UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

MARIANA PALMA GUIMARÃES

**Avaliação do tecido adiposo subcutâneo e sua associação com o
metabolismo energético de pessoas vivendo com HIV**

Ribeirão Preto

2019

MARIANA PALMA GUIMARÃES

Avaliação do tecido adiposo subcutâneo e sua associação com o metabolismo energético de pessoas vivendo com HIV

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina (Clínica Médica) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Investigação biomédica

Orientador: Prof. Dr. Anderson Marliere Navarro

Ribeirão Preto
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Guimarães, Mariana Palma

Avaliação do tecido adiposo subcutâneo e sua associação com o metabolismo energético em pessoas vivendo de HIV. Ribeirão Preto, 2019.

89 p. : il. ; 30 cm.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina (Clínica Médica) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Investigação biomédica.

Orientador: Navarro, Anderson Marliere.

1. HIV. 2. Lipodistrofia. 3. Tecido Adiposo Subcutâneo. 4. Marcadores de Adipogênese. 5. Metabolismo Mitocondrial. 6. Metabolismo Energético.

GUIMARÃES, MP.

Avaliação do tecido adiposo subcutâneo e sua associação com o metabolismo energético em pessoas vivendo com HIV.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de Concentração: Investigação biomédica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Á Deus pelo dom da vida, aos meus pais João e Lilian que nunca mediram esforços para a formação do meu caráter e para minha felicidade, às minhas irmãs Lisa e Ana Luiza que sempre foram meus espelhos e me motivaram a buscar o meu melhor, e às minhas sobrinhas Alícia, Manu e Grazi, e sobrinhos Bruno e Mateus, que tornaram meus dias mais leves e coloridos durante essa caminhada.

Agradecimientos

À **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP)** que possibilitou a realização desse projeto.

Ao **Prof. Dr. Anderson Marliere Navarro** que possibilitou que mais um sonho se tornasse realidade e pela sua amizade, compreensão em todos os momentos, pelos ensinamentos e exemplo de ser humano e profissionalismo que muito contribui para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos **voluntários** pela colaboração e participação, que o tornou este estudo possível.

À **Dra. Jamilly Gomes Maciel** pela disponibilidade e paciência em analisar as imagens de Tomografia Computadorizada e realizar as biopsias.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Henrique-Nogueira** pela colaboração nas análises das imagens de Tomografia Computadorizada.

Ao amigo **Prof. Dr. Anderson Oliveira** pela paciência e ajuda em conduzir as análises do metabolismo mitocondrial, e com ajuda na compreensão dos dados! Obrigada por estar sempre presente, mesmo estando longe!

À **Prof. Dra. Luciane Alberici** pela colaboração e fornecimento dos reagentes para as análises do metabolismo mitocondrial.

À amiga **Dra. Ana Carolina Bueno** por toda ajuda, colaboração e ensinamento nas análises moleculares. Por me acalmar nos meus momentos de desespero e me mostrar a luz quando tudo parecia escuro!

À amiga e **técnica Renata Danielle Scchieri Pugliesi**, por toda disponibilidade, ajuda, e paciência em ensinar. Pelo carinho e empatia de sempre!

À **Profa. Dra. Vivian Suen** por permitir o uso da calorimetria indireta e a amiga **Cássia Machado** por conduzir as análises!

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Santana** pela colaboração desde o início desse projeto!

À **técnica Karina Cristina Garcia da Costa**, do serviço de radiologia, pela disponibilidade em realizar o DEXA.

Às amigas **Mariana Pupin e Naiara Monteverde** pela ajuda com a coleta de dados. Por compartilharem as manhãs frias, os sufocos e os dramas da coleta!

Às minhas amigas e companheiras de pós-graduação **Mariana Pupin, Lúgia Moriguchi, Renata Dessordi, Loiane Sartori, Daniela Takaara, Rebeca Beraldo e Ana Carolina Momenti** por toda troca de conhecimento, pela ajuda durante a realização do meu projeto, pela parceria, pelos consolos, pela torcida, pelas risadas e por estarem ao meu lado em todos momentos cruciais!

Aos **funcionários da UETDI**, especialmente ao Chico, pela ajuda na seleção dos voluntários, atenção e amizade.

À **minha família** por estarem sempre presentes e me apoiarem independentemente de qualquer coisa. Por compreenderem meus momentos de ausência, por terem sido pacientes nos meus dias turbulentos, por terem me estimulado a superar as dificuldades e por comemorarem as minhas conquistas! Sou grata por tudo! Vocês são minha vida!

Aos Professores **Dra. Marta Giralt e Dr. Francesc Villaroya** por abrirem as portas de seus laboratórios, por me conduzirem durante meu estágio de pesquisa em Barcelona, pelo carinho, amizade, por terem permitido que eu vivesse esse sonho e terem me feito apaixonar pela biologia molecular. Vocês foram essenciais para meu crescimento profissional e pessoal!

À técnica **Merche Morales, a doutoranda Laura Campderros, e a Pos doc Tania Quesada**, por pacientemente e carinhosamente terem me ensinado e ajudado com todas as técnicas de biologia molecular, no laboratório TAM, em Barcelona!

Por **todos os amigos do laboratório TAM**, por me receberem de braços abertos, pelo acolhimento, companheirismo, amizade, e por toda ajuda durante os 11 meses que estive em Barcelona.

Aos amigos, que estão próximo e aos que estão longe, pelo apoio e carinho essenciais à vida.

Ao **CNPQ** pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto e concessão das bolsas de estudos no Brasil e Exterior (processos: 2016/1955-2 e 2017/26509-8).

À todos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento deste trabalho, meu muito obrigada!

Epígrafe

“Eu estou entre aquelas que acreditam que a ciência tem grande beleza. Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico: é também uma criança colocada frente a um fenômeno natural que a impressiona tanto quanto um conto de fadas”.

Marie Curie

RESUMO:

GUIMARÃES, M.P. **Avaliação do tecido adiposo subcutâneo e sua associação com o metabolismo energético de pessoas vivendo com HIV.** 2019. 89 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introdução: A eficácia das terapias antirretrovirais (TARV) aumentou a expectativa de vida de pessoas vivendo com o HIV (PVHIV). Entretanto, a TARV e o próprio vírus estão associados a disfunções no tecido adiposo (incluindo disfunções mitocondriais) que afetam o metabolismo sistêmico, contribuindo para o desenvolvimento das alterações metabólicas e morfológicas observadas na síndrome da lipodistrofia do HIV (SLHIV). O tecido adiposo, além da sua função de armazenamento, age como um tecido endócrino. Estudos recentes tem apontado o papel do tecido adiposo marrom (TAM) no metabolismo energético. **Objetivo:** Avaliar o tecido adiposo subcutâneo e sua associação com o metabolismo energético de PVHIV, com lipodistrofia. **Casuística e Métodos:** Participaram deste estudo 33 homens, com idade igual à $47,5 \pm 6,5$ anos, que foram divididos em 3 grupos: 12 soropositivos para HIV, em uso de TARV, com lipodistrofia (HIV+LIPO+), 10 soropositivos para HIV, em uso de TARV, sem lipodistrofia (HIV+), e 11 indivíduos não infectados pelo HIV (CTRL). Foram avaliados: composição corporal, gasto energético de repouso (GER), o metabolismo glicídico e lipídico e as concentrações de adipocinas e citocinas séricas. Uma amostra de tecido adiposo subcutâneo da região supraclavicular posterior foi coletada para análises da expressão do RNA mensageiro dos genes relacionados com adipogênese e função de adipócito (*PPAR γ* e *ADIPOQ*), biogênese e cadeia respiratória mitocondrial (*PGC1 α* e *COX4/I*), termogênese no TAM (*UCP1*, *DIO2*) e biogênese dos microRNAs, que são importante para diferenciação e função de adipócitos marrons e brancos (*DICER1*). Adicionalmente, foram analisados a densidade mitocondrial, por meio da atividade da citrato sintase, e o metabolismo mitocondrial, por meio do consumo de oxigênio nos estados acoplado (P), não fosforilado (L) e desacoplado (E). **Resultados:** Todas as PVHIV estavam clinicamente estáveis, com carga viral indetectável, e T-CD4 igual à 714 ± 220 cel/ml. Não houve diferenças na idade, IMC e % de gordura corporal (%G) entre os grupos. O grupo CTRL apresentou maior LDL-C quando comparado ao HIV+ e uma tendência em possuir maior número de pessoas com %G elevada ($p=0,08$), quando comparado aos demais grupos. Os marcadores do metabolismo da glicose, adipocinas e citocinas foram semelhantes entre os grupos. Não houve diferenças significativas no GER ($p=0,427$) e no GER/ massa livre de gordura (MLG) ($p=0,154$) entre os

grupos. O metabolismo e a densidade mitocondrial também foram semelhantes. A análise dos marcadores moleculares não evidenciou alterações na expressão dos genes *PPAR γ* , *ADIPOQ*, *PGC1 α* , *COX4/1*, *DIO2*, e *DICER*, entre os grupos. Apenas 8 indivíduos (2 HIV+LIPO+; 3 HIV+; e 3 CTRL) apresentaram expressão do *UCPI*, que não esteve associada com o GER nesses indivíduos. Não foram encontradas associações entre o GER e o metabolismo mitocondrial e a expressão dos marcadores moleculares analisados. **Conclusão:** O tecido adiposo subcutâneo supraclavicular posterior de PVHIV, em uso da TARV, com lipodistrofia, não apresenta alterações no metabolismo e densidade mitocondrial, bem como na expressão dos marcadores moleculares de adipogênese, função adipocitária, e *DIO2* e *DICER*, quando comparado ao tecido adiposo de PVHIV sem lipodistrofia e de indivíduos não infectados pelo HIV. A expressão dos genes analisados neste tecido não se associam com o GER, que se mostrou semelhante entre PVHIV, com e sem lipodistrofia, e indivíduos não infectados pelo HIV

Palavras chaves: HIV, lipodistrofia, tecido adiposo subcutâneo, marcadores de adipogênese, metabolismo mitocondrial, metabolismo energético.

