



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL**

**NÍVEIS DE TNF-A E SEU POLIMORFISMO GENÉTICO EM
PACIENTES HIV POSITIVOS, PORTADORES DE LIPODISTROFIA E
EM USO DE TERAPIA ANTI-RETROVIRAL**

MIGUEL CORRÊA PINHEIRO

**Belém – Pará
2008**

MIGUEL CORRÊA PINHEIRO

**NÍVEIS DE TNF- α E SEU POLIMORFISMO GENÉTICO EM PACIENTES
HIV POSITIVOS, PORTADORES DE LIPODISTROFIA E EM USO DE
TERAPIA ANTI-RETROVIRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Medicina Tropical, do Instituto de Ciências Saúde, da Universidade Federal do Pará, para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosana Maria Feio Libonati Bebiano

**Belém – Pará
2008**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) –
Biblioteca Central/ UFPA, Belém-PA**

Pinheiro, Miguel Corrêa.

Níveis de TNF- α e seu polimorfismo genético em pacientes HIV positivos, portadores de lipodistrofia e em uso de terapia anti-retroviral / Miguel Corrêa Pinheiro; orientadora, Prof^a Dr^a Rosana Feio Libonati. _ 2008

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Belém, 2008.

1. Síndrome de Imunodeficiência Adquirida. 2. HIV. 3. Polimorfismo. 4. FTN. I. Título.

CDD: 22. ed. 616.9792

MIGUEL CORRÊA PINHEIRO

NÍVEIS DE TNF- α E SEU POLIMORFISMO GENÉTICO EM PACIENTES HIV POSITIVOS, PORTADORES DE LIPODISTROFIA E EM USO DE TERAPIA ANTI-RETROVIRAL

Dissertação apresentada à aprovação como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, pela Comissão formada pelos professores:

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Rosana Feio Libonati - Orientador
Universidade Federal do Pará

Prof^a Dr^a Irna Carneiro - Membro
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma - Membro
Universidade Federal do Pará

Dr. Maurício de Pinho Lima - Membro
Universidade Federal do Pará

**Belém – Pará
2008**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela capacidade de criação. Por toda a força necessária para continuar a caminhada.

Aos meus pais, por todo o ensinamento necessário para o desenvolvimento de um bom caráter e por sempre me terem mostrado que eu poderia, com humildade, ir além do que eles foram.

À competente Profa. Dra. Rosana Feio Libonati, minha estimada orientadora, por ter-me ajudado a dar os primeiros passos no mundo da ciência.

Ao Prof. Emanuel Fontel, pela amizade, pelo estímulo de nunca desistir e por ter sido sempre um exemplo para mim.

À Dra. Simone Conde e à Bioquímica Renata, que incansáveis e sempre bem humoradas, ajudaram-me na realização das técnicas laboratoriais.

À Dra. Silvia Mara Bezerra, pelo carinho e ajuda nos momentos em que eu precisei ausentar-me do trabalho para coletar os dados desta pesquisa.

À Dra. Rosineide Duarte, que, sempre amiga, criou meios para diminuir as minhas dificuldades durante o período do mestrado.

Ao amigo Walaci Wagner Morais, pelo carinho, pela paciência e por, mesmo sem perceber, nunca deixou que eu desistisse nos momentos de fraqueza.

Enfim, a todos aqueles, não citados, mas não menos importantes, que torceram e sempre me estimularam: o meu muito obrigado.

Não ousou falar do que fiz, porque também os Espíritos têm o pudor de suas obras; considero, porém, a que iniciei como uma das que mais hão de contribuir para o alívio dos vossos semelhantes.”

Allan Kardec

RESUMO

Este trabalho apresenta os resultados da pesquisa intitulada Níveis de TNF- α e seu Polimorfismo Genético em Pacientes HIV Positivos, Portadores de Lipodistrofia e em Uso de Terapia Anti-retroviral. Objetivou-se, por meio da pesquisa ora apresentada, estudar os níveis séricos de TNF- α e seu Polimorfismo Genético em Pacientes HIV Positivos, Portadores de Lipodistrofia e em Uso de Terapia Anti-retroviral. Justifica esse objetivo a necessidade de melhor conhecer um dos fatores envolvidos no desenvolvimento de uma síndrome clínica conhecida como lipodistrofia, considerada um efeito adverso da terapia anti-retroviral, a fim de que esse conhecimento oportunize a exeqüidade de um regime terapêutico seguro, propiciando, desse modo, uma possível melhoria na qualidade de vida dos pacientes. A metodologia empreendida para a determinação quantitativa dos níveis séricos de TNF- α utilizou-se do método ELISA, enquanto, tendo em vista a pesquisa da ocorrência do polimorfismo, utilizou-se da reação de PCR para a extração do DNA, seguida da digestão pela enzima de restrição NcoI. Participaram da presente pesquisa 40 pacientes, dos quais 26 do sexo masculino e 14 do sexo feminino. Desses pacientes, procedeu-se a dosagem dos níveis de TNF- α , bem como pesquisa da presença ou ausência do polimorfismo genético (-308A).

PALAVRAS-CHAVE: Polimorfismo genético. Fator de Necrósito Tumoral alfa. Lipodistrofia.

ABSTRACT

This work presents the results of the research entitled Levels of TNF- α and its Genetic Polimorfism in Patient Positive HIV, Bearers of Lipodistrophy and in Use of Anti-retroviral Therapy. It was aimed at, through the research for now presented, to study the levels series of TNF- α and its Genetic Polymorphism in Patient Positive HIV, Bearers of lipodistrophy and in Use of Anti-retroviral Therapy. The need of know better the factors involved in the development of a syndrome clinic known as lipodistrophy justifies that aims, considered an adverse effect of the anti-retroviral therapy, so that that knowledge oportunize the reliable of a safe therapeutic regime, propitiating, in that way, a possible improvement in the quality of the patients' life. The methodology undertaken for the quantitative determination of the serics levels of TNF- α it was used of the ELISA method, while, tends in view the research of the occurrence of the polymorphism, it was used of the reaction of PCR for the extraction of DNA, followed by the digestion for the restriction enzyme NcoI. Forty patients participated of the present researches, which 26 were male and 14 were female. In this patient, the dosing of the TNF- α levels was proceeded, as well as it researches of the presence or absence of the genetic polymorphism (-308A).

KEYWORDS: Genetic Polymorphism. Alpha - Tumor Necrosis Factor. Lipodistrophy.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A SÍNDROME DA IMUNODEFICÊNCIA ADQUIRIDA.....	11
1.2	EPIDEMIOLOGIA.....	12
1.3	ETIOLOGIA.....	14
1.3.1	Genes estruturais	15
1.3.2	Genes reguladores	15
1.4	MECANISMOS DE TRANSMISSÃO.....	16
1.5	DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO.....	16
1.6	TRATAMENTO.....	16
1.7	LIPODISTROFIA DO HIV.....	19
1.8	ALTERAÇÕES LIPÍDICAS.....	21
1.9	ALTERAÇÕES GLICÊMICAS E RESISTÊNCIA INSULÍNICA.....	22
1.10	ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DE TNF- α E SEU POLIMORFISMO GENÉTICO.....	25
1.10.1	Fisiopatologia do TNF-α	26
1.10.2	Polimorfismo genético do TNF-α	29
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	CASUÍSTICA E COLETA DE DADOS.....	34
4.2	METODOLOGIA.....	34
4.3	ETAPAS DO TRATAMENTO.....	35
4.3.1	Caracterização dos pacientes	35
4.3.2	Exame físico	35
4.3.3	Exames complementares	35
4.3.4	Fichas protocolares	35
4.3.5	Avaliação dos níveis de TNF-α e polimorfismo no gene codificador da citocina	36
4.3.6	Métodos de Biologia Molecular	36
4.4	MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	38

5	RESULTADOS	39
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51
	APÊNDICES	57
	ANEXO	64

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Síndrome de Lipodistrofia (Giba).....	24
Figura 2 - Síndrome de Lipodistrofia (perda da gordura de bichat).....	24
Figura 3 – Síndrome de Lipodistrofia (lipoacumulação visceral).....	24
Figura 4 – Síndrome de Lipodistrofia (lipoatrofia em membros)	25
Figura 5 – Mecanismo de apoptose e da transcrição gênica induzidos pelo FNT- α	31
Figura 6 – Representação da distribuição dos alelos do FNT- α no gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata e submetido à eletroforese, conforme o tipo de nucleotídeo presente na posição – 308.....	37
Gráfico 1 Média e desvio padrão da idade em anos correlacionada com o sexo, dos pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto.....	39
Gráfico 2: Média e desvio padrão dos níveis de TNF- α comparados com os sexos masculino e feminino dos pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto	40
Gráfico 3: Correlação linear negativa entre os níveis séricos de TNF- α e a idade dos pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto.....	40
Gráfico 4 mostrando a correlação linear negativa entre os níveis de TNF- α e o tempo de uso de TARV pelos pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto	41
Gráfico 5: Média e desvio padrão do tempo de uso de TARV de acordo com o sexo e o tempo médio e desvio padrão total da amostra (pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto)	41
Gráfico 6: Níveis séricos e desvio padrão dos níveis de TNF- α nas diferentes formas clínicas de lipodistrofia (formas lipoatrófica, mista e lipohipertrófica) dos pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto	42
Gráfico 7: Média e desvio-padrão de TNF- α na presença ou ausência do polimorfismo genético -308A dos pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto	46
Gráfico 8: Comparação dos níveis de TNF- α com a carga viral dos pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA

Ao tratar sobre a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS ou Sida), Nadler (1997) define essa doença como uma avançada manifestação clínica da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, que apresenta-se como HIV-1 e HIV-2. Acrescenta ainda que geralmente a infecção pelo HIV leva a uma imunossupressão progressiva, especialmente da imunidade celular e a uma desregulação imunitária. Tais desregulações e supressões imunitárias acabam por resultar em infecções oportunistas, neoplasias e/ou manifestações outras (demência, caquexia, trombocitopenia, etc.) que são condições definidoras de aids, quando em presença da infecção pelo HIV. Essa síndrome vem modificando profundamente a prática médica, a sociedade contemporânea e as iniciativas em saúde pública em todo o mundo.

Em 1982, a aids foi reconhecida a partir da identificação de alguns casos de pneumonias extremamente graves e raras que logo chamaram a atenção dos epidemiologistas do Centro de Controle de Doenças (CDC) nos Estados Unidos. Sepkowitz (2001), ao analisar essas pneumonias, afirma que, até aquele momento, aquelas pneumonias eram observadas somente em pessoas com graus severos de imunodeficiência, ocasionada por qualquer motivo, tais como por quimioterapia e/ou mesmo por doenças congênitas e eram causadas pelo *Pneumocystis jiroveci*. Também podiam-se observar que as pessoas acometidas compartilhavam características comuns, quais sejam: adultos jovens e sadios, homens que fazem sexo com homens (HSH) e usuários de drogas. Adiante em 1983, o HIV foi isolado pelo grupo de Luc Montagnier, Instituto Pasteur, e posteriormente, em 1984, por Robert C. Gallo, do CDC dos EUA.

A epidemia da infecção pelo HIV e da aids tornou-se um fenômeno global, dinâmico e instável, cuja ocorrência nas diferentes regiões do mundo depende, entre outros aspectos, do comportamento individual e coletivo do indivíduo. Essa doença destaca-se entre as enfermidades infecciosas emergentes pela sua grande magnitude e pela extensão dos danos causados às populações e, desde a sua origem, cada uma de suas características e repercussões tem sido exaustivamente discutida pela comunidade científica e pela sociedade em geral, tal como preceituam Brito, Castilho e Szwarcwald (2001) e ratifica Scheld (2005) e Valente (2005), porquanto esses estudiosos afirmam que apesar de ter sido restrita inicialmente a áreas específicas, o HIV disseminou-se rapidamente por todo o mundo, ocasionando uma epidemia massiva e tornando-se mundialmente um dos maiores causadores de morte.

De acordo com estimativas do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS) em sua última atualização de 2007, a prevalência do HIV parece estar estabilizada. Entretanto, o número de pessoas vivendo e convivendo com esse vírus aumentou para 33,2 milhões em 2007, comparado com 29,0 milhões em 2001. Outras estimativas demonstram que 2,5 milhões de pessoas foram infectadas pelo vírus HIV pela primeira vez no ano de 2007 e que 2,1 milhões de pessoas morreram de doenças relacionadas à aids. Esse dados desenham um mapa preliminar da geografia da aids em certos espaços mundias, tal como esposados em UNAIDS (2007) e Melchior (2006), respectivamente, a saber:

- A África Subsaariana permanece como sendo a região mais afetada. Dados demonstram que 1,7 milhões de pessoas foram infectadas pela primeira vez pelo HIV no ano de 2007, chegando a um número alarmante de 22,5 milhões de pessoas vivendo com o HIV. Outro fator relevante é o grande número de mulheres acometidas, chegando a 61% do total de pessoas infectadas, o que difere de outras regiões do mundo.
- No Brasil, cerca de 41 mil novos casos de aids foram registrados em 2004. A epidemia iniciou atingindo principalmente homens que mantinham relações sexuais com homens e, em seguida, usuários de drogas injetáveis. No entanto, hoje a transmissão heterossexual é responsável por uma proporção crescente de infecções, sendo as mulheres as mais afetadas. Conjuntamente a isso, observa-se a interiorização progressiva dessa epidemia cujo início remonta à década de 90. Esse contexto é corroborado, em consonância com Tin (2005); Fernandes (2005); Yu (2005); Garcia (2005), por meio da constatação de que, há algumas décadas a aids era vista como uma doença que levava inevitavelmente ao óbito pelo fato de não haver qualquer possibilidade de interferência farmacológica capaz de alterar o seu curso. Contudo o tratamento dessa enfermidade, que era tida como uma sentença de morte, adquiriu avanços importantes após a introdução da terapia anti-retroviral combinada, outrora denominada Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) e atualmente TARV, que tem mudado drasticamente o curso da infecção pelo HIV.

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Após duas décadas, desde que a aids foi reconhecida, o padrão epidemiológico mundial da infecção pelo HIV sofreu importantes modificações. Atualmente a doença está disseminada de forma ampla em todos os continentes, o que contrasta com o início, quando a infecção se concentrava na América do Norte, Europa Ocidental e regiões da África Subsaariana. De acordo com o relatório da UNAIDS (2007), há uma estimativa de que, atualmente, existam no mundo todo em torno de 33,2 milhões de pessoas portadoras do HIV e

que no ano de 2007 ocorreram 2,5 milhões de novas infecções. No mesmo ano ocorreram 2,1 milhões de óbitos em decorrência da aids. Acresce a isso a triste estatística de que 68% das pessoas infectadas pelo HIV e 76% das mortes decorrentes desta doença estão concentrados na África Subsaariana. Em contra-partida, na Costa do Marfim, Quênia e Zimbábue, têm-se observado uma queda na taxa de prevalência; o que também se tem observado em países asiáticos dos quais são exemplos Camboja, Mianmar e Tailândia.

As estatísticas esposadas no documento supramencionado informam, ainda, que na América Latina, a epidemia permanece estável. No ano de 2007 foram estimados 100 mil novos casos de infecção pelo HIV e 58 mil mortes. Atualmente se estima que 1,6 milhões de pessoas vivem com HIV naquela região. A transmissão do vírus persiste entre populações com risco iminente, haja vista o exercício cotidiano de certas práticas de risco, tal como é exemplo o risco à que profissionais do sexo e homens que fazem sexo com homens estão expostos. O sexo com parceiros que se descuidam da necessária proteção constitui-se em um grande fator de risco, propenso a desencadear várias doenças em níveis, muitas vezes, epidemiológicos. Ademais, fatores como o estigma da doença e a discriminação generalizada têm dificultado os esforços na tentativa de se conseguir o acesso universal à prevenção, ao tratamento, à atenção e ao apoio em relação ao HIV.

