

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
PEDIATRIA

USO DE PROBIÓTICOS EM CRIANÇAS HIV
POSITIVAS: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO
DUPLO CEGO (CONTROLADO)

LÍVIA TROIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil, 2005.
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
PEDIATRIA

USO DE PROBIÓTICOS EM CRIANÇAS HIV
POSITIVAS: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO
DUPLO CEGO (CONTROLADO)

Lívia Trois

Orientador: Dr. Ernani Miura

“A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre”

Porto Alegre, Brasil, 2005.

T845e Trois, Livia

Uso de probióticos em crianças HIV positivo: Um ensaio clínico randomizado duplo cego e controlado / Livia Trois; orient. Ernani Miura. – 2005.

100 f.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Probióticos 2. Soropositividade para HIV 3. Criança 4. HIV 5. Trato gastrointestinal: fisiologia 6. Relação dose-resposta imunológica I. Miura, Ernani II. Título.

NLM: WC 503.2

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Ao meu orientador, prof. Ernani Miura, por acreditar em meu projeto, pelo voto de confiança, e pela orientação na realização deste trabalho.

Ao querido prof. Edmundo Cardoso pelo grande apoio e incentivo, dando-me força e estímulo para seguir adiante, pela rica convivência e inúmeros ensinamentos, e por ser um exemplo de garra e persistência. Nem tenho palavras para expressar tal agradecimento.

Ao querido e insubstituível Eduardo por seu imenso apoio, paciência e compreensão. E, principalmente, pelo auxílio e pelas incansáveis revisões fundamentais para a finalização deste trabalho.

Aos meus pais pelo apoio, paciência e compreensão nos momentos difíceis, sem os quais não haveria realizado este passo tão importante de minha vida.

Ao PPG Pediatria pela oportunidade ímpar e pelo espaço e conhecimento oferecidos, bem como aos seus grandes professores.

À querida Rosane, secretária extremamente eficiente deste PPG, que foi um guia desde o começo de minha caminhada, facilitando, muitas vezes, meu trajeto, sempre dedicada e atenciosa.

A CAPES pelo apoio financeiro, fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Hospital da Criança Conceição, em especial ao SAE-GAAP, pela relevante colaboração, cedendo o espaço e a estrutura para realização da pesquisa de campo.

Às crianças e seus pais que participaram com grande interesse nesta pesquisa.

Ao serviço de microbiologia do HCPA, em especial ao Valério, pelo apoio e dedicação nas análises de fezes.

Ao GPPG do HCPA pela orientação das etapas deste projeto e FIPE pelo financiamento das análises de fezes da pesquisa e da correção do artigo científico. Também do GPPG, agradeço a Vânia pelas análises estatísticas e por toda sua atenção especial e paciência.

A Nestlé Nutrição Infantil e seus colaboradores, pela ética, apoio e incentivo à pesquisa, fornecendo materiais científicos e os produtos utilizados, em especial a Rosana, por sua disponibilidade e entusiasmo para com esta pesquisa.

SUMÁRIO

1. Introdução	01
2. Revisão da Literatura	06
2.1 A Microflora Intestinal	06
2.1.1 Microflora Intestinal e a defesa imunológica	07
2.1.2 A Microflora na criança HIV+	08
2.1.3 Presença de Cândida na população HIV+	10
2.2 Probióticos	
2.2.1 Definição de Probióticos	12
2.2.2 Características dos Probióticos	12
2.2.3 Mecanismos de ação dos Probióticos	14
2.2.4 Aplicação Clínica dos Probióticos	15
2.2.5 Efeito Imunomodulatório dos Probióticos	17
2.2.6 Terapia Probiótica	21
2.2.7 Determinação da Colonização Intestinal dos Probióticos	24
2.2.8 Segurança	24
3. Objetivos	
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos Específicos	26
4. Metodologia	
4.1 Delineamento	27
4.2 Considerações Éticas	27
4.3 Amostra	27
4.4 População	27
4.5 Critérios de Inclusão	28
4.6 Critérios de Exclusão	28
4.7 Produtos: Probiótico e Controle	29
4.8 Aplicação do Produto	29
4.9 Variáveis Nutricionais	30
4.10 Variáveis Imunológicas	31
4.11 Episódios de Diarréia	31

4.12 Análise de Fezes	32
4.13 Análise Estatística	32
5. Artigo Científico (português)	34
Referência Bibliográfica	55
Anexos	66
Tabelas	67
Formulários de Pesquisa	68
Resolução dos Comitês de Ética	72
Consentimento Livre e Esclarecido	74
Apresentação em congressos	76
Banco de dados da pesquisa	77
Artigo Científico (inglês - JPGN)	81
Artigo de Revisão	90

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)

B. = Bifidobacterium

CDC = Centers for Disease Control and Prevention

cels/mm³ = células por milímetro cúbico

DDI = didanosina

DPE = desnutrição protéico-energética

ufc = unidades formadoras de colônias (cfu = colony forming units)

FIPE = Fomento e Incentivo a Pesquisa

GAAP = Grupo de Atenção à Aids Pediátrica

GEP = Grupo de Ética em Pesquisa

GPPG = Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

HCC = Hospital da Criança Conceição

HCPA = Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HIV = Vírus da Imunodeficiência Humana

HIV+ = Vírus da Imunodeficiência Humana positiva

HIV-1 = vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1

IL – interleucina

IFN = interferon

kcal/kgP/d = calorias por quilograma de peso por dia.

L. = *Lactobacillus*

MALT = Tecido Linfóide Associado à Mucosa

NCHS = National Center for Health Statistics

RDA = Recomendação diária adequada

S. = *Streptococcus*

USP = Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1	53
Número de evacuações líquidas uma semana antes do estudo e quatro semanas durante o uso de probióticos (grupo 2) e controle (grupo 1).	
Figura 2	53
Número de evacuações normais uma semana antes do estudo e quatro semanas durante o uso de probióticos (grupo 2) e controle (grupo 1).	

LISTA DE TABELAS

	página	
Tabela I - Escore de classificação da quantificação de Cândida	31	
Tabela 1. Tabela do artigo científico	51	
Característica do Pacientes (n= 77) do estudo		
Tabela 2. Tabela do artigo científico	52	
Resposta Imunológica dos pacientes (n = 77) do estudo (início e fim)		
Tabela 3. Tabela do Banco de Dados da pesquisa		
Dados socioeconômicos dos pacientes		77
Dados Imunológicos e Tratamento		79

RESUMO

Introdução: AIDS é uma infecção caracterizada pela disfunção das células imunes - imunodeficiência, e freqüente disfunção intestinal. Probióticos, suplemento alimentar microbiano vivo, que afeta benéficamente o animal hospedeiro através do balanço da microflora intestinal e promoção de efeitos benéficos à saúde. **Objetivos:** determinar a resposta imunológica (CD4 cels/mm³) e diminuir os episódios de fezes líquidas. **Metodologias:** estudo randomizado duplo-cego controlado, com crianças infectadas pelo vírus HIV (2 - 12 anos), divididas em dois grupos – um recebendo probióticos (fórmula contendo *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus thermophilus* – $2,5 \times 10^{10}$ ufc) e, o outro, fórmula padrão (grupo controle). Os valores de CD4 foram coletados no início e término do estudo. A consistência e o número de episódios de fezes foram acessados através de um questionário, e duas amostras de fezes foram coletadas para cultura de Cândida. **Resultados:** observamos aumento da media de células totais de CD4 no grupo (791 cels/mm³), e um pequeno declínio no grupo controle (538 cels/mm³); a diferença das médias foi de 118 cels/mm³ vs. -42 cels/mm³ (p 0.049), analisado estatisticamente pelo delta de logaritmo base 10 do CD4 log₁₀. Observamos uma redução na freqüência de fezes líquidas semelhante nos dois grupos (p 0,06), porém com leve melhora no grupo probiótico, porém sem diferença estatística (p 0,522). Também houve uma leve diminuição da freqüência de fezes pastosa (p 0,955), bem como um aumento na freqüência de fezes normais nos dois grupos (p 0.01). **Conclusão:** Nosso estudo mostrou as propriedades imunomodulatórias dos probióticos, e que estes podem ser úteis para auxiliar no tratamento de crianças infectadas pelo HIV.

SUMMARY

Introduction: HIV is an infection characterized by immune cell dysfunction and subsequent immunodeficiency, and intestinal dysfunction is frequent.

Probiotics, a live microbial feed supplement, which beneficially affect the host animal by improving intestinal microbial balance, and promote health benefits.

Objective: The goals of this study were to determine the immune response by CD4 cells/mm³ counts and reduce the liquid stools. **Methods:** randomized

double-blind controlled trial with HIV-infected children (2 - 12 years), in two groups – one receiving probiotics (formula containing *Bifidobacterium bifidum*

with *Streptococcus thermophilus* – 2,5x10¹⁰ cfu) and the other a standard formula (controlled group). CD4 were collected in the beginning and until after

the ending of the study. The quality and number of stools were assessed by a questionnaire, and two stool samples were cultures for Candida colonization.

Results: increase in the mean CD4 count on the probiotic group (791 cells/mm³), and a small decreased in controlled group (538 cells/mm³); the

difference of this increased between children receiving probiotic and control group was 118 cells/mm³ vs. -42 cells/mm³ (p 0.049), represented by delta

CD4 log₁₀ for statistical analyses. We observed a similarly reduction in liquid stools consistency in both groups (p 0.06), with a little enhance in the probiotic-

group, but without significant difference (p 0.522). The frequency of loose soft had a little decreased in both groups (p 0.955), and an increased of the

frequency of normal stool's consistencies, in both groups (p 0.01).

Conclusion: Our study showed the probiotics immunoestimulatory properties, and it might be helpful in the treatment of HIV-infected children.

1. Introdução

A progressiva disseminação da Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (*SIDA/AIDS*) é atualmente um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo. Segundo relatório da ONU, divulgado em novembro de 2004, dos 1,7 milhões de portadores do HIV na América Latina, 600.000 vivem no Brasil. O Boletim Epidemiológico do Programa Nacional de DST/AIDS, Ministério da Saúde, revela a presença de cerca de 257.780 casos de AIDS, desde o início da epidemia (1980). Deste total, 7.488 casos são de menores de 13 anos, por exposição perinatal, sendo a região sul responsável pela maior contribuição.

As manifestações clínicas da doença se caracterizam pela presença de infecções oportunistas, causadas por agentes etiológicos comumente encontrados na infância, decorrente da disfunção das células imunes e diretamente relacionada à baixa contagem de CD4 (Yolken et al, 1991). Os agentes mais comuns encontrados afetando o trato gastrointestinal são: *Campylobacter* sp., *Shigella* sp., *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Citomegalovirus*, *Isospora belli*. Muitos destes microorganismos podem ser encontrados na terra, água, comida, plantas e animais domésticos, e o trato gastrointestinal é a principal porta de entrada para estes microorganismos colonizarem facilmente todo o organismo (Succi, 1998; Abrams, 2000; Dankner et al, 2001).

A desnutrição protéico-energética (DPE), comum nestes pacientes, acarreta a falência de crescimento que varia de 20 a 80%, e é um indicador sensível para a avaliação da progressão da doença. Como causa multifatorial da DPE encontramos distúrbios do trato gastrointestinal, alterações no metabolismo intermediário, má absorção de nutrientes, aumento da permeabilidade intestinal e infecções crônicas ou recorrentes (Miller et al, 2001; Miller, 2002; Benjamin et al, 2003). As disfunções

gastrointestinais podem predispor as crianças ao desbalanço hidroeletrólítico e desnutrição, que irá exacerbar as células T de defesa associado à replicação viral (Guarino et al, 2000; Ansari et al, 2003).

O corpo humano hospeda mais de 500 espécies de microorganismos, resultando em comensalismo (sem efeito nocivo) ou mutualismo (beneficia o hospedeiro). Cada espécie beneficia o hospedeiro de maneiras diferentes, fornecendo nutrientes essenciais, digerindo carboidratos não-digeríveis, fornecendo energia, entre outros (Schaible e Kaufmann, 2005). A colonização do epitélio intestinal por microorganismos se dá no momento do nascimento, inicialmente por espécies anaeróbicas facultativas e, após, a colonização dependerá do tipo de dieta utilizada. As Bifidobactérias são predominantes no recém-nascido e mantêm-se assim durante o aleitamento materno, não ocorrendo o mesmo em crianças alimentadas com fórmulas, as quais apresentam maior colonização de bacteróides e *clostridia streptococci*. Após dois anos de idade, a microflora se estabelecerá, assemelhando-se a do adulto (Salminen e Salminen, 1997; Fuller e Gibson, 1997; Saavedra, 2001; Sampaio, 2001; Martin et al, 2003).

A microflora intestinal é a primeira linha de defesa do organismo e compete por espaço, nutrientes e receptores celulares, bloqueando a colonização de patógenos e estimulando a resposta imunológica local. O organismo tem mecanismos próprios para o controle e regulação do número de bactérias, para manter seu equilíbrio. No entanto, muitos destes fatores estão alterados devido a doenças oportunistas, medicações (principalmente antibióticos – que desestabilizam a flora e alteram a integridade da superfície do epitélio), trânsito intestinal acelerado, estresse e má alimentação. Condições que impossibilitam a manutenção da flora intestinal, ocasionando uma maior suscetibilidade à colonização de bactérias patogênicas, vírus, prejuízo na absorção e

metabolismo de nutrientes e medicamentos (Trabulsi et al, 2000; Levy, 2000; Bengamark, 2000).

É freqüente em pacientes infectados pelo HIV a disfunção intestinal, que inclui má absorção de carboidratos, esteatorréia, e aumento da permeabilidade intestinal, podendo ou não ser causada por patógenos entéricos (Miller et al, 1991). O desenvolvimento de bactérias a nível intestinal, as infecções gastrointestinais e a má absorção de carboidratos podem ser fatores relevantes no estado nutricional destas crianças (Miller, 2002). A disfunção gastrointestinal envolve uma série de anormalidades digestivas e absorptivas, que contribuem para a perda de peso, pois a diarréia nem sempre é associada a patógenos, resultado da anormalidade imunológica (Johnson et al, 2000). Outro agravante é a privação ao aleitamento materno, devido ao risco elevado de transmissão através do leite humano em qualquer fase da infecção, não oportunizando a estas crianças a formação da flora intestinal adequada, além da carga diária elevada de medicamentos (Succi, 1998).

Mesmo em ótimas condições, bactérias, vírus e fungos, presentes no meio ambiente, penetram pela barreira intestinal e invadem o organismo e a mínima modificação no equilíbrio populacional do ecossistema microbiano interfere em todas as suas funções (Penna et al, 2000; Abrams, 2000; Markowitz e Bengmark, 2002). A difícil manutenção da flora intestinal sugere a suplementação de probióticos para promover o balanceamento da flora intestinal, o aumento da tolerância e da digestão da lactose, a modulação do sistema imunológico, e o auxílio no tratamento da diarréia (Neumann et al, 1998; Silva e Stamford, 2000). Frequentes episódios de diarréia ou disfunção intestinal podem afetar a absorção e metabolismo dos medicamentos administrados diariamente pelas crianças HIV-positivas (HIV+). A deficiência imunológica, causada pelo vírus, pode ter papel importante na disfunção intestinal, e a

exata maneira que o probiótico atua no seu hospedeiro ainda é desconhecida (Ball/1998; Jirapynio et al, 2002).

O probiótico é definido como um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro (Fuller, 1991). O principal efeito benéfico à saúde do hospedeiro atribuído aos probióticos é o aumento da defesa imunológica da mucosa e atuação contra a colonização e translocação de microorganismos patogênicos (Fuller e Gibson, 1997; Vanderhoof, 2001; Kalliomäki et al, 2003). Devido a esta função da flora microbiana intestinal, sugere-se o uso freqüente de probióticos, principalmente em crianças com quadro de diarréia crônica de diversas etiologias e para a manutenção da adequada composição da flora intestinal (Penna et al, 2000; Sampaio, 2001; Marteau et al, 2001; Young e Huffman, 2003).

Isto posto, o objetivo deste estudo é analisar o efeito da suplementação das espécies probióticas *Bifidobacterium bifidum* com *Streptococcus thermophilus* em crianças HIV+, durante dois meses. Nossa hipótese é de que os probióticos possam aumentar as defesas imunológicas, e diminuir os episódios de diarréia de crianças infectadas pelo HIV. Portanto, iremos acompanhar a resposta imunológica desta população através das células totais de CD4+ e observar a freqüência dos episódios de fezes líquidas, já que uma redução de 15% nas células de CD4 é uma evidência de morbidade e mortalidade (Butensky, 2001; Lindsey et al, 2000).

O presente estudo mostra-se relevante, pois não há na literatura estudos realizados para comprovar a modulação imunológica dos probióticos nestes pacientes. Há uma indicação do uso da terapia com probióticos para amenizar os efeitos do tratamento dos antiretrovirais e demais intercorrências ocasionadas por vírus/bactérias oportunistas, pois, na grande maioria dos casos, melhoram a flora intestinal e reprimem

o crescimento e a colonização de bactérias patogênicas (Vanderhoof, 1998; Marteau et al, 2001; Sampaio, 2001).

2. Revisão da literatura

2.1 A microflora intestinal

O intestino é um complexo e extenso ecossistema formado por três componentes que interagem entre si: células do hospedeiro, microflora e nutrientes. A microflora é uma biomassa viva, de 100.000 bilhões de bactérias e mais de 400 espécies diferentes, que desempenha importante papel na fisiologia, nutrição e sistema imunológico do hospedeiro, atuando principalmente no cólon. Tão importante que, conforme Saavedra (2001), “esta relação simbiótica não é apenas inevitável, mas sim necessária”.

Ao nascimento, o homem adquire seus primeiros microrganismos, através de sua mãe e do meio ambiente, que compõem a microflora intestinal. Esta, somente assemelhar-se-á a do adulto após os dois anos de idade. Inicialmente há um domínio das bactérias anaeróbicas facultativas; após, haverá diferentes composições das espécies que se desenvolvem no intestino, de acordo com o tipo de alimentação (Salminen et al, 1998). O leite humano parece modular a composição da flora intestinal do bebê. Assim, as crianças amamentadas ao peito apresentam uma microflora intestinal enriquecida em relação às alimentadas com leite de vaca ou substitutos, principalmente em *Bifidobactérias* e *Lactobacilos*, constituindo uma flora mais adequada à saúde, protegendo-as de doenças infecciosas (Fuller e Gibson, 1997; Saavedra, 2001; Sampaio, 2001; Martin et al, 2003).

Ao longo do trato gastrointestinal, a composição e volume de bactérias presentes variam consideravelmente de acordo com a idade e hábitos do indivíduo, desde 10^4 unidades formadoras de colônia por mililitro (ufc/ml) no intestino delgado a 10^7 ufc/ml na região ileocecal, e 10^{12} ufc/ml intestino grosso. Além das bactérias residentes no

intestino, podemos encontrar no bolo fecal uma porção grande de bactérias transitivas, que não se alojam (Vanderhoof et al, 1999; Isolauri et al, 2001). Fatores endógenos e exógenos, como o uso de antibioticoterapia, as mudanças alimentares e o estresse, podem desequilibrar a composição da microflora gastrointestinal (Abrams, 2000; Markowitz, 2002).

2.1.1 Microflora Intestinal e a defesa imunológica

A microflora interage diretamente com o sistema imunológico da mucosa intestinal, e o balanço destes microorganismos é crucial para uma função gastrointestinal normal, sendo constituinte fundamental da barreira intestinal de defesa. Esta defesa constitui-se de microflora, barreira da mucosa e sistema imune local (GALT – gut-associated lymphoid tissue, ou, em português, MALT – tecido linfóide associado à mucosa). A mucosa compreende agregados linfóides organizados – placas de Peyer – e folículos isolados que se estendem através da mucosa e submucosa do intestino delgado, formando o MALT, o qual permite a comunicação dos linfócitos T e B com as células de outros tecidos, e produção de IgA (Bourlioux et al, 2003).

O primeiro contato que as bactérias (incluindo probióticos) têm ao penetrar no organismo é a mucosa intestinal, que está constantemente exposta a antígenos do meio ambiente, e que requer uma efetiva resposta a esta “invasão patogênica”. Uma boa composição e manutenção da flora intestinal pode exercer considerável influência no número e na distribuição das células do MALT, sendo um papel importante na regulação da resposta imune (Duggan et al, 2002).

Uma resposta imune iniciada no MALT pode induzir à resposta imune de outras superfícies de mucosa, sendo que 60% do total de imunoglobulinas produzidas

diariamente são secretadas no trato gastrointestinal. O tecido linfóide difuso é composto de imunoglobulinas A, linfócitos T (CD4 e CD8) e B. As placas de Peyer, altamente permeáveis, fagocitam antígenos e microorganismos e apresentam as células imunológicas competentes que, situadas logo abaixo da lâmina própria, induzem à produção de IgA. Esta última tem importante papel na mediação da exclusão de antígenos externos, evitando a aderência ao epitélio de microorganismos patógenos, neutralizando toxinas e replicação viral. E, logo após, observa-se o envolvimento de células T maduras (CD4) (Salminen et al, 1998).

2.1.2 A Microflora na criança HIV+

As crianças infectadas pelo vírus da imunodeficiência adquirida são automaticamente privadas do aleitamento materno, tendo assim uma composição desfavorável da microflora intestinal em relação às crianças amamentadas ao peito. Devido ao intestino ser a grande porta de entrada para microorganismos patogênicos, é extremamente importante termos conhecimento da composição da flora intestinal. Os organismos mais comumente encontrados nesta população são: *rotavírus*, *Escherichia coli*, *Cryptosporidium parvum*, *Shigella*, *Salmonella* e *Campylobacter species*. Crianças HIV+ estão mais suscetíveis a infecções, sendo, portanto, necessário que elas possuam uma defesa acentuada no intestino para tentar bloquear esta colonização (Johnson et al, 2000).

Fatores clínicos e sociais podem afetar a qualidade de vida de crianças infectadas pelo HIV, como o uso freqüente de medicações para o controle da doença, com elevado potencial de toxicidade e efeitos colaterais (Miller et al, 2001). Acrescentando-se, ainda, os hábitos alimentares precários e a falha de crescimento e

desenvolvimento, sendo esta última comum e podendo atingir quase que 100% destas crianças no curso da doença (Saavedra et al, 2000; Miller et al, 1991). Sabe-se que a desnutrição contribui diretamente na diminuição das células CD4. Por isto, para reverter a disfunção imunológica, é necessário a restauração da mucosa intestinal e das funções absorptivas em estágio inicial da doença, mesmo em situações onde a ingestão calórica é adequada para idade, o que geralmente ocorre (Missmer et al, 2000; Guarino et al, 2000).

