SP) com acréscimo de glutamina a 1% e gentamicina a 0,1% (ambos fornecidos por Sigma, Sant Louis, MO, EUA).

Descrição das técnicas utilizadas

Com o objetivo de reduzir o volume de sangue periférico necessário para o protocolo de proliferação linfocitária, optou-se por padronizar um método de cultura com sangue total (ST), adaptado de Gaines et al. (1996), cujas vantagens, além da mencionada são, menor manipulação do material biológico, menor tempo para preparo, redução dos suprimentos necessários o que reduz os custos. Esse método foi comparado à cultura com células mononucleadas de sangue periférico (CMSP), tradicionalmente utilizada, em adaptação do método descrito por Givan et al. (1999).

As CMSP foram isoladas através da centrifugação com um gradiente de densidade, Ficoll-Hypaque 1077 (Sigma, Sant Louis, MO, EUA), por 30 minutos a 400 G, com posterior lavagem e ressuspensão em meio de cultura completo RPMI 1640 + glutamina + gentamicina +10% SBF. O sangue total foi diluído 1/10 em RPMI 1640 + glutamina + gentamicina.

O sangue total e as CMSP, na concentração de 1×10^6 células/mL, foram cultivadas em placas de poliestireno de 96 poços com fundo arredondado (Nuclon, NUNCTM, Rockilde, Dinamarca), em alíquotas de 200µL, em incubadora a 37°C, 5% de CO₂ durante 6 dias, na ausência ou presença de antígeno ou mitógeno. Após a colheita da cultura, foi realizada a marcação fenotípica dos linfócitos, conforme descrito a seguir.

A suspensão de células recuperada, aproximadamente 1mL, foi incubada com 50 µL de EDTA 20mM e, lavada com solução de lavagem (solução salina tamponada com fosfato, com 2% de SBF e 0,1% de azida sódica). Após o descarte do sobrenadante, a suspensão foi incubada com 20µL de imunoglobulina G humana (Bläusiegel, Alemanha), em seguida, incubada com anticorpo monoclonal de camundongo (anti-CD3-PECy5, anti-CD4-FITC e anti-CD8-PE ou anti-CD3-PECy5, anti-CD4-RD e anti-CD8-FITC, Opticlone, Coulter-Immunotech, Marselha, França), por 20 minutos, a 4°C, no escuro.

A suspensão de células da cultura de CMSP foi lavada e ressuspendida em 1 mL de solução de lavagem. A suspensão proveniente da cultura de ST foi lisada com solução de cloreto de amônia e após, lavada e ressuspendida em 1mL de solução de lavagem.

A leitura das amostras foi realizada com aquisição de 50.000 eventos, no intervalo entre 4 horas após a ressuspensão, em citômetro de fluxo Coulter XL-MCL. Os resultados obtidos foram armazenados em arquivos FCS II e posteriormente analisados com o auxílio do programas computacional EXPO 1.0 (Beckman-Coulter, Flórida, EUA).

Na análise das aquisições foram criadas regiões baseadas na morfologia celular (*foward scatter* para tamanho e *side scatter* para granularidade). As células foram diferenciadas em linfócitos pequenos, linfoblastos e células não-viáveis. As regiões foram inicialmente otimizadas e após, utilizadas para todas as análises. Os resultados foram expressos em percentual de células em cada região e, a divisão celular foi quantificada pelo percentual de linfoblastos.

Análise Estatística

Os dados foram analisados através do programa SPSS (v. 7.5.1, SPSS Inc., 1989 – 1996, USA). As análises descritivas das variáveis foram apresentadas como mediana (valores mínimo e máximo).

As possíveis diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

Resultados

Das culturas realizadas com a finalidade comparar as respostas linfoproliferativas das culturas de sangue total com as de CMSP, observou-se que o método de sangue total avaliado foi eficaz no estudo das respostas linfoproliferativas a mitógeno.

Foi observada, nas culturas de sangue total, maior viabilidade celular ($p = 0,018$, teste de Wilcoxon) e maior resposta à PHA ($p = 0,018$, teste de Wilcoxon). Entretanto, não foram observadas diferenças na expansão das subpopulações linfocitárias (**Tabela 5**).

Tabela: Comparação das respostas proliferativas (percentual de linfoblastos), subpopulações linfocitárias e viabilidade das culturas de Sangue Total ou de Células Mononucleadas de Sangue Periférico.