Subcutaneous adipose tissue evaluation and its association with biomarkers of inflammation and energy metabolism in people living with HIV

ABSTRACT:

The effectiveness of antiretroviral therapies (ART) increased the life expectancy of HIV-infected patients. However, ART and HIV itself are associated with adipose tissue dysfunction (including mitochondrial dysfunction), which affects systemic metabolism and contributes to the metabolic and morphologic changes observed in HIV-associated lipodystrophy syndrome (HALS). In addition to its storage function, the adipose tissue acts as an endocrine organ. Recently studies have shown the role of brown adipose tissue (BAT) in energy metabolism. **Aim:** to evaluate subcutaneous adipose tissue and its association with the energetic metabolism of PVHIV with lipodystrophy. **Methods:** Thirty-three men aged 47.5 ± 6.5 years were enrolled. They were divided into 3 groups: 12 HIV-infected individuals undergoing ART with lipodystrophy (HIV+LIPO+), 10 HIV-infected individuals undergoing ART without lipodystrophy (HIV+), and 11 non-HIV-infected individuals (CTRL). Body composition, resting energy expenditure (REE), glucose and lipid metabolism, and serum adipokine and cytokine concentrations were evaluated. A sample of subcutaneous adipose tissue from the posterior supraclavicular region was collected for the analysis genes related to adipogenesis and adipocyte function (*PPAR γ* and *ADIPOQ*), biogenesis and mitochondrial respiratory chain (*PGC1 α* and *COX4/1*), thermogenesis in BAT (*UCP1* and *DIO2*) and microRNA biogenesis, which are important for differentiation and function of brown and white adipocytes (*DICER1*). The mitochondrial density was evaluated by citrate synthase activity, and mitochondrial metabolism was evaluated by coupled (P), non-phosphorylated (L), and uncoupled (E) states. **Results:** All PLHIV were clinically stable, with undetectable viral load, and TCD4 of 714 ± 220 cell/ml. There were no differences in age, BMI, and % body fat (% BF) between groups. The CTRL group had higher LDL-C when compared to HIV+, and it tended to have a higher number of people with high-fat percentage ($p = 0.08$) when compared to the other groups. Markers of glucose metabolism, adipokines, and cytokines were similar between groups. There were no significant differences in REE ($p=0,427$) and REE/ fat-free mass (FFM) ($p=0,154$) between HIV+LIPO+, HIV+, and CTRL groups. Mitochondrial metabolism and density were similar between groups. Analysis of molecular markers gene expression showed no changes in expression of *PPAR γ* , *ADIPOQ*, *PGC1 α* , *COX4/1*, *DIO2*, e *DICER* between groups. Only 8 samples (2 HIV + LIPO +, 3 HIV

+, and 3 CTRL) presented *UCPI* expression, which was not associated with REE in these people. No associations were found between REE and mitochondrial metabolism, and between REE and the molecular markers analyzed. FFM was a predictor of REE in the HIV+ and CTRL groups, while BF (%) was a predictor of REE in the HIV+LIPO+ group.

Conclusion: posterior supraclavicular subcutaneous adipose tissue of PLHIV using ART with lipodystrophy shows no changes in mitochondrial metabolism and density, and in the expression of molecular markers of adipogenesis, adipocyte function, *DIO2* and *DICER* when compared to the adipose tissue of PLHIV without lipodystrophy and non-HIV infected individuals. The expression of the genes analyzed in this tissue is not associated with REE, which was similar between PVHIV, with and without lipodystrophy, and individuals not infected with HIV.

Keywords: HIV, lipodystrophy, subcutaneous adipose tissue, adipogenesis markers, mitochondrial metabolism, energetic metabolism.

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1	Fluxograma do recrutamento dos indivíduos participantes do estudo.....	16
Figura 2	Fluxograma do protocolo de pesquisa do estudo.....	17
Figura 3	Avaliação do consumo de oxigênio, em cada estado da respiração.....	23
Figura 4	Expressão de mRNA dos marcadores moleculares no tecido adiposo subcutâneo.....	30
Figura 5	Respiração mitocondrial de tecido adiposo subcutâneo dos grupos de estudo	31
Figura 6	Razões das taxas respiratórias e conteúdo mitocondrial de tecido adiposo subcutâneo dos grupos de estudo.....	32

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Medicamentos antirretrovirais.....	08
Quadro 2	Genes analisados nas amostras tecido adiposo subcutâneo.....	24
Tabela 1	Fluxograma do recrutamento dos indivíduos participantes do estudo.....	26
Tabela 2	Fluxograma do protocolo de pesquisa do estudo.....	27
Tabela 3	Avaliação do consumo de oxigênio, em cada estado da respiração.....	28
Tabela 4	Expressão do mRNA dos marcadores moleculares no tecido adiposo subcutâneo dos grupos de estudo.....	29
Tabela 5	Respiração mitocondrial de tecido adiposo subcutâneo dos grupos de estudo.....	35
Tabela 6	Razões das taxas respiratórias e conteúdo mitocondrial de tecido adiposo subcutâneo dos grupos de estudo.....	36

LISTA DE SIGLAS:

AF	Atividade Física
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ARV	Antirretroviral
ATP	Trifosfato de adenosina
CCCP	Cianeto de carbonilo m-clorofenil-hidrazona
CI	Calorimetria Indireta
CO₂	Dióxido de Carbono
CS	Citrato sintase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Estado E	Estado desacoplado
Estado L	Estado de repouso
Estado P	Estado de fosforilação
ETA	Efeito Térmico do Alimento
FADH	Flavina-adenina dinucleotídio
FDG	[18F] fluorodeoxiglicose
GC	Gordura Corporal
GE	Gasto Energético
GEB	Gasto Energético Basal
GER	Gasto Energético de Repouso
GET	Gasto Energético Total
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
INI	Inibidores de Integrase

IP	Inibidores de protease
ITRN	Inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e nucleotídeos
ITRNN	Inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos e nucleotídeos
LA	Lipoatrofia
LH	Lipoipertrofia
MLG	Massa Livre de Gordura
mtDNA	DNA mitocondrial
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo
O₂	Oxigênio
PET/CT	Imagens combinadas de Tomografia por Emissão de Pósitrons e de Tomografia Computadorizada de raios
PGC-1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha</i>
PPARγ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i>
PVHIV	Pessoas Vivendo com HIV
SLHIV	Síndrome da Lipodistrofia do HIV
T3	tri-iodotironina
T4	tiroxina
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAM	Tecido Adiposo Marrom
TARV	Terapia Antirretroviral Combinada
UCP1	Proteína desacopladora 1
VCO₂	Dióxido de carbono
VO₂	Volume de oxigênio

Sumário

1 Introdução	1
1.1 Metabolismo Energético	1
1.2 Metabolismo Mitocondrial	2
1.3 Tecido Adiposo	4
1.3.1 Tecido Adiposo Branco	4
1.3.2 Tecido Adiposo Marrom	5
1.4 HIV e a Terapia de Antirretroviral	7
1.5 Síndrome da Lipodistrofia do HIV:	9
1.6 Tecido Adiposo e Metabolismo Energético em Pessoas Vivendo com HIV	11
2 Hipótese:	13
3 Objetivos:	14
3.1 Geral:	14
3.2 Específicos:	14
4 Casuísticas e Métodos:	15
4.1 Grupos de estudo	15
4.2 Seleção dos Voluntários	15
4.3 Protocolo experimental	17
4.4 Avaliação Clínica	17
4.5 Avaliação nutricional e da atividade física	18
4.6 Avaliação da composição corporal e confirmação da lipodistrofia	19
4.7 Avaliação Bioquímica	19
4.8 Avaliação do gasto energético de repouso	20
4.9 Identificação do tecido adiposo	20
4.10 Biópsia do tecido adiposo	21
4.11 Análise do metabolismo e densidade mitocondrial	21
4.12 Análise de expressão gênica	23
4.13 Análise Estatística	25
5 Resultados:	26

6 Discussão:	37
7 Conclusão:	46
8 Referências Bibliográficas:	47
Anexos:	55

1 Introdução

1.1 Metabolismo Energético

O gasto energético (GE) é considerado um processo de geração de energia a partir da combustão de substratos energéticos, em que há consumo de oxigênio (O_2) e produção de dióxido de carbono (CO_2) (Volp *et al.*, 2011). O gasto energético total (GET) refere-se à energia necessária para a manutenção do organismo durante o dia todo. Ele pode ser dividido em três componentes mensuráveis: gasto energético basal (GEB), efeito térmico do alimento (ETA) e atividade física (AF) (Elwyn *et al.*, 1981).

O GEB é responsável por cerca de 60-75% do valor do GET e é definido como a quantidade de energia consumida durante atividades metabólicas para manter a homeostase durante o repouso. O ETA refere-se à energia necessária para a digestão, absorção, uso e armazenamento dos nutrientes ingeridos nas refeições, representa cerca de 5 a 10% do GET. A AF é a energia gasta em exercícios físicos e/ou atividades físicas, sendo bastante variável entre os indivíduos (Kosmiski, 2011; Elwyn *et al.*, 1981).

A medida do GEB é obtida durante as primeiras horas da manhã, com o indivíduo acordado, em jejum de 12 a 14 horas, em posição supina e em ambiente com temperatura entre 25 e 26°C, condições que minimizam os efeitos do ETA e da AF no metabolismo. O gasto energético de repouso (GER) é obtido nas mesmas condições, com a diferença de que a medida é realizada após o deslocamento do indivíduo até o local do exame, podendo ser, assim, de 10 a 20% maior que o GEB (Kamimura, 2008).

A mensuração do GER pode ser feita pela calorimetria indireta (CI), método que quantifica o consumo de O_2 inspirado e a produção de CO_2 expirado do ar pelos pulmões (Chang *et al.*, 2007). Além do gasto energético, a CI também permite identificar qual substrato energético está sendo predominantemente metabolizado pelo corpo no momento do exame. É uma técnica não invasiva e muito precisa, tendo um erro inferior a 1% (Shutz, 1999; Volp, 2011). A utilização da CI visa determinar as reais necessidades energéticas, as quais podem ser alteradas de acordo com a situação clínica, doença de base e nível de AF. Tanto a superestimação quanto a subestimação

das necessidades energéticas tem efeito negativo na recuperação ou manutenção do estado nutricional do indivíduo (Haugen *et al.*, 2007).

1.2 Metabolismo Mitocondrial

As mitocôndrias são organelas semiautônomas, formadas por quatro compartimentos: duas membranas citoplasmáticas (externa e interna), um espaço intermembranas e uma matriz mitocondrial, na qual evidencia-se o DNA mitocondrial. As mitocôndrias desempenham funções celulares vitais, como induzir a apoptose, autofagia e produção de espécies reativas de oxigênio (Boengler *et al.*, 2017; Schöpf *et al.*, 2016). Contudo, sua principal função está relacionada com a geração de energia na forma de ATP (trifosfato de adenosina), por meio do pleno funcionamento do Ciclo do Ácido Cítrico (Krebs), descarboxilação do piruvato e β -oxidação, resultando na síntese de ATP, um processo denominado fosforilação oxidativa (Friedman e Nunnari, 2014).

A fosforilação oxidativa acontece na membrana mitocondrial interna, a qual é constituída por proteínas que compõem a cadeia respiratória (ou cadeia transportadora de elétrons, CTE), sendo tal cadeia formada por quatro complexos: o complexo I (NADH: ubiquinona oxidoreductase), II (succinato-ubiquinona oxidoreductase), III (ubiquinolcitocromo c oxidoreductase) e IV (citocromo c oxidase). Além desses 4 complexos, existem mais 2 complexos móveis: a coenzima Q e o citocromo C, estruturas essenciais para a geração de um gradiente eletroquímico de prótons (H^+) através da membrana interna. A transferência de elétrons provenientes de NADH (Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio) e $FADH_2$ (Flavina-Adenina-Dinucleotídio) (advindos da oxidação de moléculas complexas como carboidratos, proteínas e lipídeos) para a cadeia respiratória até o oxigênio molecular é acoplada ao transporte de H^+ da matriz para o espaço intermembrana. Uma vez formado o gradiente eletroquímico de H^+ , o sistema ATP sintase (complexo V) é acionado e a fosforilação de moléculas de ADP em ATP ocorre (Friedman e Nunnari, 2014; Bénard *et al.*, 2006; Zeviani, 2004).

O acoplamento da transferência de elétrons e a fosforilação do ADP em ATP, refletem a eficiência das mitocôndrias para cobrir as demandas energéticas celulares (Schöpf *et al.*, 2016). O desvio de energia, obtida pela oxidação de nutrientes, para a produção de calor, mais comumente, pelo aumento da respiração desacoplada, reflete

a diminuição da eficiência bioenergética mitocondrial, que pode servir como um mecanismo de proteção contra os efeitos prejudiciais associados ao excesso de nutrientes (Liesa e Shirihai, 2013). A respiração desacoplada pode contar com mais de 25% do gasto energético de repouso no organismo (Parker *et al.*, 2009).