O referido documento, em consórcio com o BRASIL (2004) revela que, no Brasil, desde o início da epidemia até 30 de junho de 2004 foram registrados 362.364 casos de aids, tendo sido registrado 160.933 óbitos por essa síndrome no mesmo período. Atualmente o nosso país concentra um terço das pessoas que vivem com HIV na América Latina. É digno de destaque o índice de incidências da aids no Estado do Pará, que notificou, entre os períodos de 1985 a 2006, 4.049 casos, sendo 2.809 ocorrências acometendo indivíduos do sexo masculino e 1.240 acometendo indivíduos do sexo feminino. Merece atenção, ainda, o fato de que no Pará também foi observado o maior número de casos incidentes em indivíduos heterossexuais, tal como nos diz SESP (2006). Após duas décadas, desde que a aids foi reconhecida, o padrão epidemiológico mundial da infecção pelo HIV sofreu importantes modificações. Atualmente a doença está disseminada de forma ampla em todos os continentes, o que contrasta com o período inicial do aparecimento da doença, quando a infecção concentrava-se na América do Norte, Europa Ocidental e regiões da África Subsaariana.

O documento UNAIDS (2007) proporciona a construção de um quadro panorâmico de prognóstico e de ocorrências já registradas de infecção pelo vírus HIV. A seguir, resumimos as principais informações apresentadas pelo referido documento:

- Há uma estimativa de que, atualmente, existam no mundo todo cerca de 33,2 milhões de pessoas portadoras do HIV e que no ano de 2007 ocorreram 2,5 milhões de novas infecções. No mesmo ano ocorreram 2,1 milhões de óbitos em decorrência da aids.
- Das pessoas infectadas pelo HIV, 76% das mortes decorrentes de aids estão concentrados na África Subsaariana. Entretanto, na Costa do

Marfim, Quênia e Zimbábue, tem-se observado uma queda na taxa de prevalência, o que também tem-se observado em países asiáticos, tais como Camboja, Mianmar e Tailândia.

- Na América Latina, a epidemia permanece estável. No ano de 2007 foram estimados 100 mil novos casos de infecção pelo HIV e 58 mil mortes. Atualmente a estimativa é de que 1,6 milhões de pessoas vivem com HIV na América Latina. A transmissão do HIV persiste entre populações com risco acrescido de exposição, destacando-se os profissionais do sexo e homens que fazem sexo com homens. O sexo desprotegido entre homens é um fator de risco em várias epidemias. Além do que fatores como o estigma da doença e a discriminação generalizada têm dificultado os esforços na tentativa de se conseguir o acesso universal à prevenção, ao tratamento, à atenção e ao apoio em relação ao HIV.
- No Brasil, desde o início da epidemia até 30 de junho de 2004 foram registrados 362.364 casos de aids, do que resultaram 160.933 óbitos por essa síndrome no mesmo período. Atualmente no Brasil concentra-se um terço das pessoas que vivem com HIV na América Latina. Nesse contexto, o Estado do Pará notificou no período de 1985 a 2006 4.049 casos de aids, sendo 2.809 casos acometendo indivíduos do sexo masculino e 1.240 acometendo indivíduos do sexo feminino. Preocupante estatística também é a de que o Pará concentra o maior número de casos de heterossexuais infectados pelo HIV segundo boletim da SESP (2006).

1.3 ETIOLOGIA

O HIV foi isolado pela primeira vez em 1983. Em 1986 foi identificado o segundo agente etiológico com características semelhantes ao HIV-1, denominado de HIV-2. Ambos são capazes de infectar seres humanos e pertencem à família dos retrovírus (SEPKOWWITZ, 2001). Em trabalho produzido por Nadler (2001), os vírus HIV-1 e HIV-2 são descritos como membros da família Retroviridae, e subfamília dos lentivírus. Esse grupo de vírus caracteriza-se por infecção persistente, a despeito da resposta imune do hospedeiro; por uma replicação dependente de um DNA dupla-hélice intermediário (provírus) integrado ao genoma da célula hospedeira, conforme explica Nadler (1997).

Acresce ainda ao estudo do HIV, em consonância com Leão et al (1997), a constatação de que o genoma desse vírus é constituído por duas moléculas iguais de RNA de cadeia simples, envolto por uma capa protéica denominada capsídeo viral. Mais externamente existe ainda uma matriz de natureza lipoprotéica, o envelope, que abriga as glicoproteínas

virais. No interior do nucleocapsídeo encontra-se também a enzima DNA polimerase, dependente de RNA (transcriptase reversa), cuja função é regular o processo inicial da replicação dos retrovírus, quando ocorre a síntese de uma cadeia de DNA de cadeia simples, a partir do molde do RNA viral. A partícula viral apresenta um capsídeo com simetria icosaédrica, forma esférica e um tamanho final de aproximadamente 150nm. O autor supramencionado neste parágrafo apresenta, ainda, uma subdivisão em três grupos do vírus HIV, quais sejam: os grupos O, M e N, sendo o grupo M considerado o principal e o mais disseminado, além de ser composto por 10 subtipos designados de A a J.

Nadler (1997) expõe a estrutura genômica do HIV, descrita a seguir.

1.3.1 Genes estruturais:

- Gene env: codifica a síntese das proteínas do envelope do vírus, ou seja, gp160, cuja quebra gera a gp120 e gp41.
- Gene gag: ou gene do antígeno de grupo, que codifica a síntese das proteínas da região central do vírus, ou seja, p55, cuja quebra gera a p24 e p17.
- Gene pol: codifica as enzimas que atuam na replicação viral, ou seja, p66, p51 e p31.

1.3.2 Genes reguladores:

- Gene tat – responsável pela transativação viral, isto é, pela transmissão de sinais recebidos pela célula infectada e passados ao genoma viral.
- Gene rev – responsável pela regulação da síntese de proteínas virais, isto é, regula a proporção de produção de proteínas reguladoras em relação às estruturais.
- Gene nef – regula negativamente a síntese das proteínas virais.
- Gene vif – é conhecido como fator de virulência, por acreditar-se que sua presença esteja associada a maior transmissibilidade da infecção.

As proteínas reguladoras são sintetizadas em concentrações menores e os métodos sorológicos habituais não detectam anticorpos contra estas proteínas (NADLER, 1997).

1.4 MECANISMOS DE TRANSMISSÃO

Descrevendo os mecanismos de transmissão do HIV, Scheld (2005) afirma claramente que o contato sexual por relacionamento HSH ou heterossexual é o principal meio de transmissão do HIV, contribuindo com mais de 60% dos casos. A transmissão sanguínea, por sua vez, contribui com 30% das ocorrências. Em contrapartida observa-se o decréscimo da transmissão do vírus por meio da exposição a sangue e a seus derivados, dado o controle feito por sorologia. Por outro lado, em usuários de drogas injetáveis é crescente o número de contaminados, sendo esse último grupo de indivíduos responsável pela maioria (80%) em que o risco foi atribuído ao sangue. Já a transmissão perinatal, insignificante no início da epidemia, atualmente contribui com cerca de 3-5% dos casos com tendência ascendente em países subdesenvolvidos, haja vista o grande número de mulheres infectadas. O risco de transmissão da mãe para o concepto, incluindo o período gestacional, o trabalho de parto e a amamentação é genericamente estimado em 25%. A transmissão pode ser drasticamente reduzida com o uso de terapia anti-retroviral.

1.5 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Vários são os testes atualmente disponíveis, tais como: Ensaio Imunoenzimático ou ELISA; Reação de Imunofluorescência Indireta; Reação de Imunotransferência ou Western-Blot; PCR para diagnóstico da carga viral - discute-se a realização destas na eventual confirmação diagnóstica – sendo já aceito no diagnóstico do recém-nascido de mãe soropositiva – visto serem altamente sensíveis e com custo competitivo ao Western-Blot (NADLER, 1997).

1.6 TRATAMENTO

O tratamento da AIDS objetiva o combate específico ao HIV e a prevenção e controle de inúmeras infecções oportunistas que acometem o indivíduo, principalmente a partir do momento em que desse acometimento resulta deficiência imunológica grave. A avaliação dessa deficiência imunológica deve ser feita clínica e laboratorialmente, com mensuração periódica de linfócitos T auxiliares (CD4+). Pacientes que apresentam número de CD4+ menor que 200 células/mm³ têm maior probabilidade de desenvolver qualquer uma dessas infecções. Paralelamente, considera-se que indivíduos com níveis de carga viral acima de 20.000 cópias/ml apresentarão rápida deterioração do sistema imune e, conseqüentemente, deterioração clínica, caso inexista intervenção medicamentosa, tal como é recomendado em Brasil (2003).

Rang et al (2004) afirma que o principal objetivo da terapia anti-retroviral é retardar a progressão da imunodeficiência e/ou restaurar, tanto quanto possível, a imunidade, aumentando o tempo e a qualidade de vida da pessoa infectada. Por outro lado, Oliveira e Lins (2003) informam que a TARV – associação de três ou mais drogas, tendo os inibidores da protease como classe de drogas predominantes – tem levado a uma substancial redução na mortalidade dos pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em todo o mundo, culminando com o aumento da sobrevida em muitos anos, redução de episódios mórbidos, como infecções e cânceres (Sarcoma de Kaposi, linfoma), diminuição do número de hospitalizações, e conseqüente melhoria da qualidade de vida desses pacientes. Muitos regimes terapêuticos resultam em supressão quase completa da replicação do HIV-1.

Ressaltam, ainda, que vários fatores chamam a atenção quanto à toxicidade da terapia anti-retroviral. Primeiro, desde que a erradicação não ocorra com a terapia atual, essa necessita ser indefinida, a fim de preservar os benefícios clínicos. Segundo, a gravidade das proporções epidêmicas da infecção por HIV leva à liberação de muitos agentes anti-retrovirais, frequentemente com pouco conhecimento sobre a sua segurança em longo prazo. Terceiro, os benefícios da terapêutica têm diminuído os sintomas relacionados com as infecções oportunistas e dado espaço a sintomas relacionados com o uso das drogas. Contudo com o uso do esquema HAART, a replicação do HIV é inibida em grande parte das células do SNC que provocam a redução da presença do RNA do HIV no plasma para níveis com certo limite de detecção e prolongamento da sobrevida do paciente. Todavia, o esquema é complexo e apresenta muitos efeitos adversos. Além disso, a adesão do paciente a esse tratamento é difícil, e a administração do tratamento pode ser permanente, visto que o HIV não é erradicado. O vírus permanece latente nas células T de memória, integrado no genoma do hospedeiro, constituindo uma fonte para a reativação potencial se os fármacos forem interrompidos.

Em Brasil (2003), encontra-se a recomendação de que o tratamento anti-retroviral continua sendo indicado para todos os pacientes infectados pelo HIV, sintomáticos ou assintomáticos, que apresentam contagem de linfócitos T CD4+ abaixo de $200/\text{mm}^3$. Quando o paciente assintomático apresenta contagem de linfócitos T CD4+ entre 200 e $350/\text{mm}^3$, o início da terapia anti-retroviral deve ser considerado conforme a evolução de parâmetros imunológicos, virológicos (carga viral) além de se ter em conta outras características dos pacientes (motivação, capacidade de adesão, co-morbidades). Ademais, espousa o referido documento que o uso de esquemas anti-retrovirais altamente ativos (três ou mais drogas) está recomendado para todos os pacientes em início de terapia. A terapia inicial geralmente é composta por dois inibidores de transcriptase reversa análogos ao nucleosídeo (ITRN) associados a um inibidor de transcriptase reversa não análogo ao nucleosídeo (ITRNN). Nos pacientes com imunodeficiência mais grave, sintomáticos ou assintomáticos, o ITRNN deve ser preferencialmente o efavirenz, e existe uma alternativa de, ao invés de um ITRNN, se utilizar um inibidor de protease. Na edição de 2006, o documento infra-mencionado alude que, na escolha de ITRN para compor o esquema anti-retroviral inicial com ITRNN ou IP, estão recomendadas preferencialmente as associações AZT/3TC e d4T/3TC. Essas associações AZT/ddI (com maior número de comprimidos), ddI/3TC (menos avaliada

em estudos clínicos) e ddI/d4T (com maior potencial de toxicidade) permanecem como opção de segunda escolha.

O uso de potente terapia antiretroviral tem oportunizado a diminuição da mortalidade e da progressão da doença em pacientes infectados com HIV. Todavia, a morbidade secundária a esta terapia em longo prazo tem crescido em importância. Vale salientar que essas morbidades podem ser definidas como, a síndrome de lipodistrofia, a dislipidemia, a resistência à insulina e a osteopenia, que são os efeitos colaterais mais preocupantes, afetando tanto adultos, como crianças. Além do que, as alterações na composição da gordura corporal (síndrome lipodistrófica) prejudicam a auto-imagem do paciente e podem interferir na aderência ao tratamento antiretroviral, levando à falha terapêutica (VALENTE et al., 2005).

Estudos evidenciam que a utilização prolongada da TARV, principalmente dos inibidores de protease, tem um impacto importante sobre o estado nutricional de seus usuários. Antes da chamada era-HAART, a perda de peso e a desnutrição, conseqüências das infecções oportunistas, eram os maiores problemas nutricionais (JAIME et al., 2004).

Os efeitos adversos relacionados à administração de agentes anti-retrovirais, em consonância com o que afirma Moyle (2001), representam o maior obstáculo ao início e à continuidade da terapia. A freqüência, a severidade, as seqüelas e a maleabilidade dos efeitos provocados atuam em favor dos riscos na relação risco/benefício, fazendo com que seja um verdadeiro dilema o debate sobre quando iniciar a terapia anti-retroviral.

Atualmente com os avanços no tratamento, as pessoas com HIV comumente apresentam ao longo da infecção uma variedade de problemas nutricionais como perda de peso, redistribuição de gordura e obesidade. A incidência da desnutrição tende a aumentar devido à sobrevivência prolongada do indivíduo, sendo essencial monitorar anualmente o peso dos pacientes assintomáticos e freqüentemente daqueles sintomáticos ou com mudança de peso. Para Moyle (2001) o foco principal das discussões sobre esse tema tem-se situado nas mudanças metabólicas e morfológicas, freqüentemente aliadas a lipodistrofia, que acompanha a terapia de longo prazo em muitos pacientes. As pesquisas realizadas com o intuito de caracterizar e compreender os mecanismos desses problemas têm descoberto outras alterações em indivíduos infectados por HIV, as quais podem ou não estar relacionadas à lipodistrofia, ao uso de drogas específicas e/ou à classe de medicamentos, ou, ainda, à própria infecção. Já Grinspoon e Carr (2005), ao analisar as complicações metabólicas do assunto em tela afirmam que as complicações metabólicas, incluindo dislipidemia, resistência à insulina, alterações nos níveis hormonais e distribuição alteradas da gordura corpórea (caracterizada por perda do tecido adiposo subcutâneo e um relativo aumento da gordura visceral) são comuns em adultos infectados pelo HIV em uso de TARV. Essas complicações podem aumentar o risco de doenças cardiovasculares ou eventos cerebrovasculares. Destarte, lembra Lichtenstein (2005), a síndrome de lipodistrofia compreende condições variadas (lipoatrofia, lipohipertrofia, síndrome mista, geralmente associada com dislipidemia e resistência à insulina). Essas condições, as quais algumas vezes podem ocorrer conjuntamente, também podem ocorrer independentemente, sugerindo um complexo de causas multifatoriais

Alterações no hábito corporal relacionadas ao uso dos Inibidores da Protease (PI) têm sido relatadas desde 1997, em ambos os sexos. Foram, também, notadas em pacientes não tratados com PI. As mudanças características incluem acúmulo de gordura com aumento da cintura abdominal, da gordura dorsocervical (“giba de búfalo”), aumento das mamas e lipomatose. Podem, também, manifestar-se por meio da perda ou depleção de gordura em nádegas, membros (resultando em proeminências das veias) e face. Não obstante, há possibilidade de os pacientes apresentarem apenas acúmulo anormal de gordura, ou somente depleção dessa gordura, ou ambos, sugerindo, dessa forma, que eles podem desenvolver anomalias distintas (CASTELLAR; VILAR, 1999).

1.7 LIPODISTROFIA DO HIV

No que diz respeito aos aspectos genéticos que favorecem o desenvolvimento da lipodistrofia, associada ao tratamento antirretroviral (TARV) até o momento, é salutar o adendo de que poucas informações há sobre o tema. Os que aí se debruçam de forma mais aprofundada destacam o papel individual dos diferentes fármacos, da duração do tratamento, do sexo, idade e do grau de recuperação dos linfócitos CD4+. Nenhum modelo, no que pese a possibilidade de aplicação de todos esses fatores, é, no entanto, capaz de explicar completamente os mecanismos que levam ao desenvolvimento da lipodistrofia. É provável que outras variáveis ainda não identificadas façam parte desse processo; porém é importante frisar que, provavelmente, a susceptibilidade individual exerça algum tipo de influência no seu aparecimento. Lichtenstein (2005) conjectura que a prevalência da lipodistrofia varia de 2 a 84% em pacientes adultos e de 1 a 43% em crianças. Pacientes com lipodistrofia têm frequentemente obesidade central (lipohipertrofia) e lipoatrofia em face, membros e nádegas.