Morbidade, relacionada a SIDA, é caracterizada pelas infecções oportunistas, falha de crescimento, declínio de 15% da contagem total de linfócitos CD4 e um aumento da carga viral maior do que 10^5 ou 10^6 cópias por mililitro (Butensky et al, 2001). A distribuição de CD4 através do logaritmo base 10 tem maior associação de risco de falha de crescimento do que seu percentual, e o risco de morte dobra a cada aumento de $1 \log_{10}$ na carga viral do HIV-1 (Lindsey et al, 2000). A desregulação imunológica provavelmente representa papel importante na disfunção intestinal e na colonização de patógenos. Entretanto, não se sabe exatamente como estes mecanismos funcionam, somente reconhece-se que a frequência e severidade da disfunção intestinal estão correlacionadas com o estado imunológico, sendo que estes episódios de diarreia e disfunção intestinal podem vir a afetar a absorção e o metabolismo das medicações anti-retrovirais. (Ball, 1998; Jirapinyo et al, 2002).

A microflora intestinal é o primeiro e o maior estímulo de desenvolvimento do MALT, e os probióticos vêm demonstrando reverter o aumento da permeabilidade intestinal e estimular a produção de IgA (Kalliomäki et al, 2003). Função esta importante para crianças infectadas pelo HIV, pois sabe-se que um sistema imune alterado pode modular a microbiota indígena destes pacientes (Wolf et al, 1998; Guarino et al, 2000). Esta população apresenta 7,3 vezes mais risco de má absorção da

lactose do que crianças soronegativas com sintomas gastrointestinais, independente da presença de diarreia (Miller et al, 1991).

A falha de crescimento, observada em crianças HIV+, provavelmente se dá pelo dano do epitélio da mucosa intestinal, devido a repetidas infecções intestinais, baixa mediação imunológica, má absorção de nutrientes e diminuição do apetite. Assim, estima-se que a promoção da regeneração do epitélio intestinal, através do uso de alimentos ricos em probióticos (10^8 organismos/g), possa trazer benefícios a esta população (Cunningham-Rundles et al, 2000). Saran e colaboradores (2002) observaram, em seis meses, aumento de peso em crianças indianas, de 2 a 5 anos, de baixa renda e vivendo em precárias condições de higiene, as quais apresentavam retardo do crescimento, e muitas vezes diarreia crônica, com o uso de probiótico.

Estudos foram feitos com crianças HIV+, observando a atuação do probiótico sobre o ganho de peso, porém não observaram associação com células CD4 (Lindsey et al, 2000; Cunningham-Rundles et al, 2002). Um estudo em adultos infectados pelo HIV avaliou o efeito da suplementação da espécie probiótica *Lactobacillus rhamnosus GG* na diarreia não infecciosa e sintomas gastrointestinais, e na resposta de células CD4, havendo melhora na diarreia, porém não obtiveram resposta estatisticamente significativa nas células linfocitárias. Estes resultados negativos se deram, provavelmente, pelo curto tempo de terapia probiótica – apenas 2 semanas, e pela população do estudo ser muito pequena – $n = 17$ (Salminen et al, 2004).

2.1.3 Presença de Cândida na população HIV+

A Cândida é a quarta causa de infecção de corrente sanguínea nos hospitais da América Central e do Sul. Entre os pacientes infectados pelo HIV há uma alta

prevalência de colonização de *Cândida* no trato gastrointestinal, que varia de 15 a 40%, já na população saudável não passa de 8 %. A *Cândida*, em concentração elevada no trato gastrointestinal, pode vir a ser patogênica quando se trata de pacientes imunocomprometidos e com alta resistência a antifúngicos, e, agravado, quando ocorre qualquer desequilíbrio na microbiota ou lesão da mucosa. Este fungo, comum entre a população em geral, pode apresentar efeitos nocivos ao homem, podendo destruir as células da borda escova e produzir toxinas agressoras da mucosa (Abrams, 2000; Sullivan e Coleman, 1998; Colombo e Guimarães, 2003). Miller e colaboradores (1997) encontraram, através de endoscopia, 65% de prevalência de *cândida* nesta população, sendo que 30% não apresentavam nenhuma alteração da cavidade oral ou anormalidade histológica e os testes de fezes eram negativos para *cândida*.

Estudos demonstram que os probióticos podem reduzir a colonização de *Cândida albicans* através da estimulação imunológica, mesmo em ratos imunocomprometidos, reduzindo assim sua translocação (Penna et al, 2000). Este papel é muito importante nesta população, pois é grande a possibilidade de translocação deste patógeno através do trato gastrointestinal (Colombo e Guimarães, 2003).

2.2 Probióticos

2.2.1 Definição de probióticos

A definição de probiótico, feita por Fuller (1991): “suplemento alimentar microbiano vivo que, quando ingerido, apresenta efeitos benéficos para o hospedeiro, promovendo o equilíbrio microbiano intestinal” foi, por muito tempo, utilizada em unanimidade pela maioria dos pesquisadores. Entretanto, recentemente, esta definição foi revisada e atualizada de acordo com o avanço do conhecimento dos benefícios destas bactérias, por Schrezenmeir e Vrese (2001): “produto ou preparação contendo viáveis microorganismos em número suficiente, que altera a microflora (por implantação ou colonização) de um compartimento do hospedeiro e exerce efeito benéfico para a sua saúde”.

Os microorganismos considerados probióticos pertencem basicamente ao grupo das bactérias ácido lácticas (*Lactobacilos*, *bifidobactérias* e *estreptococcus* - em menor funcionalidade) e leveduras, pois fermentam o açúcar, produzindo ácido láctico como principal produto do metabolismo. As cepas mais frequentemente estudadas são: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*; e, *bifidobactérias bifidum* e *bifidobactérias longum* (Isolauri et al, 2001; Trabulsi et al, 2000).

2.2.2 Características dos probióticos

Para que um microorganismo possa ser usado como probiótico, ele deve ser capaz de atuar benéficamente no hospedeiro, resistindo ao trato digestivo (aos ácidos clorídrico e biliar) e colonizando o intestino. Deve, também, ser habitante normal da microflora intestinal, com determinadas exceções, como, por exemplo, o *Lactobacillus*

bulgaricus e o *Streptococcus thermophilus*, pois estas bactérias não colonizam o trato gastrointestinal, apenas produzem efeito benéfico sobre o balanço da microflora durante o trânsito. Além destas características, exige-se ainda: disponibilidade em alimentos ou cápsulas, não ser enteropatogênica ou enteropatotóxica e, também, manter suas características de crescimento e sobrevivência durante a manipulação, estoque e consumo do produto (Neumann et al, 1998; Ishibashi e Yamazaki, 2001; Tuomola et al, 2001; Holzapfel et al, 2001).

Para receber a nomenclatura de “alimento probiótico” os leites fermentados e iogurtes devem conter no mínimo 10^7 viáveis bifidobactérias/g ou ml do produto. (Stanton et al, 2001). Mesmo em doses baixas, como aqueles oferecidos sob a forma de alimento, apresentam adequada colonização, provando eficácia na sua administração. Entretanto nem toda cepa dita como probiótico é capaz de colonizar o trato gastrointestinal quando a via de administração é o alimento; enquanto isto, outras cepas desempenham muito bem seu papel por esta via. (Vanderhoof, 2001).

A fermentação láctica exercida pelo probiótico promove incremento de cinquenta por cento nos teores de vitaminas B₆ e B₁₂, e mais de cem por cento de vitamina C, ácido fólico e de colina. Este procedimento apresenta também uma melhora na digestibilidade de proteínas e gorduras, produção de nutrientes essenciais, como ácidos graxos de cadeia curta e aminoácidos (arginina, cisteína e glutamina), bem como uma melhora na utilização de alguns cátions no metabolismo humano, além de sintetizar vitamina K e auxiliar no metabolismo de xenobióticos (Salminen e Salminen, 1997; Bengamark, 2000; Penna et al, 2000).

Os probióticos são comercializados de diferentes formas, sendo que a mais popular e acessível, no Brasil, é o leite fermentado (iogurte). Estudos estão sendo feitos para tornar viável a aplicação de probióticos em queijos e sorvetes sem mudar suas

características organolépticas (Stanton et al, 2001). Masco e colaboradores (2005) recentemente avaliaram a disponibilidade das bifidobactérias em alimentos comercializados. Através das análises dos alimentos, observaram que estas espécies têm grande capacidade de se manter em quantidades suficientes nos produtos durante seu armazenamento e distribuição.

2.2.3 Mecanismos de ação dos probióticos

Os metabólitos produzidos pela fermentação probiótica de substratos podem exercer atividade imunomodulatória sobre o hospedeiro. A atuação do probiótico dependerá da quantidade da espécie presente no intestino, do tempo de permanência e do tempo que se mantém vivo no veículo de transporte – alimento ou fármaco (Bourlioux et al, 2003).

Cada espécie de probiótico exerce um determinado efeito no hospedeiro baseado em suas capacidades, atividades enzimáticas, e habitude preferencial (Schrezenmeir e Vrese, 2001; Bezkorovainy, 2001). Os efeitos benéficos dos probióticos sobre a saúde do homem vêm sendo demonstrados claramente, mas o mecanismo de atuação destes no trato gastrointestinal não é bem conhecido. Porém, pela composição da microflora e suas atividades, tal atuação pode ser, pelos seguintes mecanismos, explicada:

- a) Antagonismo direto - produção e secreção de agentes antimicrobianos, ou pela produção de ácidos orgânicos que fazem o controle da flora, “eliminando” as cepas patogênicas.
- b) Competição por nutrientes - as bactérias competiriam por um nutriente igualmente essencial para cada uma delas.

- c) Competição por receptores de adesão - por ter maior resistência aos movimentos peristálticos, agrega-se com mais facilidade à mucosa intestinal, ocupando assim o lugar de certos agentes patogênicos na mucosa.
- d) Estimulação da imunidade - promovendo aumento da atividade macrocítica, do número de células T e interferon, e aumento na concentração de IgA, oferecendo assim uma evidente proteção contra agentes patogênicos (Fuller e Gibson,1997).

2.2.4 Aplicação clínica dos probióticos

Silva e Stamford sugeriram em 2000 que o uso freqüente de alimentos probióticos – como, por exemplo, iogurtes ou leites fermentados – é importante para promover, no ser humano, benefícios como: balanceamento da flora intestinal, aumento da tolerância e digestibilidade da lactose, atividade anticarcinogênica, redução dos níveis de colesterol, síntese de vitaminas do complexo B, absorção de Cálcio e a modulação do sistema imunológico. Inúmeros outros estudos comprovam o crescente potencial dos probióticos em benefício da saúde do homem, documentando sua atuação no tratamento e prevenção de diversas patologias: diarréia de diversas etiologias (rotavírus, *Clostridium difficile*, viajante e antibioticoterapia), intolerância a lactose, dermatites atópicas, síndrome do intestino irritável, e outras, mais recentes, como a estimulação da resposta imunológica no ser humano (Isolauri et al, 2000; Marteau et al, 2001; Stanton et al, 2001; Vrese et al, 2001; Floch, 2005).

Está bem estabelecida na literatura a grande eficácia dos probióticos no tratamento de doenças gastrointestinais, principalmente na prevenção e no tratamento de diarréia – com mais de uma espécie de bactéria probiótica (Davidson e Butler, 2000; Missmer et al, 2000). Esta eficácia se mostra ainda maior em antibiótico terapia, pois

o antibiótico desequilibra a flora intestinal, diminuindo assim sua capacidade fermentativa e facilitando a agregação de bactérias patogênicas no cólon. Nestas situações, as espécies mais utilizadas foram *Lactobacillus GG*, *acidophilus* e *bulgaricus*, apresentando uma redução de 25 a 50% da duração da diarreia (Salminen e Salminen, 1997; Vanderhoof et al, 1999; Markowitz, 2002; Vanderhoof, 2001). Entretanto, o comitê europeu de nutrição revisou, recentemente, estudos sobre as cepas mais eficazes contra a diarreia decorrente da terapia antibiótica, e destacaram as espécies *Saccharomyces boulardii* e *lactobacilli*, porém é necessário um número mais consistente de estudos para comprovar estes dados (Agostoni et al, 2004).

Há mais de uma década, observa-se o aumento de IgA secretora circulante em crianças que receberam suplementação de *Lactobacillus casei*, diminuindo o tempo de duração da diarreia, quando comparado ao grupo placebo (Kaila et al, 1992). Comprovando os resultados, Shornikova e colaboradores, em 1997, observou a diminuição dos efeitos da diarreia pelo rotavírus com um estímulo da resposta imune. Anteriormente, Saavedra e colaboradores (1994) havia utilizado *Bifidobacteria bifidum* para este mesmo fim. O uso de iogurtes também vem sendo utilizado para o estímulo de produção de citocinas, incluindo a indução de interleucina 10 nas células sanguíneas do homem (Pessi et al, 2000; Soli-Pereyra et al, 1997). Em estudo feito com ratos, Perdígón e colaboradores (1995) obteve aumento na resposta imune com administração de 10^9 ufc, duas vezes ao dia, de *Lactobacillus casei*, elevando o número de células produtoras de IgA. Mas, a administração contínua do probiótico diminuiria seus efeitos, no número total de células linfóides.

A atuação dos probióticos também se verifica na prevenção de processos alérgicos em crianças com história familiar de alergias, ou, ao menos, retardando e minimizando os sinais e sintomas (Kalliomäki et al, 2001; Bongaerts e Severijnen,

2004). Recentemente vem sendo estudada a atuação dos probióticos na prevenção de enterocolite necrozante e na redução de translocação bacteriana *in vitro*, com as espécies *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium infantis*, porém ainda sem efetiva comprovação (Mattar et al, 2001; Lin et al, 2005). O estudo acerca da minimização dos sintomas da má absorção da lactose (tanto para crianças como para adultos) também é recente, constatando uma redução na velocidade do trânsito intestinal (comparado com o leite), na medida em que as bactérias fazem a digestão da lactose no lúmen intestinal – principalmente a espécie *Lactobacillus acidophilus* (Rinne et al, 2005).

2.2.5 Efeito imunomodulatório dos probióticos

Estudos têm demonstrado uma considerável influência no crescimento da resposta imune no ser humano e sua manutenção através do uso terapêutico de probióticos – tanto na resposta imune específica quanto não específica do hospedeiro contra antígenos potencialmente nocivos (Fuller e Gibson, 1997; Yasui et al, 1999). A imaturidade da flora intestinal é responsável pela vulnerabilidade do indivíduo a infecções, inflamações e hipersensibilidades (alergias). O uso de probióticos pode melhorar a composição da microflora intestinal e, assim, aumentar e manter a barreira imunológica local, amenizando as respostas inflamatórias. As espécies mais estudadas que oferecem este benefício ao hospedeiro são do grupo dos lactobacilos e bifidobactérias (Isolauri et al, 2001; Cross, 2002).

O efeito atribuído aos probióticos de aumento da defesa imunológica da mucosa intestinal e sua atuação contra a colonização e translocação de microorganismos patogênicos, ocorre mediante o aumento da atividade macrocíticas, função fagocitária, neutrófilos, monócitos e aumento do número de células *killer*, T e interferon. (Fuller e

Gibson, 97; Vanderhoof, 2001; Kalliomäki, 2003). Isto porque a resposta imunológica inicia-se no MALT e pode afetar a resposta imune de outras superfícies de mucosas, atravessando as placas de Peyer, estimulando os linfócitos T e induzindo a resposta de células B. O aumento dos níveis séricos de IgA secretora e da produção de macrófagos são extremamente importantes na resposta imune inata do intestino, pois esta é a primeira linha de defesa não específica do organismo. (Salminen et al, 1998; Vanderhoof, 2001).

As bactérias ácido lácticas são resistentes ao pH baixo e colonizam o intestino com facilidade, associando-se às células Peyer e ao tecido linfóide. O efeito imunomodulatório dos probióticos pode estar relacionado a esta capacidade dos microrganismos interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA (Perdigón & Holgado, 2000). Esta capacidade, na maioria das vezes, é dose dependente: quanto maior a ingestão, maior a capacidade de colonização. Dentre as bactérias probióticas, algumas são mais resistentes que outras, como *B. longum*, *L. gasserie* e *casei*, e colonizam a flora intestinal dentro de aproximadamente sete dias, aumentando a função fagocitária a partir do terceiro dia de ingestão do produto (Adolfsson et al, 2004).

Em um estudo randomizado duplo-cego, elaborado por Schifrim e colaboradores (1997), com *Bifidobacterium* e *Streptococcus thermophilus*, observou um aumento significativo na atividade fagocitária e nos níveis séricos de granulócitos e monócitos, mas não em linfócitos ou ativação das células T. Também tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (Cross, 2002). Isto porque, a entrada do antígeno via oral estimula primeiramente os linfócitos intra-epiteliais que carregam os marcadores de CD8+,

através da produção de IgA-secretora, que migram ao intestino (lâmina própria) através da corrente sanguínea, para mediar a tolerância oral de antígenos (Duggan et al, 2002; Erickson e Hubbard, 1999).

Testes em ratos confirmam a ação das bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus acidophilus*, *casei*, *delbrueckii ssp. bulgaricus*; *Streptococcus thermophilus*), em dose de 10^9 ufc, sobre a resposta imunológica, através do aumento de IgA secretora, células linfocitárias, macrófagos e fagócitos. Esta resposta se mostrou dose dependente, e a melhor dose utilizada foi de duas vezes ao dia, por sete dias consecutivos, prevenindo infecções entéricas. Porém, um período muito prolongado de suplementação de lactobacilos diminui o número total de células linfocitárias com o tempo, já que a utilização dos probióticos na alimentação tem efeito paliativo, exceto se ingerido em doses elevadas e repetidamente, com intervalo entre as administrações – oferecendo, assim, efeito imunomodulatório (Bourlioux et al, 2003). Outra recente utilização é a suplementação concomitante a vacinas orais para estimular a imunidade da mucosa (Perdigón et al, 1995; Bezkorovainy, 2001).

A microflora intestinal promove processos potencialmente antialérgicos, estimulando células imunológicas T-helper, aumentando a transformação de fator β de crescimento e a produção de IgA. Três estudos clínicos semelhantes, duplo-cego controlado por placebo, em crianças com história familiar de alergia, analisaram a suplementação de 10^{10} ufc de *Lactobacillus GG* perinatal, através da dieta materna (por 4 semanas), e pós natal, através do aleitamento materno ou diretamente via oral (por 2 anos). Ao final da terapia probiótica, observaram a diminuição na ocorrência de eczemas atópicos, com diminuição da concentração de IgE – não sendo dependente da forma de administração. E, observaram ainda que, a utilização destas espécies, após quatro semanas, diminuiu os níveis de clostridium e amônia nas fezes, e, também,

diminuiu a permeabilidade intestinal das crianças atópicas (Isolauri et al, 2000; Kalliomäki et al, 2001; Rinne et al, 2005).

Yasui e colaboradores (1999) comprovou que a administração de *Bifidobacterium breve* estimulou o sistema imune humoral em camundongos, provocando aumento da produção de IgA anti-Rotavírus e de IgG antivírus da Influenza, protegendo-os contra essas duas infecções. Pessi (2000) reforça a utilização de probióticos (especificamente *Lactobacillus rhamnosus GG*) para o alívio dos sintomas nas inflamações gastrointestinais e dermatites atópicas por alergia a alimentos. Este fato está associado ao estímulo de células IgA secretoras e supressão do processo inflamatório citocina (fator de necrose tumoral).

No grupo dos lactobacilos, as espécies *casei* e *shirota*, induziram resposta celular tipo 1 em camundongos gnotobióticos, aumentando a produção *in vitro* de IL-12 por células peritoniais e de IFN- γ e IFN - α por células esplênicas (Neumann et al, 1998) e estimulando a secreção de IgA no lúmen intestinal (Perdigón et al, 1995; Perdigón et al, 2000). As espécies *L. casei* e *L. plantarum* demonstraram interagir com as células M das placas de Peyer, estimulando a imunidade secretora específica. Vitini (2000) testou a influência da administração oral de diferentes espécies de bactérias ácido lácticas, tais como *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus*, e verificou que o aumento da produção de IgA nem sempre esteve correlacionado ao aumento do número de células T CD₄⁺, indicando que algumas bactérias testadas somente induziram ativação das células B produtoras de IgA. Neste caso, também foi observado que não houve influência sobre as células T CD₈⁺, indicando que essas bactérias não foram capazes de induzir citotoxicidade.

2.2.6 Terapia probiótica

Os probióticos não colonizam permanentemente o intestino e, quando bifidobactérias e lactobacilos são suplementados, somente 30 e 10%, respectivamente, do ingerido chega intacto ao cólon, por não resistir ao pH do estômago e aos ácidos biliares. Além da dificuldade em resistir à passagem do trato gastrointestinal, sua permanência nas fezes é curta, pois desaparece 7 dias após a ausência de suplementação. Por este motivo, a dose de administração deve ser feita em quantidades elevadas, mantendo-se assim em número suficiente no trato gastrointestinal para promover efeito imunoestimulador (Fuller e Gibson, 1997; Vanderhoof, 2001; Tuomola, 2001; Duggan, 2002; Kalliomäki, 2003).

Acredita-se que a contínua administração ou a permanente colonização dos probióticos pode não ser o melhor método de administração para se obter efeito imunoestimulatório, pois o sistema imunológico requer periódicos estímulos – doses repetidas de probióticos com intervalos (Vanderhoof et al, 1999; Penna et al, 2000). É necessária a ingestão diária de um probiótico em quantidades adequadas para manter os níveis artificialmente elevados e desenvolver algum efeito benéfico, porém oferecendo um intervalo para que os microorganismos patogênicos não desenvolvam resistência à flora intestinal. A terapia com probióticos deve observar o período e a dose administrados para um melhor resultado na indução da resposta imune na mucosa (Perdigon et al, 1995; Saavedra, 2001).

A capacidade das bactérias ácido lácticas de se associarem às células das placas de Peyer e ao tecido linfóide, na maioria das vezes, é dose dependente (Perdigón e Holgado, 2000). Recentemente estabeleceu-se um consenso, de diversos autores e do Comitê científico de alimentos Europeu, sobre a dose diária de administração dos

probióticos, sendo recomendado em torno de 10^8 a 10^{10} ufc por dia (Duggan et al, 2002; Bourlioux et al, 2002; Agostoni et al, 2004).

As doses diárias citadas na literatura são muito semelhantes, mesmo com aplicações diferentes. Vanderhoof (2001) cita para o tratamento da diarreia causada por antibioticoterapia, a dose de 10^{10} ufc de *Lactobacillus GG*, duas vezes ao dia, e no caso de crianças com menos de 12 Kg, uma vez ao dia é suficiente. Esta dose é reforçada por Pessi e colaboradores (2000), que indica por quatro semanas o uso de 10^{10} ufc de *Lactobacillus rhamnosus GG*, duas vezes ao dia, para crianças com dermatite atópica e alergia ao leite de vaca. Seu estudo apresentou resultados até um mês após o término da terapia com probióticos, sugerindo que a suplementação de probióticos é um excelente coadjuvante para diminuir a resposta inflamatória nestes pacientes.