Condição Experimental	Método da Cultura		valor de P
	Sangue Total	CMSP ³	
Controle			NS ⁴
Linfócitos T	78,1 (45,5 - 81,1) ²	75,1 (37,8 - 84,5)	NS
CD4 ⁺	60,3 (38,0 - 68,5)	64,7 (48,2 - 70,0)	NS
CD8 ⁺	34,6 (27,5 - 47,8)	32,0 (25,4 - 40,1)	NS
Linfoblastos	1,7 (1,5 - 3,9)	4,3 (1,5 - 6,3)	NS
CD4 ⁺	55,8 (30,9 - 64,6)	68,8 (55,8 - 81,3)	0,018
CD8 ⁺	31,5 (2,3 - 47,4)	15,4 (4,8 - 22,5)	NS
Não viáveis	4,6 (2,6 - 8,3)	5,1 (3,5 - 27,7)	NS
PHA¹			NS
Linfócitos T	16,45 (5,4 - 19,6)	30,6 (21,2 - 62,3)	0,018
CD4 ⁺	35,4 (18,5 - 59,0)	50,5 (28,5 - 62,9)	NS
CD8 ⁺	56,5 (33,8 - 71,6)	40,3 (32,4 - 59,2)	NS
Linfoblastos	62,1 (51,7 - 69,7)	28,4 (11,5 - 51,1)	0,018
CD4 ⁺	54,6 (39,4 - 70,0)	47,5 (9,7 - 49,6)	NS
CD8 ⁺	36,8 (22,3 - 50,3)	35,4 (5,6 - 49,4)	NS
Não viáveis	5,6 (3,6 - 10,4)	14,7 (5,6 - 49,4)	NS

¹PHA (fitohemaglutinina); ²Mediana (valores mínimo e máximo); ³CMSP: cultura de células mononucleadas de sangue periférico; ⁴NS: não significativo (teste de Wilcoxon)

Nas culturas de sangue total foi observada menor proliferação inespecífica, como pode ser observado nas análises das aquisições representadas nas Figuras 1 e 2. Na Figura 1 pode ser visualizada uma amostra representativa de uma cultura de sangue total e na Figura 2 uma amostra de cultura de CMSP. Em ambas figuras são observadas aquisições de células estimuladas com PHA ou não, bem como as subpopulações de cada região analisada. A maior viabilidade celular nas culturas de sangue total também pode ser visualizada nas figuras 1 e 2.