Pacientes podem apresentar apenas lipoatrofia ou apenas lipohipertrofia central, porém os dois achados podem vir associados. O aumento da gordura visceral está associado com risco cardiovascular aumentado bem como contribui para outros fatores de riscos conhecidos, incluindo resistência à insulina e a desordens lipídicas, em pacientes sem infecção pelo HIV.

Desse modo, o impacto da má distribuição de gordura e sua associação com resistência à insulina e dislipidemia há de ser preocupações óbvias em pacientes infectados pelo HIV. Grinspoon e Carr (2005) afirmam que o tipo, a duração e o uso corrente ou não de terapia anti-retroviral estão fortemente associados com a severidade da lipodistrofia. A terapia combinada baseada no uso de dois análogos nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa e um inibidor da protease é especialmente associada com a lipoatrofia severa. Por outro lado, seguindo a esteira de Lichtenstein (2005), que alude aos muitos estudos atualmente empreendidos acerca dos diversos mecanismos patogênicos para a redistribuição da gordura corpórea, pode-se afirmar que tais mecanismos incluem comprometimento na diferenciação de adipócitos, de apoptose de adipócitos mediada por citocinas pró-inflamatórias, como o

fator de necrose tumoral (TNF- α), desregulação da 11- β -hidroxiesteróide desidrogenase (11- β -HSD) e toxicidade mitocondrial.

Estudos *in vitro* chamam atenção, demonstrando que os inibidores da protease (PIs) podem inibir a lipogênese e que, especialmente o indinavir, pode agir pela alteração da sinalização do ácido retinóide, que representa uma etapa importante para a sensibilidade insulínica intracelular. A hipótese é a de que os PIs inibem proteínas envolvidas no metabolismo lipídico, promovendo diminuição da diferenciação de adipócitos periféricos, com conseqüente lipólise periférica e aumento de ácidos graxos livres circulantes, com dislipidemia, obesidade visceral e resistência à insulina. O uso de indinavir e a associação de saquinavir-ritonavir são fortemente relacionados à síndrome. De um modo geral, a prevalência relatada de mudança na forma corporal, relacionada com PIs, varia de 1,8% a 71% em pacientes estudados, que foram submetidos de 3 a 24 meses de terapia. Em estudo recente, Castellar e Vilar (1999) observaram que a terapia com PI induziu a um aumento de duas a três vezes nos níveis de apo-E e apo-C-III, associado a um incremento de até oito vezes de lipopartículas contendo apo-B. Entre tais parâmetros, apenas a apo-C-III se associou fortemente à ocorrência de lipodistrofia. Esta última apresentou-se em cerca de 50% dos pacientes tratados Castellar e Vilar (1999).

Em seus estudos, Grinspoon e Carr (2005) ponderam que o inibidor da transcriptase reversa análogo ao nucleosídeo (ITRN) mais fortemente associados à lipoatrofia é a estavudina, particularmente quando usada em combinação com a didanosina. A lipoatrofia associada com ITRN pode ser devido, em parte, à injúria mitocondrial, resultante da inibição da -DNA polimerase e da depleção do DNA mitocondrial de adipócitos, no que pese a extensão e a especificidade desse efeito permanecer desconhecido. Ademais, os ITRN podem inibir a adipogênese e a diferenciação de adipócitos; podem promover a lipólise e, ainda, exercer efeito tóxico sinérgico aos PIs *in vitro* e *in vivo*. Por outro lado, as experiências de Lima, Verdeal e Farias (2005) espelham, além desses efeitos colaterais, alterações no metabolismo ósseo dos indivíduos soropositivos. A prevalência relatada de diminuição da densidade mineral óssea em adultos infectados pelo HIV tem sido 22-50% de adultos com osteopenia e 3-21% com osteoporose.

Para o diagnóstico da lipodistrofia podem ser utilizadas medidas antropométricas, absorimetria com dupla energia de Rx (DEXA), tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética. Já para avaliação da dislipidemia, são necessárias dosagem dos níveis de colesterol total / frações, e triglicerídeos e para avaliação da resistência à insulina e diabetes, a realização de curva glicêmica (GTT) e dosagem da insulinemia basal (VALENTE et al., 2005).

Ao analisar os possíveis tratamentos aplicáveis à lipodistrofia, é possível afirmar não existir terapia aprovada para nenhum componente da síndrome lipodistrófica, razão por que a decisão do tratamento condiciona-se a certas variáveis, das quais elecam-se:

- Presença de sintomas;
- Estado clínico do paciente;

- Tipo de anti-retrovirais utilizados;
- Tempo de uso dos anti-retrovirais;
- Presença de um ou de mais fatores de risco cardiovascular.

Os resultados preliminares de estudos em que o PIs foi trocado por inibidores da transcriptase reversa não-nucleosídeos (p.ex., nevirapina, efavirens) têm mostrado melhora subjetiva e diminuição da gordura abdominal visceral, em alguns pacientes. Castellar e Vilar (1999) confirmam que estudos com o hormônio do crescimento têm revelado alguma redução na obesidade de tronco e na “giba de búfalo” após três a seis meses de tratamento, mas nenhuma reversão da perda de gordura periférica. Em alguns pacientes, as melhoras obtidas reverteram-se com a interrupção do tratamento. Exercícios físicos podem reduzir a massa gordurosa total, inclusive a localizada no tronco. Lipoaspiração tem sido usada com sucesso no manuseio da giba; entretanto, não se verifica semelhante sucesso quando empreendida para a retirada de gordura acumulada no abdome, que é, sobretudo, gordura visceral. O risco de desenvolvimento das alterações lipodistróficas deve ser discutido com todo paciente, suscetível à terapia com PI. Corroboram as informações que aqui se trouxe à baila os estudos de Schwenk et al (2000), segundos quais pesquisa com pacientes soropositivos, submetidos à terapia anti-retroviral durante 12,6 meses, nos EUA, demonstrou que os IP acarretam alterações significativas na composição corporal. Considerando que os pacientes não estavam edemaciados e não houve aumento de massa magra, esse ganho ponderal estaria relacionado ao aumento de massa gorda. Sugerindo, desse modo, que o aumento de gordura é proporcional à porcentagem de gordura corpórea do indivíduo antes do início da terapia.

1.8 ALTERAÇÕES LIPÍDICAS

A dislipidemia em níveis associados com aumento do risco de doença cardiovascular ocorre em aproximadamente 70% dos pacientes infectados pelo HIV-1 recebendo terapia antiretroviral (MONTESORI et al., 2004). As características da dislipidemia nessa síndrome incluem hipertrigliceridemia severa, baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) e elevação da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Essa dislipidemia é mais importante entre os pacientes que recebem inibidores de protease e entre aqueles com redistribuição de gordura (lipoacumulação e lipoatrofia). Grinspoon e Carr (2005), com base em seus estudos, afirmam que esses padrões são extremamente heterogênicos e, somados a outros fatores presentes no paciente HIV, tais como resistência à insulina e inflamação vascular, levam ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares prematuras.

Muitos estudos postulam a associação entre hipercolesterolemia e/ou hipertrigliceridemia e uso de inibidores de protease. Após cinco anos de monitoramento de pacientes soropositivos em terapia com IP, observou-se uma incidência cumulativa de novos casos de hipertrigliceridemia. Estudos com um grupo de pacientes que nunca receberam

inibidor de protease, e que estavam em tratamento com inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeo, demonstrou que aqueles pacientes apresentavam níveis significativamente elevados de triglicédeos, sugerindo, desse modo, a existência de outros fatores implicados nessas alterações. As duas principais combinações de drogas observadas foram zidovudina-lamivudina e estavudina-lamivudina (VALENTE, 2005). Analisando fatores de risco, Sweet (2005) ponderam que fatores de risco tradicionais contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em pacientes, razão por que esses fatores de risco demandam a necessidade de manejo agressivo. Acresce, ainda, que pacientes HIV positivos parecem suscetíveis a um aumento do risco de doença coronariana, bem como para diabetes e hipertensão, todos considerados fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A terapia anti-retroviral parece aumentar a progressão da resistência insulínica e dislipidemia. O tratamento dos fatores de risco é complicado devido às interações droga-droga e droga-doença.

Ademais, estudo realizado por Haugaard e colaboradores (2005) sugere que pacientes HIV positivos com normoglicemia apresentam diminuição no metabolismo da glicose e lipídios em múltiplas vias, chegando a envolver o fígado, tecido muscular e as alterações funcionais da célula β pancreática.

Destarte, na ausência de um consenso específico para o tratamento de dislipidemia nos indivíduos soropositivos, utilizam-se os mesmos critérios do National Cholesterol Education Program para a população geral. Todos os pacientes adultos infectados pelo HIV necessitam de dosagem anual de lipídios ou antes do início da terapia anti-retroviral, ou a cada dois meses após a instituição do tratamento, ou após qualquer mudança em seu esquema terapêutico. É importante a investigação da presença de história familiar para dislipidemia e/ou diabetes, bem como dos hábitos de vida do paciente, tais como uso de álcool, ou de medicamentos como estrógeno. Dessa forma, a mudança no estilo de vida torna-se indispensável no tratamento da dislipidemia. As estatinas como a sinvastatina, lovastatina e atorvastatina são metabolizadas pelo citocromo P-450, isoforma 3^a4, o qual é inibido pelos inibidores de protease. Entretanto, a pravastatina e o ezetimibe podem ser boas alternativas para o tratamento. Nos casos de associação entre as drogas anti-retrovirais e os antilipemiantes (fibratos e/ou estatinas), é fundamental uma rigorosa monitoração da função renal, das enzimas hepáticas e da creatinofosfoquinase (CPK), em razão da potencialização dos efeitos nefrotóxicos, hepatotóxicos e miotóxicos dessas medicações, tal como preceituam Valente (2005); Grinspoon (2005) e Carr (2005).

1.9 ALTERAÇÕES GLICÊMICAS E RESISTÊNCIA INSULÍNICA

O primeiro registro de casos de hiperglicemia em pacientes soropositivos foi formalizado pelo FDA que, em 1997, relatou sua ocorrência em 83 pacientes em uso de terapia anti-retroviral com inibidores de protease. Em 1998, Carr e colaboradores realizaram estudo de corte transversal por meio do qual verificou-se que a lipodistrofia, a hiperlipidemia

e a resistência insulínica eram complicações comuns, resultantes dos inibidores de protease nos pacientes HIV. Para esse estudo, o diabetes não foi considerado evento comum. Bem a propósito, vale citar que Currier et al (2004) afirmam que a prevalência de diabetes melitus é quatro vezes mais comum em homens em terapia antiretroviral comparado com homens não infectados. A incidência de pré-diabetes e diabetes é de duas e três vezes respectivamente.

O tratamento de indivíduos não infectados pelo HIV com indinavir (IP) promoveu instalação rápida de resistência insulínica, sem mudanças na composição corporal. No entanto, é importante salientar que a resistência insulínica pode estar associada à própria infecção pelo HIV, provavelmente pela ação direta do vírus na função das células beta pancreáticas, assim como nos mecanismos de secreção insulínica é o que informa Valente et al (2005). Para Currier (2004) e Sweet (2005), o diabetes parece também contribuir para seqüelas neurológicas das infecções por HIV. Um estudo de coorte examinou os fatores associados com várias funções cognitivas em uma coorte de adultos infectados por HIV e concluiu que o diabetes foi mais comum entre pessoas idosas e foi associada com piora global da função cognitiva e da função psicomotora.

Estudando a terapia anti-retroviral, Grinspoon e Carr (2005) afirmam que ela pode levar ao fluxo alterado de substratos, incluindo ácidos graxos livres, bem como acúmulo de lipídio intramiocelular, alterações nos níveis de adipocina e baixos níveis de adiponectina, além de redução da expressão de PPAR γ em adipócitos subcutâneos. A terapia anti-retroviral pode também contribuir para alteração da homeostase da glicose. Inibidores de protease (incluindo indinavir, amprenavir, nelfinavir e ritonavir) mostraram induzir resistência à insulina in vitro pela redução do transporte de glicose mediado pelo transportador 4 de glicose, sem afetar a sinalização pós-receptor de insulina. Os resultados de estudos clínicos têm sugerido que indinavir e lopinavir apresentam efeito adverso em curto prazo na sensibilidade à insulina. Inibidores de protease tais como atazanavir e saquinavir podem ter mínimos efeitos na sensibilidade à insulina. Inibidores de protease podem também reduzir a secreção de insulina pela célula beta pancreática, o efeito primário, porém é a resistência à insulina. Efeito direto dos análogos de nucleosídeos no metabolismo da glicose não tem sido demonstrado, mas tais drogas podem contribuir para resistência à insulina indiretamente através de mudanças na distribuição de gordura.

Hadigan e colaboradores (2004) e Valente (2005) realizaram estudo randomizado, duplo-cego, com três meses de seguimento, visando avaliar os efeitos da rosiglitazona na dose de 4mg/dia em pacientes HIV com hiperinsulinemia e na lipoatrofia de 28 pacientes soropositivos em terapia anti-retroviral. Esses estudos espelharam melhora significativa na sensibilidade insulínica, na elevação dos níveis de adiponectina, na redução dos ácidos graxos livres e no aumento da gordura periférica com uso da medicação em relação ao grupo placebo. Em contrapartida, um estudo australiano com o mesmo desenho não observou alterações significativas na composição corporal em um seguimento de 12 meses. Dessa forma, é imperioso constatar a necessidade de novos estudos a fim de avaliar os benefícios desses medicamentos em pacientes infectados pelo HIV.



Figura 1 – Síndrome de Lipodistrofia (Giba)
Fonte: AIDSmeds.com



Figura 2 – Síndrome de Lipodistrofia (perda da gordura de bichat)
Fonte: AIDSmeds.com



Figura 3 – Síndrome de Lipodistrofia (lipoacumulação visceral)
Fonte: AIDSmeds.com



Figura 4 – Síndrome de Lipodistrofia (lipoatrofia em membros)
Fonte: AIDSmeds.com

1.10 ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DE TNF- α E SEU POLIMORFISMO GENÉTICO

Citocinas pró-inflamatórias são responsáveis pela patogênese de diversas doenças inflamatórias, auto-imunes e infecciosas. Nesse contexto, o TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) desempenha um papel central. Em 1893, durante a observação de ocorrência de necrose hemorrágica e diminuição de tamanho de um tumor após uma infecção estreptocócica, Dr. William Coley pressupôs a existência do TNF- α , que também pode ser denominado catequina. No entanto somente nas duas últimas décadas do século XX, passou a ser caracterizado biologicamente, teve suas funções determinadas e seu gene mapeado (SILVA, 2004).

O gene que codifica essa proteína está localizado dentro do Complexo Principal de Hiscompatibilidade (CPH), comum em todas as espécies de vertebrados, e que compreende um segmento cromossômico de 4000 kilobases (Kb), sendo considerado a região mais polimórfica de todo o genoma. No seu interior, são encontradas as regiões de classe I, II e III do Complexo de Antígenos Leucocitários do complexo HLA e onde estão contidos os loci clássicos (HLA-A,-B, e -C) (SILVA, 2008)

As ações efectoras das citocinas estão em estreita relação com os seus níveis circulantes. Desse modo, sua desregulação gênica e, principalmente, o aumento de sua produção, alteram a homeostase do organismo, determinando alterações orgânicas específicas e sistêmicas. As alterações nos níveis de TNF- α representam um fator fundamental na patogênese de diversas enfermidades. O TNF- α é uma citocina que tem um papel fundamental nos mecanismos normais da imunidade inata e imunidade adquirida. Tem-se descrito que o polimorfismo genético das citocinas pró-inflamatórias, entre elas o TNF α , empreendem predisposições ao desenvolvimento de enfermidades como consequência de um possível aumento da atividade transcripcional dos genes que a codificam (AGUILLÓN et al, 2002).