Sobre o tempo da terapia probiótica para a estimulação da imunidade ainda não há um consenso, porém diversos estudos concordam que o tempo mínimo de administração deverá ser de um mês. Já para observar-se melhoria no quadro de diarreia, bastariam apenas 3 dias de suplementação (Johnson et al, 2000; Kalliomäki e Isolauri, 2003; Saavedra et al, 1994).

Como exemplo de doses terapêuticas, temos na literatura alguns estudos bem delineados, para uma rápida visualização:

- Majamaa et al (1995). Uso de $2,8 \times 10^9$ ufc de *Lactobacillus GG* e 10^9 ufc de *Lactobacillus casei* por cinco dias em 49 crianças (de 4 à 35 meses de idade) com gastroenterite aguda causada pelo rotavírus por mais de 7 dias de duração dos sintomas, recebendo reidratação oral. Observaram redução da diarreia e aumento de IgA, IgG e IgM; e IgA secretora (específica para rotavírus).

- Salminen S e Salminen E (1997). Uso de 250 ml de iogurte fermentado com *Lactobacillus acidophilus* acrescido de 1,25% de fibras solúveis e *Lactobacillus GG*, duas vezes ao dia. Observaram melhora no quadro da constipação, sendo que o aumento da dose não alterou seu efeito.
- Guandalini et al (2001). Uso de reidratação oral (250 ml) suplementada com 10^9 ufc de *Lactobacillus GG* durante a ocorrência da diarreia em crianças menores de dois anos. Observou redução do tempo de duração da diarreia.
- Salminen et al (2004). Uso de 5×10^{10} ufc de *Lactobacillus GG*, duas vezes ao dia, por duas semanas, em pacientes HIV+ em terapia HAART regular por mais de três meses, com diarreia não infecciosa. Não observou diminuição dos episódios de diarreia, nem da consistência das fezes entre os grupos, apenas a diminuição de fezes líquidas. Neste estudo não houve nenhum efeito colateral indesejado, e não observaram diferença na contagem de CD4 ou na carga viral (HIV RNA), porém a amostra foi muito pequena e o tempo de suplementação muito curto.
- Marteau et al (2001). O uso de *L. rhamnosus GG* (10^9 ufc/25ml uma vez ao dia) reduziu significativamente a diarreia por rotavírus em crianças (estudo caso controle controlado por placebo).
- Saavedra et al (1994). Uso de fórmulas suplementadas com *Bifidobacterium lactis* ($1,9 \times 10^8$ ufc/g de pó) e *Streptococcus thermophilus* ($0,14 \times 10^8$ ufc/g), com crianças de 5 a 24 meses, apresentou redução significativa de diarreia por rotavírus.
- Wang et al (2004). Uso de *Lactobacillus La5* e *Bifidobacterium lactis B12* – 10^7 ufc de cada espécie/ml de iogurte, duas vezes ao dia, por 6 semanas, controlado por placebo. Observou a redução da atividade de urease do *Helicobacter pylori* no antro.

2.2.7 Determinação da colonização intestinal dos probióticos

Determinar a presença das bactérias probióticas nas fezes é extremamente difícil, pois não temos ainda na literatura técnicas bem estabelecidas, e as existentes têm um custo muito elevado e são, geralmente, invasivas. As pesquisas que visam determinar a presença e resistência do probiótico nos produtos e no corpo humano utilizam técnicas como PCR (reação da polimerase em cadeia), CDSA (análises da compreensão da digestão e das fezes) ou FISH (hibridização fluorescente). Entretanto, estas técnicas não são capazes identificar as diferentes linhagens de uma mesma espécie de probiótico (Grönlund et al, 1999; Harmsen et al, 2000).

Sendo assim, a colonização dos probióticos não pode ser determinada através de análises de fezes, fazendo-se necessária a biópsia da mucosa intestinal, o que é um procedimento muito invasivo. Novas técnicas são necessárias para facilitar e baratear a identificação dos probióticos nas fezes, além daquelas onde se diferencia dentro da mesma espécie as mutações e evoluções da mesma, através da análise do DNA (Fuller e Gibson, 1997; Tuomola et al, 2001; Tannock, 2001).

2.2.8 Segurança

Não existem evidências de que o consumo de probióticos contendo lactobacilos e bifidobactérias, via alimento, aumente o risco de infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos. Na literatura, estudos demonstram a segurança do consumo de probióticos em pacientes infectados pelo HIV, e a utilização para prevenção de diarreia em pacientes com SIDA. (Wolf, 1998; Penna, 2000). Em estudo controlado por placebo, Cunningham-Rundles e colaboradores (2000), observou a colonização, com segurança,

do *Lactobacillus plantarum* 299v, em crianças HIV+, durante duas semanas; bem como melhora no quadro clínico de candidíase, retomada do crescimento e aumento do apetite após um mês. Estes resultados, juntamente com outros estudos, vêm a reforçar a segurança na suplementação de probióticos nesta população (Young et al, 1998; Davidson e Butler, 2000; Borriello et al, 2003).

Casos de infecção por lactobacilos e bifidobactérias são extremamente raros e representam menos de 0,5% dos casos de endocardites e bacteremias. E, estes casos, estão associados a procedimentos invasivos, terapia de imunossupressão e antibióticos que podem contribuir para aumentar o risco de infecção ou endocardite. Em um levantamento sobre 86 casos de bacteremia por lactobacilos observou-se que a maioria desses consistia em doenças graves ou malignas do trato gastrointestinal, como cirrose hepática e pancreatite crônica, juntamente com hospitalização. Na grande parte dos casos havia imunossupressão, elevada contagem de leucócitos e valores de proteína c-reativa, além de tratamento prévio com antibióticos, cirurgias, e realização de endoscopia. Estes casos comprovam que a translocação dos *Lactobacillus* se deu através de catéteres ou nosocomialmente, sendo geralmente a espécie responsável o *Lactobacillus rhamnosus*. (Borriello et al, 2003; Agostoni et al, 2004; Salminen et al, 2004).

Estudos realizados com a administração de lactobacilos e bifidobactérias, na dose de $10^6 - 10^9$ ufc, por aproximadamente um ano, não apresentaram nenhum efeito adverso, inclusive em estudo realizado em crianças com imunossupressão. (Saavedra, 2001; Markowitz e Bengmark, 2002). A predominância destas bactérias em bebês amamentados ao peito comprova sua capacidade de proteção contra infecções (Salminen et al, 1998).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estudar a influência dos probióticos na resposta imunológica de pacientes pediátricos portadores do vírus HIV, através da contagem das células linfocitárias CD4.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Acompanhar os marcadores imunológicos, através da contagem das células CD4 das crianças envolvidas no estudo.

3.2.2 Avaliar a frequência de episódios de diarreia, através do número de evacuações em 24 horas e consistência das evacuações.

3.2.3 Avaliar a presença ou não de *Cândida*, através da análise de fezes.

4. Metodologia

4.1 Delineamento

Ensaio Clínico Randomizado Duplo Cego com controle, conduzido em crianças infectadas pelo HIV, de dois a doze anos de idade, divididas em dois grupos - um recebendo fórmula com probióticos (grupo probiótico) e o outro fórmula semelhante, porém sem probiótico (grupo controle).

4.2 Considerações éticas

Todas as crianças entraram no estudo após a obtenção do consentimento informado livre e esclarecido com os pais ou responsáveis. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – GPPG (nº 03/096), e pelo Grupo de Ética em Pesquisa do Hospital da Criança Conceição – GEP (nº 038/03).

4.3 Amostra

O cálculo da amostra ($n = 76$) foi baseado na estimativa de efeito do probiótico em 50% da população, com margem de erro aceitável de no máximo 10%, para confiança de 95%, através do programa Epi info 3.2.

4.4 População

O estudo foi realizado no Hospital da Criança Conceição, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS, com pacientes em seguimento no ambulatório de pediatria – Grupo de Atenção à Aids Pediátrica, GAAP (tratamento de crianças soropositivas);

com crianças maiores de dois (2) anos e menores de doze (12) anos, de ambos os sexos, infectadas com o vírus do HIV.

As crianças foram escolhidas aleatoriamente e divididas (por sorteio) em dois grupos: grupo controle (fórmula padrão) e o grupo de intervenção (fórmula com probiótico). As crianças foram selecionadas entre o período de outubro de 2003 a novembro de 2004.

Para a descrição da população aplicou-se um questionário de entrevista, no início da pesquisa, para coleta de dados socioeconômicos da família da criança, tais como: escolaridade dos pais, renda per capita, condições de moradia (rede de esgoto e água encanada, energia elétrica, refrigerador). [tabela 1]

4.5 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão foram: infecção pelo HIV; estar regularmente freqüentando o GAAP Grupo de Atenção à Aids Pediátrica do HCC; estar em terapia antiretroviral por no mínimo três meses sem trocas e com boa adesão ao tratamento; ter entre dois e dose anos; ausência de doenças congênitas que possam interferir no desenvolvimento e estado nutricional; assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e ter disponibilidade de comparecer as consultas do estudo.

4.6 Critérios de exclusão

Crianças com doenças crônicas, diabetes, infecções severas, história de alergia à proteína do leite de vaca ou intolerância à lactose foram excluídas do estudo, bem como a internação hospitalar ou falha no tratamento no decorrer do estudo.

4.7 Produtos: probiótico e controle

Os produtos utilizados no estudo foram: fórmula infantil contendo *Bifidobacterium bifidum* com *Streptococcus thermophilus* – $2,5 \times 10^{10}$ ufc (grupo probiótico) e o mesmo produto, fórmula infantil padrão, sem as bactérias probióticas. Estes produtos são comercialmente conhecidos como NAN2 probio[®] e NAN2[®], da Companhia Nestlé Brasil Ltda., que declara conter $9,7 \times 10^8$ ufc/g do produto. Estes produtos foram doados para a pesquisa pela empresa.

Estas bactérias foram selecionadas por sua capacidade de colonizar a mucosa intestinal e por ter propriedades imunoestimulatórias, e o produto foi escolhido por sua facilidade de armazenamento e manipulação, pois as fórmulas em pó não necessitam de refrigeração. Além disto, estes microorganismos são importantes componentes da microflora intestinal e não são nocivos ao organismo (Fuller, 1991; Tuomola et al, 2001; Isolauri et al, 2001; Bourlioux et al, 2003).

As latas dos produtos foram cegadas por pessoa não envolvida no estudo e as crianças foram divididas por sorteio (randomização) para receber produto com probiótico ou sem probiótico, representados pelos números 1 ou 2, sendo que nem o pesquisador, nem as crianças ou os pais sabiam qual dos produtos estava sendo administrado.

4.8 Aplicação do produto

Os participantes, após o consentimento livre e esclarecido assinado, retornavam no mês seguinte para iniciar a administração do produto. A adesão e presença nas consultas da pesquisa eram voluntárias e nenhum incentivo foi oferecido. O número

total de consultas do estudo, realizadas por uma nutricionista, foi estipulado em seis para cada criança, com duração média de acompanhamento no estudo de 4 meses.

Os pais ou responsáveis pelas crianças foram instruídos conforme a administração do produto, devendo ser diluído 14 g do produto (três medidas da lata) em no mínimo 100 ml. de leite (ou seja, a quantidade diária habitual de cada criança), duas vezes ao dia, durante dois meses ininterruptos. A administração e aceitação do produto foram acompanhadas semanalmente por telefone e quinzenalmente nas consultas. Caso alguma criança não fosse capaz de consumir o produto, por quaisquer motivos, seria excluída do estudo. Ainda, os pais foram instruídos a não modificar a dieta habitual da criança e a não oferecer nenhum tipo de alimento contendo probiótico durante o estudo.

4.9 Variáveis nutricionais

Peso e altura foram coletados através de técnicas padronizadas (Frisancho/1974), e classificados nas curvas de percentil do NCHS (*National Center for Health Statistics*), ajustados para idade e sexo (Tanner et al, 1985; Ogden et al, 2001).

Um recordatório alimentar de 24 horas foi realizado com pais ou responsáveis para determinar o consumo alimentar diário de cada criança. As análises foram realizadas com auxílios do software de cálculo nutricional Virtual Nutri da USP (Philippi et al, 1996).

4.10 Variáveis imunológicas

Cada criança foi classificada, no início do estudo, conforme o estágio imunológico, de acordo com a classificação do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) para crianças infectadas pelo HIV (Caldwell et al, 1994). [anexo 1]

A resposta imunomodulatória dos probióticos foi acompanhada através da contagem absoluta de células linfocitárias CD4, expressa pela concentração absoluta (cells/mm³), através de exame de sangue coletado um mês antes do início do estudo e logo após o término da administração do produto, observando um intervalo de 3 meses entre as coletas. Tais exames são realizados de rotina no tratamento destas crianças e são realizados pelo Hospital da Criança Conceição rotineiramente.

4.11 Episódios de diarreia

A consistência e o número de evacuações foram acessados através de um questionário (anexo 4), composto por 5 grupos de desenhos ilustrando a consistência das fezes - de líquida a normal. Este questionário foi elaborado, validado e utilizado anteriormente na literatura, e recebemos o consentimento para utilizá-lo (Young et al, 1998; Vanderhoof, 1999).

Os questionários eram completados pelos pais, que comparavam as figuras com as fezes e marcavam cada episódio de evacuação. A frequência de evacuações foi determinada durante o período de 24 horas.

4.12 Análise de fezes

Foram realizadas duas coletas de fezes das crianças do estudo – uma antes de iniciar a administração do produto e outra após o término do mesmo. As amostras (esfregaço em lâmina) eram imediatamente levadas ao serviço de microbiologia do HCPA para análise da presença da forma infectante (pseudo-hifas) de *Cândida sp.*

As lâminas recebiam coloração *gram* e eram examinadas através de exame microscópico, realizando-se contagem semi-quantitativa de pseudo-hifas infectantes por campo de objetiva, de imersão de 100 x, classificadas conforme um escore ilustrado na tabela I. Os dados das análises, antes e após o uso do produto, foram comparados com o objetivo de avaliar a colonização do probiótico.

Tabela I. Escore de classificação da quantificação de *Cândida*.

Presença de pseudo-hifas por 40 campos	Semi-quantificação
+ de 10	numerosas
2 a 9	algumas
1	raras
0	ausente

4.13 Análise estatística

Os dados quantitativos foram descritos através de médias e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartilico (percentis 25 e 75). A comparação das características entre os grupos foi feita por teste t-Student, para variáveis categóricas, ou teste U de Mann-Whitney, para as variáveis quantitativas; e a classificação imunológica foi feita através do qui-quadrado. A consistência e frequência das fezes foram

comparadas entre os dois grupos pela análise de variâncias (ANOVA), para medidas repetidas.

Devido à distribuição assimétrica dos valores de CD4, estes foram transformados em logarítimo na base 10. A diferença entre os valores iniciais e finais, ajustados para idade e diferença dos valores iniciais, foi comparada através da análise de covariâncias (ANCOVA).

O nível de significância adotado neste estudo foi de $\alpha = 0,05$. Todos os dados foram processados e analisados com o auxílio do software SPSS versão 12.0.

5. Artigo científico original (português)

Uso de Probióticos em crianças infectadas pelo HIV: Um Estudo Randomizado duplo-cego controlado.

Lívia Trois ⁽¹⁾
Edmundo Machado Cardoso ⁽²⁾
Ernani Miura ⁽³⁾

(1) Nutricionista, Especialista em Terapia Nutricional, Pós-graduanda de Pediatria (UFRGS)

(2) Médico Pediatra Infectologista (HCC)

(3) Médico, Neonatologista (HCPA), Doutor professor orientador do Programa de Pós Graduação Pediatria (UFRGS)

Responsável pelo contato: Lívia Trois

Endereço eletrônico: liviatrois@gmail.com

Correspondência: HCPA, Ramiro Barcelos, 2350/ s. 1123/ Porto Alegre/RS/Brasil.

Resumo

Introdução: a AIDS é uma infecção caracterizada pela disfunção das células imune e subsequente imunodeficiência, e freqüente disfunção intestinal. Probiótico, suplemento microbiano vivo, que afeta benéficamente o animal hospedeiro através do aperfeiçoamento do balanço da microflora intestinal, promovendo efeitos benéficos.

Objetivos: O objetivo deste estudo é determinar a resposta imune através da contagem das células de CD4 e redução de fezes líquidas. **Métodos:** estudo randomizado duplo-cego controlado, com crianças infectadas pelo HIV (2 e 12 anos), em dois grupos – um recebendo probiótico (fórmula contendo *Bifidobacterium bifidum* com *Streptococcus thermophilus* – $2,5 \times 10^{10}$ unidades formadoras de colônia) e o outro fórmula padrão (grupo controle). Os valores de CD4 (cels/mm³) foram coletados no início e fim do estudo. A consistência de fezes e número das evacuações foram acessados através de um questionário (consistência de fezes líquida a normal). **Resultados:** houve um aumento na média dos valores de CD4 no grupo probiótico (791 céls/mm³), e uma pequena redução no grupo controle (538 céls/mm³). Esta diferença entre os grupos foi de 118 cels/mm³ vs. -42 céls/mm³ (p 0,049), representada pelo delta do logaritmo base 10 dos valores de CD4 para análise estatística. Observamos uma similar redução na freqüência de fezes líquidas nos dois grupos (p 0,06), e um pequeno aumento na ocorrência de fezes normais no grupo probiótico, porém sem diferença significativa (p 0,522). A freqüência de fezes amolecidas teve ligeira diminuição nos dois grupos (p 0,01). **Conclusão:** Nosso estudo mostrou que os probióticos têm propriedades imunoestimulatórias, e podem auxiliar no tratamento de crianças infectadas pelo HIV.

Palavras-chave: probióticos, aids pediátrica, imunidade, HIV, diarreia.

Abstract:

Introduction: AIDS is an infection characterized by immune cell dysfunction and subsequent immunodeficiency, and intestinal dysfunction is frequent. Probiotic, a live microbial feed supplement, which beneficially affect the host animal by improving intestinal microbial balance, and promote health benefits. **Objective:** The goals of this study were to determine the immune response by CD4 cells/mm³ counts and reduce the liquid stools. **Methods:** randomized double-blind controlled trial with HIV-infected children (2 - 12 years), in two groups – one receiving probiotics (formula containing *Bifidobacterium bifidum* with *Streptococcus thermophilus* – 2,5x10¹⁰ colony forming units) and the other a standard formula (controlled group). The values of CD4 (cells/mm³), were collected in the beginning and until after the ending of the study. The quality and number of stools were assessed by a questionnaire (watery to normal stools consistency). **Results:** increase in the mean CD4 count on the probiotic group (791 cells/mm³), and a small decreased in controlled group (538 cells/mm³); the difference between children receiving probiotic and control group was 118 cells/mm³ vs. -42 cells/mm³ (p 0.049), represented by delta CD4 log₁₀ for statistical analyses. We observed a similarly reduction in liquid stools consistency in both groups (p 0.06), higher in the probiotic-group, but without significant difference (p 0.522). The loose soft had a little decreased in both groups (p 0.955), and an increased of the normal stool's consistencies, in both groups (p 0.01). **Conclusion:** Our study showed the probiotics immunoestimulatory properties, and it might be helpful in the treatment of HIV-infected children.

Key-words: probiótics, aids pediatric, immunity, HIV, diarrhea.

Introdução

O HIV/AIDS é um grande problema no mundo, mesmo em países desenvolvidos. Muitas das manifestações da infecção pelo HIV são causadas pela disfunção das células imunes e subsequente deficiência imunológica (1). As disfunções gastrointestinais podem predispor as crianças infectadas pelo HIV a distúrbios eletrolíticos e desnutrição, podendo futuramente estender-se às células T de defesa associado à replicação viral (2, 3).

É freqüente em pacientes HIV positivos a disfunção intestinal, que inclui má absorção de carboidratos, esteatorréia e aumento da permeabilidade intestinal, podendo, ou não, ser causada por patógenos entéricos (4). O desenvolvimento de bactérias no intestino, as infecções gastrointestinais oportunistas e a má absorção de carboidratos podem ser fatores relevantes no estado nutricional destas crianças (5). A disfunção gastrointesinal envolve uma série de anormalidades digestivas e absorptivas, que contribuem para a perda de peso, pois a diarreia nem sempre é associada a patógenos, resultando em anormalidade imunológica (6).

A deficiência imunológica, causada pelo vírus, pode ter papel importante na disfunção intestinal e sua freqüência e severidade, mesmo ocorrendo uma vez por semana, correlaciona-se com o estado imunológico. Este quadro freqüente de diarreia ou disfunção intestinal pode afetar a absorção e metabolismo dos medicamentos administrados diariamente (7, 8).

Probióticos foram definidos por Fuller como “suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro aperfeiçoando o balanço da microflora intestinal, promovendo efeitos benéficos a sua saúde” (9). O principal efeito benéfico à saúde do hospedeiro, atribuído aos probióticos, é o aumento da defesa

imunológica da mucosa (através do aumento da atividade dos macrófagos, elevando o número de células *killer*, T e interferon) e atuação contra a colonização e translocação de microorganismos patogênicos. Devido ao fato de os probióticos não colonizarem permanentemente o intestino, eles devem ser ingeridos em quantidade suficiente ($>1 \times 10^7$ ufc/d) para colonizar e manter-se em quantidade adequada no cólon, promovendo assim a estimulação imunológica periódica (10, 11, 12, 13, 14).

Não existem evidências de que o consumo de probióticos, contendo lactobacilos e bifidobactérias, aumente o risco de infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos. Dois estudos demonstram a segurança do consumo de probióticos em pacientes infectados pelo HIV, na prevenção da diarreia em pacientes com SIDA (15, 16, 17, 18).

Sendo assim, a hipótese do presente estudo é de que os probióticos possam aumentar as defesas imunológicas e diminuir os episódios de diarreia de crianças infectadas pelo HIV. O objetivo deste estudo é determinar a resposta imunológica desta população através da contagem total de células CD4+ e reduzir a frequência de fezes líquidas, já que uma redução de 15% nas células de CD4 é uma evidência de morbidade e mortalidade (19, 20).

Métodos

Ensaio Clínico Randomizado Duplo Cego com controle, conduzido em crianças infectadas pelo HIV, entre dois e dozes anos de idade, divididas em dois grupos - um recebendo probióticos (grupo probiótico) e, o outro, fórmula padrão (grupo controle). Todas as crianças foram envolvidas no estudo após a obtenção do consentimento informado assinado pelos pais. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital

Clínicas de Porto Alegre – GPPG (nº 03/096), e do Hospital da Criança Conceição – GEP (nº 038/03).

Pacientes: a população foi selecionada do serviço ambulatorial de referência de atenção a AIDS pediátrica (GAAP) do Hospital da Criança Conceição, em Porto Alegre, Brasil, no período de outubro a novembro de 2004. Os critérios de inclusão foram: ser infectado pelo HIV, estar em tratamento antiretroviral regular sem trocas por três meses antecedentes ao estudo e nem durante o estudo, e aqueles que freqüentam o GAAP. Os critérios de exclusão foram: crianças com doenças crônicas, diabetes, infecções severas, alergia à proteína do leite de vaca, intolerância à lactose, hospitalização e falha na terapia antiretroviral.