É importante notar que o aumento da respiração desacoplada pode ocorrer por dois tipos diferentes do estado respiratório:

1) Respiração controlada por vazamento inerente de prótons (*próton leak*), que experimentalmente pode ser medida pela inibição da síntese de ATP, por meio da exaustão de ADP ou pelo uso de oligomicina (inibidora da ATP sintase), e pode mimetizar condições fisiológicas de baixa síntese de ATP mitocondrial (demanda reduzida de ATP) e alta disponibilidade de nutrientes. Este estado é associado a taxas reduzidas de consumo de oxigênio e uma elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Liesa e Shirihai, 2013; Parker *et al.*, 2009).

2) Respiração controlada por indução de proteínas desacopladoras, que pode ser experimentalmente replicada pela adição de compostos químicos, como o carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP). A ativação desses desacopladores assume o controle da respiração a partir da síntese de ATP, com isso, a respiração é controlada pela capacidade da cadeia respiratória e pela disponibilidade de combustíveis mitocondriais. Nesse estado, ocorre um aumento no consumo de oxigênio para valores mais altos ou próximos ao estado acoplado, e está associado a uma menor produção EROS (Liesa e Shirihai, 2013; Parker *et al.*, 2009).

Estudos tem apontado que o mau funcionamento da cadeia transportadora de elétrons, a geração prejudicada de ATP, o desequilíbrio entre a geração e sequestro de EROs, e um desbalanceado *turnover* mitocondrial, causados por disfunções na organela, estão associados ao desenvolvimento de doenças e a processos fisiopatológicos, incluindo obesidade, distúrbios metabólicos, envelhecimento, neurodegeneração e câncer (Boengler *et al.*, 2017; de Andrade *et al.*, 2016; Koh *et al.*, 2007; Schöpf *et al.*, 2016).

A disfunção mitocondrial pode ser provocada por redução da biogênese mitocondrial, do conteúdo mitocondrial, da atividade mitocondrial e da fosforilação oxidativa (Montgomery e Turner, 2014).

Uma proteína essencial para o processo de biogênese mitocondrial é o *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha*, (PGC-1 α),

uma vez que atua como um importante regulador de genes envolvidos no metabolismo energético e da função mitocondrial (Hondares *et al.*, 2011).

1.3 Tecido Adiposo

O tecido adiposo é um órgão endócrino-metabólico complexo, atualmente reconhecido não só como estoque de energia, mas também como um importante regulador do metabolismo sistêmico (Valencak, Osterrieder e Schulz, 2017). Em mamíferos, existem dois tipos de tecido adiposo com funções diferentes: o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM).

1.3.1 Tecido Adiposo Branco

A maior parte do tecido adiposo é constituída por TAB que pode corresponder entre 5 a 50% do peso corporal (Kajimura, 2017). O TAB é composto por adipócitos brancos que contém um único e grande vacúolo de lipídios e poucas mitocôndrias. Assim, sua principal função é a de estoque de energia na forma de triglicerídeo, possuindo uma enorme capacidade de expansão, por meio da hipertrofia e ou hiperplasia (diferenciação ou adipogênese) de adipócitos preexistentes (Castro *et al.*, 2014; Giralt, Domingo e Villarroya, 2011). Adicionalmente, o TAB é considerado um importante órgão endócrino, produtor de fatores que agem como hormônios, denominados de adipocinas (Giralt, Domingo e Villarroya, 2011; Kajimura, 2017).

Além dos adipócitos brancos, o TAB é composto por pré-adipócitos, macrófagos, células endoteliais e linfócitos, que podem liberar fatores regulatórios (citocinas e quimiocinas) e metabólicos (ácidos graxos livres) que exercem efeitos parácrinos e endócrinos, capazes de influenciar a homeostase energética, o metabolismo da glicose e dos lipídios, a inflamação, a função vascular e a própria biologia do tecido adiposo (Giralt, Domingo e Villarroya, 2011).

Sabe-se que o excesso de TAB (obesidade) está associado a anormalidades cardiometabólicas, como a resistência a insulina, dislipidemia e hipertensão. A fisiopatologia das doenças metabólicas associadas à obesidade tem sido atribuída à uma disfunção do TAB, incluindo o aumento da inflamação, estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático, hipóxia, fibrose, prejuízo na capacidade de expansão e angiogênese, e disfunção mitocondrial (Alcalá *et al.*, 2017). Embora o TAB possua poucas mitocôndrias, é necessário que essas mitocôndrias sejam

funcionais para gerar ATP suficiente para a diferenciação e função do adipócito, incluindo a síntese e secreção de adipocinas, lipogênese e lipólise (Boengler *et al.*, 2017; Koh *et al.*, 2007).

Vale destacar que mais do que a quantidade total de tecido adiposo, a forma como esse tecido se distribui no organismo, em particular o acúmulo de gordura intra-abdominal (visceral) e em tecidos não adiposos, como no músculo esquelético, hepatócitos e miócitos cardíacos (gordura ectópica), é um importante fator de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 e de doenças cardiovasculares na população geral (Boengler *et al.*, 2017; Castro *et al.*, 2014; Elffers *et al.*, 2017). A gordura visceral é mais metabolicamente ativa quando comparada a gordura subcutânea (Boengler *et al.*, 2017). Os adipócitos viscerais produzem mais citocinas inflamatórias enquanto que os adipócitos subcutâneos são as principais fontes de adiponectina e leptina (de Andrade, Bolsoni-Lopes e Alonso-Vale, 2016).

1.3.2 Tecido Adiposo Marrom

Diferentemente do TAB, indivíduos adultos possuem pequenas quantidades de TAM (aproximadamente 60g), que encontram-se localizadas principalmente nas regiões do pescoço, supraclavicular, interescapular, paravertebral, para-aórtica, suprarenal e do mediastino (Kajimura, 2017). A temperatura ambiente, idade, sexo e quantidade de gordura corporal influenciam a quantidade de TAM no organismo (Sampath *et al.*, 2016).

Os adipócitos marrons são caracterizados por possuírem múltiplos e pequenos vacúolos de gorduras e diversas mitocôndrias. O TAM apresenta como particularidade, e principal função, ser termogênico, ou seja, possui a capacidade de dissipar energia produzindo calor (Villarroya, Cereijo e Villarroya, 2013). Ele é considerado o principal tecido responsável pela termogênese adaptativa durante a exposição ao frio (na ausência de tremores) (Chondronikola *et al.*, 2016).

O potencial termogênico do TAM é conferido pela proteína mitocondrial desacopladora-1 (UCP1) presente em seus adipócitos marrons, que quando ativada provoca uma fuga de prótons H⁺ do espaço intermembrana até a matriz mitocondrial. Esse processo dissipa energia na forma de calor e desacopla a respiração da produção de ATP (Richard, 2011).

A regulação da atividade do TAM é dependente da estimulação adrenérgica dos adipócitos marrons. O TAM é innervado por ramos eferentes do sistema nervoso simpático (SNS) que alcançam os adipócitos marrons e liberam noradrenalina. A noradrenalina se liga ao receptor adrenérgico β_3 , que desencadeia uma série de eventos metabólicos levando a ativação da lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL), uma enzima lipolítica que aumenta a liberação de ácidos graxos. No TAM os ácidos graxos livres atuam como substratos para a β -oxidação e como estimuladores da atividade da UCP1 (Richard, 2011; Kajimura e Saito, 2014).

Embora o ácido graxo seja o principal substrato para a termogênese no TAM, a utilização de glicose também é aumentada com a ativação da UCP1, provavelmente para fornecer oxaloacetato, permitindo a rápida oxidação de ácidos graxos e acetil-CoA (Saito, Yoneshiro e Matsushita, 2016).

Cannon & Nedergaard (2004) sugerem que quando ativado, o TAM consome seus estoques intracelulares de energia e posteriormente, para manter a termogênese, utiliza os lipídios e glicose circulantes, exercendo assim, efeitos benéficos no metabolismo sistêmico (Cannon e Nedergaard, 2004).

Diversos sinais que recrutam e ativam o TAM (como exposição ao frio) induzem também o surgimento de células denominadas de beiges, ou “*brite*”, que exibem um fenótipo de adipócito marrom em depósitos de TAB. Esse processo é conhecido como “*browning*” e faz com que o adipócito beige compartilhe as propriedades termogênicas com o adipócito marrom clássico (Villarroya, Cereijo e Villarroya, 2013).

É importante observar que ambos tipos de adipócitos marrons (clássico e beige) expressam marcadores comuns de função termogênica e de diferenciação, como a UCP1 e PGC-1 α (Villarroya, Cereijo e Villarroya, 2013).

Evidências apontam que o papel fisiológico do TAM e sua associação com o metabolismo saudável parece não ser apenas pela sua capacidade de oxidação, mas também por meio da secreção de fatores, denominados de adipocinas marrons ou “*batokines*”, que exercem efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos, e parecem contribuir para um perfil metabólico saudável (Giralt, Domingo e Villarroya, 2011; Villarroya, Cereijo e Villarroya, 2013).

O potencial da atividade do TAM na proteção contra obesidade e síndrome metabólica tem sido reconhecido. Estudos indicam que em indivíduos saudáveis, o TAM associa-se inversamente com o IMC e gordura corporal (Lichtenbelt *et al.*,

2009; Virtanen *et al.*, 2009). A ativação prolongada do TAM (5-8 horas de exposição ao frio), em indivíduos cuja presença foi confirmada por meio de PET/CT, foi associada ao aumento no GER, melhora da homeostase de glicose, da sensibilidade à insulina, e do metabolismo lipídico, levando-o a ser considerado um alvo terapêutico promissor no combate da obesidade e distúrbios metabólicos relacionados (Saito e Yoneshiro, 2014, Chondronikola *et al.*, 2014, 2016; Cypess *et al.*, 2009).

O PET/CT é um exame que combina imagens obtidas de Tomografia por Emissão de Pósitrons e de Tomografia Computadorizada de raios X. É frequentemente utilizado para avaliar a presença e ativação do TAM nas regiões corporais onde espera-se encontrá-lo (como a região supraclavicular), por meio da captação de [18F] fluorodeoxiglicose (FDG), em respostas à exposição ao frio (Chen *et al.*, 2016).

1.4 HIV e a Terapia de Antirretroviral

A aids, ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, foi observada no início nos anos 80, e seu agente causador identificado em 1981, o HIV (sigla originada do inglês: *Human Immunodeficiency Vírus*, ou vírus da imunodeficiência humana) (Ministério da Saúde do Brasil, 2008). Atualmente, 37,9 milhões de pessoas vivem com o HIV no mundo todo (UNAIDS, 2019). No Brasil, de 2007 até junho de 2018, foram notificados 247.795 casos de infecção pelo HIV, sendo que só em 2017 foram registrados 37.791 novos casos de aids (Ministério da Saúde do Brasil, 2018).

A evolução natural da infecção causada pelo HIV é caracterizada pela replicação viral de forma intensa e contínua, resultando em destruição das células imunitárias, incluindo as células T-CD4+. A supressão dos linfócitos T4 ou T *helper* a valores abaixo de 200 céls/mm³ caracteriza um estágio final das reações imunossupressoras, que torna o organismo altamente suscetível ao desenvolvimento de neoplasias (como sarcoma de Kaposi e linfoma não Hodgkin) e infecções oportunistas (como pneumocistose, neurotoxoplasmose, tuberculose pulmonar atípica ou disseminada, meningite criptocócica e retinite por citomegalovírus), condições definidoras da aids (Young *et al.*, 2012; Ministério da Saúde, 2018).