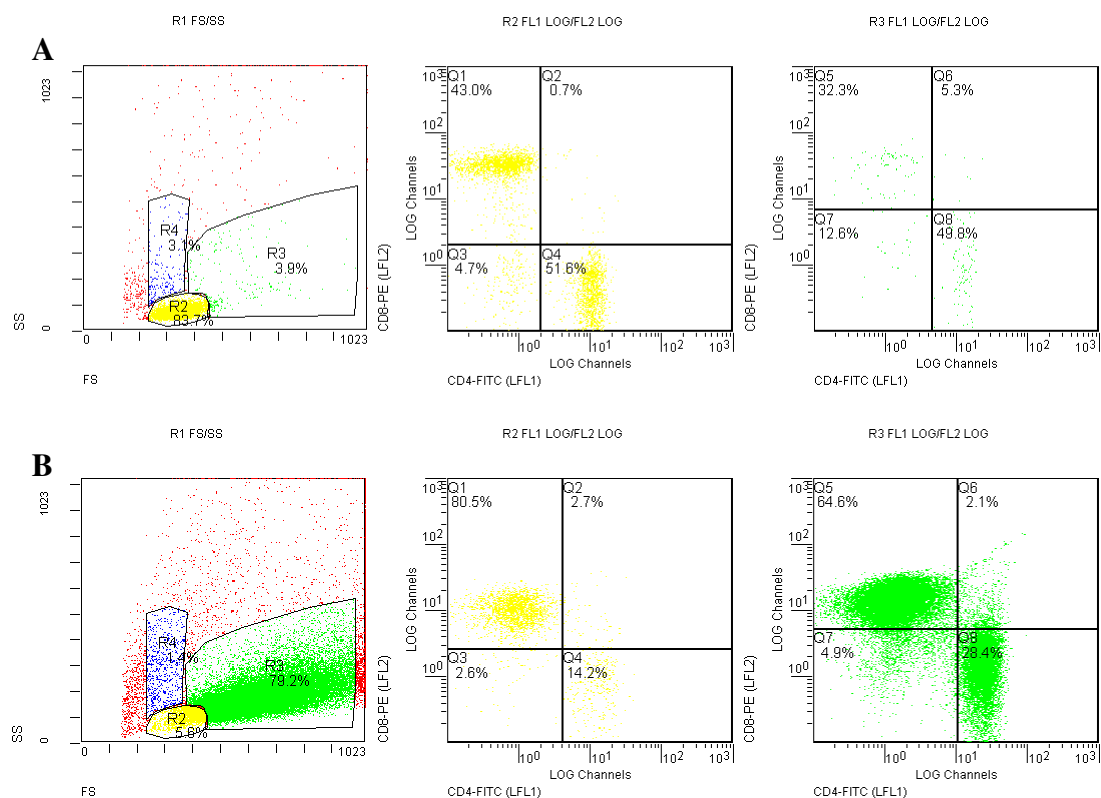


Figura 1: Amostra representativa de Cultura de Sangue Total. **A:** controle; **B:** controle positivo correspondente. **R2:** linfócitos pequenos, **R3:** linfoblastos, **R4:** células não viáveis.

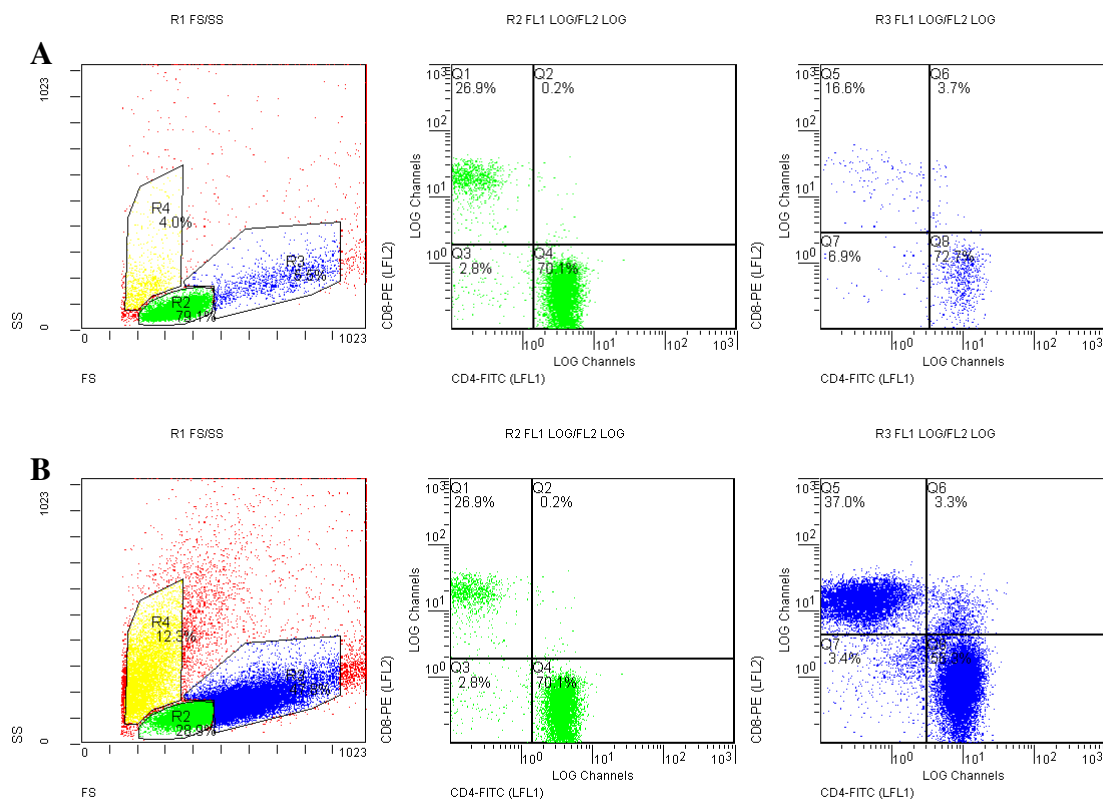


Figura 2: Amostra representativa de Cultura de Células Mononucleadas de Sangue Periférico. **A:** controle; **B:** controle positivo correspondente. **R2:** linfócitos pequenos, **R3:** linfoblastos, **R4:** células não viáveis.