Os produtos foram cegados por pessoa não envolvida no estudo, e as crianças foram divididas (randomização), por sorteio, em dois grupos para receber probiótico ou placebo. Os pais ou responsáveis legais foram orientados sobre a administração do produto (14g diluídas em no mínimo 100ml de leite, duas vezes ao dia, por dois meses ininterruptos). Um grupo recebeu fórmula padrão (controle) e o outro grupo recebeu fórmula contendo *Bifidobacterium bifidum* com *Streptococcus thermophilus* – $2,5 \times 10^{10}$ ufc (unidades formadoras de colônia). Os produtos utilizados, NAN2 probio[®] e NAN 2[®], foram doados para pesquisa pela empresa Nestlé, foram, contendo $9,7 \times 10^8$ ufc/g.

As bactérias foram selecionadas devido a suas propriedades de tolerância aos ácidos, capacidade de adesão à mucosa intestinal, propriedades imunoestimulatórias e, também, em função do produto não necessitar refrigeração (fórmula em pó). Além disto, são importantes componentes da microflora intestinal e não são nocivos (9, 12, 21, 22).

Solicitou-se aos participantes o retorno às consultas do estudo a cada quinze dias para o acompanhamento, e as orientações e o questionário de fezes eram sempre repetidos – totalizando 6 consultas para cada criança acompanhada no estudo. A adesão ao estudo era voluntária e nenhum incentivo foi oferecido. Os pais eram questionados todas as semanas, por telefone, sobre a administração e aceitação do produto.

Se alguma criança não fosse capaz de consumir o produto, por quaisquer razões, ou, se o responsável não conseguisse completar as informações necessárias, o paciente seria retirado do estudo.

Os pais foram instruídos a não alterar a dieta de seus filhos no decorrer do estudo e, também, a não oferecer nenhum produto contendo probiótico.

Avaliação nutricional: peso e altura foram coletados, através de técnicas padrão (23), e classificados através das curvas de percentis do NCHS - *National Center for Health Statistics*, ajustadas para idade e sexo (24). Foi realizado um recordatório alimentar de 24 horas, com os pais ou responsáveis, para determinar a ingestão calórica diária de cada criança. Esta análise foi feita através do software Virtual Nutri da USP (25).

Resposta imunológicas: o estado imunológico de cada criança infectada pelo HIV foi estabelecido no início da pesquisa de acordo com a classificação do CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*, para esta população (26). A contagem absoluta de células linfocitárias T-CD4 foi expressa em concentração absoluta por milímetros cúbicos (cél/mm³), e as coletas de sangue realizadas no HCC, em média, um mês antes do início do estudo e um mês após a intervenção do estudo, contabilizando três meses de intervalo entre elas.

Episódios de diarreia: a qualidade e o número de fezes foram acessados através de um questionário, composto por cinco grupos de desenhos caracterizando as fezes de líquida a normal – questionário de referência validado anteriormente (11, 27). Os pais foram solicitados a comparar cada evacuação com os desenhos e registrar o número correspondente à consistência. A frequência das fezes foi determinada através do número de evacuações durante o período de 24 horas.

Análises estatísticas: Os dados quantitativos foram descritos através de médias e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartilico (percentis 25 e 75). A comparação das características entre os grupos foi feita por teste t-Student, para variáveis categóricas, ou teste U de Mann-Whitney, para as variáveis quantitativas; e a classificação imunológica foi feita através do qui-quadrado. A consistência e frequência das fezes foram comparadas entre os dois grupos pela análise de variâncias (ANOVA), para medidas repetidas. Os valores de CD4, devido à distribuição assimétrica, foram transformados em logaritmo na base 10. A diferença entre os valores iniciais e finais, ajustados para idade e diferença dos valores iniciais, foi comparada através da análise de covariâncias (ANCOVA). O nível de significância adotado neste estudo foi de $\alpha = 0,05$. Todos os dados foram processados e analisados com o auxílio do software SPSS versão 12.0.

Segurança do produto: não há registro de efeitos adversos na ingestão diária desta quantidade de bifidobactérias, por menos de 1 ano (27, 29). Esta dose foi testada e referenciada anteriormente, com segurança, em pacientes imunocomprometidos (30).

Resultados

Características dos Pacientes: 78 foram selecionados para o estudo, dentre os quais, 76 (com idade média 6,72 anos) o completaram e 2 foram excluídos durante o seu curso (um em cada grupo), um devido à hospitalização e, outro, por falha no acompanhamento, sendo que, este último, foi incluído na análise como intenção de tratamento (*intention to treat*). Os dois grupos foram semelhantes: em distribuição de idade, peso, altura, ingestão calórica, tipo e características sócio-econômicas (tabela 1). O tempo de tratamento antiretroviral e o tipo de medicação também foram semelhantes, com uma predominância de DDI nesta população com uma prevalência de 60%, sendo 48,1% no grupo controle e 62,2% no grupo probiótico, sem diferença entre os grupos ($p = 0,343$). A classificação do estágio da doença foi estabelecida de acordo com o protocolo do CDC para estado imunológico, representado na tabela 1.

Resultados imunológicos: o grupo probiótico apresentou maiores valores iniciais de células CD4, 673 céls/mm³ vs. 580 céls/mm³ em comparação ao grupo controle, e esta diferença foi ajustada através de análises estatísticas (teste t). Ao final do estudo, observou-se um aumento na média de CD4 do grupo probióticos (791 céls/mm³) e uma pequena redução no grupo controle (538 céls/mm³), apresentados na tabela 2. Este aumento nas células CD4 ocorreu apenas nas crianças que receberam probióticos, e a diferença das médias foi de 118 céls/mm³ vs. -42 céls/mm³ ($p = 0,049$), representada pelo delta do log₁₀ de CD4.

Consistência das fezes: houve similar redução na frequência de fezes líquidas nos dois grupos ($p < 0,02$), representada pelos escores 1, 2 e 3 do questionário, com maior inclinação no grupo probiótico, porém sem diferença significativa entre os grupos ($p = 0,522$), representado na figura 1. As evacuações de fezes pastosas (score 4) diminuíram discretamente nos dois grupos ($p = 0,955$), porém o melhor resultado foi no

aumento considerável da frequência de fezes de consistência normal nos dois grupos ($p = 0,01$), com tendência maior no grupo probiótico, porém, novamente, sem diferença significativa ($p = 0,199$), figura 2.

Análises de fezes: Os exames de fezes foram descartados das análises estatísticas pelo alto índice de ausência de *Cândida* já no primeiro exame (60% da amostra total). Entretanto, o grupo controle apresentou aumento de colonização de *Cândida* - (17%) (qui-quadrado).

Ingestão calórica: todas as crianças apresentaram semelhante ingestão calórica diária, com uma média de 2.098,95 calorias no grupo probiótico, com média de 123 kcal/kgP/d; e 2.151,09 calorias no grupo controle, com média de 106 kcal/kgP/d ($p = 0,433$). Estes valores são maiores do que as necessidades para a idade, com uma adequação para idade, de acordo com a RDA, de 140,47 % vs. 147,71%, respectivamente ($p = 0,188$). Em relação à suplementação, o percentual representado pelas 14g (67 kcal) adicionadas na alimentação diária das crianças foi, em média, de 3% para os dois grupos; não sendo um valor significativo no montante calórico ingerido diariamente.

Discussão

Este estudo analisou o efeito da suplementação, por dois meses, de *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus thermophilus* em crianças infectadas pelo HIV. Os resultados mostraram que, provavelmente, estas crianças apresentam resposta imune a estas bactérias. Não houve nenhuma falha de tratamento ou troca de medicação durante o estudo que pudesse ser responsável por esta resposta. Não são todas as espécies de probióticos que têm propriedade imunomodulatória, como mostrado pelas espécies aqui estudadas, as quais aumentaram a contagem de células de CD4.

Semelhante estudo foi desenvolvido por Schifrin e colaboradores, com as mesmas bactérias suplementadas, por 3 semanas. Encontraram aumento da atividade fagocitária e da concentração sanguínea de granulócitos e monócitos, mas não puderam observar diferenças na ativação de células linfocitárias T (31).

O presente estudo não observou estes efeitos da terapia probiótica, mas o curto período de suplementação (três semanas) do estudo citado poderia ser responsável pela não estimulação das células T, pois sabemos que é necessário ao menos um mês de administração das bactérias (6, 14, 32). A contínua suplementação dos probióticos e sua permanente colonização parece não ser a melhor maneira de administração, já que a propriedade imunoestimulatória dos probióticos necessita de doses alternadas para promover a estimulação imunológica (33).

Estudos foram realizados com crianças HIV+ (16, 20), mas nenhum associado às células CD4. Em um estudo com adultos HIV+, avaliou-se o efeito da suplementação de *Lactobacillus rhamnosus GG* na diarreia infecciosa e nos sintomas gastrointestinais, porém sem encontrar efeitos significativos na resposta de CD4, como encontramos. Provavelmente, e reforçando, devido ao curto espaço de tempo da administração (duas semanas) e pela pequena amostra (n = 17) (34).

Em pacientes com SIDA, diversos fatores podem ser geradores de confusão em estudos de associação de causa-efeito. Vieses além da terapia antiretroviral não foram especificamente observados neste estudo, pelo extenso período de desenvolvimento e pela heterogeneidade da população. Devemos ter cautela no estabelecimento de associações de causa-efeito, e mais estudos são necessários para confirmar estes dados aqui apresentados.

Uma explicação razoável para a estimulação dos valores de CD4+ é de que a resposta imunológica iniciada na MALT pode afetar a resposta imunológica de outras superfícies de mucosa, as quais atravessam as placas de Peyer e estimulam a produção de linfócitos T, induzindo, assim, a resposta de células B, pela modulação da composição da microflora intestinal destes pacientes (3, 15).

Diversos fatores clínicos e sociais podem afetar o estado funcional e a qualidade de vida de crianças infectadas pelo HIV. A administração permanente de medicações, para controlar o progresso da doença, apresenta diversos efeitos colaterais e potencial de toxicidade (35). A má absorção nestas crianças contribui diretamente para a diminuição da contagem de CD4 (36). Por isto, para reverter o desajuste imunológico, é importante restaurar a função digestiva e absorptiva do intestino o mais precocemente possível no estágio da doença (3). Como sugerem nossos resultados, já que a ingestão calórica foi suficiente para a idade e igual para os dois grupos. Este estudo mostrou relativa importância como coadjuvante da terapia antiretroviral.

Nossos resultados são particularmente estimulantes, pois nem toda bactéria candidata a probiótico demonstra eficácia e nem todas são eficientes em cada doença. A microflora intestinal tem um único ponto largamente inexplorado, suas propriedades imunomodulatórias endógenas, sendo que esta espécie de probiótico estudada demonstrou sua provável capacidade de promover o sistema imunológico. Por isto, acreditamos que a reabilitação da microflora, através da terapia probiótica, pode aumentar a contagem de células CD4, permitindo uma parcial recomposição da resposta do sistema imune de crianças infectadas pelo HIV.

A eficácia dos probióticos no tratamento de doenças gastrointestinais é bem estabelecida na literatura, especialmente na prevenção e tratamento de diarreia. Assim, nossos resultados foram surpreendentes, pois não encontramos diferença significativa

na diarreia entre os grupos com as espécies utilizadas (36, 30). Na Literatura há um estudo de Thibault e colaboradores (2004), com as mesmas cepas, que encontrou uma redução nos episódios de diarreia e diminuição do tempo de internação hospitalar, porém, também, sem diferença significativa. A hipótese do estudo é de que a terapia antiretroviral, especialmente o DDI (presente em 60% dos pacientes) – por apresentar a diarreia com efeito colateral –, possa ter influenciado na resposta do probiótico sobre a diarreia (35).

Já a escolha da *Cândida sp* como marcador para o efeito do probiótico no intestino, através da análise de fezes, deu-se pela presença comum deste patógeno na população estudada, de 40 a 80% e, por esta apresentar grande resistência, podendo ser extremamente infectante. Outro fator é que os probióticos são capazes de competir e reduzir sua colonização, diminuindo o risco de translocação da *Cândida* (37, 38, 39, 40). Porém os exames de fezes foram descartados das análises estatísticas pelo alto índice de ausência de *Cândida* já no primeiro exame (60% da amostra total) – valores esses discordantes da literatura –, não permitindo a realização das análises estatísticas. Mesmo sem realizar as análises, com estes resultados, pudemos observar que os indivíduos com piora (aumento de colonização de *cândida*) apresentavam-se no grupo controle (17%) (qui-quadrado).

Conclusão

Neste estudo o grupo probiótico mostrou provável propriedade imunoestimulatória, o que pode ser um coadjuvante no tratamento da AIDS, na busca por qualidade de vida. Os resultados não comprovaram efeito dos probióticos na diarreia, nem sobre a inibição da colonização de *Cândida*, porém demonstraram sensível diminuição da frequência de fezes líquidas nesta população. A proposta deste estudo

não era a recomendação de mudanças no tratamento padrão da doença, e sim auxiliar numa melhor qualidade de vida desta população. A terapia probiótica pode auxiliar na melhora do sistema imune, através da restauração da função digestiva e absorptiva da mucosa intestinal. Porém mais estudos são necessários para comprovar estes resultados e aprofundar mais o conhecimento sobre a flora intestinal de crianças infectadas pelo HIV, mediante técnicas simples, baratas e, acima de tudo, não invasivas.

Referência Bibliográfica:

1. Yolken RH, Hart W, Oung I, et al. Gastrointestinal dysfunction and disaccharide intolerance in children infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr* 1991; 118(3):359-363.
2. Ansari NA, Kombe AH, Kenyon TA, Mazhani L, et al. Pathology and causes of death in a series of human immunodeficiency virus-positive and negative pediatric referral hospital admissions in Botswana. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:43-7.
3. Guarino A, Spangnolo MI, Giacomet V, et al. Effects of nutritional rehabilitation on intestinal function and on CD4 cell number in children with HIV. *JPGN* 2002;34:366-371.
4. Miller TL, McQuinn L, Orav EJ. Upper gastrointestinal endoscopy as a diagnostic tool for children with human immunodeficiency virus infection. *J Pediatr* 1997;130:766-773.
5. Miller TL. Nutritional Interventions in Pediatric HIV: It's hard to hit a moving target. *JPGN* 2002;34(4):353-356.
6. Johnson S, Hendson W, Crewe-Brown H, et al. Effect of human immunodeficiency virus infection on episodes of diarrhea among children in South Africa. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:972-9.
7. Ball CS. Global Issues in Pediatric Nutrition: AIDS. *Nutrition* 1998;14(10):767-770.
8. Jirapinyo P, Brewster D, Succi RCM, et al. HIV Disease: Working group report of the first world congress of pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition. *JPGN* 2002;35(2):S134-S142.
9. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 1991;32:439-442.
10. Fuller R and Gibson GR. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand J Gastroenterol* 1997;32(Suppl)222:28-31.

11. Vanderhoof JA. Probiotics: future directions. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):1152S-5S.
12. Tuomola E, Crittenden R, Playne M, et al. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):393S-8S.
13. Duggan C, Gannon J and Walker WA. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 2002;75:789-808.
14. Kalliomäki M and Isolauri E. Role of intestinal flora in development of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3:15-20.
15. Wolf BW, Wheeler KB, Ataya DG, et al. Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* supplementation to a population infected with the human immunodeficiency virus. *Food Chem Toxicol* 1998;36:1085-94.
16. Cunningham-Rundles S, Ahrné A, Bengmark S, et al. Probiotics and immune response. *Am J Gastroenterol* 2000;95:S22-5.
17. Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, et al. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin Inf Dis* 2003;36:775-80.
18. Penna FJ, Filho LAP, Calçado AC, et al. Up-to-date clinical and experimental basis for the use of probiotics. *J Pediatr* 2000;76(suppl.2):209S-217S.
19. Butensky EA. The role of nutrition in pediatric HIV/AIDS: A review of micronutrient research. *J Pediatric Nurs* 2001;16(6):402-411.
20. Lindsey JC, Hugles MD, McKinney RE, Cowles MK 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.
21. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, et al. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):444S-50S.

22. Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, et al. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium “The intelligent intestine”, held in Paris, June 14, 2002. *Am J Clin Nutr* 2003;78:675-83.
23. Frisancho AR. Triceps skin fold and upper arm muscle size norms for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr* 1974; 27:1052-1058.
24. Ogden CL, Kuczmarski RJ, Flegal KMF, et al. Centers for Disease Control and Prevention 2000 Growth Charts for the United States: Improvements to the 1977 National Center for Health Statistics Version. *Pediatrics* 2001;109(1):45-60.
25. Philippi ST, Szarfarc SC, Latterza AR. Virtual Nutri [software], versão 1.0, for Windows. Departamento de Nutrição/Faculdade de Saúde Pública/USP. São Paulo, 1996.
26. Caldwell MB, Oxtobv MJ, Simonds RJ, et al. 1994 Revised classification system for Human Immunodeficiency Virus Infection in children less than 13 years of age. CDC – MMWR Recommendations and Reports 1994;43:1-10.
27. Young RJ, Beerman LE, Vanderhoof JE. Increasing oral fluids in chronic constipation in children. *Gastroenterol Nurs* 1998;21:156-61.
28. SPSS version 12.0.2, for Windows. SPSS Inc., 2003; Chicago, Illinois, USA.
29. Thibault H, Aubert-Jacquin C, and Goulet O. Effects of long-term consumption of a fermented infant formula (with *Bifidobacterium breve* c50 and *Streptococcus thermophilus* 065) on acute diarrhea in healthy infants. *JPGN* 2004;39:147-152.
30. Davidson GP, Butler RN. Probiotic in pediatric gastrointestinal disorders. *Curr Opin Pediatr* 2000;12:477-481.
31. Schiffrin EJ, Brassart D, Servin AL, et al. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am J Clin Nutr* 1997;66:515S-20S.

32. Saavedra JM, Bauman NA, Oung I et al. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994;344:1046-9.
33. Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonons DL, et al. *Lactobacillus GG* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr* 1999;135(5):564-569.
34. Salmine MK, Tynkkynen S, Rautelin H, et al. The efficacy and safety of probiotic *Lactobacillus rhamnosus GG* on prolonged, noninfectious diarrhea in HIV patients on antiretroviral therapy: A randomized, placebo-controlled, crossover study. *HIV Clin Trials* 2004;5(4):183-191.
35. Miller TL, Mawn BE, Orav EJ, Wilk D et al. The effect of protease inhibitor therapy on growth and body composition in Human Immunodeficiency Virus type 1-infected children. *Pediatrics* 2001;107(5):1-6.
36. Missmer SA, Spiegelman D, Gorbach SL and Miller TL. Predictors of Change in the Functional Status of Children with Human Immunodeficiency Virus Infection. *Pediatrics* 2000;106(2):1-7.
37. Penna FJ, Filho LAP, Calçado AC, et al. Up-to-date clinical and experimental basis for the use of probiotics. *J Pediatr* 2000;76(suppl.2):209S-217S.
38. Miller TL, McQuinn LB, and Orav EJ. Endoscopy of the gastrointestinal tract as a diagnostic tool for children with human immunodeficiency virus infection. *J Pediatr* 1997;130(5):766-774.
39. Sullivan D and Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol* 1998;36(2):329-334.
40. Colombo AL and Guimarães T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. *Rev Soc Br Medic Trop* 2003;36(5):599-607.

TABELAS

Table 1. Características dos Pacientes (n= 77) do estudo

Características:		Grupo Probiótico (n = 38)	Grupo Controle (n = 39)	p	teste
Sexo	Masculino	19 (50)	17 (43,6)	0,737	#
	Feminino	19 (50)	22 (56,4)	-	
Idade Média (anos)		6,33 (\pm 2,1)	7,12 (\pm 2,52)	0,141	*
Z score Peso/Altura (média)		- 0,02 (\pm 0,74)	0,35 (\pm 0,783)	0,46	*
Educação Materna	Média de anos	5,78 (\pm 2,5)	6,21 (\pm 2,65)	0,478	*
Renda Percapita (R\$)	Média/Mediana	126,00/80,88 (\pm 106)	100,00/80,00 (\pm 72)	0,574	+
Tratamento:					
HAART		18 (48,6)	24 (61,5)	0,369	#
Não-HAART		20 (51,4)	15 (38,5)		
DDI		24 (62,2)	19 (48,70)	0,343	#
Recordatório Alimentar:					
Ingestão calória	Kcal/dia	2098,95 (\pm 313,44)	2151,09 (\pm 265,89)	0,433	*
Adequação média de calórica/idade (%)		140,47	147,71	0,188	*
RDA	Kcal/kg/dia	114 (\pm 38)	107(\pm 30)	0,333	*
CDC classificação:					
Severo - 3		2 (2,66)	6 (8)	0,254	#
Moderado - 2		17 (22,66)	17 (22,66)		
Normal - 1		19 (25,35)	14 (18,66)		

Nota: valores apresentados em média e/ou mediana (\pm desvio padrão) ou frequência absoluta (percentual). * teste t-Student; # qui-quadrado de Pearson; + Mann Whitney.

HAART = *highly active antiretroviral therapy*; R\$ = reais; CDC classificação = Estado Imunológico por idade baseado na classificação do CDC.

Table 2. Resposta Imunológica dos pacientes (n = 77) do estudo (início e fim)

		Grupo Probiótico (n = 38)	Grupo Controle (n = 39)	p	teste
CD4 count (cells/mm ³)	início ⁽¹⁾	673 (528;962)	580 (337;821)		
	final ⁽¹⁾	791 (509;951)	538 (332;789)		
log ₁₀ CD4	início ⁽²⁾	2,83 (± 0,19)	2,69 (± 0,33)	0,35	*
	final ⁽²⁾	3,86 (± 0,27)	2,67 (± 0,30)	0,05	*
Δ log ₁₀ CD4	final – inicial ⁽²⁾	0,04 (± 0,19)	-0,26 (± 0,16)	0,048	@

Nota: ⁽¹⁾ valores apresentados em mediana (intervalo interquartilico); ⁽²⁾ valores apresentados em média (± desvio padrão); * teste t-Student; @ Ancova ajustado para idade e CD4 inicial.