No ano de 1996, houve a introdução da terapia antirretroviral combinada (TARV). A partir desse momento, foi possível suprimir a replicação do HIV, diminuindo a ocorrência de doenças oportunistas e aumentando, assim, a sobrevida e

a qualidade de vida dos pacientes soropositivos para HIV (Campos, Cesar e Guimaraes, 2009). A TARV permitiu que a infecção pelo HIV, que culturalmente era percebida como um prenúncio de morte, se tornasse uma doença com perspectiva de cronicidade, possibilitando mudanças de valores, crenças, hábitos e conhecimentos individuais (Schaurich, Coelho e Motta, 2006).

A TARV consiste em uma combinação terapêutica entre medicamentos ARV (antirretrovirais) de diferentes classes. No **quadro 1** são apresentados os medicamentos ARV licenciados pela *Food and Drug Administration* (FDA).

Quadro 1 - Medicamentos antirretrovirais

Inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e nucleotídeos (ITRN)	abacavir, emtricitabina, lamivudina, zidovudina e tenofovir
Inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos e nucleotídeos (ITRNN)	doravirina, efavirenz, nevirapina, etravirina, rilpivirine
Inibidores de protease (IP)	atazanavir, darunavir, fosamprenavir, ritonavir, tipranavir e saquinavir
Antagonista CCR5	maraviroc
Inibidores de integrase	raltegravir, dolutegravir
Inibidor de fusão	enfuvirtida

O objetivo principal da TARV é manter a carga viral suprimida pelo maior tempo possível e possibilitar concentrações mais elevadas de células T-CD4+. O risco para doenças oportunistas aumenta quando as concentrações de T-CD4+ estão baixas e as de carga viral estão altas. Pessoas vivendo com HIV (PVHIV), em uso da TARV, que mantêm contagens de T-CD4+ acima de 500 células/mm³ e carga viral indetectável (menor que 40 cópias/mm³) atingem expectativa de vida semelhante à da população geral (Ministério da Saúde do Brasil, 2008).

Devido aos seus benefícios na redução da morbimortalidade, a TARV está indicada para todas as PVHIV, independente do seu estágio clínico e/ou imunológico. A recomendação de início precoce da TARV também contribui para a diminuição da transmissão da infecção e impacta na redução da tuberculose (principal causa infecciosa de óbitos em PVHIV no Brasil e no mundo). Desde 1996, os medicamentos que compõem a TARV são distribuídos pelo Sistema Único de Saúde no Brasil, garantindo o acesso ao tratamento gratuito para toda população brasileira (Ministério da Saúde do Brasil, 2018).

1.5 Síndrome da Lipodistrofia do HIV:

Apesar dos seus benefícios e eficácia, a interação entre TARV com a própria infecção e inflamação causadas pelo HIV, está associada a efeitos tóxicos secundários que incluem alterações metabólicas sistêmicas e alterações na distribuição de tecido adiposo (lipodistrofia), que podem ou não ocorrer concomitantemente. O conjunto destas alterações é denominado de Síndrome da Lipodistrofia do HIV (SLHIV) (Sweeney, Brennan e Mantzoros, 2007).

Dentre as alterações metabólicas observadas em PVHIV, em uso da TARV, incluem-se a resistência à insulina, diabetes tipo 2, dislipidemias, hipertensão, disfunção endotelial e produção alterada de citocinas e adipocinas (Giralt, Domingo e Villarroya, 2011; Srinivasa e Grinspoon, 2014). Essas alterações são semelhantes as que ocorrem na síndrome metabólica, aumentando assim, o risco cardíaco nesses pacientes (Bedimo, 2008). As doenças cardiovasculares representam hoje uma das principais causas de morte não relacionadas ao HIV nessa população (Fitch e Grinspoon, 2011).

Diferente do que se observava nos anos que antecederam a terapia antirretroviral combinada, em que os portadores de HIV apresentavam perda de peso, de gordura corporal generalizada e de massa muscular (*HIV wasting syndrome*), atualmente a maioria dos pacientes soropositivos para HIV, em uso da TARV, apresenta-se eutrófico ou com excesso de peso, com manutenção da massa muscular, porém com alterações graves relacionadas a distribuição do tecido adiposo (Carr *et al.*, 2003; Grufeld, *et al.*, 2008; Bedino, 2008). A redistribuição anormal de gordura corporal é descrita como ponto central da SLHIV, e inclui a lipoatrofia e a lipoipertrofia (Carr *et al.*, 2003).

A lipoatrofia (LA) é caracterizada pela perda de gordura subcutânea, principalmente em face, nádegas, braços e pernas, o que torna as veias e os músculos mais proeminentes. Já na lipoipertrofia (LH) ocorre acúmulo de tecido adiposo visceral e lipomatoso na região dorsocervical (“giba de búfalo”), nas mamas e nas áreas supra-púbica, sob a axila e anterior do pescoço (Bedimo, 2008; Giralt, Domingo e Villarroya, 2011).

Estudos apontam que a LA e LH são alterações que se distinguem etiológica e patologicamente e que, portanto, o risco e o desenvolvimento das alterações na composição de gordura corporal durante o curso da terapia será afetado pelo IMC e perfil metabólico do paciente no início da doença, estágio da infecção pelo HIV e perfil imunológico, estilo de vida, além do tipo e duração das TARV anteriores ou em curso (Bedimo, 2008; Finkelstein *et al.*, 2015).

A patogênese da SLHIV ainda não está claramente elucidada. No entanto, a disfunção do tecido adiposo parece ser o mecanismo-chave das alterações metabólicas e da composição corporal (Giralt, Domingo e Villarroya, 2011). Entre os antirretrovirais, os pertencentes às classes dos IP e ITRN, são os mais associados com as alterações na função e biologia do tecido adiposo (Finkelstein *et al.*, 2015; Giralt *et al.*, 2010). Os IPs estão ligados à toxicidade dos adipócitos, inibindo sua diferenciação e regulando negativamente fatores de transcrição relacionados à adipogênese. Estudos realizados a partir de biópsia de tecido adiposo de PVHIV têm demonstrado alteração na expressão de *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma* (PPAR γ), o principal regulador da diferenciação de adipócitos (Vidal *et al.*, 2012). Os IPs também estão ligados à redução do acúmulo de lipídios e aumento da apoptose nos adipócitos e indução de resistência à insulina. Já os ITRN estão ligados à inibição da transcrição do RNA mitocondrial, depleção do DNA mitocondrial (mtDNA) e disfunção da organela, via inibição da DNA polimerase γ , sendo, provavelmente, um dos principais contribuintes no desenvolvimento da LA (Finkelstein *et al.*, 2015).

É importante destacar que, independente do uso de TARV, a própria infecção pelo HIV pode contribuir para o desenvolvimento da lipodistrofia. O HIV age no tecido adiposo, promovendo ativação imune e inflamação crônica, por meio da infiltração de macrófagos no tecido, bem como secreção de adipocinas e citocinas. Esses efeitos indiretos do HIV contribuem para a redução do conteúdo mitocondrial e disfunção mitocondrial no tecido adiposo (Garrahou *et al.*, 2011). A disfunção adiposa, mesmo na ausência de lipodistrofia evidente, provoca fenômenos de lipotoxicidade, que resultam em dislipidemia, esteatose hepática e resistência à insulina, contribuindo de uma forma muito importante no desenvolvimento das alterações metabólicas sistêmicas observadas nos pacientes com HIV (Giralt *et al.*, 2010; Giralt, Domingo e Villarroya, 2011).

1.6 Tecido Adiposo e Metabolismo Energético em Pessoas Vivendo com HIV

Conforme descrito anteriormente o tecido adiposo é um órgão alvo dos efeitos deletérios resultantes da infecção pelo HIV, das citocinas pró-inflamatórias induzidas localmente e pelos múltiplos fármacos da TARV.

Estudos apontam que as alterações moleculares no tecido adiposo parecem se distinguir entre os diferentes depósitos de gordura corporal, apontando que o tecido adiposo visceral ou lipomatoso, são afetados inclusive de maneira oposta ao lipoatrófico (Gallego-Escuredo *et al.*, 2013; Guallar *et al.*, 2008; Kannisto *et al.*, 2003). Adicionalmente, a infecção pelo HIV, a inflamação crônica e o uso da TARV, parecem afetar o TAM e o processo de *browning* em PVHIV (Cereijo *et al.*, 2015), podendo ser mecanismos responsáveis pelo aumento do GER observado em PVHIV com lipodistrofia.

Batterham (2005), em um estudo de revisão sistemática, destacou que indivíduos portadores de HIV teriam um aumento de 9% no GER quando comparados a indivíduos saudáveis. Outros estudos têm mostrado associação entre o GER e as alterações na distribuição de gordura corporal em PVHIV (Kominski *et al.*, 2001; Vassimon *et al.*, 2012). Alguns autores relatam que o hipermetabolismo em pacientes com lipodistrofia poderia ser justificado por uma termogênese adaptativa, uma vez que a perda de gordura subcutânea reduz a capacidade de armazenar o substrato triglicérido de maneira normal. Além disso, as baixas concentrações de leptina e adiponectina observadas nesses pacientes também favoreceriam o acúmulo de lipídios em tecidos não adiposos como músculos e fígado. Assim, o maior gasto energético em PVHIV com lipodistrofia, seria uma forma de dissipar calorías que já não podem ser normalmente armazenadas no TAB (Kosmiski *et al.*, 2007; Kosmiski *et al.*, 2009, Kosmiski *et al.*, 2011), apontando deste modo, uma possível influência do TAM no metabolismo energético de PVHIV com lipodistrofia.

Estudos que tem avaliado a presença de TAM em PVHIV com lipodistrofia e sua influência no metabolismo energético têm apresentado resultados controversos. Enquanto uns apontam que a gordura dorsocervical (“giba de búfalo”), em pessoas com lipohipertrofia, apresenta um fenótipo de gordura marrom relacionado à linhagem de células adiposas marrons clássicas (Cereijo *et al.*, 2015; Rodriguez De La Concepcion *et al.*, 2004), outros demonstram redução significativa de mtDNA mitocondrial apontando que esse depósito de gordura não parece ser TAM, embora

apresente-se menos inflamada (quando comparada à gordura subcutânea abdominal) (Sevastianova *et al.*, 2011), e apresente aumento da expressão de *DIO2*, uma deidodinase que converte T4 (tiroxina) em sua forma ativa T3 (tri-iodotironina) e contribui para ativação de UCP1 e termogênese no TAM (Torriani *et al.*, 2012).

Alguns estudos tem utilizado o PET/CT para a avaliação da atividade de tecido adiposo marrom em PVHIV com lipodistrofia e não tem observado maior captação da [18F] fluorodeoxiglicose nesses indivíduos (Torriani *et al.*, 2012; Kosmiski *et al.*, 2011), sugerindo que o hipermetabolismo observado nesses pacientes é decorrente da termogênese adaptativa de outros tecidos e não do TAM (Kosmiski *et al.*, 2011).

Mori *et al.*, em um estudo experimental, observou que camundongos *knockout* para *dicer* específica para tecido adiposo, desenvolveram alterações metabólicas, acúmulo de gordura na região dorsocervical e perda de gordura subcutânea, características semelhantes a SLHIV. Além disso, os autores observaram aumento do “branqueamento” do TAM nesses camundongos, que aumentaram os tremores durante a exposição ao frio como uma forma adaptativa para manter a temperatura corporal, os quais contribuem com o aumento do gasto de energia.