Quanto aos antígenos testados, apenas a vacina de BCG, o toxóide tetânico (isento de timerosal e hidróxido de alumínio) e os antígenos de CMV estimularam a resposta linfoproliferativa. Entretanto, o percentual de proliferação observado nas culturas de sangue total não foi semelhante ao observado nas culturas de CMSP. Dentre esses antígenos a vacina de BCG foi o que apresentou resultados mais reprodutíveis.

Embora existam relatos de que a cultura com sangue total seja um método eficaz no estudo da proliferação linfocitária antígeno-específica (Gaines et al., 1996), neste trabalho, após a avaliação de 7 antígenos, em várias concentrações, não foram observados bons resultados.

Com base nesses achados, optou-se por conduzir o ensaio experimental utilizando o método de cultura com as CMSP e com a vacina de BCG, na concentração de 6,5 $\mu\text{L/mL}$, como antígeno.

Tabela 19: Concentração de TNF- α e IFN- γ em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas, estimuladas por BCG ou por fitohemaglutinina (PHA) por 48 horas, de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (Tempo 1) e final (Tempo 2) de ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).

Citocina	Estímulo	Grupo	Tempo 1	Tempo 2	p ²	Diferença ³	p ⁴
TNF- α	Controle	Hidrolisado	192,90 (30,38 - 727,19)	33,77 (ind. - 233,60)	0,116	-203,47 (-727,19 - 76,10)	0,633
		Pré-biótico	95,42 (1,11 - 763,48)	91,81 (21,39 - 277,56)	0,889	-26,65 (-761,33 - 276,0)	
		Nativo	62,82 (ind. - 2253,21)	26,26 (ind. - 346,88)	0,173	-25,88 (-2253,21 - 280,23)	
	BCG	Hidrolisado	2229,68 (958,98 - 7438,85)	2468,67 (641,30 - 5992,42)	0,753	376,58 (-5502,88 - 1814,59)	0,378
		Pré-biótico	3109,05 (819,66 - 22199,54)	5377,01 (3388,76 - 11347,18)	0,674	1202,05 (-15662,02 - 4643,45)	
		Nativo	1876,33 (199,72 - 11147,11)	2952,63 (115,98 - 10970,46)	0,612	2021,47 (-9579,04 - 9982,34)	
	PHA	Hidrolisado	713,89 (156,89 - 1951,53)	354,24 (98,30 - 2213,21)	0,345	-586,22 (-1853,22 - 1680,83)	0,892
		Pré-biótico	1423,89 (ind. - 7117,71)	589,68 (386,94 - 4553,61)	0,779	241,61 (-5482,95 - 1966,04)	
		Nativo	505,70 (133,47 - 7132,50)	903,31 (169,03 - 2631,96)	0,499	-20,40 (-6776,93 - 2201,02)	
INF- γ	Controle	Hidrolisado	ind. (ind. - 59,52)	18,37 (ind. - 51,04)	0,285	0 (-12,95 - 51,04)	0,305
		Pré-biótico	ind. (ind. - 807,80)	ind. (ind. - 39,68)	0,138	0 (-768,11 - 41,13)	
		Nativo	ind. (ind. - 57,85)	18,37 (ind. - 51,04)	1,000	0 (-57,85 - 39,63)	
	BCG	Hidrolisado	44,27 (ind. - 875,69)	44,43 (ind. - 571,74)	0,138	-65,56 (-303,94 - 54,63)	0,074
		Pré-biótico	38,29 (ind. - 975,61)	115,68 (ind. - 1099,50)	0,678	113,09 (-913,95 - 201,37)	
		Nativo	37,0 (ind. - 1772,09)	106,12 (ind. - 2625,45)	0,043	34,53 (-5,18 - 2465,46)	
	PHA	Hidrolisado	51,63 (ind. - 4979,79)	39,98 (ind. - 5100,13)	0,463	-31,02 (-4979,79 - 2838,24)	0,504
		Pré-biótico	229,16 (ind. - 3835,14)	131,92 (34,20 - 1613,19)	0,594	26,92 (-2769,94 - 983,08)	
		Nativo	123,73 (ind. - 1522,68)	43,76 (ind. - 1117,64)	0,310	17,67 (-339,72 - 3574,36)	