FIGURAS

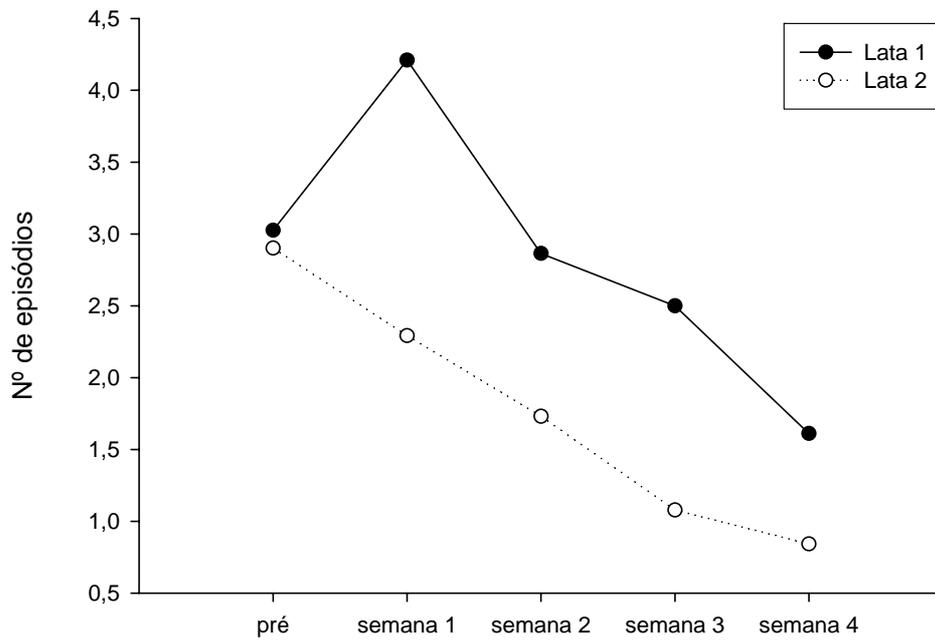


Fig 1. Número de evacuações líquidas uma semana antes do estudo e quatro semanas durante o uso de probióticos (grupo 2) e controle (grupo 1).

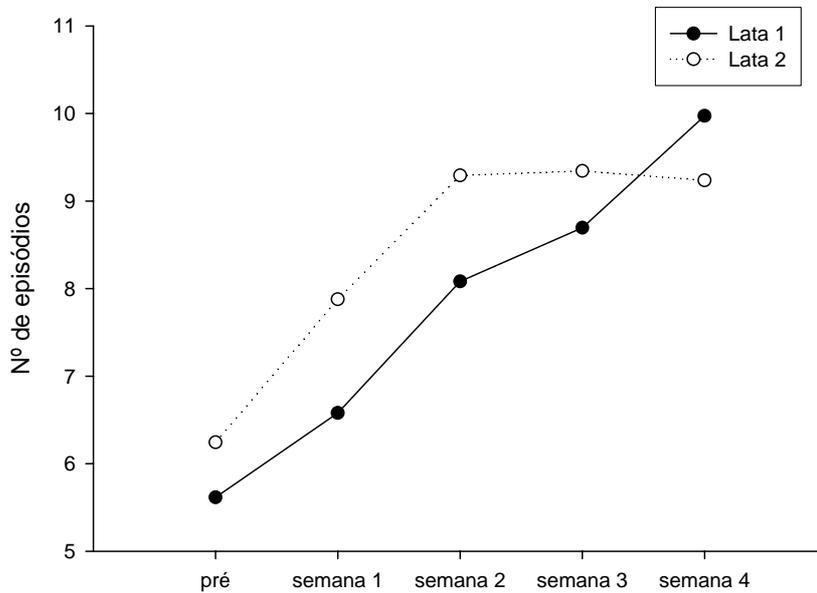


Fig 2. Número de evacuações normais uma semana antes do estudo e quatro semanas durante o uso de probióticos (grupo 2) e controle (grupo 1).

Referência Bibliográfica

1. Abrams EJ. Opportunistic infections and other clinical manifestations of HIV disease in children. *Pediatr Clin North Am* 2000;47(1):79-104.
2. Adolfsson O, Meydani SN, and Russell RM. Yogurt and gut function. *Am J Clin Nutr* 2004;80:245-56.
3. Ansari NA, Kombe AH, Kenyon TA, Kenyon TA, Mazhani L, Binkin N, et al. Pathology and causes of death in a series of human immunodeficiency virus-positive and negative pediatric referral hospital admissions in Botswana. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:43-7.
4. Ball CS. Global issues in pediatric nutrition: AIDS. *Nutrition* 1998;14(10):767-770.
5. Bengamark S. Colonic food: pré- and probiotics. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(1)suppl:5S-7S.
6. Benjamin DKJr, Miller WC, Benjamin DK, Ryder RW, Weber DJ, Walter E, et al. A comparison of height and weight velocity as a part of the composite endpoint in pediatric HIV. *AIDS* 2003;17:2331-2336.
7. Bezkorovainy A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):399S-405S.
8. Bongaerts GPA and Severijnen RSVM. Preventive and curative effects of probiotics on atopic patients. *Med Hypotheses* 2005;64:1089-1092.
9. Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J, Vaara M, et al. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin Inf Dis* 2003;36:775-80.

10. Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, and Braesco V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium “The intelligent intestine”, held in Paris, June 14, 2002. *Am J Clin Nutr* 2003;78:675-83.
11. Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, Duggan C, Gannon J, and Walker WA. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 2002;75:789-808.
12. Butensky EA. The role of nutrition in pediatric HIV/AIDS: A review of micronutrient research. *J Pediatric Nurs* 2001;16(6):402-411.
13. Caldwell MB, Oxtobv MJ, Simonds RJ, Lindegren ML, Rogers MF. 1994 Revised classification system for Human Immunodeficiency Virus Infection in children less than 13 years of age. *CDC – MMWR Recommendations and Reports* 1994;43:1-10.
14. Colombo AL and Guimarães T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. *Rev Soc Br Medic Trop* 2003;36(5):599-607.
15. Cross M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002;34(4):245-253.
16. Cunningham-Rundles S, Ahrné A, Bengmark S, Johann-Liang R, Marshall F, Metakis L, et al. Probiotics and immune response. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(suppl):22S-25S.
17. Dankner WM, Lindsey JC, and Levin MJ. Correlates of opportunistic infections in children infected with the human immunodeficiency virus managed before highly active antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20(1):40-48.

18. Davidson GP, and Butler RN. Probiotic in pediatric gastrointestinal disorders. *Curr Opin Pediatr* 2000;12:477-481.
19. Duggan C, Gannon J, and Walker WA. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 2002;75:789-808.
20. Erickson KL, and Hubbard NE. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr* 1999;april(suppl):Washington.
21. ESPGHAN Committee on Nutrition: Agostoni C, Axelsson I, Braegger C, Goulet O, Koletzko B, Michaelsen KF, et al. Probiotic bacteria in dietetic products for infants: A commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *JPGN* 2004;38:365-374.
22. Floch MH. Use of diet and probiotic therapy in the irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2005;39(suppl3):243S-245S.
23. Frisancho AR. Triceps skin fold and upper arm muscle size norms for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr* 1974;27:1052-1058.
24. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 1991;32:439-442.
25. Fuller R and Gibson GR. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand J Gastroenterol* 1997;32(Suppl)222:28-31.
26. Grönlund M, Lehtonen P, Eerola E, and Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *JPGN* 1999;28:19-25.
27. Guandalini S, Pensabene L, Zikri A, Dias AJ, Casali L, Hoekstra A, et al. *Lactobacillus GG* administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhoea: A multicenter European trial. *JPGN* 2001;30:54-60.

28. Guarino A, Spagnuolo MI, Giacomet V, Canani RB, Bruzzese E, Giaquinto C, et al. Effects of nutritional rehabilitation on intestinal function and on CD4 cell number in children with HIV. *JPGN* 2000;34(4):366-371.
29. Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo ACM, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijin N, Bindels JG, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *JPGN* 2000;30(1):61-67.
30. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth, and Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):365S-72S.
31. Ishibashi N, Yamazaki S. Probiotic and safety. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):465S-70S.
32. Isolauri E, Arvola T, Sutas Y, Moilanen E, Salminen S. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1604-10.
33. Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):444S-50S;
34. Jirapinyo P, Brewster D, Succi RCM, Guarino A, Heyman M, Winter H, et al. HIV disease: Working group report of the first world congress of pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition. *JPGN* 2002;35(2):134S-142S.
35. Johnson S, Hendson W, Crewe-Brown H, Dini L, Freaun J, Perovic O, et al. Effect of human immunodeficiency virus infection on episodes of diarrhea among children in South Africa. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:972-9.

36. Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virtanen E, Laine S, and Arvilommi H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human lactobacillus strain. *Pediatr Res* 1992;32:141-144.
37. Kalliomäki M and Isolauri E. Role of intestinal flora in development of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3:15-20.
38. Kalliomäki M, Salmine S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2001;357:1076-79.
39. Kalliomäki M, Salmine S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;361:1869-71.
40. Langherndries JP, Detry J, Van HeesJ, Lamboray JM, and Darimont J. Effect of a fermented infant formula containing viable Bifidobacteria on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. *JPGN* 1995;21:177-181.
41. Levy J. The effects of antibiotic use on gastrointestinal function. *Am J Gastroenterol* 2000;95(1)suppl:8S-10S.
42. Lin H, Su B, Chen A, Lin T, Tsai C, Yeh T, et al. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2005;115(1):1-4.
43. Lindsey JC, Hugles MD, McKinney RE, Cowles MK, Englund JA, Baker CJ, 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.

44. Majamaa H, Isolauri E, Saxelin M, and Vesikari T. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenterites. *JPGN* 1995;20:333-338.
45. Markowitz JE e Bengmark S. Probiotics in health and disease in the pediatric patient. *Pediatr Clin North Am* 2002;49(1):127-141.
46. Marteau PR, Vrese M, Cellier CJ, and Schrezenmeir J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):430S-6S.
47. Martin R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 2003;143:754-8.
48. Masco L, Huys G, De Brandt E, Temmerman R, and Swings J. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *Int J Food Microbiol* 2005;102:221-230.
49. Mattar AF, Drongowski RA, Coran AG. Effect of probiotics on enterocyte bacterial translocation in vitro. *Pediatr Surg Int* 2001;17:265-268.
50. Miller TL. Nutritional interventions in pediatric HIV: It's hard to hit a moving target. *JPGN* 2002;34(4):353-356.
51. Miller TL, Mawn BE, Orav EJ, 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(5):1-6.
52. Miller TL, McQuinn LB, and Orav EJ. Endoscopy of the gastrointestinal tract as a diagnostic tool for children with human immunodeficiency virus infection. *J Pediatr* 1997;130(5):766-774.

53. Miller TL, Orav J, Martin SR, Cooper ER, McIntosh K, and Winter HS. Malnutrition and carbohydrate malabsorption in children vertically transmitted human immunodeficiency virus 1 infection. *Gastroenterology* 1991;100:1296-1302.
54. Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde – Programa Nacional de DST e AIDS. *Boletim Epidemiológico AIDS e DST* 2004;ano I(01).
55. Missmer SA, Spiegelman D, Gorbach SL and Miller TL. Predictors of change in the functional status of children with Human Immunodeficiency Virus Infection. *Pediatrics* 2000;106(2):1-7.
56. Neumann E, Oliveira MAP, Cabral CM, Moura LN, Nicoli JR, Vieira EC, et al. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. *Braz J Med Biol Res* 1998;31(12):1565-1573.
57. Ogden CL, Kuczmarski RJ, Flegal KM, Mei Z, Guo S, Wei R, et al. Centers for disease control and prevention 2000 growth charts for the United States: Improvements to the 1977 National Center for Health Statistics Version. *Pediatrics* 2001;109(1):45-60.
58. Penna FJ, Filho LAP, Calçado AC, Junior HR, Nicolli JR. Up-to-date clinical and experimental basis for the use of probiotics. *J Pediatr (Rio J)* 2000;76(suppl2):209S-217S.
59. Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Rachid M, Agüero, and Gobbato N. Symposium: Probiotic bacteria for humans: clinical systems for evaluation of effectiveness. *J Dairy Sci* 1995;78(7):1597-1606.
60. Perdigón G; Holgado APR. Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria. In: FULLER, R.; PERDIGÓN, G. *Probiotics 3: Immunodulation by the gut microflora and probiotics*. Dordrecht: Kluwer Academic 2000;213-233.

61. Pessi T, Sütas Y, Hurme M, and Isolauri E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus GG*. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1804-1808.
62. Philippi ST, Szarfarc SC, Latterza AR. Virtual Nutri [software], versão 1.0, for Windows. Departamento de Nutrição/Faculdade de Saúde Pública/USP. São Paulo, 1996.
63. Rinne M, Kalliomaki M, Arvilommi H, Salminen S and Isolauri E. Effect of probiotic and breastfeeding on the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus/Enterococcus* microbiota and humoral immune responses. *J Pediatr* 2005;147:186-91.
64. Saavedra J. Probiotics and infectious diarrhea. *Am J Gastroenterol* 2000;95(suppl):16S-18S.
65. Saavedra JM. Clinical applications of probiotic agents. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):1147S-51S.
66. Saavedra J, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken R. Effect of long term consumption of infant formulas with *Bifidobacteria* and *S. Thermophilus* on stool patterns and diaper rash infants. *JPGN* 1998;27(4):483.
67. Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA, Yolken RH. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994;344:1046-9.
68. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit J Nut* 1998;80(suppl.1):147S-171S.
69. Salminen S e Salminen E. Lactulose, lactic acid bacteria, intestinal microecology and mucosal protection. *Scand J Gastr* 1997;32(suppl222):45-48.

70. Salminen MK, Rautelin H, Tynkkynen S, Poussa T, Saxelin M, Valtonen V, et al. *Lactobacillus* bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic *L. Rhamnosus GG*. *CID* 2004;38(1):62-66.
71. Salminen MK, Tynkkynen S, Rautelin H, Poussa T, Saxelin M, Ristola M, et al. The efficacy and safety of probiotic *Lactobacillus rhamnosus GG* on prolonged, noninfectious diarrhea in HIV patients on antiretroviral therapy: A randomized, placebo-controlled, crossover study. *HIV Clin Trials* 2004;5(4):183-191.
72. Sampaio MMSC. Probióticos: Aspectos atuais. 58º Curso Nestlé de Atualização em Pediatria 2001;182-189.
73. Saran S, Gopalan S, and Krishna P. Use of fermented foods to combat stunting and failure to thrive. *Nutrition* 2002;18(5):393-396.
74. Schaible U, and Kaufmann SHE. A nutritive view on the host-pathogen interplay. *Trends Microbiol* 2005;13(8):373-380.
75. Schiffrin EJ, Brassart D, Servin AL, Rochat F, Donnet-Hughes A. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am J Clin Nutr* 1997;66:515S-20S.
76. Schrezenmeir J and Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):362S-4S.
77. Shornikova AV, Isolauri E, Burkanova L, Lukovnikova S, and Vesikari T. A trial in the Karelian Republik of oral rehydration and *Lactobacillus GG* for treatment of acute diarrhoea. *Acta Pediatr* 1997;86:460-465.
78. Silva LP e Stamford TLM. Alimentos probióticos: uma revisão. *Higiene Alim* 2000;14(68):41-50.
79. SPSS version 12.0.2, for Windows. SPSS Inc., 2003; Chicago, Illinois, USA.

80. Soli-Pereyra B, Aattouri N, and Lemonnier D. Role of food in the stimulation of cytokine production. *Am J Clin Nutr* 1997;66:521S-5S.
81. Stanton C, Gardiner G, Meehan H, Collins K, Fitzgerald G, Lynch PB, et al. Market potential for probiotics. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):476S-83S.
82. Succi RCM. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). *Infectologia Pediátrica*. Ed. Atheneu. São Paulo/1998, 2ª ed.; 56: 488-496.
83. Sullivan D and Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol* 1998;36(2):329-334.
84. Tanner JM, Davies PSW, and Phil M. Clinical longitudinal standards for height and height velocity for North American children. *J Pediatr* 1985;107(3):317-329.
85. Tannock GW. Molecular assessment of intestinal microflora. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):410S-4S.
86. Trabulsi LR, Schiffrin EJ, Sampaio MMC, Saavedra JM. Os probióticos e a saúde infantil. In: *Temas de Pediatria*, Nestlé, São Paulo, 2000.
87. Tuomola E, Crittenden R, Playne M, Isolauri E, and Salminen S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):393S-8S.
88. Vanderhoof JA. Food hypersensitivity in children. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998;1(5):419-22.
89. Vanderhoof JA. Probiotics: future directions. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):1152S-5S.
90. Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, Hanner T, Lupo JV, and Young J. *Lactobacillus GG* in prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr* 1999;135(5):564-568.

91. Vitini E. Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell* 2000;24(3):223-232.
92. Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, and Schrezenmeir J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):421S-9S.
93. Wang K, Li S, Liu C, Liu C, Perng D, Su Y, Wu D, et al. Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *Am J Clin Nutr* 2004;80:737-41.
94. Wolf BW, Wheeler KB, Ataya DG, Garleb KA. Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* supplementation to a population infected with the human immunodeficiency virus. *Food Chem Toxicol* 1998;36:1085-94.
95. Yasui H, Shida K, Matsuzaki T, Yokokura T. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J General Molecular Microbiology* 1999;76(1):383-389.
96. Yolken RH, Hart W, Oung I, Schiff C, Greenson J, Perman JA. Gastrointestinal dysfunction and disaccharide intolerance in children infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr* 1991;118(3):359-363.
97. Young RJ, and Huffman S. Probiotic use in children. *J Pediatr Health Care* 2003;17:277-283.
98. Young RJ, Beerman LE, Vanderhoof JE. Increasing oral fluids in chronic constipation in children. *Gastroenterol Nurs* 1998;21:156-61.

ANEXOS

ANEXO 1.Classificação Proposta pelo CDC para a Infecção pelo HIV em Crianças (1994)

Categorias Imunológicas:	Categorias Clínicas/Sinais ou Sintomas:			
	N: Ausentes	A: Leves	B: Moderados	C: Severos
1. Sem supressão	N1	A1	B1	C1
2. Supressão moderada	N2	A2	B2	C2
3. Supressão severa	N3	A3	B3	C3

Categorias Imunológicas com base na contagem de Linfócitos CD4+ proposta pelo CDC (1994)

Categoria Imune:	Idade da Criança			
	1 a 5 anos		6 a 12 anos	
	nº/ul	(%)	nº/ul	(%)
Categoria 1 sem supressão	>1.000	>=25	>=500	>=25
Categoria 2 supressão moderada	500 a 999	15 a 24	200 a 499	15 a 24
Categoria 3 supressão severa	<500	<15	<200	<15

ANEXO 2 - Formulários de pesquisa:**DADOS DO PACIENTE:****Data:** ____ / ____ / ____

Nome: (iniciais)

Fone: _____

Responsável: _____

Idade: _____ Sexo: () M () F Classificação da doença: _____

Altura: _____ Peso: _____ IMC: _____

Patologias Atuais: _____

Medicamentos: _____

Intolerância/Alergias Alimentar: _____

Consumo de Líquidos: _____

Condições Habitacionais: (*higiênico sanitário*)

Rede de água e esgoto = _____ Geladeira = _____

Filtro de água = _____ Eletricidade = _____

Escolaridade: mãe _____ pai = _____

Renda familiar média (per capita) = _____

Valores Laboratoriais:

<i>Data dos exames:</i>				
CD4:				
CD8:				
Carga Viral:				
Peso:				
Altura:				
Percentil de Peso/Altura:				
Percentil de Altura/Idade:				
IMC:				

ANEXO 3 – Formulário de Recordatório Alimentar

Nome: _____

Responsável: _____

Recordatório de 24 horas:

<i>Refeição:</i>	<u><i>Horário</i></u>	<u><i>Alimento</i></u>	<u><i>Quantidade</i></u>
Café da Manhã			
Lanche da Manhã			
Almoço			
Lanche da Tarde			
Janta			
Ceia			
Líquidos			
Alimentos fora de hora			

ANEXO 5

- 1. Resolução dos Comitês de Ética em Pesquisa**
- 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 03-096

Versão do Projeto: 25/04/2003

Versão do TCLE: 02/05/2003

Pesquisadores:

ERNANI MIURA

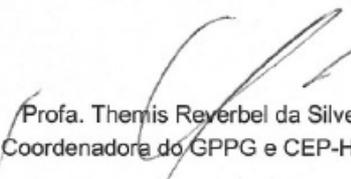
MARCELO ZUBARAN GOLDANI

LÍVIA TROIS DE OLIVEIRA

Título: ENSAIO CLÍNICO COM PROBIÓTICOS EM CRIANÇAS HIV POSITIVO
OBSERVANDO: FUNÇÃO GASTROINTESTINAL E RESPOSTA IMUNOLÓGICA.

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

Porto Alegre, 02 de maio de 2003.


Profa. Themis Reverbél da Silveira
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO

CEP - GHC

RESOLUÇÃO

Porto Alegre, 17 de julho de 2003.

O Comitê de Ética em Pesquisa-CEP-GHC, que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS, em reunião ordinária em 16/07/2003 analisou o projeto de pesquisa:

Nº 038/03

Título Projeto: Ensaio clínico randomizado duplo cego (controlado com placebo) usando probióticos em crianças HIV Positivo observando: função gastrointestinal e resposta imunológica.

Pesquisador(es): Livia Trois de Oliveira
Edmundo Machado Cardoso
Ernani Miura

PARECER:

Documentação: Aprovada

Aspectos Metodológicos: Aprovados

Aspectos Éticos: Aprovados

Parecer final: Este projeto, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de **APROVADO**, neste CEP.

Grupo e área temática: Projeto pertencente ao Grupo III – Área Temática: Ciências da Saúde (nutrição – 4.05).

Considerações finais: Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/GHC. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do CEP/GHC. O autor deverá encaminhar relatórios semestrais sobre o andamento do projeto. Após conclusão do trabalho, o pesquisador deverá encaminhar relatório final ao Centro de Resultados onde foi desenvolvida a pesquisa e ao Comitê de Ética em Pesquisa.


DR. ALEXANDRE HORETTO
ASSISTENTE COORDENADOR CENTRO RESULTADOS
ATIV. IDENTIFIC. PESQUISA - CEP/GHC


Dr. Julio Baldisserotto
Coordenador
Comitê de Ética do GHC

Termo do Consentimento Livre e Esclarecido

Ensaio Clínico com Probióticos em crianças HIV positivas, observando: função gastrointestinal e resposta imunológica

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em crianças é um grave problema mundial que atinge todo o mundo. Entre os muitos problemas destas crianças, estão as infecções bacterianas, diarreia e falta de ganho em peso e altura perda de peso e de altura (falha no crescimento). Existem leites em pó com *bifidobactérias vivas* que também são encontradas em iogurtes, que produzem uma melhora da função do intestino. Estamos realizando este estudo para verificar se um leite com bifidobactérias vivas, chamado BIO NAN₂[®], é capaz de modificar e melhorar a defesa do organismo, provocando menos diarreia, menos infecções e maior ganho de peso e de altura. O leite deverá ser tomado 2 vezes por dia durante dois meses.

Para a realização deste estudo será preciso conhecer o resultado dos exames que são realizados habitualmente durante o tratamento da criança. Pedimos sua autorização para que os pesquisadores possam ter acesso aos resultados dos exames de sangue de rotina realizados na instituição uma vez por mês (CD4 e CD8), e, para a realização de dois exames de fezes. As mães deverão comunicar ao pesquisador como são as fezes da criança.