A enzima *dicer* é um componente crítico na via dos micro RNAs (miRNAs), que são importantes reguladores do desenvolvimento e função de adipócitos em condições fisiológicas e patológicas. Os miRNAs tem uma importante relação com a manutenção das características do adipócito marrom (Xu e Sun, 2015). Biópsias de tecido adiposo subcutâneo dorsocervical e abdominal de PVHIV com lipodistrofia apresentaram redução na expressão *DICER* (Mori *et al.*, 2014).

Estudos têm direcionado esforços no entendimento das disfunções adiposas em PVHIV com lipodistrofia, no entanto, os resultados ainda são confusos e permanece a dúvida se as alterações no tecido adiposo subcutâneo, incluindo o TAM, contribuem para o aumento do metabolismo energético nesses indivíduos. Até o nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou amostras de tecido adiposo supraclavicular de PVHIV, uma região onde estudos tem evidenciado presença de TAM em indivíduos saudáveis (Virtanen *et al.*, 2009).

A compreensão sobre as alterações no tecido adiposo subcutâneo e no metabolismo energético de PVHA, com lipodistrofia, poderá contribuir para auxiliar na prevenção e tratamento das alterações metabólicas e morfológicas observadas nesses pacientes.

2 Hipótese:

Pessoas vivendo com HIV, em uso da TARV, com lipodistrofia, apresentam disfunções no tecido adiposo subcutâneo que contribuem com o aumento de seu metabolismo energético.

3 Objetivos:

3.1 Geral:

Avaliar o tecido adiposo subcutâneo supraclavicular posterior e sua associação com o metabolismo energético de pessoas vivendo com HIV, em uso da TARV, com lipodistrofia.

3.2 Específicos:

- ✓ Avaliar o gasto energético de repouso em pessoas vivendo com HIV.
- ✓ Avaliar a densidade mitocondrial e o metabolismo mitocondrial do tecido adiposo subcutâneo supraclavicular posterior de pessoas vivendo com HIV e correlacioná-los com o gasto energético de repouso.
- ✓ Avaliar a expressão do RNAm de marcadores de tecido adiposo marrom/bege, de adipogênese, de biogênese mitocondrial, de adiponectina, DICER e DIO2 no tecido adiposo subcutâneo supraclavicular posterior, e correlaciona-los com o gasto energético de repouso em pessoas vivendo com HIV.

4 Casuísticas e Métodos:

O estudo caracteriza-se como analítico observacional, do tipo caso-controle, transversal. Ele está registrado na plataforma do Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) sob o numero RBR-4zrmm4 (**ANEXO 1**). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP) sob o número CAAE 57946316.9.0000.5440 (**ANEXO 2**), e todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**ANEXO 3**).

4.1 Grupos de estudo

Para o cálculo da amostra a ser estudada foram utilizadas as médias e desvios-padrão obtidos de estudos prévios que avaliaram o GER ajustado para a MLG em PVHA com lipodistrofia (Vassimon *et al.*, 2012). Para a variância σ^2 foi utilizada a maior variância encontrada entre os grupos para cada variável. Foi adotado um nível de significância de 0,05 e poder de teste estatístico de 0,8 o que resultou em um total de 33 indivíduos.

A amostra foi dividida em 3 grupos de estudo:

- 1- Grupo HIV+LIPO+: 12 indivíduos soropositivos para HIV com o diagnóstico de lipodistrofia.
- 2- Grupo HIV+: 10 indivíduos soropositivos para HIV sem o diagnóstico de lipodistrofia;
- 3- Grupo CTRL: 11 indivíduos soronegativos para HIV.

4.2 Seleção dos Voluntários

A seleção dos voluntários ocorreu durante todo o ano de 2016. Para a seleção, inicialmente houve revisão de 332 prontuários de pacientes soropositivos para HIV que frequentam os ambulatórios da Unidade Especializada em Terapia de Doenças Infectocontagiosas (UETDI) do HC-FMRP.

Os indivíduos soronegativos para HIV (grupo controle) foram convidados a participar do estudo por meio de cartazes expostos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Os critérios de inclusão para participar do estudo foram: sexo masculino; idade entre 18 e 60 anos; peso estável há 3 meses e índice de massa corporal (IMC) entre 18 a 35 kg/m². Os pacientes soropositivos para HIV deveriam estar em uso de terapia antirretroviral há no mínimo 6 meses, apresentar contagem de células T-CD4 maior que 200 células/mm³ e carga viral indetectável (< 40 cópias/ml). Os critérios de exclusão foram: alteração da função tireoidiana, infecção pelo vírus da hepatite B e C, uso de glicocorticoides nos últimos 6 meses, uso de medicamentos hipolipemiantes, anti-diabéticos orais ou insulina, beta-bloqueadores e benzodiazepínicos. Os pacientes soropositivos para HIV que apresentarem sinais ou sintomas de doenças oportunistas também foram excluídos.

Foram convidados a participar do estudo 87 pessoas que se enquadravam nos critérios do estudo. Cinquenta e quatro pacientes se recusaram a participar do estudo ou não compareceram na data e hora marcada para esclarecimentos sobre a pesquisa. Assim, participaram deste estudo 33 voluntários, que receberam esclarecimentos sobre os objetivos e sobre a metodologia do projeto (**Figura 1**). Após a assinatura do TCLE, iniciou-se a coleta de dados.

Figura 1: Fluxograma do recrutamento dos indivíduos participantes do estudo.

4.3 Protocolo experimental

A coleta dos dados ocorreu entre os meses de março e julho de 2017.

Todas as avaliações de cada paciente foram realizadas em um único dia. Os participantes foram orientados a chegar ao HC-FMRP às 7:00 horas, após jejum noturno de 12 horas para a realização dos exames na seguinte sequência (**Figura 2**):

- Antropometria e calorimetria indireta;
- Dupla emissão de raios-X (DEXA);
- Exposição durante 1 hora em sala com temperatura entre 18-22°C, vestindo roupas leves. Durante esse período ocorreu a aplicação do Protocolo de Pesquisa (**ANEXO 4**) e do Questionário de Atividade Física (**ANEXO 5**);
- Tomografia computadorizada;
- Biópsia de tecido adiposo;
- Coleta de sangue;

Figura 2: Fluxograma do protocolo de pesquisa do estudo.

4.4 Avaliação Clínica

Todos os voluntários soropositivos para HIV foram avaliados por um dos médicos infectologistas da UETDI do HC-FMRP de acordo com o protocolo de

avaliação clínica padrão do serviço, composto por anamnese, exame físico e avaliação bioquímica.

A história clínica dos participantes do estudo, dos últimos 12 meses, foi coletada por revisão dos prontuários. Os participantes foram aconselhados a notificar a coordenadora do estudo se houvesse alguma alteração na medicação ou estado de saúde no dia da pesquisa.

Para o diagnóstico de lipodistrofia, foi realizada a avaliação subjetiva, que consiste na inspeção visual do pesquisador sobre alterações na composição de gordura corporal seguida da concordância do paciente sobre tais alterações. Nesta avaliação é fundamental que em pelo menos um local seja detectada a lipoatrofia acompanhada ou não de lipoipertrofia (Sutinen e Yki-Jarvinen, 2007).

Os indivíduos soronegativos para HIV foram questionados sobre sua história clínica e uso de medicamentos.

4.5 Avaliação nutricional e da atividade física

Na antropometria foram mensurados o peso, altura, circunferência do braço (CB) e circunferência abdominal (CA). O IMC foi calculado a partir fórmula Peso/Estatura^2 , resultando em um valor expresso em kg/m^2 (Duarte, 2002).

O peso corporal, em kg, foi aferido em balança eletrônica Filizola® do tipo plataforma, com capacidade máxima de 300 kg e precisão de 0,1kg, e a estatura, em estadiômetro com precisão de 0,1 cm, estando o indivíduo descalço, com braços estendidos ao longo do corpo e calcanhares juntos, tocando a haste vertical e posicionados no centro do equipamento (Duarte, 2002).

A CB e a CA foram aferidas com auxílio de uma fita métrica não extensível, com o indivíduo em pé. Para a mensuração da circunferência da cintura foi utilizado o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca do paciente, e a circunferência de braço foi obtida no ponto médio entre o acrônio e o olecrano (Kamimura *et al.*, 2006).

A atividade física foi avaliada utilizando o questionário Baecke, que por meio de escalas quantitativas e qualitativas, avalia a magnitude da atividade física habitual dos últimos 12 meses (Baecke, Burema e Frijters, 1982). O questionário consiste de perguntas, de fácil compreensão, envolvendo três escores de atividade física (ANEXO 5).

- 1) AFO: atividade física ocupacional;
- 2) EFL: exercício físico no lazer;
- 3) AFLL: atividade física de lazer e atividades de locomoção.

O escore total da atividade física habitual é obtido pela soma dos escores de atividade física ocupacional + exercício físico no lazer + atividade física de lazer e locomoção.

Este questionário foi validado para população brasileira soropositiva para HIV (Florindo *et al.*, 2006).

4.6 Avaliação da composição corporal e confirmação da lipodistrofia

A composição corporal foi avaliada DEXA na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do HC-FMRP. Foi utilizado um modelo de equipamento Hologic (Discovery Wi, QDR[®] series, Waltham, MA, USA), operado por um técnico treinado, seguindo rigorosamente os procedimentos padrão. Os voluntários foram posicionados em decúbito dorsal e foram orientados a permanecerem imóveis durante a avaliação. Foram coletados dados sobre a quantidade de massa magra e de gordura corporal no corpo todo e separadas por membros (inferior e superior).

4.7 Avaliação Bioquímica

Foram coletadas amostras de sangue periférico após jejum noturno de 12 horas. A coleta foi feita na UPC do HC-FMRP. Após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas em aparelho de centrífuga Universal 320R Hettich[®] por 10 minutos, à 23°C e a 3500 rotações/minutos (rpm). O soro obtido foi armazenado em freezer a -70°C até o momento das análises.

Foram realizadas avaliações bioquímicas de adipocinas e citocinas, do metabolismo lipídico e da glicose e da função tireoidiana.

As quantificações de adiponectina, leptina, *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) foram realizadas por meio do método imunométrico por luminescência utilizando-se o sistema Milliplex (Millipore[®]).

Para análise do metabolismo da glicose foram quantificadas as concentrações de glicose, pelo método colorimétrico (Labtest[®]), e insulina, pelo método imunométrico (IMMULITE 1000, Siemens[®]). Para o metabolismo lipídico foram

quantificados o colesterol total (CT), HDL-C e triglicerídeos (TG), pelo método colorimétrico (Labtest®), e a concentração de LDL-C, que foi calculada utilizando-se a fórmula de Friedewald (Friedewald, Levy e Fredrickson, 1972).

As concentrações do hormônio tireoestimulante (TSH) foram determinadas por método imunométrico (IMMULITE 1000, Siemens®).

4.8 Avaliação do gasto energético de repouso

A avaliação do GER foi feita por meio da calorimetria indireta (ParvoMedics TrueOne 2400, EUA), na Unidade Metabólica do HC-FMRP. Cada voluntário foi avaliado após jejum noturno, repousando na posição supina, com um “canopy” transparente cobrindo a cabeça e o tórax. O VO_2 e o VCO_2 foram quantificados durante 30 minutos, em uma sala com temperatura constante (23 – 25°C). As medidas obtidas nos 5 primeiros minutos foram excluídas, para garantir que o participante atingisse um estado estacionário.