As fases crônicas da infecção pelo HIV associam-se a um moderado declínio da proporção de células T que produzem o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Após a administração de inibidores de protease, há um aumento absoluto e proporcional de células T, sintetizando TNF- α em todos os pacientes, o que contribui, provavelmente, com a restauração imune nesses indivíduos. Essa polarização de células T para a síntese de TNF- α seria favorável ao desenvolvimento da lipodistrofia, porquanto o TNF- α reduz a captura de ácidos graxos livres pelos adipócitos por meio da inibição da lipoproteína lipase, resultando, desse modo, perda de gordura, aumento de lipogênese hepática favorecida pela estimulação da triglicéride sintetase e, desta feita, resultando hiperlipidemia. Ademias, o aumento da produção do TNF- α pode também contribuir, indiretamente, para a perda de gordura pela ativação da produção de leptina e resistência à insulina. Ressalte-se, contudo, que ainda emergem discussões acerca da correlação entre níveis plasmáticos de TNF- α e os parâmetros lipídicos séricos, não obstante as sugestões de que as alterações podem ser locais. Sugestiona-se também que variações na produção de citocinas pró-inflamatórias entre indivíduos podem estar associadas à diferentes polimorfismos genéticos, propiciando, desse modo, a resposta imune durante a doença. Diferentes formas alélicas de vários gens de citocinas são conhecidos até o momento, destacando-se aí os polimorfismos de base única (SNPs) nas posições -238 e -308. Nesses polimorfismos ocorrem uma substituição GA. Essas mutações parecem estar relacionadas a diferenças na expressão gênica e na secreção de proteínas, no que pese tal afirmação ainda não ser consenso na comunidade científica. A presença de SNP -308 está associada com aumento da transcrição do gene TNF- α . Clinicamente, a presença do alelo -308 (TNF2) está associada com a susceptibilidade a várias enfermidades, das quais são exemplo a malária cerebral e a hanseníase, que estão diretamente relacionadas com níveis elevados de TNF- α circulantes no sangue periférico. Por outro lado, a presença mutações, como as em tela, também está associada à proteção em algumas formas de hanseníase. A SNP na posição -238 está associada com a diminuição da transcrição do TNF- α . Em pacientes HIV positivos, a presença desse alelo relaciona-se à proteção (OLIVEIRA et al., 2004).

1.10.1 Fisiopatologia do TNF α

Aguillón et al (2002) esboça a definição de TNF- α como uma molécula secretora não glicosilada, de 17 kDa, derivada de uma molécula de 26kDa, produzida, principalmente, por macrófagos. Em condições fisiológicas, forma um homotrímero de 55kDa, não estabilizado covalentemente. Possui 2 receptores transmembrana; um de 55kDa (TNFR1 ou R ou CD1 20a) e outro de 75kDa (TNFR2 ou p75R ou CD1 20b), que seriam parte de uma família emergente de receptores. Como produtos da digestão proteolítica de um domínio extracelular de TNFR1 e TNFR2, surgem dois tipos de receptores solúveis (TNF binding proteins), que envolvem-se na regulação dos níveis circulantes da citocina. Ao ligar-se aos seus receptores, o TNF- α estimula fatores de transcrição, tal como o fator nuclear Kappa b (nf-kb) e a proteína de ativação 1 (ap-1) os quais, atuando no núcleo das células, transcrevem proteínas imunorreguladoras essenciais para a ocorrência de respostas

inflamatórias, além do que ativam a expressão de antígenos da classe I do complexo principal de histocompatibilidade (cph) na membrana celular que reconhece antígenos circulantes, podendo, ainda, induzir a morte celular programada – apoptose –, ressalte-se, porém, que isso tudo depende dos comandos celulares.

Têm sido atribuídas ao TNF- α várias ações deletérias, tais como alteração das propriedades hemostáticas do endotélio vascular, em decorrência da indução da atividade pró-coagulante, o que leva à inibição da expressão de trombosmodulina na membrana celular além de favorecer, com isso, a formação de trombo, coagulação intravascular e oclusão dos vasos sanguíneos. Os endotélios pulmonares e cerebrais são mais sensíveis aos efeitos deletérios dessa citocina (DANIEL-RIBEIRO; CRUZ, 2000).

Em algumas doenças crônicas que cursam com caquexia, das quais é exemplo a aids, o TNF α , atuando sobre a biossíntese de várias moléculas específicas do adipócito por meio da supressão do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA), inibe enzimas como a lipase lipoprotéica cuja função é a captação e estocagem de triglicerídeos exógenos, aumentando, dessa forma, o nível de colesterol na circulação (SILVA, 2004).

O TNF- α pertence à família FNT, na qual estão incluídas a linfotóxina ou FNT- β e os ligantes Faz (FasL), CD27, CD30, OX40 e CD40. Essa classe de proteínas tem como receptores o receptor do FNT tipo 1 (FNT-R1), o do FNT tipo 2 (FNT-R2), o do FNT- β (LT- β R), além do receptor do Faz (Faz) e do CD40. Esses receptores caracterizam-se por múltiplos domínios ricos em cisteína nas porções extracelulares. A capacidade dos receptores FNT-R1 e Faz para induzir expressão gênica ou apoptose reside na presença de dois domínios nas porções citoplasmáticas, chamados “domínio de morte” (ABBAS et al, 2003).

Com a finalidade de induzir a apoptose, o TNF- α passa a desencadear uma cascata de eventos intracelulares, que envolvem várias enzimas, dentre as quais as proteases específicas de aspartato cisteína (caspases) e a proteína interagente do receptor (RIP), que caracterizam-se por possuírem domínios ricos em cisteína. Quando ativadas, as caspases clivam proteínas-alvos específicas no domínio do aspartato das cadeias polipeptídicas, continuando, destarte, o evento apoptótico.

O TNF- α , ao iniciar o processo, liga-se ao FNT-R1. Em seguida, sofre trimerização e recruta para si a proteína do domínio de morte associada ao FNT-R1 (TRADD), cuja finalidade é servir de plataforma para outras proteínas, entre essas, a proteína do domínio de morte associada ao Faz (FADD/MORT1), o fator 2 associado ao receptor-1 do TNF- α (TRAF2) e a RIP. O FADD/MORT1 recruta a caspase-8 para si ativando-a, iniciando, assim, a clivagem de proteínas-alvos como a RIP e a proteína agonista do domínio de morte-BH3 (BID) e a estimulação de outras caspases. A clivagem da RIP pela caspase 8 é altamente seletiva e ocorre precocemente durante a ativação da via apoptótica (LIN et al, 1999; SILVA, 2004). Após ser clivada, a BID atua sobre a mitocôndria e leva à liberação do citocromo c, que, por sua vez, liga-se ao fator ativador da apoptose (APAF) e estimula a caspase-9. Esse mecanismo ainda é desconhecido (LIN et al, 1999). Com a progressão desse processo, outras caspases são estimuladas e ativam proteínas-alvo, como a endonuclease do ácido

desoxirribonucléico (DNA), que entra no núcleo e corta a fita de DNA, levando ao dano do controle central da célula. Em decorrência da ação de outras cinases, ocorre desintegração do citoesqueleto, fragmentação e formação dos corpos apoptóticos, que são englobados por células removedoras.

Quanto à imunidade, para que ocorra sua estimulação, é necessário que o TRAF-2 ligue-se ao TRADD ou que a RIP não seja submetida à clivagem. O TRAF-2 atua por meio de enzimas MAP quinases (MEKK1, JNKK e JNK) que fosforilam o fator de transcrição denominado proteína de ativação 1 (AP-1), levando, por conseguinte, ao seu desligamento da proteína que a mantém no citoplasma e que permite a sua entrada no núcleo da célula. A RIP não clivada atua sobre o fator kappa B (NF- κ B) de forma semelhante. É imperioso lembrar, ainda, que o TNF- α é considerado um agente chave na imunidade, na atividade anti-tumoral, antiviral e na antibacterina. Induz ao crescimento tissular, diferenciação dos tecidos e imunorregulação. Em indivíduos saudáveis, os seus níveis são variáveis entre 50 pg/ml a níveis não detectáveis. Os níveis acima de 100 pg/ml, geralmente, estão relacionados com enfermidades (AGUILLÓN et al, 2002). Também atribui-se ao TNF- α a estimulação da síntese de vários grupos de moléculas de adesão celular, a indução de trocas vasculares, o que afeta a adesão de leucócitos e promove atividade pró-coagulante. Se esses efeitos ocorrerem em grande escala, podem causar coagulação intravascular disseminada, tal como podemos observar em pacientes em choque séptico. Alguns dos efeitos tóxicos do TNF- α , como choque e inflamação, são mediados pela indução de apoptose, principalmente através de 1 TNFR1 (AGUILLÓN et al, 2002).

A despeito do seu papel fisiológico, o TNF- α , quando em níveis elevados, está relacionado com a patogênese de enfermidades associadas ao Complexo de Histocompatibilidade, especialmente naqueles com um componente inflamatório e autoimune, tais como lúpus eritematoso sistêmico, obesidade associada à resistência à insulina e síndrome da imunodeficiência adquirida (AGUILLÓN et al, 2002).

1.10.2 Polimorfismo genético do TNF- α

O aumento na expressão do TNF α e o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e auto-ímmunes poderiam ser explicados, dentre outros fatores, pela ocorrência de polimorfismo em seu gen. Tem-se sugerido que tanto a variabilidade das regiões promotoras, quanto a incidência de fatores de transcrição associados modulariam a magnitude da resposta secretora dessa citocina.

O gene que codifica o TNF- α localiza-se na região central do MHC, entre os loci HLA-B e HLA-D, no braço curto do cromossomo 6, no segmento correspondente às moléculas do MHC de classe III (HAJEER, HUTCHINSON, 2000). O locus do TNF α apresenta uma variedade de sítios polimórficos, tanto na região codificante quanto em sua circunvizinhança. São descritas duas formas de polimorfismo, quais sejam: os polimorfismos

mononucleotídicos (SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms), nos quais ocorre a troca de um nucleotídeo, podendo ser detectado em qualquer lugar do DNA, em seqüências reguladoras no extremo 5' (promotor); ou depois da região codificante (região não transcrita do extremo 3'); ou dentro do DNA que codifica a proteína. Nesta categoria tem-se identificado vários SNPs, em que destacamos a transcrição G/A nas posições 308 e 208 da região promotora do gene do TNF α . A segunda variante polimórfica é o DNA microsatélite, que se distribui em todos os cromossomas por meio do genoma. Essas são seqüências repetitivas de DNA, não transcritas e de longitude variável, que se localizam em regiões não codificantes (AGUILLÓN et al, 2002). Ainda, relativamente ao assunto em tela, faz-se relevante atentar para o fato de que a lipodistrofia está freqüentemente relacionada à atrofia de gordura periférica e ao acúmulo de gordura visceral. Esses efeitos ocorrem em mais de 40% dos pacientes HIV positivos que fazem uso de TARV por um ou mais anos.

A lipólise, que freqüentemente está aumentada nesses pacientes, parece ter um papel importante para o desenvolvimento do fenótipo da lipodistrofia por acelerar a redistribuição da gordura. O TNF- α intensifica a lipólise. Altos níveis plasmáticos têm sido relatados em pacientes HIV positivos com lipodistrofia, quando comparado com pacientes HIV positivos sem lipodistrofia e com controles saudáveis. Alguns trabalhos têm demonstrado uma possível correlação entre a expressão do TNF- α em tecido adiposo subcutâneo e sua expressão no plasma de pacientes HIV positivos em uso de TARV, sugerindo, destarte, que o aumento do TNF- α plasmático pode aumentar a liberação de TNF- α para os tecidos. Citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α induzem a um número de alterações metabólicas, incluindo a hiperlipidemia e a resistência à insulina (HAUGAARD et al, 2006).

A secreção do TNF- α varia consideravelmente entre diferentes indivíduos, isso se deve particularmente ao controle genético. A região promotora do polimorfismo apresenta uma transcrição ativa bem descrita e tem sido observada em um grande número de doenças infecciosas. O TNF- α tem numerosas ações, além de que ele pode ser considerado como um possível indutor genético (MAHER, 2002).

Resultado de pesquisas várias espelham conclusões de que a TARV está associada com o acúmulo progressivo de células T, indutoras da produção do TNF- α , criando, desse modo, um ambiente pró-inflamatório que pode contribuir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias imunes. Dessa forma, a polarização de células T para a síntese de TNF- α favorece o desenvolvimento da síndrome de lipodistrofia por contribuir para ocorrência de alterações no metabolismo lipídico (LEDRU et al, 2000).

Um grande número de indutores de TNF α , incluindo proteínas do HIV, tem sido descritos. No que pese a carga viral do HIV ser altamente suprimida pela TARV, reservatórios virais ainda persistem e a liberação de proteínas virais, como a Tat, em consórcio com maiores concentrações de TNF-RII solúvel, poderia levar à ativação de NFkB e posteriormente à iniciação da produção de TNF- α . É mister, portanto, empreender rigorosos

mecanismos de controles, a fim de prevenir a produção crônica de TNF- α e, por conseguinte, as conseqüências adversas posteriores (LEDRU et al, 2000). Sobre o tema ora discutido, não há de se negligenciar o fato de que o polimorfismo genético do TNF- α determina a ocorrência dos alelos 238 A e 308 A, que podem ser detectados em pacientes HIV positivos em uso de TARV e portadores de lipodistrofia por meio da reação em cadeia de polimerase. Por outro lado, diversos estudos tem demonstrado que o alelo 238 A apresenta diferença significativa, quando comparados pacientes HIV positivos com lipodistrofia e pacientes HIV positivos sem lipodistrofia. Ressalte-se, contudo, que não se verifica diferença quando se comparam pacientes HIV positivos com lipodistrofia e pacientes HIV negativos. Também não se reconhece diferença em relação ao alelo 308 A quando se compara pacientes HIV positivos com lipodistrofia e pacientes HIV negativos (MAHER, 2002). Outros estudos, utilizando a detecção da síntese de citocina intracelular e a apoptose em linfócitos em pacientes não tratados, sugestionavam que a apoptose representa um papel imprescindível na regulação negativa da síntese de TNF- α por células T. Na verdade, mesmo em pacientes saudáveis, produtores de TNF- α são altamente sensíveis à apoptose, e isso está parcialmente relacionado com a expressão da molécula Bcl-2. Durante a progressão natural da infecção pelo HIV, a suscetibilidade de produtores de TNF- α para a apoptose aumenta progressivamente, e esse aumento, por sua vez, relaciona-se com a diminuição das representações daqueles em amostras de sangue de pacientes. Aos aspectos supramencionados, aduz, ainda, o fato de o polimorfismo 308A definir os alelos TNF1 (G/G) e TNF2 (G/A e A/A). Ademais, o alelo TNF2, tem sido descrito como o mais importante na regulação da produção do TNF α .

Ressalte-se, por ora, a existência de estudos in vitro utilizando células estimuladas com lipopolissacarídeos, os quais indicam que as de genótipo TNF2 representam uma maior expressão da citocina quando cotejadas com as do genótipo TNF1. Os trabalhos que medem a atividade transcripcional desses alelos afiguram-se contraditórios. Dentre as doenças cuja ocorrência tem sido influenciada pelo polimorfismo 308A, conta-se a artrite reumatóide, o lúpus eritematoso sistêmico, a hanseníase, a tuberculose e a síndrome de resistência à insulina (SCHIATTINO et al., 2001).