¹: mediana (mínimo e máximo), ²: Valor de p, Teste de Wilcoxon; ³: Diferença entre os tempos (Tempo 2 – Tempo 1); ⁴: Valor de p, Teste de Kruskal Wallis.
ind.: indetectável . Número de casos: Hidrolisado: 6, Pré-Biótico: 9, Nativo: 8

Tabela 20: Concentração de IL-10 e IL-4 em sobrenadantes de cultura de células monocucleares de sangue periférico não estimuladas, estimuladas por BCG ou por fitohemaglutinina (PHA) por 48 horas, de crianças infectadas pelo HIV-1 no início (Tempo 1) e final (Tempo 2) de ensaio de suplementação alimentar com suplemento contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas (Hidrolisado), nativas (Nativo) ou enriquecidas com pré-biótico (Pré-biótico).

Citocina(pg/mL)	Estímulo	Grupo	Tempo 1	Tempo 2	p ²	Diferença ³	p ⁴
IL-10	Controle	Hidrolisado	58,64 (ind. - 520,11)	ind. (ind. - 68,35)	0,080	-58,64 (-106,0 - 33,74)	0,632
		Pré-biótico	40,64 (ind. - 1911,66)	77,35 (ind. - 994,37)	0,735	-11,67 (-917,29 - 217,81)	
		Nativo	51,10 (ind. - 664,85)	ind. (ind. - 151,51)	0,753	-23,23 (-88,53 - 151,51)	
	BCG	Hidrolisado	622,50 (198,09 - 3480,35)	698,95 (466,11 - 1023,23)	0,249	-556,33 (-2457,12 - 641,28)	0,620
		Pré-biótico	1036,67 (81,28 - 2104,26)	966,81 (ind. - 2055,30)	0,123	289,71 (-422,36 - 618,59)	
		Nativo	608,28 (65,39 - 2290,70)	992,73 (157,66 - 2607,32)	0,889	230,58 (-1621,33 - 2028,95)	
	PHA	Hidrolisado	225,23 (22,38 - 800,93)	181,81 (53,63 - 556,34)	0,753	-167,60 (-411,80 - 508,99)	0,417
		Pré-biótico	363,86 (ind. - 1131,11)	734,73 (ind. - 2102,32)	0,123	162,11 (-367,14 - 1011,69)	
		Nativo	190,84 (ind. - 1110,06)	720,30 (97,47 - 1870,81)	0,484	157,51 (-838,62 - 1870,81)	
IL-4	Controle	Hidrolisado	149,61 (ind. - 168,16)	77,09 (ind. - 202,54)	0,893	-2,16 (-168,16 - 172,35)	0,223
		Pré-biótico	88,82 (ind. - 229,48)	162,29 (ind. - 215,32)	0,398	0 (-144,53 - 168,85)	
		Nativo	ind. (ind. - 245,86)	163,89 (ind. - 231,74)	0,043	104,29 (0 - 231,74)	
	BCG	Hidrolisado	23,70 (ind. - 165,41)	83,66 (ind. - 198,8)	0,893	21,16 (-165,41 - 177,33)	0,086
		Pré-biótico	165,75 (ind. - 226,78)	143,93 (ind. - 208,87)	0,735	0 (-186,10 - 151,47)	
		Nativo	ind. (ind. - 185,46)	161,18 (ind. - 226,33)	0,043	152,81 (0 - 226,33)	
	PHA	Hidrolisado	91,59 (ind. - 152,90)	102,79 (ind. - 147,42)	0,463	40,73 (-148,92 - 129,16)	0,442
		Pré-biótico	153,50 (ind. - 231,74)	149,94 (55,16 - 208,44)	0,139	51,10 (-119,33 - 164,41)	
		Nativo	78,40 (ind. - 437,05)	139,09 (ind. - 159,40)	0,674	-10,97 (-390,31 - 159,40)	

¹: mediana (mínimo e máximo), ²: Valor de p, Teste de Wilcoxon; ³: Diferença entre os tempos (Tempo 2 – Tempo 1); ⁴: Valor de p, Teste de Kruskal Wallis. **ind.**: indetectável . Número de casos: Hidrolisado: 6, Pré-Biótico: 9, Nativo: 8