A partir dos dados de VO_2 e VCO_2 , a formula de Weir (1949) foi utilizada para cálculo do GER e as fórmulas de Frayn (1983) para cálculo das taxas de oxidação de carboidratos e gorduras, conforme descritas abaixo:

- $\text{GER (kcal/dia)} = (3,9 \times \text{VO}_2 + 1,1 \times \text{VCO}_2) \times 1.440,$
- $\text{Taxa de oxidação de lipídeos (g/dia)} = (1,695 \times \text{VO}_2 + 1,701 \times \text{VCO}_2) \times 1.440,$
- $\text{Taxa de oxidação de carboidratos (g/dia)} = (4,585 \times \text{VCO}_2 + 3,226 \times \text{VO}_2) \times 1.440,$

sendo;

- VO_2 em ml/min;
- VCO_2 em ml/min;
- 1.440 número de minutos em um dia.

4.9 Identificação do tecido adiposo

A identificação do tecido adiposo marrom foi realizada por meio de imagem de tomografia computadorizada da região do tórax, realizada no Centro de Ciências da Imagens e Física Medica da FMRP, seguindo a metodologia proposta por Ahmadi *et al.* (2013).

Previamente à realização do exame, os indivíduos permaneceram em uma sala com temperatura entre 18 e 22°C, durante 1 hora, com a finalidade de ativar o TAM para que o mesmo pudesse ser identificado no exame. A imagem gerada ao nível do processo espinhoso da vértebra C7, a aproximadamente 6-7 cm, do lado esquerdo de cada voluntario foi analisada e o TAM foi identificado quando as unidades Hounsfield (HU) estiveram entre -10 a -87 (Ahmadi *et al.*, 2013).

4.10 Biópsia do tecido adiposo

Após a realização da tomografia computadorizada e identificação do TAM, foram coletadas amostras de tecido adiposo subcutâneo localizadas na região supraclavicular posterior, do lado esquerdo de cada voluntario (6-7 cm do processo espinhoso da C7). As biópsias foram realizadas por uma médica radiologista, utilizando-se agulhas de 14G acoplada à pistola ProMag ultra (*core biopsy*). O procedimento foi realizado após aplicação de anestesia local (xylocaina 2% sem vasoconstrictor) e foi guiado por ultrassonografia.

Uma parte da amostra foi congelada imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente armazenada a -70 °C. Outra parte da amostra foi imediatamente encaminhada para avaliação mitocondrial.

4.11 Análise do metabolismo e densidade mitocondrial

As análises do metabolismo e da densidade mitocondrial do tecido adiposo coletado (aproximadamente 50 mg) foram realizadas no laboratório de Metabolismo Mitocondrial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

As amostras de tecido adiposo foram homogeneizadas em 1 mL de solução tampão para manutenção da viabilidade das células do tecido (BIOPS, 2,77 mM Ca²⁺-EGTA, 7.23 mM EGTA, 6.56 mM MgCl₂.6H₂O, 20 mM taurina, 15 mM fosfocreatina, 20 mM imidazol, 0.5 mM ditioneitol (DTT), 50 mM 2- [N-morfolino]-ácido etanossulfônico (KMES) and 5.77 mM ATP) mais 1 mg.mL⁻¹ de saponina durante 10 minutos à 100 rpm. Posteriormente, as amostras foram adicionadas a 2 mL

da solução tampão de respiração MiR05 (20 mM HEPES, 10 mM KH₂PO₄, 110 mM sacarose, 20 mM taurina, 60 mM K-lactobionato, 0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂ e 1 g/L de BSA livre de ácidos graxos, pH 7,1) a 37°C e 900 rpm. O consumo de oxigênio foi monitorado utilizando um respirômetro de alta resolução (OROBOROS Oxygraph®) equipado com o software DatLab (OROBOROS, Innsbruck, Austria) para a aquisição (2 segundos de intervalo) e análise dos dados .

A respiração tecidual foi determinada na ausência (Estado *R* ou *Routine*) e na presença (Estado *netR* ou *netRoutine*) de substratos (1.5mM piruvato, 0.28mM malato e 1.3mM glutamato) (**Figura 3**). Adicionalmente, outros estados mitocondriais foram verificados, como:

- Estado de fosforilação (Estado *P* ou *Phosphorylation*), estabelecido pela adição de 240μM ADP;
- Estado de repouso (Estado *L* ou *Leak*), estabelecido pela adição 0,5μg/mL oligomicina;
- Estado desacoplado (Estado *E* ou *Uncoupled*), estabelecido pela adição de 0,25μM (titulação) até 2,5μM de cianeto de carbonilo m-clorofenil-hidrazona (CCCP).

Para a inibição da respiração mitocondrial e avaliação do consumo de oxigênio não relatado na cadeia de transporte de elétrons (Estado *Rox*), foram adicionados 0,625μg/mL de Antimicina A. Os valores do Estado *Rox* foram subtraído das taxas em outros estados respiratórios (Baggio *et al.*, 2014).

As taxas respiratórias foram normalizadas com a concentração de proteína determinadas por método de Bradford (1976), realizado posteriormente.

A densidade mitocondrial foi avaliada por meio da atividade da citrato sintase (CS) (Sigma®).

A atividade da CS foi mensurada nas amostras após a análise do consumo de oxigênio. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas com tampão Trietanolamina-Hcl (0.1 M) pH 8,0, para promover a ruptura das membranas mitocondriais. As amostras homogeneizadas foram então centrifugadas a 12.000 xg durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e a concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976). A atividade da CS foi mensurada por espectrofotometria de acordo com Srere (1969), utilizando o equipamento Cary 50MPR Varian Espectrofotometro (Varian Ltd.®, Melbourne, Australia). Cada amostra foi analisada em triplicata e os valores de absorbância foram expressos

normalizados pela quantidade total de proteína na amostra. A atividade da CS ($\mu\text{mol/ml/min}$) foi calculada seguindo a seguinte formula:

$$\text{Citrato Sintase } (\mu\text{mol/ml / min}) = \left(\frac{\Delta A_{412}}{\text{min}} \right) \times \left(\frac{V}{\epsilon^{\text{mM}}} \right) \times L$$

sendo,

- A412: absorbância do TNB em 412 nm;
- V: volume (ml) da reação;
- ϵ^{mM} : coeficiente equimolar do TNB, o qual é 13,6 mM-1cm-1
- L: distância (cm) para mensuração da absorbância.

Figura 3. Avaliação do consumo de oxigênio, em cada estado da respiração, após adição de substratos.

4.12 Análise de expressão gênica

O RNA total das amostras de tecido adiposo foi extraído por meio do TRIzol[®] Reagent (Invitrogen), segundo protocolo do fabricante.

A quantificação do RNA foi realizada por espectrofotometria e o cálculo da razão entre a densidade ótica em 260 e 280 nm foi utilizado para estimar o grau de pureza do RNA total extraído (1,8 +/- 0,2).

A transcrição reversa foi realizada a partir de 500 ng de RNA com o uso da enzima *MultiScribe™* e kit *High capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), segundo protocolo do fabricante. O cDNA foi diluído (1:5) para utilização nos ensaios de PCR quantitativa em tempo-real (qPCR) que foram realizadas em aparelho 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). As reações foram feitas em duplicatas utilizando ensaios TaqMan™ específicos para cada gene-alvo e controle endógeno. Os valores de *cycle threshold* (Ct) foram analisados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001), que permitiu obter o valor que revela o número de vezes que o gene avaliado está mais ou menos expresso nos grupos avaliados em comparação ao grupo controle. Os genes analisados estão descritos na **Quadro 2**. A expressão do mRNA do gene *RPLO* (*ribosomal protein lateral stalk subunit P0*) foi usada como controle endógeno.

Quadro 2. Genes analisados nas amostras de tecido adiposo subcutâneo

Marcador de tecido adiposo marrom	
<i>UCP-1</i> Proteína desacopladora 1	Proteína responsável pela termogênese em adipócitos marrons/beges.
Marcadores Mitocondriais	
<i>PGC1α</i> <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α</i>	Coativador transcricional envolvido na biogênese mitocondrial.
<i>COX4I</i> Subunidade 4 da Citocromo C Oxidase	Membro da cadeia respiratória mitocondrial codificada pelo DNA nuclear.
Marcadores de adipogênese e função do adipócito	
<i>PPARγ</i> <i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i>	Principal regulador da diferenciação do adipócito
<i>ADIPOQ</i> Adiponectina	Adipocina com efeitos antidiabéticos, anti-inflamatórios, antiaterogênicos e cardioprotetores
<i>DICER</i>	Biogênese dos mRNA, importantes para diferenciação e função de adipócitos marrons e brancos.
Outros marcadores	
<i>DIO2</i> <i>deiodinase 2</i>	Conversor de T4 em sua forma ativa T3 e facilitador da ativação de UCP1 e termogênese no TAM

4.13 Análise Estatística

Inicialmente, para as variáveis numéricas, foi verificado a hipótese das mesmas possuírem ou não distribuição normal dentro de cada grupo pelo teste de Shapiro-Wilks. Para as que não rejeitaram a hipótese em nenhum grupo foi aplicado o método da Análise de Variância (ANOVA) e quando houve diferença significativa utilizou-se o teste *post hoc* de Bonferroni. Para as que rejeitaram em ao menos um grupo foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e quando houve diferença significativa foi aplicado o teste *post hoc* de Dunn. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão, ou mediana, erro padrão, mínimo e máximo.

Para as variáveis categóricas aplicou-se o teste exato do χ^2 , e os resultados foram apresentados em frequências e percentuais das mesmas.

Para verificar a correlação entre o GER e as variáveis de interesse foi aplicado o teste de correlação de *Spearman*. Para as variáveis que apresentaram correlações com o GER foi aplicado a análise de regressão linear, para verificar a influência desta variável no GER.

Para as análises estatísticas utilizou-se os programas estatísticos SPSS 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e o GraphPad Prism 6 (GraphPad Software), sendo considerado significativo o valor de $p < 0,05$.

5 Resultados:

Foram avaliados 33 homens adultos. A média de idade dos participantes foi igual a $47,5 \pm 6,5$ anos, sendo que não houve diferença significativa entre os grupos. Também não foram encontradas diferenças significativas nos escores de atividade física ocupacional, de lazer e locomoção, total e no escore de exercício físico de lazer entre os grupos, bem como na densidade de tecido adiposo da região supraclavicular. Sessenta e sete por cento do grupo HIV+LIPO+, 60% do grupo HIV+, e 64% do grupo CTRL apresentaram densidade de tecido adiposo entre -10 a -87 HU, indicando a presença de tecido adiposo marrom (**Tabela 1**).

Tabela 1. Características gerais, escores de atividades físicas, e densidade do tecido adiposo de acordo com os grupos de estudo.