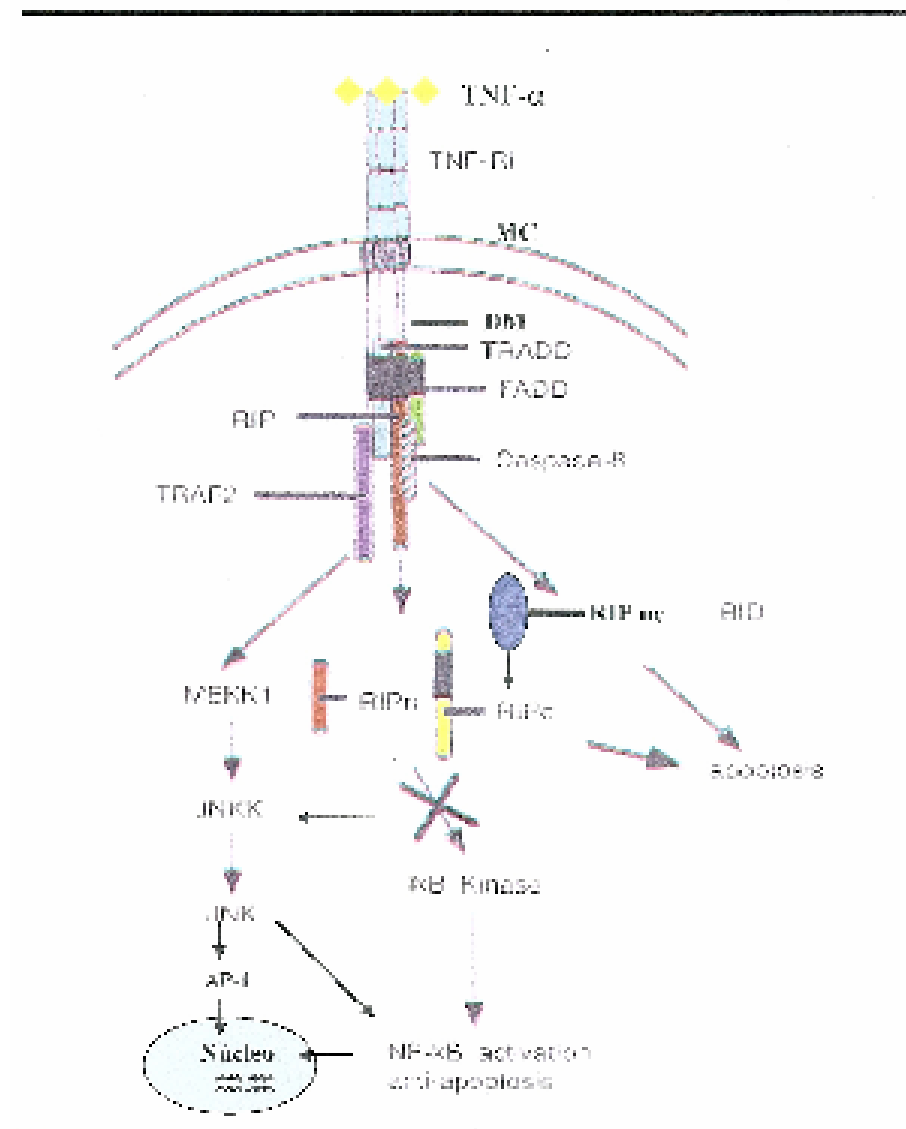


Figura 5 – Mecanismos de apoptose e da transcrição gênica induzidos pelo FNT- α TNF- α : fator de necrose tumoral alfa, TFN-R1: receptor 1 do TNF, MC: membrana celular DM: “domínio de morte”, TRADD: proteína do domínio de morte associada ao FNT-R1, FADD: proteína do domínio de morte associada ao ligante Faz, RIP: Proteína Integrante do Receptor, RIPc: RIP clivada, RIPnc: RIP não clivada, RIPn: fragmento da RIP clivada sem atividade conhecida, TRAF 2: fator associado ao FTN-R1, Caspase-8: NF κ B: fator nuclear kappa B, MEKK1, JNKK, JNK, cascata de enzimas N-terminal MEK e Jun cinases AP-1: proteína ativadora 1.

Fonte: LIU et al, 1996; BARNES; KARIN, 1997; LIN et al, 1999; VERHAGEN et al, 2001; ABBAS, 2003.

2 JUSTIFICATIVA

A Lipodistrofia define-se como uma síndrome que ilustra a importância do funcionamento normal do tecido adiposo para a maioria dos processos metabólicos vitais do organismo. Contudo, a fisiopatologia de suas alterações endócrino-metabólicas, bem como seus agentes causais e sua possível associação à TARV, ainda não foram totalmente esclarecidas.

Para que se possa reduzir a morbimortalidade decorrentes dessa síndrome e, ainda, para que se tenha mais conhecimento sobre a segurança dessa terapia, faz-se necessário compreender a gravidade e as proporções de seus efeitos adversos. Compreendendo esses aspectos, provavelmente relacionados à lipodistrofia e à terapêutica implementada nos pacientes, vislumbra-se ser possível garantir, aos mesmos, um regime terapêutico seguro e uma melhoria na sua qualidade de vida tanto a curto quanto a longo prazo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa e seu polimorfismo genético em pacientes HIV positivos, portadores de lipodistrofia e em uso de terapia anti-retroviral.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a frequência do polimorfismo genético do TNF- α e sua associação com as diferentes formas clínicas da síndrome de lipodistrofia (forma mista, forma lipoatrófica e forma lipohipertrófica);

Avaliar se há associação entre os níveis séricos de TNF- α e seu polimorfismo genético;

Avaliar se há associação entre os níveis de TNF- α com o tempo de terapia e com a carga viral;

Avaliar se há correlação entre os níveis de TNF- α e as variáveis idade e sexo do paciente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA E COLETA DE DADOS

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical (UFPa), mediante protocolo n. 068/2006. Este projeto está inserido no projeto “Terapia Anti-retroviral e Lipodistrofia: uma abordagem clínico-terapêutica e etiopatogênica”.

Empreende-se um estudo transversal, valendo-se uma amostra constituída por 40 pacientes HIV positivos em uso de TARV por um período maior de 1 (um) ano e portadores de lipodistrofia, os quais foram encaminhados pela rede pública para o Ambulatório de Lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto. Após terem sido esclarecidos e terem, em seguida, lido o termo de livre consentimento – desse modo, estando livres e esclarecidos e conscientes – aceitaram participar do estudo e demonstraram sua aquiescência assinando o referido termo.

Os pacientes foram selecionados mediante preenchimento dos seguintes critérios de inclusão: pacientes adultos, de ambos os sexos, com sorologia positiva para HIV, em uso de terapia anti-retroviral por um período maior de 1 ano, com manifestações clínicas sugestivas de lipodistrofia e atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto. Tendo sido excluídos pacientes sem sorologia positiva para HIV, crianças, adolescentes e gestantes.

4.2 METODOLOGIA

Após esclarecimento acerca dos procedimentos e objetivos da pesquisa foi solicitado aos participantes que lessem atentamente e assinassem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os procedimentos incluíram: informações sobre TARV e lipodistrofia, referenciados por meio de uma abordagem educativa e sistematizada de forma a minimizar o temor do paciente em relação à aderência ao tratamento anti-retroviral e a possíveis falhas terapêuticas; preenchimento dos dados clínico-epidemiológicos contidos na folha protocolar; solicitação de

exames para avaliar o quadro clínico do paciente; coleta de sangue para dosagem do TNF- α sérico e seu polimorfismo genético.

4.3 ETAPAS DO TRATAMENTO

4.3.1 Caracterização dos pacientes

Foram coletados dados gerais de identificação dos pacientes e informações sobre possíveis fatores de risco, relacionados ao desenvolvimento de lipodistrofia, tais como sexo, idade, raça, tempo de uso de TARV e carga viral.

4.3.2 Exame físico

Foram observadas e descritas as principais manifestações clínicas relacionadas à síndrome de lipodistrofia, como também foram feitas as medidas antropométricas de cada paciente, a fim de avaliar o grau de lipodistrofia, lipohipertrofia ou síndrome mista. Dentre os valores catalogados estão presentes: altura, peso, Índice de Massa Corporal (IMC), circunferência abdominal, da coxa e braço bilateralmente (utilizando fita métrica), além da espessura da prega cutânea suprailíaca, subcapsular e em bíceps e tríceps, utilizando-se de um adipômetro.

4.3.3 Exames complementares

Os pacientes que fizeram parte deste estudo foram submetidos aos seguintes exames complementares: hemograma completo, níveis de colesterol total e frações, triglicerídeos, enzimas hepáticas (AST e ALT), insulina basal, curva glicêmica, ácido úrico, uréia e creatinina, a fim de identificar dislipidemia e outras possíveis alterações metabólicas relacionadas à síndrome lipodistrófica. Para a realização deste trabalho foram avaliados os níveis séricos de TNF- α e o polimorfismo no gene codificador da citocina.

4.3.4 Fichas protocolares

Os dados foram coletados em fichas protocolares durante o período de realização desta pesquisa.

4.3.5 Avaliação dos níveis de TNF- α e polimorfismo no gene codificador da citocina

Visando à dosagem dos níveis de TNF- α , os pacientes foram submetidos à punção sangüínea em veia braquial, para coleta de 5 ml de sangue, que foram acondicionados em tubos “vacutainer” contendo EDTA. Imediatamente após a punção venosa, as amostras sangüíneas foram transportadas em isopor contendo gelo para o Laboratório de Virologia da UFPa, onde, após a separação do plasma das células, foram congeladas em frízer com temperatura igual a - 70°C.

A determinação quantitativa das concentrações do TNF- α foi realizada utilizando-se o método de imunoabsorção enzimática (Human TNF- α ELISA Kit, ANTIGENIX AMÉRICA, Inc.). Esse teste utiliza como antígeno um anticorpo monoclonal específico.

4.3.6 Métodos de Biologia Molecular

- Extração do DNA: utilizou-se o método de extração de DNA total a partir de células mononucleadas do sangue periférico das amostras positivas para os marcadores da resposta inflamatória, em consonância com o protocolo do kit de isolamento de ácido nucléico da Puregene, Gentra Systems, Inc., USA. O procedimento ocorreu seguindo-se as etapas de lise celular, de precipitação de proteínas, de precipitação do DNA e de hidratação do DNA.
- Genotipagem do polimorfismo: para a análise da mutação específica (G→A, na posição - 308 da região promotora do gene TNF- α), o DNA foi amplificado por meio da Reação em Cadeia da Polimerase e, posteriormente, digerido pela enzima de restrição NcoI (Biolabs/New England/USA).

A reação foi realizada em um volume final de 10 μ l, contendo 50ng de DNA total extraído, 0,2mM de cada dNTP, 2,0 pmol/ml de cada iniciador, 2,0 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH 8,3 e 0,4 de Taq DNA polimerase. O par de iniciadores empregado nesta reação foi: TNF- α -308F: 5'- AGGCAATAGTTTTGAGGGCCAT-3' e TNF- α -308R: 5' TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3' os quais amplificam um segmento de 107 pb (SALLAKCI et al, 2005).

A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 45 segundos à 94°C (desnaturação), 45 segundos à 60°C (hibridização), 45 segundos à 72°C (extensão) e uma extensão final de 5 minutos à 72°C.

O produto amplificado foi submetido à digestão com a endonuclease de restrição NcoI em um volume total de 10 mL, contendo 5 mL do produto amplificado, 1 mL de NcoI, 1 mL de tampão e 3 mL de água deionizada, o qual foi incubado a 37°C por 6 h. A enzima NcoI pode clivar o produto da digestão em três fragmentos de 102 pb, 87 pb e 20 pb (heterozigose), em dois fragmentos de 87 pb e 20 pb (homozigose para o alelo G), ou não clivar o produto (homozigose para o alelo A).

Os produtos das amplificações e das digestões enzimáticas foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de acrilamida a 8%, em tampão TAE 1x (TAE 40x estoque – TrisBase 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na₂ 40 mM/1000 mL água deionizada), contendo 5 mL de brometo de etídio (10mg/mL), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultra-violeta.

A presença ou ausência da mutação -308 na região promotora do gene do fator de necrose tumoral definiu dois padrões, quais sejam:

Padrão I: com presença de mutação -308

Padrão II: sem mutação -308

Os indivíduos do Padrão I foram subdivididos em homozigotos (AA) e heterozigotos (GA) para alelo com a mutação. Os indivíduos do Padrão II eram todos homozigotos (GG). Após a identificação, os alelos foram alocados no Padrão I ou II e feita a contagem dos tipos alélicos e suas freqüências correspondentes.

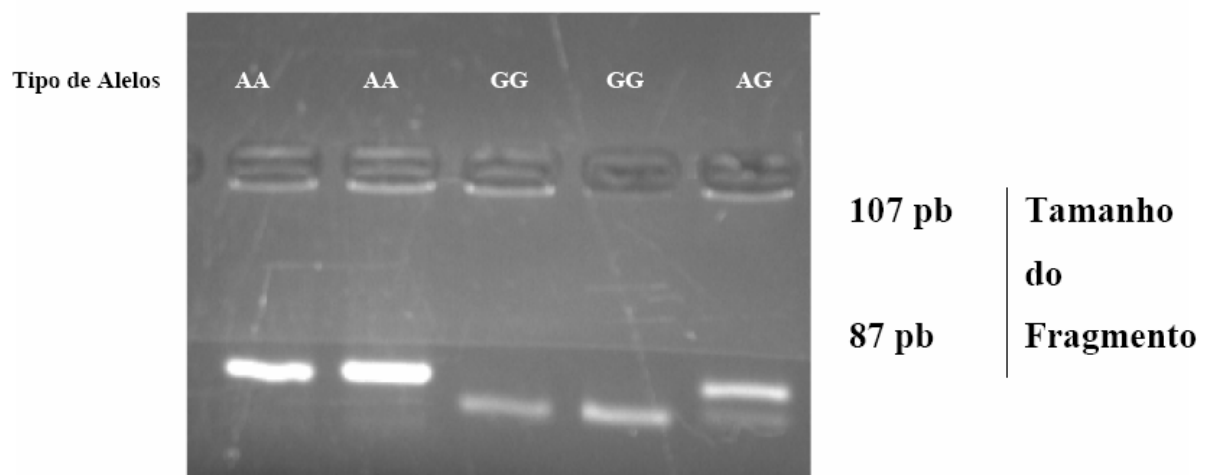


Figura 6 – Representação da distribuição dos alelos do FNT- α no gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata e submetido à eletroforese, conforme o tipo de nucleotídeo presente na posição – 308.

4.4 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Os resultados quantitativos obtidos durante o presente estudo foram armazenados em planilhas eletrônicas, utilizando o software Microsoft Excel 2000 e analisados por meio dos softwares BioEstat 5.0, estabelecendo-se em 0,05 (5%) o nível alfa de rejeição da hipótese de nulidade. As variáveis contínuas foram analisadas pelo estudo de medidas de tendência central, como média e mediana, bem como por medidas de variabilidade, como o desvio-padrão. As hipóteses foram avaliadas pelos seguintes testes: exato de Fisher para avaliar associação entre o polimorfismo do TNF- α e as formas clínicas de lipodistrofia; correlação de Spearman para avaliação da correlação entre níveis de TNF com idade e carga viral; para as demais comparações de média e mediana; foram utilizados os teste “t” de Student, análise de variância de Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney, dependendo da variável ter distribuição paramétrica ou não-paramétrica.

Os dados qualitativos obtidos foram organizados por meio do software Microsoft Word versão 2000 e, posteriormente, descritos, interpretados e analisados, valendo-se de raciocínios indutivos, dedutivos e comparativos. A utilização dos procedimentos supramencionados espelhou os resultados que, a seguir, serão esposados.

5 RESULTADOS

Foram avaliados 40 pacientes. Observou-se que, do total, 14 pacientes (35%) correspondiam ao sexo feminino e que 26 pacientes (65%) correspondiam ao sexo masculino, desta feita, os grupos mostraram-se não se apresentam igualmente distribuídos, sendo significativamente maior o número de pacientes do sexo masculino.

Ao se comparar a idade em anos entre os sexos masculino e feminino, observou-se uma média de idade de $44,7 \pm 8,30$ anos e $42,92 \pm 10,11$ anos, respectivamente. Apresentando, desse modo, uma média total da amostra de $44,1 \pm 8,88$ anos. Sem, contudo, essa média apresentar diferença estatisticamente significativa ($p=0,547$), tendo sido utilizado o Teste “t”. O gráfico 1, a seguir, apresenta a média e desvio padrão da idade em anos discriminado por sexo dos pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia, atendidos no Ambulatório de Lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto.