As crianças serão sorteadas e divididas em dois grupos: 1 (um) que irá tomar o leite com as bifidobactérias- com uma possível melhora da defesa do organismo; e, o outro grupo (controle), irá receber um produto parecido com este mas sem as bactérias -- NAN₂. A chance de entrar no grupo 1 ou no grupo 2 é a mesma (50%). Nem um dos dois produtos apresenta risco ou dano à saúde das crianças; e, os dois são alimentos importantes para o crescimento da criança.

O estudo será realizado no Hospital Conceição no Grupo de Atenção à AIDS Pediátrica pela Nutricionista Livia Trois de Oliveira, com orientação e acompanhamento de Médico Pediatra do local, Dr. Edmundo Cardoso; e, tendo como professor orientador da pesquisa o Dr. Emani Miura, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Por isto, seu (sua) filho (a) esta sendo convidado a participar do estudo.

É importante lembrar que o Bio Nan₂ e o Nan₂ são leites de boa aceitação, não produzindo nenhum desconforto para a criança e nem riscos à saúde da criança. Você

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA

02.1.05.12.002
WC 030916

poderá entrar em contato com os pesquisadores em qualquer dúvida ou para dar alguma informação, através dos telefones a baixo relacionados.

Você será informado(a), em qualquer momento sobre o andamento do estudo. Entretanto, caso você desista de fazer parte deste estudo, você poderá retirar o consentimento a qualquer momento e sair da pesquisa sem prejuízo no tratamento que seu filho venha a receber na instituição. O caráter confidencial do estudo garante que o nome dos participantes não será divulgado. Da mesma forma, não haverá qualquer custo adicional, pois já está contemplado pelo orçamento da pesquisa.

Os pesquisadores a seguir, estarão a disposição para quaisquer dúvidas que possam surgir em decorrência do presente trabalho de pesquisa: Dr. Emami Miura – CRM 4656 (F: 3332-4155)- Pesquisador Responsável; Lívia Trois de Oliveira – CRN₂: 4699 (F: 3381-2346 ou 9963-3961) - Pesquisador; Dr. Edmundo Cardoso- CRM 5898 (F: 33411300 R 2710)- Pesquisador Colaborador.

Assim sendo, tenho ciência do exposto acima e dou meu consentimento para que meu filho _____ participe da pesquisa e utilize o produto como método terapêutico recomendado pelo pesquisador que subscreve este documento. Eu _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente de meus direitos, concordo em participar deste estudo.

_____ Data : ____ / ____ / ____

Assinatura do Pai ou Responsável Legal

_____ Data : ____ / ____ / ____
Pesquisador Responsável

_____ Data : ____ / ____ / ____
Pesquisador

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA

02 / 05 / 2003
nr 0309b

ANEXO 6 - Apresentações do trabalho em Congresso

Apresentação Oral Tema Livre

1. XIV Congresso Brasileiro de Infectologia Pediátrica, III Jornada Paranaense de Infectologia Pediátrica. Foz do Iguaçu/PR, abr/2005.
2. Congresso Nacional de Pediatria Região Sul. 08 a 11 de Junho de 2005. Florianópolis/SC, jun /2005.

Apresentação de Pôster

1. XII Congresso Brasileiro de Gastroenterologia Pediátrica, II Congresso Brasileiro de Hepatologia Pediátrica. Gramado/RS, nov/2005.

ANEXO 7 – Tabela do banco de dados dos pacientes da pesquisa**A) Tabela das características sócioeconômicas:**

PAC.	sx	DN	P	Alt	R\$ PC	escol	CDC	imun	LATA
AR	1	30/11/1997	16,30	107,00	96,00	3	C	1	2
ASC	2	8/1/1998	20,40	113,00	80,00	6	A	2	1
AGN	1	17/5/1998	17,80	105,50	70,00	4	A	2	1
ALP	1	4/1/1995	30,30	131,00	83,00	5	B	3	2
ARF	1	22/6/1998	19,00	103,50	95,00	7	C	3	1
ASM	2	22/9/1994	23,90	126,00	80,00	6	A	3	1
AS	2	8/6/1994	23,30	124,00	160,00	5	C	3	1
AAR	2	3/4/1995	31,60	130,50	200,00	8	A	3	2
AMR	2	22/6/1992	41,70	134,00	180,00	5	A	2	1
ATP	2	17/10/1999	12,10	98,00	133,00	5	A	1	2
BAO	2	27/4/1999	16,70	99,50	38,00	6	A	3	1
BSS	2	18/12/1997	14,80	99,00	160,00	8	A	2	2
BCA	1	14/4/1996	23,90	119,50	50,00	8	B	3	1
BOS	2	19/2/1997	20,30	119,50	50,00	8	B	2	2
BVV	2	3/4/1993	27,90	125,50	500,00	10	A	2	1
CSOS	2	12/1/1996	22,10	121,00	50,00	8	C	3	2
DP	1	10/6/1997	27,50	123,00	160,00	8	B	2	1
ETC	1	3/9/1994	25,70	124,00	127,00	7	A	2	1
FWS	1	30/11/1996	22,40	118,00	50,00	8	A	2	2
FCC	2	30/9/1999	15,10	96,00	30,00	6	B	1	2
GPP	1	13/1/1994	31,10	130,00	80,00	4	A	2	1
GRN	1	19/4/1996	23,00	117,00	100,00	5	A	3	2
GCM	2	27/6/1993	25,00	131,50	160,00	5	A	2	1
GSS	2	13/4/1998	16,60	107,50	160,00	8	A	2	2
INJS	1	9/9/1999	11,70	87,80	107,00	10	C	3	2
JCD	1	18/5/1997	19,30	110,50	50,00	5	A	3	1
JGS	2	7/2/1994	21,60	126,50	45,00	5	B	2	1
JNC	2	4/9/1996	21,00	110,00	30,00	3	A	3	1
JCD	1	29/3/1996	20,40	118,00	50,00	2	A	2	1
JRP	1	27/9/1997	19,60	112,00	50,00	8	A	2	2
JSB	2	18/5/1999	13,50	92,00	60,00	3	B	3	2
JSF	2	23/8/1994	25,40	124,00	100,00	4	C	1	2
JSP	2	8/5/1998	14,00	98,50	175,00	11	A	3	1
KDCR	2	2/6/1996	19,70	112,00	50,00	2	A	3	1
KMM	2	18/10/1997	19,50	111,00	80,00	2	B	2	2
KS	2	9/10/1998	16,50	102,00	40,00	8	C	3	1
KM	1	11/3/2000	15,80	100,00	215,00	5	A	3	1
KMS	2	24/1/1997	20,10	114,50	50,00	8	A	2	2
LNGS	2	23/10/1995	29,00	136,00	15,00	7	A	2	2
LAAS	1	7/10/1994	22,50	120,00	60,00	5	B	2	2
LG	1	9/5/1997	28,00	132,00	125,00	5	C	2	2

LB	1	21/4/1998	20,50	114,30	60,00	2	A	2	1
LL	2	15/9/1992	32,85	142,00	75,00	9	A	3	1
LMB	2	19/6/2000	14,30	90,00	335,00	8	A	3	1
LRS	2	25/1/1998	15,40	106,50	65,00	3	C	3	1
LBS	1	26/5/1997	28,00	122,50	80,00	10	A	3	1
LRBS	1	2/3/1994	18,90	115,50	80,00	11	A	1	2
LFLM	1	19/3/1999	19,00	108,60	285,00	5	B	3	2
LGLA	1	2/5/1998	18,30	110,00	50,00	8	A	2	2
MK	1	28/3/1995	22,00	122,00	45,00	55	B	3	2
MBO	1	27/6/1995	23,50	119,00	50,00	1	B	2	1
MIAS	1	6/5/2000	16,50	102,00	50,00	8	C	3	2
MMM	2	18/8/1999	14,90	98,50	50,00	1	A	3	2
MAP	2	27/9/1997	20,10	115,00	50,00	3	A	2	2
MM	1	14/12/2000	14,40	92,00	80,00	4	A	2	2
MRRP	1	28/7/1995	25,60	126,50	30,00	2	C	1	2
MFM	1	28/2/1999	16,00	103,00	335,00	5	A	2	1
PRS	2	17/12/1996	27,50	123,50	200,00	8	B	2	1
PSM	2	9/11/1993	26,40	133,00	70,00	5	B	2	1
PJSO	1	23/12/1998	18,10	104,50	150,00	9	B	2	1
RSA	2	12/8/2000	13,00	91,70	155,00	6	B	1	1
RV	2	11/9/2001	7,85	75,00	320,00	8	A	1	2
RSG	2	20/5/2001	13,30	92,00	270,00	12	A	1	1
RB	2	17/1/1999	17,10	106,00	80,00	8	B	3	2
RPPS	1	10/5/1994	31,10	133,00	270,00	3	A	3	2
SEL	2	23/6/1999	15,20	97,60	70,00	5	A	3	2
SVL	2	25/11/1991	38,40	144,50	340,00	4	B	3	1
SCC	1	3/12/2001	14,95	95,00	100,00	8	A	1	2
SWSC	1	25/6/1999	19,00	107,50	70,00	6	B	2	1
SDC	2	12/2/1999	17,60	114,00	60,00	5	A	2	2
TSN	2	28/9/1997	20,20	113,80	70,00	4	C	2	2
VRK *	1	17/3/1999	15,10	96,50	110,00	6	A	3	1
VMTS	1	14/12/1998	18,50	103,00	160,00	6	A	2	2
YFN	1	29/7/1995	25,30	94,00	160,00	2	A	3	2
YMO	2	18/5/1998	17,70	122,50	120,00	8	A	3	1
YRB	1	13/6/1996	21,00	105,50	50,00	8	B	2	1
EL	1	18/2/1999	17,00	116,00	65,00	7	B	1	2

LEGENDA:

PAC = paciente

R\$ PC = Renda Percapita (em reais)

SX = SEXO
1 masculino
2 feminino

Escol = escolaridade materna (em anos)

CDC = classificação categoria clínica CDC

DN = Data de Nascimento

Imun = classificação categoria imunológica CDC

P = Peso

Alt = Altura

B) Tabela das características Imunológicas e Tratamento:

PAC.	CD4i	logi	CD4f	logf	CVi	CVf	Med	HAART	DDI	LATA	ExFezi	ExFef
AR	1215	3,08	1870	3,27	0	0	AZT, DDI	1	1	2	2	0
ASC	1079	3,03	636	2,80	4,09	3,96	DDI, D4T, NFV.	2	1	1	0	0
AGN	874	2,94	920	2,96	0	0	D4T, 3TC, NFV	2	0	1	0	1
ALP	605	2,78	908	2,96	3,03	0	AZT, DDI, NFV	2	1	2	0	0
ARF	450	2,65	503	2,70	0	0	AZT, 3TC, NFV	2	0	1	0	0
ASM	284	2,45	243	2,39	0	3,21	AZT, 3TC, NFV	2	0	1	0	1
AS	79	1,90	95	1,98	4,93	1,98	AZT, 3TC,	1	0	1	0	0
AAR	252	2,40	264	2,42	4,23	3,99	DDI, D4T, EFV	1	1	2	4	1
AMR	301	2,48	326	2,51	4,29	4,75	AZT, 3TC, NFV	2	0	1	2	3
ATP	1332	3,12	1682	3,23	0	0	DDI, D4T, NFV	2	1	2	1	1
BAO	494	2,69	477	2,68	3,71	3,84	AZT, DDI, NFV	2	1	1	0	0
BSS	704	2,85	530	2,72	4,72	4,33	AZT, DDI	1	1	2	0	0
BCA	372	2,57	332	2,52	3,63	3,85	3TC, D4T, EFAV	2	0	1	2	0
BOS	465	2,67	886	2,95	3,37	2,99	AZT, 3TC, EFV	1	0	2	0	4
BVV	485	2,69	302	2,48	4,3	4,32	AZT, 3TC, NFV	2	0	1	0	0
CSOS	1294	3,11	1491	3,17	0	0	3TC, D4T, NFV	2	0	2	4	0
DP	809	2,91	813	2,91	50	80	D4T, 3TC, EFV	2	0	1	3	4
ETC	263	2,42	855	2,93	1,93	4,13	DDI, D4T, EFV	1	1	1	1	2
FWS	538	2,73	695	2,84	4,65	5,01	AZT, 3TC	1	0	2	0	0
FCC	940	2,97	1724	3,24	3,7	5,06	AZT, DDI	1	1	2	4	0
GPP	502	2,70	501	2,70	4,12	3,77	AZT, DDI	1	1	1	2	2
GRN	427	2,63	503	2,70	3,54	3,19	3TC, D4T, NFV	2	0	2	0	1
GCM	687	2,84	417	2,62	3,92	3,54	AZT, DDI	1	1	1	2	0
GSS	561	2,75	809	2,91	3,36	4,1	AZT, DDI	1	1	2	0	0
INJS	212	2,33	182	2,26	5,13	4,70	3TC, D4T, NFV	2	0	2	0	0
JCD	967	2,99	969	2,99	0	2,36	AZT, 3TC, EFV	1	0	1	1	0
JGS	763	2,88	612	2,79	3,11	3,2	AZT, DDI, NFV	2	1	1	0	2
JNC	264	2,42	296	2,47	4,23	4,94	AZT, 3TC, NFV	2	0	1	1	0
JCD	154	2,19	356	2,55	5,29	1,79	AZT, DDI, EFV	1	1	1	0	0
JRP	676	2,83	844	2,93	3,93	4,33	3TC, D4T, EFV	1	0	2	1	0
JSB	700	2,85	173	2,24	0	0	AZT, DDI, NFV	2	1	2	0	0
JSF	1160	3,06	1041	3,02	0	0	DDI, D4T, NFV	2	1	2	0	0
JSP	1530	3,18	946	2,98	3,88	3,46	AZT, DDI	1	1	1	0	0
KDCR	337	2,53	577	2,76	4,3	4,46	AZT, DDI, NFV	2	1	1	2	1
KMM	614	2,79	548	2,74	4,61	3,04	DDI, D4T, EFV	1	1	2	4	2
KS	396	2,60	450	2,65	3,04	3,25	3TC, D4T, NFV	2	0	1	0	1
KM	782	2,89	773	2,89	0	0	AZT, 3TC, NFV	2	0	1	0	0
KMS	531	2,73	643	2,81	3,44	3,68	AZT, DDI	1	1	2	0	0
LNGS	858	2,93	525	2,72	3,21	3,66	3TC, D4T	1	0	2	0	2
LAAS	398	2,60	867	2,94	3,45	3,22	AZT, 3TC, EFV	1	0	2	0	0
LG	557	2,75	594	2,77	3,6	4,17	AZT, DDI, EFV	2	1	2	0	0
LB	570	2,76	547	2,74	1,98	4,46	AZT, DDI, EFAV	2	1	1	0	0
LL	281	2,45	252	2,40	4,61	4,98	3TC, D4T, NFV	2	0	1	0	0
LMB	710	2,85	736	2,87	4,3	4,34	AZT, DDI, NFV	2	1	1	0	0
LRS	580	2,76	618	2,79	4,45	3,66	AZT, DDI	1	1	1	2	1
LBS	550	2,74	442	2,65	4,7	4,16	AZT, DDI	1	1	1	4	0
LRBS	729	2,86	793	2,90	4,62	4,94	DDI, D4T, AMP	2	1	2	0	0
LFLM	420	2,62	469	2,67	5,35	5,1	3TC, D4T, AMP	2	0	2	1	0
LGLA	731	2,86	855	2,93	3,25	3,47	AZT, DDI, NFV	2	1	2	0	0
MK	636	2,80	782	2,89	0	0	AZT, DDI	1	1	2	0	0
MBO	138	2,14	135	2,13	4,97	4,65	NFV, AZT, 3TC	2	0	1	0	0

MIAS	380	2,58	492	2,69	4,37	4,61	AZT, DDI	1	1	2	0	0
MMM	881	2,94	778	2,89	4,61	4,47	AZT, DDI	1	1	2	0	0
MAP	1056	3,02	790	2,90	4,1	3,91	3TC, D4T, AMP	2	0	2	0	0
MM	670	2,83	822	2,91	2,12	0	AZT, DDI, EFV	1	1	2	2	0
MRRP	676	2,83	938	2,97	4,61	4,38	AZT, DDI	1	1	2	2	1
MFM	714	2,85	742	2,87	4,50	4,5	AZT, 3TC, NFV	2	0	1	0	0
PRS	1080	3,03	1005	3,00	2,91	2,03	AZT, DDI	1	1	1	0	0
PSM	594	2,77	250	2,40	4,14	4,66	AZT, 3TC, EFV	1	0	1	1	1
PJSO	589	2,77	517	2,71	4,54	4,38	3TC, D4T, EFV	1	0	1	0	0
RSA	842	2,93	789	2,90	4,21	4,24	3TC, D4T, NFV	2	0	1	0	1
RV	1029	3,01	3050	3,48	4,07	2,55	DDI, D4T, NFV.	2	1	2	0	4
RSG	1299	3,11	856	2,93	4,12	3,69	AZT, DDI	1	1	1	3	0
RB	914	2,96	1296	3,11	2,2	2,07	AZT, DDI, NFV	2	1	2	0	0
RPPS	559	2,75	346	2,54	2,49	4,4	3TC, D4T, AMP	2	0	2	0	1
SEL	505	2,70	468	2,67	2,48	2,01	AZT, D4T, AMP	2	0	2	0	0
SVL	44	1,64	37	1,57	4,63	4,64	3TC, D4T, NFV	2	0	1	0	0
SCC	1233	3,09	1627	3,21	80	0	AZT, DDI, NFV	2	1	2	0	0
SWSC	1110	3,05	871	2,94	3,8	2,92	DDI, D4T, NFV	2	1	1	0	0
SDC	1089	3,04	1215	3,08	2,72	2,36	D4T, 3TC, EFV	1	0	2	0	0
TSN	1354	3,13	663	2,82	2,08	2,87	AZT, DDI	1	1	2	0	0
VRK *	596	2,78	542	2,73	4,98	4,84	AZT, DDI, NFV	2	1	1	1	2
VMTS	564	2,75	955	2,98	3,46	3,54	AZT, DDI, EFV	1	1	2	1	0
YFN	520	2,72	348	2,54	4,94	5,40	3TC, EFV, Kaletra	2	0	2	2	0
YMO	821	2,91	376	2,58	3,74	3,43	AZT, DDI	1	1	1	2	0
YRB	475	2,68	538	2,73	4,06	4,06	AZT, 3TC, RTV	2	0	1	4	2
EL	700	2,85	173	2,24	0	0	AZT, DDI, EFV	1	1	2	0	0

LEGENDA:

PAC	Paciente
CD4i	Contagem total de CD4 inicial
logi	logaritmo base 10 do CD4 inicial
CD4f	Contagem total de CD4 final
logf	logaritmo base 10 do CD4 final
CVi	Carga viral inicial
CVf	Carga viral final
Med	Medicação (antiretroviral)
HAART	1 não 2 sim
DDI	0 não 1 sim
*	intenção de tratamento
LATA	1 NAN2 padrão 2 NAN2 Probiótico
ExFezi	Exame de fezes inicial
ExFef	Exame de fezes final

ANEXO 8 - Artigo científico original (versão inglês para revista JPGN)

**Use of Probiotics in HIV-infected Children:
A Randomized Double-blind Controlled Study**
TROIS, Livia¹; CARDOSO, Edmundo Machado²; MIURA, Ernani³

Abstract:

Introduction: HIV/AIDS is an infection characterized by immune cell dysfunction and subsequent immunodeficiency, as well as intestinal disorder. Probiotics are live microbial feed supplements that beneficially affect the host animal by improving intestinal microbial balance and promoting health benefits. **Objective:** The goals of this study were to determine whether the use of probiotics could improve the immune response determined by CD4 cells/mm³ counts and reduce liquid stool episodes. **Methods:** a randomized double-blind controlled trial with 76 HIV-infected children (2 - 12 years), divided into two groups; one (38) receiving probiotics (formula containing *Bifidobacterium bifidum* with *Streptococcus thermophilus* – 2.5x10¹⁰ colony forming units) and the other (39) a standard formula (control group), for two months. The CD4 counts (cells/mm³) were collected at the beginning and end of the study. The quality and number of stools were assessed by a questionnaire (watery to normal stool consistency). **Results:** there was an increase in the mean CD4 count in the probiotics group (791 cells/mm³) and a small decrease in the control group (538 cells/mm³). The difference between children receiving probiotics and the control group was 118 cells/mm³ vs. -42 cells/mm³ (p = 0.049), represented by delta CD4 log₁₀ for statistical analyses. A similar reduction in liquid stool consistency in both groups (p < 0.06), with a slight enhancement in the probiotics group, was observed, but without significant difference (p < 0.522). The incidence of loose-soft stools showed a small decrease in both groups (p < 0.955) and there was an increase in the incidence of normal stool consistency in both groups (p < 0.01). **Conclusion:** Our study showed that probiotics have immunostimulatory properties and might be helpful in the treatment of HIV-infected children.

1. Nutritionist, graduate student in Pediatrics (UFRGS)
 2. MD, Service of Infectology, Hospital da Criança Conceição (HCC)
 3. MD, PhD, Department of Neonatology, Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA)
- Address: HCPA, Ramiro Barcelos, 2350/ s. 1123/ Porto Alegre/RS/Brazil. Contact: liviatrois@gmail.com

Introduction

HIV/AIDS is a huge problem in the world, even in developed countries. Many of the clinical manifestations of HIV infection are due to immune cell dysfunction and subsequent immunodeficiency (1). Gastrointestinal dysfunction can predispose infants and young children to electrolyte imbalance and malnutrition, which may further exacerbate the T cell defects associated with HIV replication (2, 3).

Intestinal dysfunction is frequent in pediatric HIV infection. It includes carbohydrate malabsorption, steatorrhea and increased intestinal permeability and it might be caused by enteric pathogens (4). Bacterial gastrointestinal overgrowth, opportunistic gastrointestinal infection, and even carbohydrate malabsorption may all be relevant factors in the nutritional status of children with HIV (5). This gastrointestinal dysfunction may involve a number of abnormalities of digestion and absorption that contribute to weight loss, since diarrhea is not always associated with a pathogen and might result in immunological abnormalities that could exacerbate the T cell defects inherent in HIV infection (6).

Immune dysregulation probably plays a central role in the pathogenesis of intestinal dysfunction and the frequency and severity of intestinal dysfunction only weakly correlates with immune status. It is well known that diarrhea or intestinal dysfunction can affect the absorption and metabolism of antiretroviral drugs (7, 8).

Probiotics are defined as live microbial feed supplements that beneficially affect the host animal by improving intestinal microbial balance and promoting health benefits (9). The principal purported health-promoting effect of probiotics is their enhancement of mucosal immune defense; through enhancing macrophage activity, elevating numbers of killer cells, T cells, and interferon; and their action against pathogenic microbial colonization and translocation. Since probiotics do not permanently colonize the intestine, they must be taken in sufficient quantities ($>1 \times 10^7$ /d) to maintain adequate amounts in the colon and to promote periodic immune stimulation (10, 11, 12, 13, 14).