	HIV+LIPO+	HIV+	CTRL	P valor
Idade (anos)	$49,4 \pm 6,7$	$45,0 \pm 6,2$	$47,5 \pm 6,3$	0,289
Tempo de HIV (anos)	$11,9 \pm 5,7^*$	$6,8 \pm 4,3^*$	NA	0,034
Tempo de TARV (anos)	$9,5 \pm 4,2$	$6,6 \pm 4,2$	NA	0,129
T-CD4 (cells/mm ³)	752 ± 212	670 ± 233	NA	0,395
CV <40 cópias/ml (%)	100	100	NA	-
<u>Esquema atual TARV</u>				
ITRN + ITRNN (%)	41,6	20	NA	
ITRN + IP (%)	58,3	70	NA	0,346
ITRN + IP + INI (%)	0	10	NA	
Escore de AF Ocupacional	$2,6 \pm 0,6$	$2,7 \pm 0,7$	$2,5 \pm 0,7$	0,825
Escore de Exercício Físico de Lazer	$2,1 \pm 1,0$	$2,0 \pm 1,0$	$2,6 \pm 0,9$	0,395
Escore de AF Lazer e Locomoção	$2,6 \pm 0,7$	$2,6 \pm 0,8$	$2,7 \pm 0,8$	0,930
Escore de Total AF	$7,3 \pm 1,8$	$7,4 \pm 2,1$	$7,8 \pm 1,5$	0,789
Densidade de tecido adiposo (HU)	$-79,9 \pm 16,0$	$-79,9 \pm 16,2$	$-86,0 \pm 13,7$	0,567

Nota: Teste ANOVA. Exceto para Tempo de HIV, Tempo de TARV, e CD4+, Teste t, e para Esquema atual de TARV teste exato do χ^2 . Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão ou em porcentagem (%). * $p < 0,05$. AF, atividade física; CV, Carga Viral; ITRN, Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos; ITRNN, Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogo de Nucleosídeos; IP, Inibidores de Protease; INI, Inibidores da Integrase; TARV; Terapia Antirretroviral.

Em relação as características clínicas dos pacientes soropositivos para HIV, todos estavam clinicamente estáveis, com carga viral indetectável e média de contagem de linfócitos T-CD4+ adequada. Todos os indivíduos faziam uso de medicamentos da classe dos ITRN, e a maioria (63,6%) fazia o uso desses medicamentos associado com medicamentos da classe dos IP. Não houve diferença significativa no esquema atual de uso dos antirretrovirais, tempo total de uso da TARV e valores de T-CD4+ entre os grupos soropositivos para HIV. O grupo HIV+LIPO+ apresentou maior tempo desde o diagnóstico de infecção pelo HIV, quando comparado ao grupo HIV+ (**Tabela 1**).

Na **tabela 2** estão apresentados os resultados da antropometria e composição corporal. Não foram encontradas diferenças significativas no peso, IMC, circunferência do braço, circunferência abdominal, massa magra (kg), e na porcentagem de gordura dos braços e total entre os grupos. O grupo HIV+LIPO+ apresentou menor porcentagem de gordura nas pernas, quando comparado com o grupo controle ($p<0,03$), o que é indicativo de lipoatrofia nos membros inferiores. Foi observado uma tendência do grupo HIV+ apresentar menor % de gordura nos braços ($p=0,052$) e no tronco ($p=0,07$) quando comparado ao grupo controle, sugerindo que esse grupo era composto por indivíduos mais magros que os indivíduos do grupo CTRL. Quarenta e um por cento do grupo HIV+LIPO+, 40% do grupo HIV+, e 81% do grupo CTRL possuíam porcentagem de gordura corporal acima de 25%, o que é considerado elevado para homens e está associada a um maior risco de doenças

Tabela 2. Antropometria e composição corporal de acordo com os grupos de estudo

	HIV+LIPO+	HIV+	CTRL	P valor
Peso (kg)	75,4 ± 15,8	70,5 ± 7,0	80,4 ± 11,6	0,176
IMC (kg/m ²)	25,0 ± 4,1	23,2 ± 2,0	26,1 ± 3,0	0,105
Massa Livre de Gordura (kg)	55,0 ± 6,5	52,0 ± 5,2	54,1 ± 8,2	0,675
Gordura Corporal Total (%)	21,5 ± 10,1	21,7 ± 8,6	28,2 ± 6,8	0,104
Gordura do braço (%)	14,7 ± 9,0	13,4 ± 6,6	20,6 ± 5,3	0,052
Gordura da perna (%)	15,9 ± 9,4*	22,0 ± 7,0	24,7 ± 5,8*	0,029
Gordura do tronco (%)	27,0 ± 11,7	23,2 ± 10,7	33,7 ± 8,5	0,073
Circunferência da cintura (cm)	92,2 ± 12,6	85,3 ± 7,0	95,4 ± 8,9	0,091
Circunferência do braço (cm)	30,3 ± 3,3	29,6 ± 2,9	31,1 ± 1,8	0,485

Nota: Teste de ANOVA. Valores expressos em media ± desvio padrão. * $p<0,03$. IMC, Índice de Massa Corporal.

associadas à obesidade (Lohamn *et al.*, 1998). Embora o grupo CTRL apresentasse o dobro de indivíduos com elevada % de gordura corporal, quando comparado aos demais grupos, os resultados não alcançaram significância estatística ($p=0,08$).

Em relação às variáveis bioquímicas (**tabela 3**), não houve diferenças significativas nos valores de TSH, glicemia, colesterol total, HDL-C e triglicérides entre os grupos. O grupo HIV+ apresentou concentrações mais baixas de LDL-C ($p<0,02$), e uma tendência a apresentar menores concentrações de colesterol total ($p=0,052$), quando comparado ao grupo controle. Trinta e seis por cento do grupo CTRL e 17% do grupo HIV+LIPO+ apresentaram valores de LDL acima de 160 mg/dL. Um indivíduo de cada grupo apresentou concentrações de triglicérides maiores que 200 mg/dL. Todos os indivíduos apresentaram valores de TSH dentro da faixa de normalidade. Não foram encontradas diferenças, entre os grupos, nos valores de insulina, leptina, adiponectina, e de MCP-1 e TNF α .

Tabela 3. Parâmetros Bioquímicos de acordo com os grupos de estudo

	HIV+LIPO+	HIV+	CTRL	P valor
Triglicérides (mg/dL)	122 $\pm$ 62	93 $\pm$ 44	117 $\pm$ 74	0,744
Colesterol Total (mg/dL)	183 $\pm$ 41	162 $\pm$ 31	212 $\pm$ 48	0,052
HDL-C (mg/dL)	46,7 $\pm$ 7	47,0 $\pm$ 12	48,0 $\pm$ 19	0,688
LDL-C (mg/dL)	117 $\pm$ 35	103 $\pm$ 24*	143 $\pm$ 36*	0,019
Glicose (mg/dL)	85,6 $\pm$ 9,8	91,9 $\pm$ 12,8	92,8 $\pm$ 7,6	0,214
Insulina (mU/L)	5,7 $\pm$ 4,0	5,9 $\pm$ 1,9	5,9 $\pm$ 4,1	0,801
TSH (μ U/mL)	1,1 $\pm$ 0,7	1,4 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,4	0,747
Adiponectina (μ g/mL)	19,9 $\pm$ 12,8	26,4 $\pm$ 17,8	15,2 $\pm$ 4,5	0,781
Leptina (ng/mL)	4,5 $\pm$ 3,2	5,8 $\pm$ 4,2	6,7 $\pm$ 4,8	0,702
MCP-1 (ng/mL)	0,16 $\pm$ 0,08	0,16 $\pm$ 0,07	0,20 $\pm$ 0,09	0,382
TNF α (pg/mL)	0,78 $\pm$ 0,39	0,87 $\pm$ 0,29	1,1 $\pm$ 0,38	0,337

Nota: Teste ANOVA, exceto para Triglicérides, Adiponectina, Leptina, Insulina e TNF α teste Kruskal-Wallis. Valores expressos em media $\pm$ desvio padrão. * $p<0,05$.

Na **tabela 4** são apresentados os valores de GER, quociente respiratório e taxa de oxidação de lipídios e de carboidratos dos grupos. Não foram encontradas diferenças significativas no GER, e no GER ajustado para peso, massa magra e gordura corporal entre os grupos. Também não se observou diferenças significativas no quociente respiratório, na taxa de oxidação de lipídios e de carboidratos.

Tabela 4. Gasto energético de repouso, taxa de oxidação de lipídeos e de carboidratos, quociente respiratório e % do gasto energético de repouso estimado.

	HIV+LIPO+	HIV+	CTRL	P valor
GER (kcal/dia)	1628 ± 268	1642 ± 188	1752 ± 256	0,427
GER/kg peso corporal (kcal/dia)	21,8 ± 2,4	23,4 ± 2,6	21,8 ± 2,1	0,229
GER/kg MLG (kcal/dia)	29,6 ± 4,3	32,3 ± 2,5	32,5 ± 3,3	0,154
GER/kg GC (kcal/dia)	125 ± 62,4	136 ± 72,1	85 ± 35,0	0,117
Oxidação de lipídeos (g/dia)	67,6 ± 29,2	64,5 ± 34,9	85,1 ± 40,7	0,351
Oxidação de carboidrato (g/dia)	267,1 ± 84,0	278,8 ± 75,0	256,5 ± 86,0	0,826
QR	0,87 ± 0,04	0,88 ± 0,05	0,86 ± 0,06	0,576

Nota: Teste ANOVA. Valores expressos em média ± desvio padrão. *p<0,05. GER, Gasto Energético de Repouso; MLG, Massa Livre de Gordura; GC, Gordura Corporal; QR, quociente respiratório.

A expressão de mRNAs dos genes dos marcadores moleculares no tecido adiposo subcutâneo estão apresentados na **Figura 4** e **Anexo 6**. É importante mencionar que nesta análise 7 amostras foram excluídas (4 HIV+LIPO+ e 3 CTRL), pois não apresentaram qualidade ou quantidade de RNA suficientes. Além disso, as expressões de mRNA do gene *UCPI* foram detectadas em apenas 8 amostras (2 LIPO+HIV+, 3 HIV+, e 3 CTRL). No restante das amostras a expressão de *UCPI* esteve abaixo dos limites de detecção. Todas as amostras que expressaram *UCPI* apresentaram densidade de tecido adiposo compatível com a presença de TAM.

A mediana da expressão de *UCPI* nas 8 amostras foi 16,9 (mínimo 0,52; máximo 59,2). A expressão de *UCPI* correlacionou-se negativamente com o peso ($R=-0,78$; $p=0,021$), IMC ($R=-0,76$; $p=0,028$), e positivamente com a expressão de *DIO2* ($R=0,857$; $p=0,007$), contudo, não houve correlação entre a expressão de *UCPI* e o GER. Na análise de regressão linear simples a expressão de *DIO2* foi um importante preditor da expressão de *UCPI* ($R^2=0,82$; $p=0,002$).

Em relação aos demais genes analisados, não foram encontradas diferenças significativas entre a expressão de marcadores de adipogênese e de função do adipócito (*PPAR γ* e *ADIPOQ*), de biogênese mitocondrial (*PGC-1 α*), de *COX4* e na expressão de *DIO2* e *DICER*, entre os grupos HIV+LIPO, HIV+ e CTRL. Nossos resultados não evidenciam disfunção do tecido adiposo subcutâneo supraclavicular posterior de PVHIV, com lipodistrofia, em uso da TARV.

Figura 4. Expressão de mRNA dos genes *PGC1 α* , *COX4/1*, *PPAR γ* , *ADIPOQ*, *DIO2* e *DICER* no tecido adiposo subcutâneo dos grupos do estudo. Dados expressos em mediana e interquartil.

A taxa respiratória mitocondrial foi avaliada nos estados basal (**routine**), fosforilado (**State P**), não fosforilado (**State L**), e desacoplado (**State E**) e foi semelhante entre os grupos do estudo (**Figura 5**).