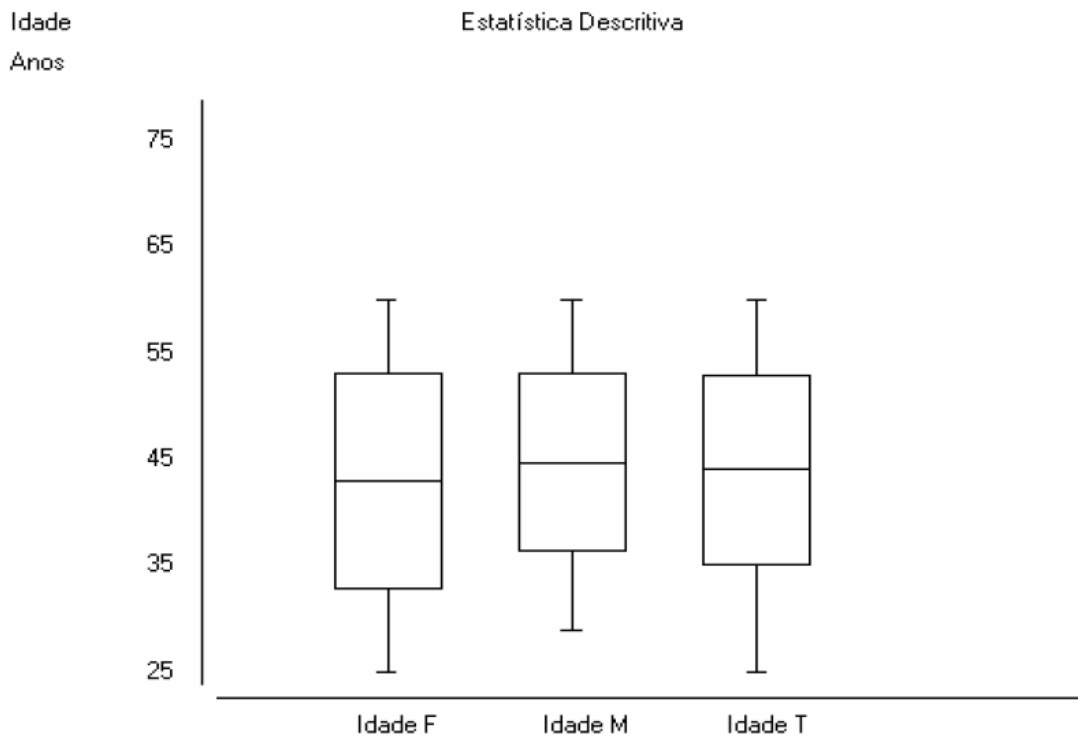


Gráfico 1 – Média e desvio padrão da idade em anos discriminado por sexo, dos pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto.

Em relação ao nível de TNF- α , quando comparado entre os sexos masculino e feminino, observa-se que a média do TNF- α corresponde a $25,56 \pm 36$ pg/ml e $30,42 \pm 12,88$ pg/ml, respectivamente. Sendo o $p=0,7552$ (Mann-Whitney), o que demonstra que também não houve diferença estatisticamente significativa (Gráfico 2).

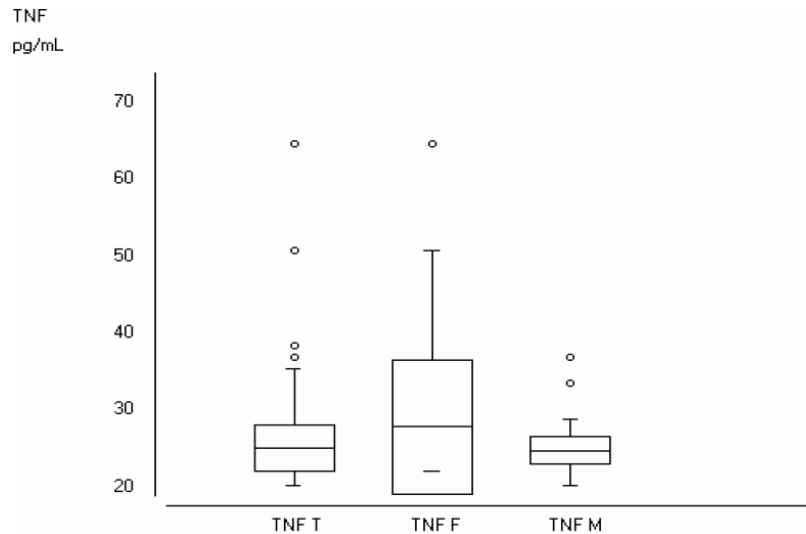


Gráfico 2 – Média e desvio padrão dos níveis de TNF- α comparados entre os sexos masculino e feminino dos pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto.

Correlacionando-se os níveis de TNF- α com a idade em anos dos pacientes, observa-se uma correlação linear negativa, mostrando que pacientes mais jovens apresentam níveis de TNF- α mais elevados. Esse estudo demonstra uma diferença estatística significativa ($p=0,0032$), o que pode ser visualizado por meio do Gráfico 3, exposto a seguir.

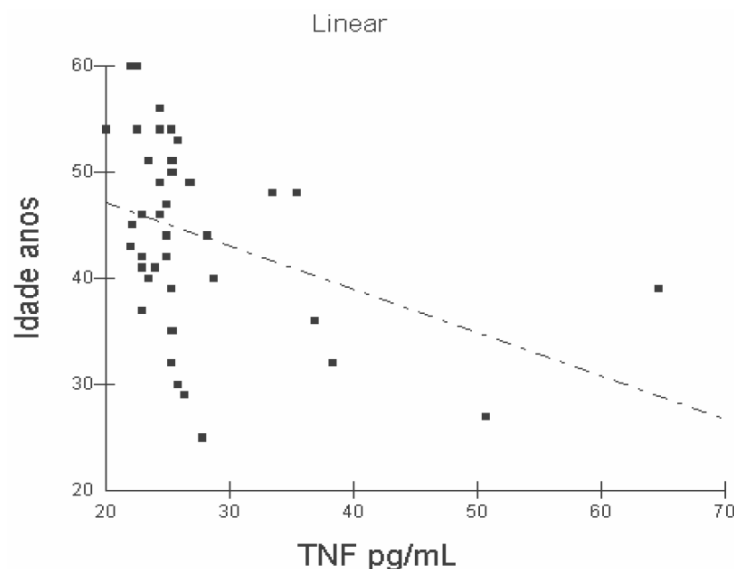


Gráfico 3 – Correlação linear negativa entre os níveis séricos de TNF- α e a idade dos pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto. Coeficiente de Spearman (r_s)= -0.4545 $p= 0,0032$.

Nesse estudo, como demonstra o Gráfico 4, observou-se que não há uma correlação entre os níveis de TNF- α e o tempo de uso de TARV ($r_s= 0,2226$ $p= 0,1673$).

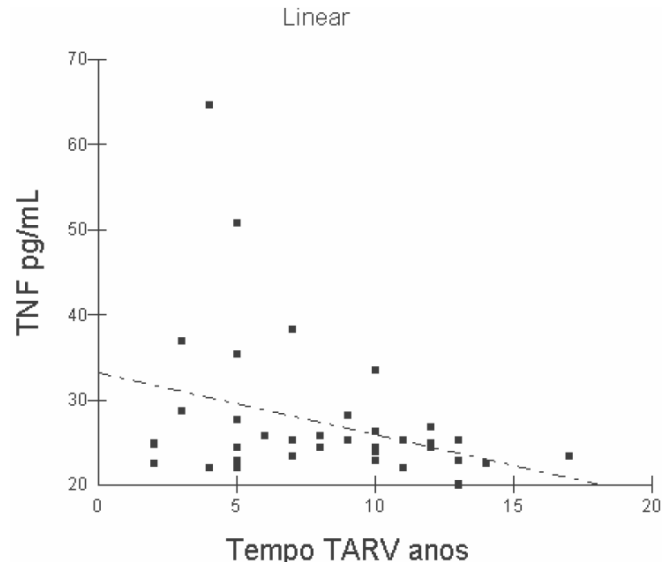


Gráfico 4 – Correlação linear negativa entre os níveis de TNF- α e o tempo de uso de TARV pelos pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto.

Coefficiente de Spearman (rs)= -0,2226 (p)= 0,1673

Por meio do Gráfico 5, pode-se observar que o tempo de uso de TARV apresentou média de $8,17 \pm 3,65$ anos. Ainda, quando comparamos o tempo de uso da TARV entre os sexos masculino e feminino, constatou-se que a média de tempo de uso de TARV corresponde a $9,42 \pm 3,53$ anos e $5,85 \pm 2,68$ anos, respectivamente, apresentando, desse modo, diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0025$) (Gráfico 5).

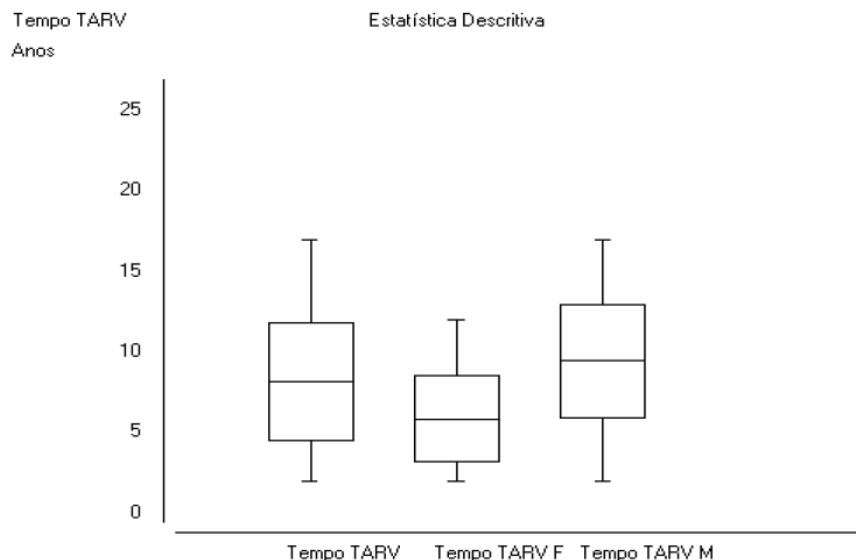


Gráfico 5 – Média e desvio padrão do tempo de uso de TARV de acordo com o sexo e o tempo médio e desvio padrão total da amostra (pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto).

Tempo total amostra: $8,17 \pm 3,65$ anos

Tempo F: $5,85 \pm 2,68$ anos

Tempo M: $9,42 \pm 3,53$ anos

Mediana = 5.000 (F) 10.000 (M)

Teste: Mann-Whitney

p-valor (bilateral) = 0,0025

Ao classificar a Síndrome de Lipodistrofia nas diferentes formas clínicas (forma lipoatrófica, forma mista e forma lipohipertrófica) e comparar os níveis de TNF- α , pode-se constatar que a média dos níveis TNF- α na forma lipoatrófia corresponde a $24,76 \pm 2,7$ pg/ml, na forma mista corresponde a $27,6 \pm 7,45$ pg/ml e na forma lipohipertrófica corresponde a $38,4 \pm 18,6$ pg/ml. Também no caso em tela, não se verificou diferença estatisticamente significativa ($p=0,2376$). O gráfico 6, a seguir, espousa esse resultado. Entretanto, utilizando-se do teste de Mann-Whitney para comparar os níveis de TNF- α entre as formas lipoatrófica e lipohipertrófica, observou-se um p-valor unilateral = 0,0562 e um p-valor bilateral = 0,1123.

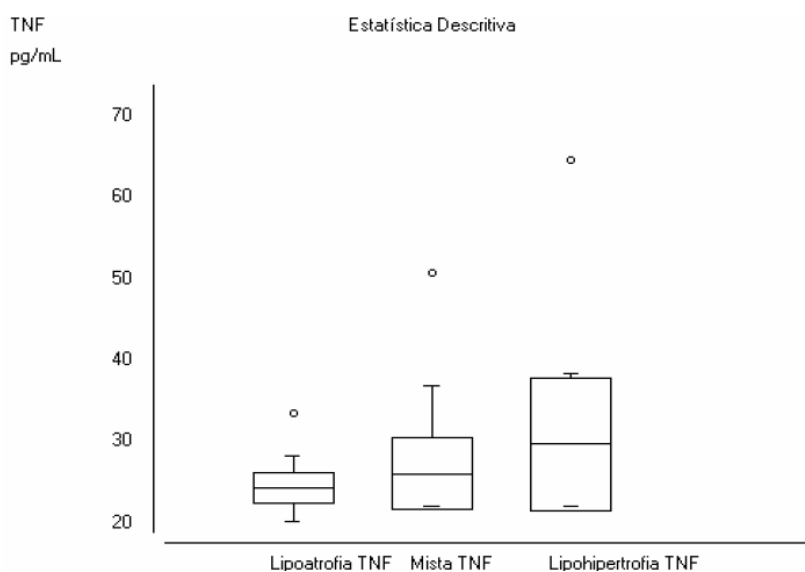


Gráfico 6 – Níveis séricos e desvio padrão dos níveis de TNF- α nas diferentes formas clínicas de lipodistrofia (formas lipoatrófica, mista e lipohipertrófica) dos pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto.

Forma lipoatrófica: $24,76 \pm 2,7$ pg/ml

Forma mista: $27,6 \pm 7,45$ pg/ml

Forma lipohipertrófica: $38,4 \pm 18,6$ pg/ml

Teste: Kruskal-Wallis = 0,2376

P= 0,2376

No presente estudo, procedeu-se também à comparação da distribuição do polimorfismo genético do TNF- α (-308A) nas diferentes formas clínicas de lipodistrofia. Com base nesse procedimento, atestou-se que o polimorfismo está presente em 25% dos pacientes portadores da forma lipoatrófica e 37,5% dos pacientes portadores da forma mista, o que espelha diferença estatística não significativa ($p=0,483$). Dos quatro pacientes que apresentavam a forma lipohipertrófica, o polimorfismo estava presente em dois pacientes, tal como se atesta por meio dos dados constitutivos do Quadro 1, a seguir exposto.

Quadro 1 – Presença do polimorfismo genético do FNT- α nas diferentes formas clínicas da lipodistrofia dos pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto.			
Polimorfismo	S. Lipoatrófica	S. Mista	S. Lipohipertrófica
Sim	5	6	2
Não	15	10	2

Teste Exato de Fisher

S. Lipoatrófica x Mista:

$p = 0,483$

Polimorfismo: lipoatrófica 5/15 (25 %), Mista: 6/10 (37,5 %)

A frequência do plimormismo do TNF- α -308A na amostra ($n=40$) está distribuída da seguinte forma:

- Gene AG (heterozigoto)= 30%
- Gene AA (homozigoto)= 2,5%
- Gene GG (selvagem) = 67,5%

O Gráfico 7, a seguir, demonstra a comparação entre os níveis de TNF- α e o polimorfismo genético -308^a, o que permite visualizar que os níveis de TNF- α na presença do

polimorfismo apresenta uma média e desvio padrão igual a $28,51 \pm 16,46$ pg/ml e na ausência do polimorfismo a média e desvio padrão foram de $26,65 \pm 6,34$ pg/ml, demonstrando, desse modo, diferença estatisticamente não significativa ($p=0,9770$).

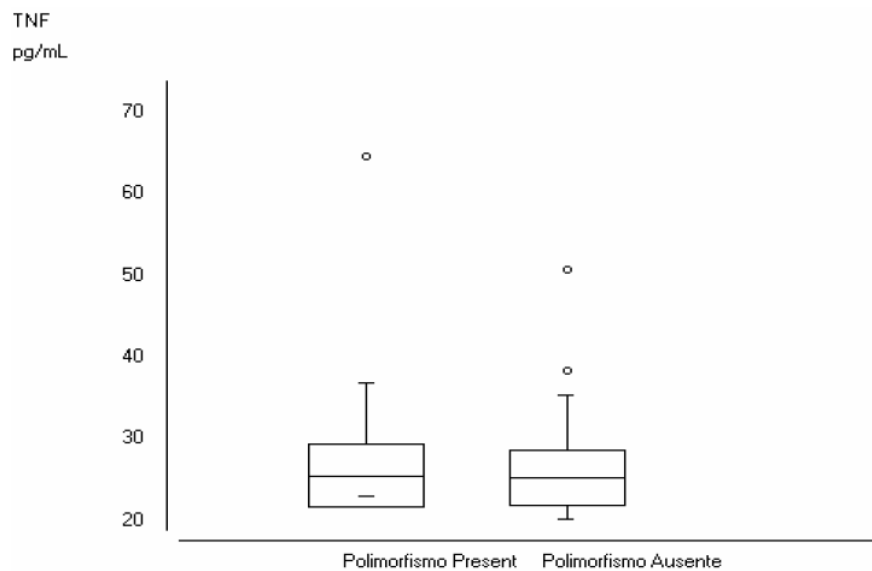


Gráfico 7: Média e desvio-padrão de TNF- α na presença ou ausência do polimorfismo genético -308A dos pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto.