There is no published evidence that the consumption of probiotics that contain *lactobacilli* or *bifidobacteria* increases the risk of opportunistic infection among immunocompromised patients. Two studies showed the safety of probiotics consumption by HIV patients and probiotics are even being used to prevent diarrhea in AIDS patients (15, 16, 17, 18).

It was hypothesized that probiotics could increase the immunity and reduce diarrhea episodes in HIV infected children. Therefore, the goals of this study were to determine the immune response by CD4 cells/mm³ counts and reduction in liquid stools, as a decline below 15% of CD4 is evidence of a high level of morbidity and mortality (19, 20).

Methods

A randomized double-blind controlled trial was conducted in HIV-infected children, between the ages of 2 and 12 years old, in two groups; one receiving probiotics (probiotics group) and the other a standard formula (control group). All the children were enrolled only after oral and written informed consent was obtained from their parents. The study was approved by the Ethics Committees of Hospital de Clínicas de Porto Alegre – GPPG (n. 03/096) and of Hospital da Criança Conceição – GEP (n. 038/03).

Patient population: The inclusion criteria was HIV infection, regular antiretroviral therapy with no changes during the three preceding months nor during the

study and attendance at the reference service for pediatric HIV infection, Hospital da Criança Conceição, in Porto Alegre, Brazil, from October/2003 to November/2004.

All children (n = 76) had acquired HIV infection perinatally, except for one who had acquired it by receiving blood products. Children with chronic disease, diabetes, serious acute infection, and allergy to proteins of bovine milk were not eligible for the study, and those that were hospitalized and failed the antiretroviral therapy were excluded.

The products were blinded by a person who was not involved in the study, and children were randomized by cast lots to receive probiotics or placebo. Parents or legal guardians were instructed in the administration of the product (14g diluted in 100ml of milk) daily throughout a two month period. One group received a standard formula (placebo), and the other received a standard formula containing *Bifidobacterium bifidum* with *Streptococcus thermophilus* – 2.5×10^{10} cfu (colony forming units). These products were NAN2 probiotico[®] and NAN 2[®], donated by Nestlé, which declared it contained 9.7×10^8 cfu/g.

These bacteria were selected because of their acid tolerance properties, adhesion capacity to the intestinal mucosa, immunostimulating properties and because the product (powder formula) does not require refrigeration. Moreover, they are important components of the gastrointestinal microflora and are harmless (9, 12, 21, 22).

Participants were asked to return to the clinic once a month for follow-up when the orientation and the stool questionnaire were repeated. Compliance with follow-up visits was voluntary and no incentives were offered, also, the parents were questioned every week by telephone about the administration of the product.

If any child was unable to consume the assigned product for whatever reason, or if the primary caregiver was unable to provide complete data, or if any change in antiretroviral therapy occurred, the child was removed from the study.

Parents were instructed not to alter the child's diet in any other way during the course of the study. No other obvious probiotic-containing supplements were allowed during the course of the study.

Nutritional variables: weight and height data were collected using standard techniques (23) and plotted on the National Center for Health Statistics percentiles to obtain age- and sex-adjusted measurements (24). Each parent or guardian was asked for a dietary 24-hour recall to determine each child's routine dietary intake of carbohydrates, fat and protein. A clinical nutritionist analyzed this information using a nutritional Data System called Virtual Nutri from USP (25).

Each child's HIV infection was staged according to the Center for Disease Control and Prevention classification system for pediatric HIV infection (26).

Immunological variables: absolute CD4 T-lymphocyte counts, expressed as absolute concentrations (cells/mm³), were collected on average 1 month before the beginning of the research and up to 1 month after its end, with 3 month intervals between them.

Diarrhea episodes: the quality and number of stools was assessed by a questionnaire. It was composed of 5 groups of drawings depicting stools varying from watery to normal; a previously approved reference questionnaire (11, 27). Parents were asked to compare each episode passed to a drawing and assign it a numeric consistency score. Stool frequency was determined by counting the number of stools passed during a 24-hour period.

Statistical Analyses: Chi-square and Student t tests were used to compare groups/characteristics. Stool consistency scores and frequency were analyzed by a mixed design, group observation point, by analysis of variance [ANOVA]. Due to

skewed distribution, natural logarithmic transformation (\log_{10}) was used for the CD4 count, adjusted for age and CD4 initial values, and analyzed by ANCOVA. All the data were obtained with the software SPSS 12.0 (28).

Safety of products: this amount of daily ingestion of bifidobacteria for less than a year resulted in no observed adverse effects (27) and was tested in immunocompromised patients safely as previously stated (29).

Results

Patient Characteristics: the study was completed by 76 children (median age 6.72 years). 2 children failed to complete the study (one in each group) because one failed the treatment and the other had to be hospitalized. However, the first one was included in the statistics analyzed due to their intention to be treated. Both groups were similar and the characteristics of the population, shown in Table 1, were similar for age distribution, weight, height, energy intake, type and time of antiretroviral therapy and the socioeconomic status of the children. HIV disease stage at the time of the study was recorded and classified according to the CDC protocol, along with the immunological stage and is also included in Table 1.

Immunological results: a higher initial number of CD4 count was found in the probiotics group, 673 cells/mm³ vs. 580 cells/mm³ in the control group and was consequently adjusted in the statistical analyses. At the end of the study, an increase in the mean CD4 count was observed in the probiotics group (791 cells/mm³), and a small decrease in the control group (538 cells/mm³), as presented in Table 2. This CD4 count increase only occurred among children receiving probiotics and the mean of this difference was 118 cells/mm³ vs. -42 cells/mm³ ($p = 0.049$), represented by the delta CD4 \log_{10} in Table 2.

Stool consistency: a similar reduction in liquid stool consistency (score 1, 2 and 3) was observed in both groups ($p = 0.06$), with a (slight enhancement in the probiotics group, but without significant differences ($p = 0.522$), as shown in Fig 1. The loose-soft stools (score 4) showed a slight decrease in both groups ($p = 0.955$), however, the best results were in the normal stool consistencies, which improved significantly in both groups ($p = 0.01$), but with no significant differences between groups ($p = 0.199$), as shown in Fig 2.

Energy intake: all the children had a similar energy intake per day, a mean of 2098.95 calories in the probiotics group, with a mean of 123 kcal/metabolic Kg/day, and 2151.09 calories in the control group, a mean of 106 kcal/metabolic Kg/day ($p = 0.433$). This calories intake is higher than required for this age, with an age-adjusted adequacy of 140.47 % vs. 147.71% ($p = 0.188$).

Discussion

This study analyzed the effect of *Bifidobacterium bifidum* with *Streptococcus thermophilus* supplementation in HIV-positive children for two months and the results show that these children presented an immune response to these bacteria. There were no changes in treatment, that is, no alterations in antiretroviral therapy occurred that could be responsible for such a change. Not all probiotics have immunomodulatory properties that increase the CD4 count, as shown in this study by *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus*.

A similar three-week draw-study was performed by Schifrin et al, with the same bacteria specimens, in which the human leukocyte subsets were analyzed and a significant increase in global phagocytic activity of blood phagocytes (granulocytes and monocytes) was found. However, differences in proportions of blood lymphocyte

subsets or in the degree of T cell activation in the groups were not observed in this study (30).

This kind of immunostimulatory effects of probiotic therapy were not studied by us, but the short duration of this study supplementation could be responsible for the negative results, since references in the literature suggest that one month is a minimum supplement period (6, 14, 31). Three weeks might not be sufficient to stimulate the immune system. The continuous administration or permanent colonization of probiotics may not be the best method of administration, due to the immune enhancement properties of probiotics, they may require periodic pulse dosing to provide periodic immune stimulation (32).

In patients with AIDS, various factors may act as confounders when studying cause-effect association. Confounders other than antiretroviral drugs were not specifically looked for in this study, because of the long period of enrollment and the heterogeneity of the population. However, major confounders were likely to be non-diagnostic opportunistic infections. Caution is required in establishing unequivocal cause-effect associations and further studies are necessary to support the findings of this trial.

Studies have been realized with HIV-infected children (16, 20), but none of them have associated probiotics and CD4 before. In one study in adults the effect of supplemental probiotic *lactobacillus rhamnosus GG* on noninfectious diarrhea and gastrointestinal symptoms and CD4 response in HIV-infected patients were evaluated and significant effects were not found, in contrast with this study. This might have happened because of the short duration (2 weeks of probiotics) and small patient sample (n = 17) (33).

One reasonable explanation for the probiotic stimulation of the values of CD4 counts is that an immune response initiated in the gut-associated lymphoid tissue can affect immune responses at other mucosal surfaces, which cross Peyer's patches and stimulate T-lymphocyte helpers, inducing phenotype and B cell response, resulting in modulation of the indigenous microbiota composition in HIV-infected patients (3, 15).

Many social and clinical factors can affect the functional status and quality of life for HIV-infected children, for example diarrhea. They are often administered medications to control the progress of their disease, with many potential toxicities and side effects (34). Malabsorption in HIV children contributes directly to CD4 count decrease (35) and because of this, it is important to restore intestinal digestive-absorptive function at an early stage of HIV in order to reverse immune derangement (3), as shown with our results, since the energy intake was sufficient for their age, and it was equal in both groups. The importance of this study as a coadjuvant of antiretroviral treatment is huge.

The results presented here are particularly noteworthy because not every probiotic candidate shows efficacy and not every probiotic demonstrates efficacy in each disease. This suggests that gut microflora has unique, yet largely unexplored, endogenous immunomodulatory properties and these specimens of probiotics showed their capacity to improve the immune system. Therefore, we speculate that microflora rehabilitation, through probiotic therapy, may increase naïve CD4 cell count, thereby allowing the partial functional recovery of the immune response in children with HIV infection.

The efficacy of probiotics in the treatment of gastrointestinal disease is well established in the literature, especially in the prevention and treatment of diarrhea with these and other probiotic bacteria, which is very surprising because the specimens used in this research did not elicit positive results (35, 29). The results of the current work

did not show a significant difference in the response regarding episodes of diarrhea. The hypothesis for the non-response of diarrhea is that the antiretroviral therapy, especially DDI, which was present in 60% of these patients' treatments, may influence the response of probiotics on diarrhea, since it is one of many side effects (34).

Conclusion

Our study showed the immunostimulatory properties of probiotics and that they might be helpful in the treatment of AIDS to improve quality of life. Since low CD4 count has been shown to be predictive of disease progression and the development of opportunistic infections in children, the purpose of this single study was not to recommend changes across the board in standard clinical practice but to add to the growing body of increased quality of life for this population. Probiotic therapy may help the immune system and restore intestinal digestive-absorptive function. However, more research should be realized to study the gastrointestinal function of HIV-infected children with simple, inexpensive and noninvasive techniques.

References:

1. Yolken RH, Hart W, Oung I, et al. Gastrointestinal dysfunction and disaccharide intolerance in children infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr* 1991; 118(3):359-363.
2. Ansari NA, Kombe AH, Kenyon TA, Mazhani L et al. Pathology and causes of death in a series of human immunodeficiency virus-positive and negative pediatric referral hospital admissions in Botswana. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:43-7.
3. Guarino A, Spangnolo MI, Giacomet V, et al. Effects of Nutritional Rehabilitation on Intestinal Function and on CD4 Cell Number in Children with HIV. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34:366-371.
4. Miller TL, McQuinn L, Orav EJ. Upper gastrointestinal endoscopy as a diagnostic tool for children with human immunodeficiency virus infection. *J Pediatr* 1997;130:766-773.
5. Miller TL. Nutritional Interventions in Pediatric HIV: It's Hard to Hit a Moving Target. *JPGN* 2002; 34(4):353-356.
6. Johnson S, Hendson W, Crewe-Brown H, et al. Effect of human immunodeficiency virus infection on episodes of diarrhea among children in South Africa. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:972-9.
7. Colin S. Ball. Global Issues in Pediatric Nutrition: AIDS. *Nutrition*, 1998; 14 (10):767-770.
8. Jirapinyo P, Brewster D, Succi RCM, et al. HIV Disease: Working Group Report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35(2):S134-S142.
9. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 1991;32:439-442.
10. Fuller R and Gibson GR. Modification of the Intestinal Microflora Using Probiotics and Prebiotics. *Scand J Gastroenterol* 1997;32Suppl222:28-31.
11. Vanderhoof JA. Probiotics: future directions. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):1152S-5S.
12. Tuomola E, Crittenden R, Playne M, et al. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):393S-8S.
13. Duggan C, Gannon J and Walker WA. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 2002;75:789-808.
14. Kalliomäki M and Isolauri E. Role of intestinal flora in development of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3:15-20.

15. Wolf BW, Wheeler KB, Ataya DG, et al. Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* supplementation to a population infected with the human immunodeficiency virus. *Food Chem Toxicol* 1998;36:1085-94.
16. Cunningham-Rundles S, Ahrné A, Bengmark S, et al. Probiotics and immune response. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:S22-5.
17. Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, et al. Safety of Probiotics That Contain *Lactobacilli* or *Bifidobacteria*. *Clin Inf Dis* 2003;36:775-80.
18. Penna FJ, Filho LAP, Calçado AC, et al. Up-to-date clinical and experimental basis for the use of probiotics. *J Pediatr (Rio J)* 2000;76(suppl.2):209S-217S.
19. Butensky EA. The Role of Nutrition in Pediatric HIV/AIDS: A Review of Micronutrient Research. *J Pediatric Nurs*, 2001; 16(6):402-411.
20. Lindsey JC, Hugles MD, McKinney RE, Cowles MK 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.
21. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, et al. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):444S-50S.
22. Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, et al. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium “The intelligent Intestine”, held in Paris, June 14, 2002. *Am J Clin Nutr*, 2003;78:675-83.
23. Frisancho AR. Triceps skin fold and upper arm muscle size norms for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr*, 1974; 27:1052-1058.
24. Ogden CL, Kuczmarski RJ, Flegal KMF, et al. Centers for Disease Control and Prevention 2000 Growth Charts for the United States: Improvements to the 1977 National Center for Health Statistics Version. *Pediatrics* 2001;109(1):45-60.
25. Philippi ST, Szarfarc SC, Latterza AR. Virtual Nutri [software], versão 1.0, for Windows. Departamento de Nutrição/Faculdade de Saúde Pública/USP. São Paulo, 1996.
26. Caldwell MB, Oxtobv MJ, Simonds RJ, et al. 1994 Revised Classification System for Human Immunodeficiency Virus Infection in Children Less Than 13 Years of Age. CDC – MMWR Recommendations and Reports 1994;43:1-10.
27. Young RJ, Beerman LE, Vanderhoof JE. Increasing oral fluids in chronic constipation in children. *Gastroenterol Nurs* 1998;21:156-61.
28. SPSS version 12.0.2, for Windows. SPSS Inc., 2003; Chicago, Illinois, USA.
29. Davidson GP, Butler RN. Probiotic in pediatric gastrointestinal disorders. *Curr Opin Pediatr* 2000; 12:477-481.
30. Schiffrin EJ, Brassart D, Servin AL, et al. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am J Clin Nutr* 1997;66:515S-20S.
31. Saavedra JM, Bauman NA, Oung I et al. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994;344:1046-9.
32. Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonons DL, et al. *Lactobacillus GG* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr* 1999;135(5):564-569.
33. Salmine MK, Tynkkynen S, Rautelin H, et al. The Efficacy and Safety of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus GG* on Prolonged, Noninfectious Diarrhea in HIV Patients on Antiretroviral Therapy: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Study. *HIV Clin Trials* 2004;5(4):183-191.

34. Miller TL, Mawn BE, Orav EJ, Wilk D et al. The Effect of Protease Inhibitor Therapy on Growth and Body Composition in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Children. *Pediatrics* 2001;107(5):1-6.
35. Missmer SA, Spiegelman D, Gorbach SL and Miller TL. Predictors of Change in the Functional Status of Children with Human Immunodeficiency Virus Infection. *Pediatrics* 2000;106(2):1-7.

ATTACHMENTS:

Table 1. Patient characteristics (n= 77) of the study

Characteristics		n = 38	n = 39	p	
		Probiotics group	Placebo group		
Gender	Male	19 (50)	17 (43.6)	0.737	#
	Female	19 (50)	22 (56.4)	-	
Mean Age (years)		6.33 (\pm 2.1)	7.12 (\pm 2.52)	0.141	*
Mean Z score Weight for height		- 0.02 (SD \pm 0.74)	0.35 (\pm 0.783)	0.46	*
Maternal education	Mean years	5.78 (\pm 2.5)	6.21 (\pm 2.65)	0.478	*
Income month per person (R\$)	Mean/Median	126/81 (\pm 106)	100/80 (\pm 72)	0.574	+
Treatment:					
HAART		18 (48.6)	24 (61.5)	0.369	#
No-HAART		20 (51.4)	15 (38.5)		
DDI		24 (62.2)	19 (48.7)	0.343	#
Nutritional variables:					
Energy intake	Kcal/day	2099 (\pm 313)	2152 (\pm 266)	0.433	*
Calories adequacy/age (mean %)		140	148	0.188	*
RDA	Kcal/kg/day	114 (\pm 38)	107(\pm 30)	0.333	*
CDC classification:					
Severe (3)		2 (2.66)	6 (8)	0.254	#
Moderate (2)		17 (22.66)	17 (22.66)		
Normal (1)		19 (25.35)	14 (18.66)		

Note: data represented in mean/median (\pm standard deviation) or absolute frequency (%).

* Student t; # Chi-square; + Mann Whitney. HAART = highly active antiretroviral therapy; R\$ = Reais; Immunological stages by age based on CDC Classification

Table 2. Immunological Responses of all patients (n = 77) of the study (enrollment and at the end)

		n = 38	n = 39	p	
		Probiotics group	Placebo group		
CD4 count (cells/mm ³) (mean)	enrollment	673 (528;962)	580 (337;821)		
	end	791 (509;951)	538 (332;789)		
log ₁₀ CD4 (median)	enrollment	2.83 (\pm 0,19)	2.69 (\pm 0.33)	0.35	*
	end	3.86 (\pm 0,27)	2.67 (\pm 0.30)	0.05	*
Δ log ₁₀ CD4		0.04 (\pm 0,19)	-0.26 (\pm 0.16)	0.048	@

Note: * Student t; @ ANCOVA age and initial CD4 adjusted.

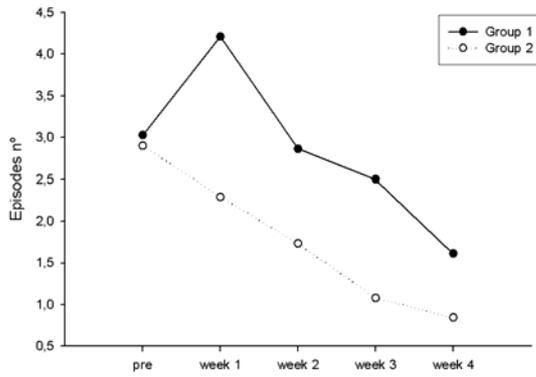
Figures: Stools Frequency

Fig 1. Number of liquid stools evacuation one week before the study and 4 weeks during the probiotics (group 2) or control product (group 1).

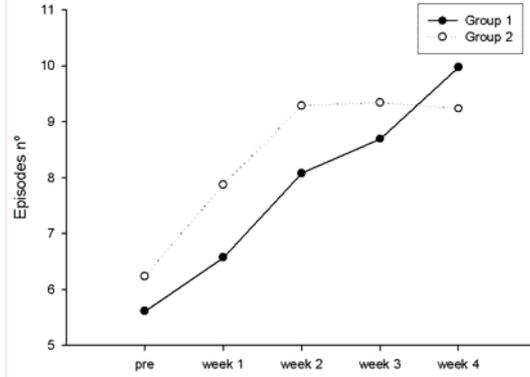


Fig 2. Number of normal stools evacuation one week before the study and 4 weeks during the probiotics (group 2) or control product (group 1).

ANEXO 8 - Artigo de revisão (versão enviada para revista Jornal de Pediatria)

ARTIGO DE REVISÃO

O PAPEL IMUNOMODULATÓRIO DOS PROBIÓTICOS

Nutricionista Livia T. de Oliveira, PPG Pediatria/UFRGS

Orientador Dr. Ernani Miura, Infectologista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Resumo

O objetivo do estudo é reunir informações sobre a atuação dos probióticos no estímulo ao sistema imunológico, através de artigos pesquisados no Bireme dos últimos anos. Os probióticos são microorganismos vivos que apresentam efeito benéfico ao hospedeiro, equilibrando a flora intestinal e, assim, melhorando seu desempenho no organismo. A flora intestinal é um fator muito importante para a defesa contra infecções, pois é a primeira barreira que o organismo possui contra vírus e bactérias patogênicas. Os efeitos benéficos dos probióticos vêm sendo estudados, e observou-se a atuação destes na prevenção ou coadjuvante no tratamento de diarreias de diversas etiologias, amenizando sintomas de processos alérgicos e nota-se uma melhora na resposta imunológica do organismo através do aumento de IgA circulante.

Palavras Chaves: probióticos, sida, resposta imunológica, microflora intestinal.

Abstract

The aim of this study is to get more information about the usefulness of probiotics in the immunity, through research Bireme of the last years. The Probiotics are live microorganisms that show benefic action in the host balancing the intestinal microflora and thus getting better its role in the organism. The intestinal flora is a very importante fact in the defense against infection, therefore it is the first barrier that the organism has against virus and patogenic bacterias. The benefic effect about probiotics have been studied and shown your usefull to prevention and tractament to diarrhea of many reasons, in constipation, decreasing symptom of alergic process and a better immunity response augmentation IgA in circulate.

Key Words: probiotics, aids, Immune response, intestinal microflora.

Introdução

O corpo humano hospeda mais de 500 espécies de microorganismos, resultando em comensalismo (sem efeito nocivo) ou mutualismo (beneficia o hospedeiro). Cada espécie beneficia o hospedeiro de maneiras diferentes, fornecendo nutrientes essenciais, digerindo carboidratos não-digeríveis, fornecendo energia, entre outros (1). A colonização do epitélio intestinal por microorganismos se dá no momento do nascimento, inicialmente por espécies anaeróbicas facultativas e, após, a colonização dependerá do tipo de dieta utilizada. As Bifidobactérias são predominantes no recém-nascido e mantêm-se assim durante o aleitamento materno, não ocorrendo o mesmo em crianças alimentadas com fórmulas, apresentando colonização por bacteroides, clostridia streptococci. Após dois anos de idade, a microflora se estabelecerá, assemelhando-se a do adulto (2, 3, 4, 5, 6).