Polimorfismo

Presente: TNF: $28,51 \pm 11,46$

Ausente: TNF: $26,65 \pm 6,34$

Soma dos Postos (Ri) 265.5 554.5

Mediana = 24.41 25.36

p-valor (bilateral) = 0.9770

Teste: Mann-Whitney

Por outro lado, o Gráfico 8 apresenta a relação entre os níveis de TNF- α e a carga viral dos pacientes. Com base nos dados desse gráfico, a seguir exposto, nota-se que não houve uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,2545$).

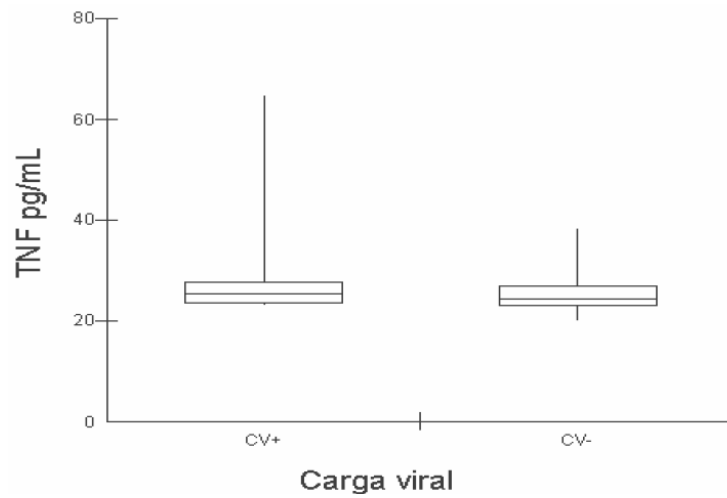


Gráfico 8 – Comparação dos níveis de TNF- α com a carga viral dos pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia atendidos no ambulatório de lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto.

- 1 -CV+ - 2 -CV-

Tamanho da amostra = 9 11

Mínimo 22.9700 20.1000

Máximo 64.6200 38.2900

Mediana 25.3600 24.4100

Média Aritmética 30.4178 CV + 26.0173 cv -

Desvio Padrão 13.3769 CV + 5.4510 cv -

TNF CV + x TNF CV -

p-valor (bilateral) = 0.2545 teste: Mann- Withiney

Equilíbrio de Hardy-Weinberg:

Não Houve diferença significativa entre as proporções genotípicas ($\chi^2 = 0,0607$ e $p = 0,8054$), permitindo concluir que a casuística estudada encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Frequência do alelo G = 0,825 e a frequência do alelo A = 0,175.

6 DISCUSSÃO

O esquema terapêutico atualmente utilizado no tratamento do HIV/aids, denominado TARV, tem como finalidade inibir a replicação viral por meio da redução do RNA do vírus (HIV-1) no plasma humano a níveis indetectáveis e aumentar o número de células TCD4+. Segundo SOUZA (2005), a TARV constitui-se em quatro classes de medicamentos: os inibidores de protease (PIs); os inibidores da transcriptase reversa análoga ao nucleotídeo (ITRN); os inibidores da transcriptase reversa não análoga ao nucleotídeo (ITRNN); os inibidores de fusão (IF).

No que pese o eminente avanço no arsenal terapêutico, efeitos adversos têm sido descritos, dentre os quais elencam-se: uma síndrome caracterizada por má distribuição da gordura corporal e várias anormalidades metabólicas, denominadas de Síndrome de Lipodistrofia. A incidência desses efeitos adversos contribuem sobremaneira para a não adesão ao tratamento por parte dos pacientes.

Neste contexto, a produção de citocinas pró-inflamatórias, mediante estímulos antigênicos passam a desempenhar um papel fundamental no que diz respeito à competência imunológica. Sendo assim, o TNF- α tem demonstrado ser um elemento de suma importância nos casos de doenças infecto-contagiosas, porquanto atua sinalizando para um controle da proliferação dos agentes infecciosos, localizados a nível sanguíneo ou intratecidual.

Na pesquisa ora apresentada observou-se uma incidência maior de lipodistrofia em pacientes do sexo masculino infectados pelo vírus HIV, quando comparado com o sexo feminino (65% e 34%, respectivamente), o que está de acordo com a literatura, se considerarmos a incidência nas diferentes formas clínicas da síndrome de lipodistrofia, haja vista que nessa síndrome a prevalência de lipoatrofia foi maior no sexo masculino. Na presente pesquisa, tal como espelha o gráfico 5, a forma clínica da lipodistrofia que prevaleceu foi a lipoatrofia. Há de se destacar que a literatura acerca desse assunto não aponta resultados semelhantes aos que aqui se apresentam quando levado em consideração apenas o sexo, porquanto os dados descritos referem-se a uma prevalência maior no sexo feminino, sem levar em consideração, no entanto, a incidência correlacionando o sexo com a forma de lipodistrofia.

Quanto à idade, a média foi equivalente nos grupos masculino e feminino (44,7 \pm 8,30 anos e 42,92 \pm 10,11 anos, respectivamente). Ressalta-se, ainda, que a média total da amostra foi igual a 44,1 \pm 8,88 anos. Conjectura-se que esses resultados relacionam-se diretamente com o tempo de uso de TARV

Em relação aos níveis de TNF- α , quando comparados com sexo, observou-se que não existe uma diferença estatisticamente significativa, apesar de se ter observado uma média maior no sexo feminino. Esse resultado poderia ser explicado pela maior ocorrência de lipohipertrofia em mulheres, haja vista que o TNF- α é considerado uma adipocina, ou seja, um fator secretado também pelo tecido adiposo. Outro fator que poderia justificar essa

incipiente diferença seria o número pequeno de pacientes nesta casuística. Quando comparado com a faixa etária dos pacientes, observou-se uma correlação linear negativa que pode ser justificada pela evolução crônica da doença. Contudo, destaque-se, a literatura da área não apresenta estudos que corroborem semelhante resultado. Nesse sentido, acredita-se que essa conclusão encontra abrigo no fato de que, com a evolução da doença, os níveis de células T indutoras da produção de TNF- α diminuem e conseqüentemente decrescem os níveis de TNF- α ..

Comparando os níveis médios de TNF- α com o tempo de TARV, observou-se uma correlação linear negativa, porém estatisticamente não significativa. Contudo, para esse resultado, não se encontra uma justificativa absolutamente conclusiva. Desta feita, conjectura-se que fatores variados, ocorridos ao acaso, possam ter sobrevividos nessa ocorrência. Por outro lado, observando e comparando os níveis de TNF- α nas diferentes formas clínicas da lipodistrofia percebeu-se que não há uma diferença estatística significativa. Entretanto, verificaram-se níveis de TNF- α mais elevados na forma lipohipertrófica, como espelha o gráfico 6. É importante demonstrar que, quando se utilizou do teste de Mann-Whitney a fim de comparar os níveis de TNF- α com as formas lipoatrófica e lipohipertrófica, obteve-se um p-valor unilateral = 0,0562 e um p-valor bilateral = 0,1123, demonstrando, assim, que o p-valor unilateral está próximo do nível alfa de rejeição da hipótese de nulidade (p=0,05). Apesar da falta de dados disponíveis na literatura, conjectura-se o acúmulo de tecido adiposo na forma lipohipertrófica como fator indutor da síntese de TNF- α .. Ainda pode esse resultado refletir o número pequeno de pacientes incluídos nessa amostra.

No que tange à distribuição do polimorfismo genético do TNF- α (-308A) nas diferentes formas clínicas de lipodistrofia, não fora visualizada uma correlação estatisticamente significativa, apesar de ter sido observado que, na forma mista, o percentual encontrado (37,5%) fora maior do que na forma lipoatrófica. Acredita-se que fatores relacionados ao acaso podem estar relacionados com esses resultados, no entanto não se pode deixar de enfatizar que tais resultados possam ser decorrentes apenas do pequeno tamanho da amostra (n=40).

O polimorfismo -308A definiu os alelos TNF1 (GG) e TNF2 (AG e AA), sendo o TNF2 considerado o mais importante alelo na regulação da produção do TNF- α . Nessa casuística, a distribuição dos alelos encontrados corresponde a 30% para o alelo AG (heterozigoto), 2,5% para o alelo AA (homozigoto) e 67,5% para o alelo GG (selvagem). Corrobora com esse resultado um único estudo realizado na população chilena na qual fora encontrada uma freqüência de 16,8% para o alelo TNF2 heterozigoto e 0,6% para o alelo TNF2 homozigoto (SCHIATTINO, 2001). Silva (2004) em um estudo realizado no Pará, estudando pacientes portadores de malária, observou a seguinte incidência do polimorfismo do TNF- α : os alelos que sofreram mutação corresponderam a 13%, desse total 11% corresponderam ao gene heterozigoto AG e 2% ao gene homozigoto AA. Os genes que não sofreram mutação (GG) corresponderam a 87%. Chama a atenção a diferença entre as formas heterozigotas encontradas nesse estudo (30%) e as encontradas no trabalho sobre malária (11%). Tal diferença pode ser justificada em virtude da população estudada, haja vista que a ocorrência do polimorfismo genético do TNF- α não está diretamente relacionado com a

ocorrência de patologias, mas, sim, com fator inerente a cada indivíduo. Vale ressaltar que trabalhos realizados com a finalidade de medir a atividade transcricional desses alelos são contraditórios.

Quando foram comparados os níveis de TNF- α com a presença ou ausência do polimorfismo -308A, observou-se que os níveis de TNF- α na presença do polimorfismo apresentaram uma média e desvio padrão de $28,51 \pm 11,46$ pg/ml, já na ausência do polimorfismo a média e desvio padrão dos níveis de TNF- α foram de $26,65 \pm 6,34$ pg/ml, não apresentando, dessa forma, uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,9770$). Silva (2004), estudando 83 pacientes portadores de malária observou que a média e desvio padrão dos níveis de TNF- α na presença do polimorfismo -308A foi de $29,25 \pm 8,54$ pg/ml enquanto na ausência foi $54,22 \pm 11,56$ pg/ml. O que poderia justificar esses dados seria a diferença no número de pacientes de cada amostra ou então estar relacionado com o acaso.

Ao estabelecer comparação entre os níveis de TNF- α e a carga viral dos pacientes, observou-se que, independentemente da carga viral ser positiva ou negativa, não existe uma diferença estatisticamente significativa. O que pode explicar esse acontecimento é o fato de que, embora a carga viral do HIV seja altamente suprimida pela TARV, reservatórios virais ainda persistem e a liberação de proteínas virais, como a Tat, em consórcio com maiores concentrações de TNF-RII solúvel, poderiam levar à ativação de NF- κ B e posteriormente à iniciação da produção do TNF- α . Dessa forma, faz-se necessário rigorosos mecanismos de controle para prevenir a produção crônica de TNF- α e consequências adversas posteriores (LEDRU, 2000).

7 CONCLUSÃO

No afã de estudar os níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa e seu polimorfismo genético em pacientes HIV positivos, portadores de lipodistrofia e submetidos à terapia anti-retroviral, valendo-se do método ELISA para determinar quantitativamente os níveis de TNF- α e da reação de PCR para detectar a ocorrência do polimorfismo, empreendeu-se a pesquisa intitulada Níveis de TNF- α e seu Polimorfismo Genético em Pacientes HIV Positivos, Portadores de Lipodistrofia e em Uso de Terapia Anti-retroviral. Para a obtenção dos resultados, adiante esposados, encaminhou-se um estudo transversal de uma amostra constituída por 40 pacientes HIV positivos em uso de TARV por um período maior de 1 (um) ano e portadores de lipodistrofia. Esses pacientes foram encaminhados pela rede pública para o Ambulatório de Lipodistrofia do Hospital Universitário João de Barros Barreto.

Assim, baseados nos aspectos supramencionados, elecam-se abaixo, como outrora referenciado, os resultados e/ou dados que constituem as conclusões a que se chegou por meio do estudo que, ao longo desta dissertação de mestrado, fora esboçado.

- Esta casuística mostrou uma prevalência da Síndrome de Lipodistrofia correspondente a 65% no sexo masculino e 35% no sexo feminino.
- Não houve diferença estatisticamente significativa quando se comparou a idade em anos dos pacientes em estudo com a variável sexo masculino e feminino.
- Quando se correlacionou os níveis de TNF- α com as diferentes idades dos pacientes, observou-se que pacientes mais jovens apresentaram níveis de TNF- α mais elevados.
- Nesse estudo não houve uma correlação entre os níveis de TNF- α e o tempo de uso de TARV.
- Comparando-se o tempo de uso de TARV entre os sexos masculino e feminino observou-se diferença estatisticamente significativa.
- Os níveis de TNF- α apresentaram-se mais elevados nos pacientes portadores da forma lipohipertrófica. O polimorfismo genético do TNF- α (-308A) apresentou a seguinte distribuição: AG=30%, AA=2,5% e GG=67,5%..
- Não se observou diferença nos níveis de TNF- α quando da presença ou ausência do polimorfismo genético.
- Nesta pesquisa, a carga viral não apresentou relação direta com os níveis de TNF- α .
- Estudos controlados e com maior amostragem são necessários para corroborarem ou não os dados obtidos e aqui apresentados para que, assim procedendo, seja possível traçar um perfil consistente do TNF- α e seu polimorfismo genético nos pacientes HIV positivos e portadores de lipodistrofia.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003, p.233-247

AGUILLON G., J. C.; CRUZAT C., A.; CUENCA M., J.; CUCHACOVICH T., M.. El polimorfismo genético del factor de necrosis tumoral alfa como factor de riesgo en patología. **Rev. Méd. Chile, Santiago**, v. 130, n. 9, p. 1043-1050, set. 2002.

AIDSMEDS.COM. **Side Effects**. Disponível em: http://www.aidsmeds.com/articles/SideEffects_5034.shtml. Acesso em: 30.10.2008.

BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor-kB: A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **New Eng J Med, Massachussets**, v. 336, p.1066-1071, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV**, Brasília, abr, 2003.

_____. **Boletim Epidemiológico AIDST**, Brasília, v. 1, n. 1, 48 p, 2004.

_____. **Mundo tem 33,2 milhões de pessoas com HIV**. Neste ano, ocorreram 2,5 milhões de novas infecções. DST-AIDS. Notícia do Programa Nacional. 03.02.2008

BRITO, A. M.; CASTILHO, E. A.; SZWARCOWALD, C. L. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 34, n. 2, p. 207-217. 2001,

CARR, A.; SAMARAS, K.; BURTON, S.; LAW, M.; FREUND, J.; CHISHOLM, D. J.; COOPER, D. A. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hiperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. **AIDS**. n. 12, F51-F58, 1998.

CASTELLAR, E.; VILAR, L.; MOURA, E.; LEAL, E.; MACHADO, A. C.; TEIXEIRA, L.; CAMPOS, R. **Distúrbios endocrinológicos e metabólicos** na AIDS. In: VILAR, L. et al. *Endocrinologia Clínica*. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSi, 1999, p. 871-882.

CURRIER, J. S. HAVLIR, D. V. **Complication of HIV disease and antiretroviral therapy**. *Topics HIV Medicine*, v. 12, n. 1, p. 31-39, mar.-abr. 2004.

DANIEL-RIBEIRO, C.T.; CRUZ, M.F. F. The new and the old in malaria immunopathology. **Ciência e Cultura: Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 52 n. 4/5, p. 269-281, 2000.

FERNANDES, A. P. M. . Lipodistrofia em portadores do HIV. **Jornal Brasileiro de AIDS**, v. 6, n. 3, p. 97-99, 2005.

GARCIA, R.; PONDÉ, M.; LIMA, M.; SOUZA, A. R.; STOLZE, S. M. O.; BADARÓ, R. Lack of effect of motivation on the adherence of HIV-positive/AIDS patients to antiretroviral treatment. **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 6, p. 494-499, Nov. 2005.

GRINSPOON, S. Metabolic syndrome and cardiovascular disease in patients with human immunodeficiency virus. **The American Journal of Medicine**. v.118, p.2-3, 2005. Sup. 2.

GRINSPOON, S.; CARR, A. Cardiovascular Risk and Body-Fat Abnormalities in HIV-Infected Adults, **New England Journal of Medicine**, Massachussets, v. 352, p. 48-62, 2005,

HADIGAN, C.; YAWETZ, S.; THOMAS, A.; HAVERS, F.; SAX, P. E, GRINSPOON, S. Metabolic Effects of Rosiglitazone in HIV Lipodystrophy: A Randomized, Controlled Trial. **Ann Intern Med**, v. 140, n. 10, p. 786-794, mai, 2004.