A microflora intestinal é a primeira linha de defesa do organismo, e compete por espaço, nutrientes e receptores celulares, bloqueando a colonização de patógenos e estimulando a resposta imunológica local. O organismo tem mecanismos próprios para o controle e regulação do número de bactérias, para manter seu equilíbrio. No entanto, muitos destes fatores estão alterados devido a patologias, medicações (principalmente antibióticos – que desestabilizam a flora e alteram a integridade da superfície do epitélio), estresse e má alimentação. Impossibilitando assim a manutenção da flora intestinal, ocasionando maior suscetibilidade à colonização de bactérias patogênicas e vírus, prejuízo na absorção e metabolismo de nutrientes e de medicamentos (7, 8, 9).

Mesmo em ótimas condições, bactérias, vírus e fungos, presentes no meio ambiente, penetram pela barreira intestinal e invadem o organismo e, a mínima modificação no equilíbrio populacional do ecossistema microbiano, interfere em todas as suas funções. (10, 11, 12). A difícil manutenção da flora intestinal sugere a suplementação de probióticos para promover o balanceamento da flora intestinal, o aumento da tolerância e da digestão da lactose, modulação do sistema imunológico e auxílio no tratamento da diarreia (13, 14).

Microflora Intestinal e a defesa imunológica

O intestino é um complexo e extenso ecossistema formado por três componentes que interagem entre si: células do hospedeiro, microflora e nutrientes. A microflora é uma biomassa viva, de 100.000 bilhões de bactérias e mais de 400 espécies diferentes e desempenha importante papel na fisiologia, nutrição e sistema imunológico do hospedeiro, atuando principalmente no cólon. Tão importante que, conforme Saavedra (2001), “esta relação simbiótica não é apenas inevitável, mas sim necessária” (2). A composição e volume de bactérias presentes ao longo do trato gastrointestinal variam consideravelmente de acordo com a idade e hábitos do indivíduo, desde 10^4 /ml no intestino delgado a 10^7 /ml na região ileocecal, e 10^{12} /ml intestino grosso. Além das bactérias residentes no intestino, podemos encontrar no bolo fecal uma porção grande de bactérias transitivas, que não se alojam. (15, 16).

A microflora interage diretamente com o sistema imunológico da mucosa intestinal, e o balanço destes microorganismos é crucial para uma função gastrointestinal normal, sendo constituinte fundamental da barreira intestinal de defesa. Esta defesa constitui-se de microflora, barreira da mucosa e sistema imune local (GALT – gut-associated lymphoid tissue = tecido linfóide associado ao intestino, ou MALT – tecido linfóide associado à mucosa). A mucosa compreende agregados linfóides organizados – as placas de Peyer – e folículos isolados que se estendem através da

mucosa e submucosa do intestino delgado, formando o GALT, o qual permite a comunicação dos linfócitos T e B com as células de outros tecidos, e produção de IgA (17).

O intestino está em constante contato com antígenos. Uma resposta imune iniciada na GALT, composto por tecido linfóide difuso e organizado, pode induzir à resposta imune de outras superfícies de mucosa, sendo que 60% do total de imunoglobulinas produzidas diariamente são secretadas no trato gastrointestinal. O tecido linfóide difuso é composto de imunoglobulinas A, linfócitos T (CD4 e CD8) e B. As placas de Peyer, altamente permeáveis, fagocitam antígenos e microorganismos e apresentam as células imunológicas competentes que, situadas logo abaixo da lâmina própria, induzem à produção de IgA - que tem importante papel na mediação de exclusão de antígenos externos, por evitar a aderência ao epitélio e invasão de microorganismos patogênicos, neutralizando toxinas e replicação viral. E, logo após, há o envolvimento de células T maduras (CD4) (18).

Estudos têm demonstrado uma considerável influência no crescimento da resposta imune no ser humano com a sua manutenção através do uso terapêutico de probióticos – ação esta ocasionada pelo aumento de fagócitos e macrófagos (5).

Probióticos

A definição de Probiótico utilizada por Fuller (19), “suplementos alimentares microbianos vivos que, quando ingeridos, apresentam efeitos benéficos para o hospedeiro, promovendo o equilíbrio microbiano intestinal”, foi revisada e atualizada de acordo com o conhecimento dos benefícios destas bactérias por Schrezenmeir e Vrese (2001): “produto ou preparação contendo viáveis microorganismos em número suficiente, que altera a microflora (por implantação ou colonização) de um compartimento do hospedeiro e exerce efeito benéfico para a sua saúde” (20).

Os microorganismos considerados probióticos pertencem basicamente ao grupo das bactérias ácido lácticas (*Lactobacilos*, *bifidobactérias* e *Streptococcus* em menor funcionalidade) e leveduras, pois fermentam o açúcar, produzindo ácido láctico como principal produto do metabolismo. As cepas mais frequentemente estudadas são: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*; e, *bifidobactérias bifidum* e *bifidobactérias longum* (16, 21). Para que um microorganismo possa ser usado como probiótico, ele deve ser capaz de expressar suas atividades e, acima de tudo, benéficas, no hospedeiro, resistindo ao trato digestivo (aos ácidos clorídrico e biliar) e colonizando o intestino. Deve, também, ser habitante normal da microflora intestinal, com determinadas exceções, como, por exemplo, o *Lactobacillus bulgaricus* e o *Streptococcus thermophilus*, pois estas bactérias não colonizam o trato gastrointestinal, apenas produzem efeito benéfico sobre o balanço da microflora durante o trânsito. Outras considerações são: a disponibilidade em alimentos ou cápsulas, não ser enteropatogênica ou enteropatotóxica e, ainda, manter suas características de crescimento e sobrevivência durante a manipulação, estoque e consumo do produto (14, 22, 23, 24).

Os metabólitos produzidos por sua fermentação de substratos podem exercer atividade imunomodulatória sobre o hospedeiro. A atuação do probiótico sobre o hospedeiro dependerá da quantidade da espécie presente no intestino, do tempo de permanência e do tempo que se mantém vivo (17). Esta fermentação láctica promove incremento de cinquenta por cento nos teores de vitaminas B₆ e B₁₂, e um aumento de vitamina C, ácido fólico e de colina em mais de cem por cento. Este procedimento

apresenta também uma melhora na digestibilidade de proteínas e gorduras, produção de nutrientes essenciais, como ácidos graxos de cadeia curta e aminoácidos (arginina, cisteína e glutamina), bem como melhora na utilização de alguns cátions no metabolismo humano, além de sintetizar vitamina K e auxiliar no metabolismo de xenobióticos. (4, 9, 10).

Os probióticos não colonizam permanentemente o intestino e, quando bifidobactérias e lactobacilos são suplementados, 30 e 10%, respectivamente, chegam intactas ao cólon, por não resistir à bile e principalmente ao pH do estômago. A sua presença desaparece 7 dias após a ausência de suplementação. Por este motivo, a dose de administração, sugerida por diversos autores e pelo Comitê científico de alimentos Europeu, deve ser em torno de 10^8 a 10^{10} cfu/dia (17, 25, 26).

Cada espécie de probiótico exerce um determinado efeito no hospedeiro baseado em suas capacidades, atividades enzimáticas, e habitat preferencial (20, 27). Estudos comprovam o crescente potencial dos probióticos em benefício da saúde do homem, documentando sua atuação no tratamento e prevenção de diarreia (principalmente causada por rotavírus e antibioticoterapia, e fundamentalmente em crianças não amamentadas ao peito) (4, 12, 15, 28, 29, 30,31), prevenindo ou retardando processos alérgicos (29, 30), enterocolite necrozante (31), oferecendo proteção contra dermatites (32), e, mais recentemente, aponta-se sua influência na melhora da resposta imunológica no ser humano. (2, 33, 34).

Probióticos: estimulando a resposta imunológica

É crescente a demonstração em estudos clínicos randomizados que os probióticos têm efeito imunomodulatório em animais e no homem, apesar de ainda não serem bem esclarecidos os mecanismos pelos quais isto ocorre (35). As espécies mais estudadas que oferecem este benefício ao hospedeiro são do grupo dos lactobacillus e bifidobactérias. (16)

As bactérias ácido lácticas são resistentes ao pH baixo e colonizam o intestino com facilidade, associando-se às células Peyer e ao tecido linfóide. Esta capacidade, na maioria das vezes, é dose dependente: quanto maior a ingestão, maior a capacidade de colonização. Dentre elas, algumas são mais resistentes que outras, como *B. longum*, *L. gasserie* e *casei*, e colonizam a flora intestinal dentro de aproximadamente sete dias, aumentando a função fagocitária a partir do terceiro dia de ingestão do produto (36).

Sendo a membrana Intestinal e o GALT a primeira linha de defesa do organismo contra infecções e doenças causadas por microorganismos patogênicos provindos de alimentos e do meio ambiente, sugere-se que o efeito terapêutico dos probióticos contra viroses intestinais demonstra sua ação mediante o estímulo do GALT (16). E, posteriormente, outras superfícies de mucosa, aumentando a resposta humoral a antígenos, elevando os níveis séricos de IgA secretora e a produção de macrófagos – parte importante da resposta imune inata do intestino, e primeira linha de defesa não específica do organismo. Conseqüentemente há aumento da função fagocitária, bem como o aumento de neutrófilos e monócitos (2, 18, 28).

Esse efeito pode estar relacionado à capacidade de os microrganismos probióticos interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA (37). Também tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (35). A entrada do antígeno via oral, estimula primeiramente os linfócitos

intraepiteliais que carregam os marcadores de CD8+, através da produção de IgA-secretora, que migram ao intestino (lâmina própria) através da corrente sanguínea, para mediar a tolerância oral de antígenos. (25, 38).

Testes em ratos confirmam a ação das bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus acidophilus*, *casei*, *delbrueckii ssp. bulgaricus*; *Streptococcus thermophilus*), em dose de 10^9 cels, sobre a resposta imunológica através do aumento de IgA secretora, células linfocitárias, macrófagos e fagócitos. Esta resposta se mostrou dose dependente, e a melhor dose utilizada foi de duas vezes ao dia, por 7 dias consecutivos, prevenindo infecções entéricas. Porém, um período muito prolongado de suplementação de lactobacilos diminui o número total de células linfocitárias, pois, sua utilização na alimentação tem efeito paliativo, exceto se ingerido em doses elevadas e repetidamente – oferecendo, assim, efeito imunomodulatório (17). Outra utilização seria a suplementação concomitante a vacinas orais para estimular a imunidade da mucosa (27, 39).

A microflora intestinal promove processos potencialmente antialérgicos, estimulando células imunológicas T-helper, aumentando a transformação de fator β de crescimento e aumento da produção de IgA. Três estudos clínicos semelhantes, duplo-cego controlado por placebo, com crianças de famílias atópicas, suplementando 10^{10} cfu de *Lactobacillus GG* perinatal através da dieta materna (4 semanas) e pós natal através do aleitamento materno ou diretamente via oral (2 anos) observaram a diminuição na ocorrência de eczemas atópicos, com diminuição da concentração de IgE – não sendo dependente da forma de administração. E a utilização de espécies lactobacilos e bifidobactérias, após 4 semanas, diminui os níveis de clostridium e amônia nas fezes, e a permeabilidade intestinal de crianças atópicas (29, 30, 32, 40).

Yasui e colaboradores (1999) comprovaram que a administração de *Bifidobacterium breve* estimulou o sistema imune humoral em camundongos, provocando aumento da produção de IgA anti-Rotavírus e de IgG antivírus da Influenza, protegendo-os contra essas duas infecções (40). Em estudo prévio, através de ensaio clínico randomizado duplo-cego com controle, observamos o aumento do número total de células CD4+ em crianças HIV+, através da suplementação de *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus thermophilus*, por dois meses, em uma dose de $2,5 \times 10^{10}$ cfu/dia por 2 meses (41). Pessi (2000) reforça a utilização de probióticos (especificamente *Lactobacillus rhamnosus GG*) para o alívio dos sintomas nas inflamações gastrointestinais e dermatites atópicas por alergia a alimentos (42). Este fato está associado ao estímulo de células IgA secretoras e supressão do processo inflamatório citouquina (fator de necrose tumoral).

As espécies de lactobacilos *casei* e *shirota* induziram resposta celular tipo 1 em camundongos gnotobióticos, aumentando a produção *in vitro* de IL-12 por células peritoniais e de IFN- γ TNF- α por células esplênicas (14) e estimulando a secreção de IgA no lúmen intestinal (44, 45). *L. casei* e *L. plantarum* interagiram com as células M das placas de Peyer, estimulando a imunidade secretora específica. Vitini et al. (2000) testaram a influência da administração oral de diferentes espécies de bacterias ácido lácticas, tais como *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus*, e verificaram que o aumento da produção de IgA nem sempre esteve correlacionado a um aumento no número de células T CD4+, indicando que algumas bacterias testadas somente induziram a uma ativação das células B produtoras de IgA (46). Também foi observado que não houve influência sobre as células T CD8+, indicando que essas bacterias não foram capazes de induzir citotoxicidade.

Em estudos sobre diarreia, o aumento de IgA secretora circulante foi observado em crianças que receberam suplementação de *Lactobacillus casei*, diminuindo o tempo de duração da diarreia quando comparado ao grupo placebo (47). Semelhante resultado foi apresentado no estudo de Shornikova et al em 1997 na diminuição dos efeitos da diarreia pelo rotavírus com um estímulo da resposta imune (48); e, anteriormente, Saavedra e colaboradores (1994) havia utilizado *Bifidobacteria bifidum* para a prevenção da diarreia pelo rotavírus (49). O uso de iogurtes também vem sendo utilizado para o estímulo de produção de citocinas, incluindo a indução de interleucina 10 nas células sanguíneas do homem (43, 50). Em estudo feito com ratos, Perdigon e colaboradores (1995) obteve aumento na resposta imune com administração de 10^9 , duas vezes ao dia, de *Lactobacillus casei*, elevando o número de células produtoras de IgA; mas, a administração contínua do probiótico diminuiria seus efeitos, no número total de células linfóides (45).

Os probióticos usados até agora nos estudos clínicos apresentam segurança suficiente para se administrar em crianças e pacientes imunocomprometidos. Todos os casos relatados de bacteremia ou endocardites por lactobacilos ocorreram em pacientes propícios a esta infecção e contaminados por sua própria flora intestinal sem suplementação com probióticos. Casos de infecção por suplementação de bifidobactérias nunca foram documentados (26, 52). Em estudo controlado por placebo, Cunningham-Rundles e colaboradores, observaram colonização – com segurança, do *lactobacillus plantarum 299v* em crianças HIV+, em duas semanas, com melhora no quadro clínico de candidíase, retomada do crescimento e melhora do apetite após um mês (52). Observando segurança na suplementação de probióticos nesta população (53).

Conclusão

A função gastrointestinal e a composição da microflora em boas condições são capazes de manter a saúde e até prevenir doenças. Esta é a chave para pesquisas futuras na área da saúde: a utilização de probióticos influenciando benéficamente na resposta imunológica do organismo.

Ainda temos dificuldade em identificar os fatores que levam ao estímulo da imunidade pela suplementação de probióticos, pois isso exige métodos exatos e muitas vezes invasivos. O método tradicional de cultura de fezes geralmente subestima a diversidade da flora, e algumas espécies não podem ser cultivadas, devendo ser isoladas na amostra (51). Muitos estudos utilizam a IgA-secretora como marcador, porém é necessário utilizar amostras de sangue e saliva ou biópsias intestinais, além de variações diárias de sua atividade (23).

A seguridade dos probióticos hoje disponíveis em forma de alimento é relativamente alta, pois estas cepas utilizadas são consideradas de baixa patogenicidade, sendo, então, recomendada a sua utilização também em portadores de HIV.

É necessário o desenvolvimento de pesquisas (duplo-cego) para comprovar o efeito e certificar a dose do probiótico para cada indicação (patologia), pois é significativo o número de estudos que observam seu mecanismo de ação como imunomoduladores. Devemos utilizar todo tipo de alimento que possa vir a beneficiar a saúde do homem e, principalmente, nas crianças portadoras do vírus da imunodeficiência, que lutam por uma melhor qualidade de vida.

Referências Bibliográficas

1. Schaible U, and Kaufmann SHE. A nutritive view on the host-pathogen interplay. *Trends Microbiol* 2005;13(8):373-380.
2. Saavedra JM. Clinical applications of probiotic agents. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(suppl):1147S-51S.
3. Salminen S e Salminen E. Lactulose, Lactic Acid Bacteria, Intestinal Microecology and Mucosal protection. *Scand J Gastr* 1997; 32(suppl222):45-48.
4. Fuller R and Gibson GR. Modification of the Intestinal Microflora Using Probiotics and Prebiotics. *Scand J Gastroenterol* 1997;32(Suppl)222:28-31.
5. Young RJ, and Huffman S. Probiotic Use in Children. *J Pediatr Health Care* 2003;17:277-283.
6. Trabulsi, LR; Schiffrin, EJ; Sampaio, MMC; Saavedra, JM. Os probióticos e a saúde infantil. In: *Temas de Pediatria (número especial) Nestlé, São Paulo, 2000.*
7. Levy J. The Effects of Antibiotic Use on Gastrointestinal Function. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(1)suppl:s8-s10.
8. Bengamark S. Colonic Food: Pré- and Probiotics. *Am J Gastroenterol* 2000;95(1)suppl:s5-s7.
9. Penna FJ, Filho LAP, Calçado AC, et al. Up-to-date clinical and experimental basis for the use of probiotics. *J Pediatr* 2000;76(suppl.2):209S-217S.
10. Abrams EJ. Opportunistic Infections and other Clinical Manifestations of HIV Disease in Children. *Pediatr Clin North Am* 2000;47(1):79-104.
11. Markowitz JE e Bengamark S. Probiotics in Health and Disease in the Pediatric Patient. *Pediatr Clin North Am* 2002;49(1):127-141.
12. Silva LP e Stamford TLM. Alimentos Probióticos: uma revisão. *Higiene Alim* 2000; 14(68):41-50.
13. Neumann E, Oliveira MAP, Cabral CM, et al. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. *Braz J Med Biol Res* 1998;31(12):1565-1573.
14. Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, et al. *Lactobacillus GG* in prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr* 1999;135(5):564-568.
15. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, et al. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):444S-50S.
16. Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, et al. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium “The intelligent Intestine”, Paris, June 14, 2002. *Am J Clin Nutr* 2003;78:675-83.
17. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit J Nut* 1998;80(suppl.1):147S-171S
18. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 1991;32:439 -442.
19. Schrezenmeir J and Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):362S-4S.
20. Trabulsi, LR; and Sampaio, MMC. Os probióticos e a saúde infantil. *Temas de Pediatria (número especial) Nestlé, São Paulo, 1999.*
21. Ishibashi N, Yamazaki S. Probiotic and safety. *Am J Clin Nutr* 2001;73 (suppl): 465s-70s.
22. Tuomola E, Crittenden R, Playne M, et al. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):393S-8S.

23. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):365S-72S.
24. Duggan C, Gannon J, and Walker WA. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 2002;75:789-808.
25. ESPGHAN Committee on Nutrition: Agostoni C, Axelsson I, Braegger C, et al. Probiotic Bacteria in Dietetic Products for Infants: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Ped Gastroenterol Nutr*, 2004;38:365-374.
26. Bezkorovainy A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr*, 2001; 73(suppl):399S-405S.
27. Vanderhoof JA. Probiotics: future directions. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):1152S-5S.
28. Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, et al. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2001;357:1076-79.
29. Rinne M, Kalliomaki M, Arvilommi H, et al. Effect of Probiotic and Breastfeeding on the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus/Enterococcus* Microbiota and Humoral Immune Responses. *J Pediatr* 2005;147:186-91.
30. Lin H, Su B, Chen A, et al. Oral Probiotics Reduce the Incidence and Severity of Necrotizing Enterocolitis in Very Low Birth Weight Infants. *Pediatrics* 2005;115(1):1-4.
31. Isolauri E, Arvola T, Sutas Y, et al. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1604-10.
32. Marteau PR, Vrese M, Cellier CJ, et al. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(suppl):430S-6S.
33. Stanton C, Gardiner G, Meehan H, et al. Market Potential for Probiotics. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):476S-83S.
34. Cross, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002;34(4):245-253.
35. Adolfsson O, Nikbin S, Meydani N, et al. Yogurt and gut function. *Am J Clin Nutr* 2004;80:245-56.
36. Perdigon, G; Holgado, APR. Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria. In: Fuller, R.; Perdigon, G. *Probiotics 3: Immunomodulation by the Gut Microflora and Probiotics*. Dordrecht: Kluwer Academic 2000:213-233.
37. Erickson KL, and Hubbard NE. *Probiotic Immunomodulation in Health and Disease*. J Nutr 1999; Washington.
38. Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, et al. Symposium: Probiotic Bacteria For Humans: Clinical Systems for Evaluation of Effectiveness. *J Dairy Sci* 1995;78(7):1597-1606.
39. Gorbach SL. Probiotics and gastrointestinal Health. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(1)suppl:s2-s4.
40. Yasui H, Shida K, Matsuzaki T, Yokokura T. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J General Molecular Microbiology* 1999;76(1):383-389.
41. Trois L, Cardoso C, Miura E. Enviado a JPGN 2005.
42. Pessi T, Sutas Y, Hurme M, et al. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1804-1808.
43. Perdigon G; Alvarez S; Holgado, APR. Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*-influence of dose on the secretory immune-response and protective capacity in intestinal infections. *Journal of Dairy Research* 1991;58(4):485-496.

44. Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Rachid M, Agüero, and Gobbato N. Symposium: Probiotic Bacteria For Humans: Clinical Systems for Evaluation of Effectiveness. *J Dairy Sci* 1995;78(7):1597-1606.
45. Vitini, E. et al. Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell* 2000;24(3):223-232.
46. Kaila M, Isolauri E, Soppi E, et al. Enhancement of the Circulating Antibody Secreting cell response in Human Diarrhea by a Human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res* 1992;32:141-144.
47. Shornikova AV, Isolauri E, Burkanova L, et al. A trial in the Karelian Republik of oral rehydration and *Lactobacillus GG* for treatment of acute diarrhoea. *Acta Pediatr* 1997;86:460-465.
48. Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, et al. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994;344:1046-9.
49. Soli-Pereyra B, Aattouri N, and Lemonnier D. Role of food in the stimulation of cytokine production. *Am J Clin Nutr* 1997;66:521S-5S.
50. Salminen M, Tynkkynen S, Rautelin H, et al. The Efficacy and Safety of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus GG* on Prolonged, Noninfectious Diarrhea in HIV Patients on Antiretroviral Therapy: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Study. *HIV Clin Trials* 2004;5(4):183-191.
51. Salminen MK, Rautelin H, Tynkkynen S, et al. *Lactobacillus* Bacteremia, Clinical significance, and Patient Outcome, with Special Focus on Probiotic *L. Rhamnosus GG*. *CID*, 2004;38(1):62-66.
52. Cunningham-Rundles S, Ahrné A, Bengmark S, Johann-Liang R, Marshall F, Metakis L, et al. Probiotics and immune response. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(suppl):22S-25S.
53. Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, et al. Safety of Probiotics That Contain *Lactobacilli* or *Bifidobacteria*. *Clin Inf Dis* 2003;36:775-80.