HAJEER, A. H.; HUTCHINSON, I. V. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. **Microsc Res Tech**, v. 50, n. 3, p. 216-28, ago, 2000.

HAUGAARD, S. B.; ANDERSEN, O.; DELA, F.; HOLST, J. J.; STORGAARD, H.; FENGER, M.; IVERSEN, J.; MADSBAD, S. Defective glucose and lipid metabolism in human immunodeficiency virus-infected patients with lipodystrophy involve liver, muscle tissue and pancreatic β -cells. **European Journal of Endocrinology**, v. 152, n. 1, p. 103-112, 2005.

_____. Hyperproinsulinaemia in normoglycaemic lipodystrophic HIV-infected patients. **Eur J Clin Invest**. 36, 6, p.436-45, Jun,2006

JAIME, P. C.; FLORINDO, A. A.; LATORRE, M. R. D. O.; BRASIL, B. G.; SANTOS, E. C. M.; SEGURADO, A. A. C. Prevalência de sobrepeso e obesidade abdominal em indivíduos portadores de HIV/AIDS, em uso de terapia anti-retroviral de alta potência. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 1, p. 65-72, mar. 2004.

LEÃO, R. N. Q.; BICHARA, C. N. C.; MIRANDA, E. C. B. M.; CARNEIRO, I. C. R. S.; ABDON, N. P.; VASCONCELOS, P. F. C.; SILVA, B. M.; PAES, A. L. V.; MARSOLA, L. R. **Doença Infectocontagiosas e Parasitárias – Enfoque Amazônico**. Belém: CEJUP, 1997.

LEDRU, E.; CHRISTEFF, N.; PATEY, O.; DE TRUCHIS, P.; MELCHIOR, J. C.; GOUGEON, M. L. Alteration of tumor necrosis factor- α T-cell homeostasis following potent antiretroviral therapy: contribution to the development of human immunodeficiency virus-associated lipodystrophy syndrome. **BLOOD**, v. 95, n. 10, p. 3191-3198, May, 2000

LICHTENSTEIN, K. A. Redefining lipodystrophy syndrome: risks and impact on clinical decision making. **Journal of Acquire Immune Deficiency Syndromes**, v. 39, n. 4, p. 395-400, 2005.

LIMA, G. A. B.; VERDEAL, J. C. R.; FARIAS, M. L. F. Osteonecrosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): report of two cases and review of the literature. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 49, n. 6, p. 996-999. dez. 2005.

LIN, Y.; DEVIN, A.; YOLANDA, R.; ZHENG-GANG, L.; Cleavage of the death domain kinase RIP by Caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. **Genes Dev**. v. 13, n. 19, p. 2514-2526, Oct. 1999

ALFIREVIC, A.; VILAR, F. J.; WILKINS, E. G. L.; PARK B. K.; PIRMOHAMED, M. TNF- α promoter region gene polymorphisms in HIV-positive patients with lipodystrophy. **AIDS**. v. 16, n. 15, p. 2013–2018, Jun, 2002.

MELCHIOR, R.; NEMES, M. I. B.; BASSO, C. R.; CASTANHEIRA, E. R. L.; ALVES, M. T. S. S. B. E. ; BUCHALLA, C. M.; DONINI, A. A.. Avaliação da estrutura organizacional da assistência ambulatorial em HIV/Aids no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 40, n. 1, p 143-151, 2006.

MONTESSORI, V.; PRESS, N.; HARRIS, M.; AKAGI, L.; MONTANER, J. S.G. Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection (review synthese). **Canadian Med Association J**, v. 170, n. 2, jan. 2004

MOYLE, G. J. Adverse effects of therapy: it's not just lipodistrophy. CONFERENCE ON RETROVIRUS AND OPPORTUNISTIC INFECTIONS – COMPLICATIONS OF HIV AND ITS THERAPHY, 8th. Proceedings . Chicago, 2001.

NAÇÕES UNIDAS. Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS). Sumário dos principais dados. 02.2008.

_____. **Fator-chave por Região**. 02.2008

NADLER, J. Aids: Etiopatogenia. In: VERONESI, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1997, p. 83-86.

OLIVEIRA, M. M.; SILVA, J. C. S.; COSTA, J. F.; AMIM, L. H.; LOREDO, C. C. S; MELO, H.; QUEIROZ, L. F.; MELLO, F. C. Q; LAPA E SILVA, J. R.; KRITSKI, A. L.; SANTOS, A. R. Distribuição de Polimorfismos de Base única (SNPs) no gene de TNF- α (-238/-308) entre pacientes com TB e outras pneumopatias: marcadores genéticos de susceptibilidade a ocorrência de TB?. **J. Bras. Pneumol.**, São Paulo, v. 30, n. 4, ago. 2004.

OLIVEIRA, S.; LINS, D. Lipodistrofia Relacionada à Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS). In: BANDEIRA, F. **Endocrinologia e Diabetes**. Rio de Janeiro: MEDSI, p. 1018-1022, 2003.

PARÁ. Secretaria de Estado de Saúde Pública (SESPA). DST/AIDS. 2006. Disponível em: <http://portal.sespa.pa.gov.br>. Acesso em: 14.03.2006

RANG H, P.; RITTER, J. M. / DALE, M. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, p. 749-755.

SALLAKCI, N.; AKCURI, N. G.; KÖKSOY, S.; KARDELEN, F.; UGUZ, A.; COSKUN, M.; ERTUG, H.; YEGIN O. TNF-alpha G-308A polymorphism is associated with rheumatic fever and correlates with increased TNF-alpha production. **Journal of Autoimmunity**, v. 25, n. 2, p.150-154, 2005.

SCHIATTINO, I.; VILLEGAS, R.; CRUZAT, A.; CUENCA, J.; SALAZAR, L.; ARAVENA, O.; PESCE, B.; CATALÁN, D.; LLANOS, C.; CUCHACOVICH, M.; AGUILLÓN, J. C. Multiple imputation procedures allow the rescue of missing data: An application to determine serum tumor necrosis factor (TNF) concentration values during the treatment of rheumatoid arthritis patients with anti-TNF therapy. **Biol. Res.**, Santiago, v.38, n.1, p.7-12, abr. 2001.

SCHELD, W. M. Introdução ao HIV e desordens associadas. In: CECIL, R. L. et al. **Tratado de Medicina Interna**. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, p. 2496-2497.

SCHWENK, A.; BEISENHERZ, A.; RÖMER, K.; KREMER, G.; SALZBERGER, B.; ELIA, M. Phase angle from bioelectrical impedance analysis remains an independent predictive marker in HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral treatment. **Am J Clin Nutr**, v. 72, n. 2, p. 496-501, 2000.

SEPKOWITZ, K. A. AIDS — the first 20 years. **N Engl J Med**, Massachusetts, v. 344, n. 23, p. 1764-1772, jun. 2001.

SILVA, I. B. A. **Malária vivax**: manifestações clínicas e laboratoriais relacionadas com o fator necrose tumoral alfa. 2004. 148 f. Tese (Doutorado – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém. Orientador: Prof. Dr. José Maria de Souza.

SILVA, M. M. Polimorfismo da região do Fator Necrose Tumoral (TFN) na Síndrome Lipodistrofia associada à terapia anti-retroviral em portadores de HIV-1. 2008. 141 f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Enfermagem), Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo. Orientador: Prof^a Dr^a Ana Paula Morais Fernandes.

SWEET, D. E. Metabolic complications of antiretroviral therapy. **Top HIV Med** , v.13, n. 2, p. 70-74, jun-jul. 2005.

TIN, E.E et al. The efficacy and adverse effects of GPO-VIR (stavudine + lamivudine + nevirapine) in treatment-naive adult HIV patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, v. 36, n. 2, p. 362-369, 2005.

VALENTE, A. M. M.; REIS, A. F.; MACHADO, D. M.; SUCCI, R. C.M.; CHACRA, A. R. Alterações metabólicas da síndrome lipodistrófica do HIV. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 49, n. 6, p. 871-881. dez. 2005

YU, P. C.; CALDERARO, D.; LIMA, E. M. O.; CARAMELLI, B. Terapia hipolipemiante em situações especiais - síndrome de imunodeficiência adquirida. **Arq. Bras. Cardiol.** São Paulo, v. 85, out. 2005. sup. 5.

APÊNDICES

APÊNDICE A – AVALIAÇÃO CLÍNICA E NUTRICIONAL

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Matrícula: _____
 Endereço: _____ Telefone: _____
 Sexo: () Fem. () Masc. Idade: _____ anos. Profissão: _____
 Grau de instrução: _____
 Procedência: _____

2 CONDIÇÕES SÓCIO-ECONÔMICAS

Renda Familiar: R\$ _____ n° de pessoas na família _____

3 HISTÓRIA CLÍNICA

FAORES DE RISCO

- () Tabagismo
- () Etilismo
- () Atividade Física. Qual: _____
- () Raça: _____
- () Diagnóstico de HIV: _____ Tempo de tratamento: _____
- () Medicação utilizada: _____
- () Antecedentes pessoais: _____
- () Antecedentes familiares de Diabetes Mellitus: _____
- () Antecedentes familiares de Hipertensão Arterial: _____
- () Antecedentes familiares de Dislipidemia: _____
- () Antecedentes familiares de eventos cardiovasculares: _____
- () Antecedentes familiares de eventos cerebrovasculares: _____
- () Uso de medicação que alterem os níveis lipídicos: _____

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

- () Lipoatrofia facial
- () Lipoatrofia de membros
- () Lipoatrofia visceral abdominal
- () Lipoatrofia mamária
- () Lipoatrofia dorso-cervical

EXAME FÍSICO:

Inspeção geral:

Medidas antropométricas

Altura: _____ cm

Peso Atual: _____ kg

Peso Usual: _____ kg

Peso Ideal: _____ kg

MPI: _____ % Em quanto tempo: _____

IMC: _____ kg/m²

Braço D: _____ cm

Braço E: _____ cm

Coxa D: _____ cm

Coxa E: _____ cm

Circ. Abdominal: _____ cm

C/Q: _____ cm

Espessura da prega cutânea

Tríceps: _____ mm _____ %

Bíceps: _____ mm _____ %

Suprailíaca: _____ mm _____ %

Subcapular: _____ mm _____ %

Média: _____ mm

CMB: _____ cm

TMB: _____ kcal

VET: _____ kcal

RESULTADO DE EXAMES

1. Hemograma: _____ Em ____ / ____ / ____.

() Anemia (Hb<10) _____

() Leucocitose (Hb<10.000) _____

() Plaquetopenia (Hb<140.000) _____

() CD4: _____

() Carga Viral: _____

2. Glicemia de jejum: _____ Em ____ / ____ / ____.

3. Urina de rotina: _____ Em ____ / ____ / ____.

4. Colesterol: _____ Em ____ / ____ / ____.

5. Triglicerídios: _____ Em ____ / ____ / ____.

6. LDL: _____ Em ____ / ____ / ____.

7. HDL: _____ Em ____ / ____ / ____.

8. LDL: _____ Em ____ / ____ / ____.

9. TGO: _____ Em ____ / ____ / ____.

10. TGP: _____ Em ____ / ____ / ____.

11. Insulina basal: _____ Em ____ / ____ / ____.

12. Curva Glicêmica: _____ Em ____ / ____ / ____.

13. Ácido Úrico: _____ Em ____ / ____ / ____.

14. Uréia: _____ Em ____ / ____ / ____.

15. Creatinina: _____ Em ____ / ____ / ____.

16. Microalbumina: _____ Em ____ / ____ / ____.

17. Densitometria óssea: _____ Em ____ / ____ / ____.

18. Eletrocardiograma: _____ Em ____ / ____ / ____.

APÊNDICE B – TERMO D CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Níveis séricos de TNF alfa e seu polimorfismo em pacientes HIV positivos, em uso de HAART e portadores de lipodistrofia.

Pesquisador Responsável: Miguel Corrêa Pinheiro

Justificativa, Objetivos e Procedimentos da Pesquisa.

O tratamento da AIDS, conhecido como terapia anti-retroviral, tem levado a uma substancial redução na mortalidade dos pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em todo o mundo. No entanto, pode causar alguns efeitos colaterais ao uso de sua medicação como perda de peso, diabetes, dislipidemia (níveis alterados de colesterol e triglicérides), gordura localizada, obesidade e problemas cardiovasculares.

As mudanças características deste tratamento incluem: acúmulo de gordura com aumento da cintura abdominal: aumento da gordura dorsocervical (na parte superior da costa), crescimento das mamas e lipomatose (nódulos de gordura), podendo também manifestar-se por perda ou diminuição da gordura do glúteo (bumbum), membros (braços e pernas) e face (rosto).

Os pacientes podem apresentar apenas acúmulo e/ou diminuição de gordura, sugerindo dois fenômenos distintos. Ou seja, o paciente não necessariamente vai apresentar os dois sinais clínicos juntos.

Dentro deste contexto, para que se tenha mais conhecimento sobre a segurança dessa terapia, faz-se necessário, através deste estudo, compreender a gravidade e as proporções dos efeitos da terapia anti-retroviral, pois assim será possível garantir aos pacientes infectados um regime terapêutico seguro e uma melhoria de sua qualidade de vida em curto e longo prazo.

Os pacientes portadores de HIV diagnosticados na cidade de Belém e apresentando quadro sugestivo de lipodistrofia serão encaminhados ao Hospital Barros Barreto, para avaliação e acompanhamento dessa síndrome.

Os procedimentos incluem:

a) Esclarecimento sobre o tratamento e seus efeitos colaterais, através de uma abordagem educativa a fim de diminuir o temor à adesão à terapia anti-retroviral e possíveis falhas;

b) Entrevista ao paciente para preenchimento de dados clínico-epidemiológicos e nutricionais contidos na ficha protocolar;

c) Solicitação de exames para avaliação do quadro clínico;

d) Realização de exame físico, onde serão avaliados: pressão, altura, peso, circunferência abdominal. Da coxa e braço em ambos os lados (através de fita métrica), além de espessura da prega cutânea suprailíaca, subescapular e em bíceps e tríceps utilizando-se de adipômetro;

e) Realização de exames complementares.

Os dados serão coletados em ficha protocolares durante o período estabelecido para pesquisa (um ano) e encaminhados em relatório parcial e final.

Desconforto e possíveis riscos associados à pesquisa

O risco neste projeto restringe-se ao sigilo a identificação do paciente, no entanto, todos os cuidados serão tomados para preservar a sua identidade, não havendo maiores riscos a este.

Benefícios da pesquisa

Em relação aos benefícios, busca-se a promoção de uma melhor qualidade de vida e prognóstico da doença a esses pacientes que decorrem de complicações associadas ao uso da terapia anti-retroviral.

Métodos alternativos existentes

Neste trabalho não há a prática de outros métodos, restringindo-se apenas aos descritos acima para a realização do estudo.

Esclarecimento e Direitos

Em qualquer momento o voluntário poderá obter esclarecimentos sobre todos os procedimentos utilizados na pesquisa e nas formas de divulgação dos resultados. Tem também a liberdade e o direito de recusar sua participação ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo do atendimento usual fornecido pelos pesquisadores.

Confidencialidade

As identidades dos voluntários serão mantidas em total sigilo por tempo indeterminado.

Ressarcimento de Pesquisas e Indenizações

Não há qualquer tipo de despesa por parte do paciente e nem sequer qualquer forma de indenização pelo mesmo pela sua participação neste estudo.

Consentimento Pós-Informado

Eu, _____, portador da
Carteira de Identidade nº _____ expedida pelo Órgão
_____, por me considerar devidamente informado(a) e esclarecido(a) sobre o conteúdo
deste termo e a pesquisa. Terapia anti-retroviral. E lipodistrofia: uma abordagem clínico-
terapêutica e etiopatogênica em pacientes atendidos no Hospital Universitário João de Barros
Barreto, Belém – Pará, a ser desenvolvida, livremente expresse meu consentimento para
inclusão, como sujeito da pesquisa. Recebi cópia desse documento por mim assinado.

Assinatura do Paciente Voluntário

_____/_____/_____

Assinatura do Responsável pelo Estudo

_____/_____/_____

ANEXO