É importante mencionar que somente 23 amostras (9 HIV+LIPO+; 6 HIV+, e 8 CTRL) foram analisadas, uma vez que 10 amostras não apresentaram respiração mitocondrial e tiveram que ser excluídas.

Figura 5. Respiração mitocondrial de tecido adiposo subcutâneo dos grupos de estudo. Dados expressos em média $\pm$ SEM. HIV+LIPO+, homens infectados pelo HIV com lipodistrofia; HIV+, homens infectados pelo HIV; CTRL, homens não infectados pelo HIV.

Routine= velocidade da taxa respiratória no estado basal

State P= Velocidade da taxa respiratória em estado fosforilado

State L= Velocidade da taxa respiratória em não fosforilado (repouso)

State E= Velocidade da taxa respiratória em estado não acoplado.

Na **Figura 6** são apresentados o conteúdo mitocondrial, e as razões das velocidades das taxas respiratórias nos grupos de estudo. As razões das taxas respiratórias fornecem informações sobre o controle respiratório, independente do conteúdo mitocondrial. Na **Figura 6A** é possível avaliar a eficiência mitocondrial dos

grupos do estudo, uma vez que apresenta a razão entre o estado fosforilado (P) e o estado não fosforilado (L). Na **Figura 6B** é apresentada a razão do estado não fosforilado (L) e desacoplado (E), mediante tal condição, podemos avaliar a taxa máxima de desacoplamento da respiração celular. A **Figura 6C** apresenta a atividade da CS, um clássico e confiável marcador de conteúdo mitocondrial. Não houve diferenças significativas, entre os grupos, em nenhum dos parâmetros avaliados.

Em concordância com os resultados encontrados na expressão dos marcadores moleculares, nossos resultados também não evidenciaram alterações nos parâmetros respiratórios mitocondrias e na densidade mitocondrial entre os grupos soropositivos para HIV (com e sem lipodistrofia), em uso da TARV, quando comparado à indivíduos não infectados pelo HIV (**Figura 5** e **Figura 6**).

Figura 6. Razões das taxas respiratórias e conteúdo mitocondrial de tecido adiposo subcutâneo dos grupos de estudo. Dados expressos em mediana e interquartil.

A) P/L = relação do controle de fluxo respiratório, acoplado^[L]_[SEP]

B) L/E= relação do controle de fluxo respiratório, desacoplado

C) Atividade de Citrato Sintase = conteúdo mitocondrial

Na **tabela 5** são apresentadas as correlações entre o GER e as variáveis de interesse. Quando todos os indivíduos do estudo foram avaliados o GER correlacionou-se positivamente com o escore de AF, peso, IMC e massa livre de gordura (MLG) (kg).

Quando somente os indivíduos infectados pelo HIV foram avaliados também observamos correlação positiva entre o GER e composição corporal (peso e MLG) e escore de AF. Adicionalmente, foi encontrada correlação entre GER e contagem de T-CD4. Na análise de regressão linear simples a contagem de linfócitos T-CD4 foi preditora do GER em todos os indivíduos infectados pelo HIV ($R^2 = 0,30$; $p = 0,029$).

Quando os indivíduos foram avaliados de acordo com os grupos de estudo, observamos que entre os indivíduos não infectados pelo HIV (grupo CTRL) o GER correlacionou-se com as mesmas variáveis de composição corporal (peso, IMC, MLG), encontradas quando todos os indivíduos do estudo foram avaliados. No entanto, neste grupo (CTRL) o GER não correlacionou-se com o escore de AF. Já no grupo HIV+LIPO+ o GER correlacionou-se com peso, IMC, e com a % de gordura total, mas não correlacionou-se com a MLG (kg), apontando desta maneira, uma possível influência da gordura corporal no metabolismo energético dos indivíduos HIV+ com lipodistrofia. Neste grupo, o GER correlacionou-se negativamente com citrato sintase. No grupo HIV+ somente a MLG correlacionou-se com GER.

Como observado na **tabela 5**, nenhum dos grupos avaliados apresentou correlações entre GER e os parâmetros bioquímicos e moleculares, e do metabolismo mitocondrial analisados.

Para avaliar a influência da massa magra e da gordura corporal no metabolismo energético foi realizada a análise de regressão linear. O modelo 1 incluiu apenas a MLG (kg) e o modelo 2 inclui, além da MLG, a % de gordura corporal (**tabela 6**).

Nota-se que a MLG foi preditora do GER nos grupos HIV+ e CTRL, contribuindo com 50 e 53%, respectivamente, do gasto de energia de repouso nesses indivíduos. Em contrapartida, no grupo HIV+LIPO+ a MLG não correlacionou-se com o GER, embora tenha sido observado uma tendência desta variável também contribuir com o GER ($p = 0,055$), em menor porcentagem (32%). Quando a % de gordura corporal foi acrescentada ao modelo, foi verificado que esta foi preditora do GER no grupo HIV+LIPO+ contribuindo com 37% do gasto de energia nesses

pacientes. Já no grupo HIV+ e CTRL a % de gordura corporal não foi preditora do GER.

Na análise de regressão linear simples incluindo a CS como variável independente, não foram encontradas correlações com o GER no grupo HIV+LIPO+ ($R^2 = 0,13$; $p=0,250$), HIV+ ($R^2 = 0,03$; $p=0,610$), e no grupo CTRL ($R^2 = 0,23$; $p=0,188$).

Tabela 5. Correlação entre o Gasto Energético de Repouso e as variáveis de interesse

Variáveis	Todos (n=33)		PVHIV (n=22)		CTRL (n=11)		HIV+LIPO+ (n=12)		HIV+ (n=10)	
	R	p valor	R	p valor	R	p valor	R	p valor	R	p valor
<u>Características Gerais</u>										
Idade (anos)	-0,15	0,413	-0,04	0,830	-0,36	0,284	0,16	0,618	-0,51	0,137
CD4	NA		0,46	0,029	NA		0,66	0,059	0,34	0,322
Escore de Atividade Física	0,40	0,020	0,50	0,017	0,35	0,298	0,55	0,067	0,06	0,136
Densidade do Tecido Adiposo (HU)	-0,10	0,578	0,09	0,693	0,06	0,852	-0,20	0,527	0,01	0,987
<u>Composição corporal</u>										
Peso	0,74	0,000	0,60	0,003	0,67	0,023	0,77	0,003	0,27	0,446
IMC (m/kg ²)	0,59	0,000	0,41	0,058	0,90	0,000	0,83	0,001	-0,26	0,467
Massa Magra (kg)	0,62	0,000	0,53	0,010	0,85	0,001	0,41	0,191	0,70	0,025
Massa Gorda Total (%)	0,31	0,072	0,29	0,186	0,01	0,979	0,76	0,004	-0,38	0,275
<u>Parâmetros Bioquímicos</u>										
Leptina	-0,17	0,335	-0,19	0,423	-0,37	0,259	0,27	0,446	-0,54	0,108
Adiponectina	-0,07	0,709	-0,17	0,811	0,18	0,627	-0,11	0,745	-0,43	0,286
Insulina	0,05	0,781	0,09	0,711	0,11	0,749	0,33	0,284	-0,11	0,751
TSH	0,17	0,345	-0,05	0,811	0,3	0,370	-0,22	0,484	0,27	0,446
<u>Parâmetros Mitocondriais</u>										
Razão P/L	-0,15	0,500	0,11	0,685	-0,29	0,493	0,58	0,099	-0,60	0,208
Razão L/E	-0,11	0,590	0,05	0,849	-0,17	0,693	-0,32	0,406	0,71	0,111
Citrato Sintase	-0,07	0,678	-0,23	0,291	0,65	0,058	-0,60	0,039	0,20	0,580
<u>Expressão Gênica</u>										
Dicer	0,10	0,616	0,26	0,309	-0,07	0,867	0,39	0,383	0,18	0,626
DIO2	-0,29	0,143	-0,15	0,548	-0,6	0,120	0,26	0,531	-0,41	0,244
COX4	0,35	0,082	0,39	0,113	0,31	0,456	0,36	0,531	0,49	0,150

Nota: Coeficiente de Correlações de *Spearman*. NA; não aplicável.

Tabela 6. Modelos de regressão linear para GER (kcal/dia)

	Modelo 1	β	Erro Padrão	p valor	R²	p valor modelo
HIV++LIPO+	MLG	24,3	11,2	0,055	0,32	0,055
HIV+		26,5	9,2	0,021	0,50	0,021
CTRL		23,7	6,7	0,007	0,53	0,007
	Modelo 2	β	Erro Padrão	p valor	R²	p valor modelo
HIV++LIPO+	MLG	16,7	8,2	0,072	0,69	0,005
	GC	17,6	5,2	0,009		
HIV+	MLG	35,1	11,8	0,021	0,58	0,047
	GC	8,1	7,0	0,289		
CTRL	MLG	28,7	7,0	0,003	0,69	0,010
	GC	13,4	8,4	0,149		

MLG, massa livre de gordura (kg); GC, gordura corporal (%)

Como a MLG é uma importante preditora do metabolismo energético, o GER foi ajustado para massa livre de gordura (GER/MLG) para avaliar as possíveis correlações com as variáveis bioquímicas de interesse (adipocinas, TSH e insulina), com a densidade e o metabolismo mitocondrial (citrato sintase, razões P/L e L/E), e com a expressão de *COX4*, *DIO2* e *DICER*.

No grupo HIV+LIPO+ o GER/MLG associou-se positivamente com a expressão da *DICER* ($R=0,85$; $p=0,014$). Já no grupo HIV+ não foram observadas correlações com o GER/MLG; e no grupo CTRL houve correlação negativa entre a razão P/L e o GER ($R=-0,76$; $p=0,028$). Adicionalmente, se observou no grupo CTRL que a razão P/L correlacionou-se negativamente com a % de gordura corporal ($R=-0,76$; $p=0,027$) e com as concentrações séricas de TNF α ($R=-0,85$; $p=0,007$).

Para analisar a relação da *DICER* e da razão P/L no GER/MLG foi realizada a análise de regressão linear simples e não foram observadas correlações entre essas variáveis com o GER nos grupos HIV+LIPO+ ($R^2=0,46$; $p=0,092$, e $R^2=0,00$; $p=0,867$, respectivamente), HIV+ ($R^2=0,08$; $p=0,409$, e $R^2=0,01$; $p=0,848$, respectivamente), e CTRL ($R^2=0,00$; $p=0,853$, e $R^2=0,06$; $p=0,538$, respectivamente).

6 Discussão:

Os resultados encontrados neste estudo não evidenciaram alterações na densidade e no metabolismo mitocondrial, na expressão gênica da *DICER*, *DIO2*, *COX4* e dos marcadores de adipogênese, de função adipocitária e de biogênese mitocondrial do tecido adiposo subcutâneo de PVHIV com lipodistrofia. Tampouco foram observadas associações entre esses marcadores e o metabolismo energético de PVHIV (com e sem lipodistrofia), que se mostrou semelhante aos dos indivíduos não infectados pelo HIV.

Neste estudo, todos os indivíduos infectados pelo HIV estavam clinicamente estáveis, com carga viral indetectável e contagem de T-CD4+ satisfatórias (>200 cel/mm). Além disso, de acordo com o protocolo utilizado para o diagnóstico de lipodistrofia (Sutinen e Yki-Järvinen, 2007), todos os indivíduos do grupo HIV+LIPO+ possuíam lipoatrofia em pelo menos um sítio, associada ou não a lipoipertrofia. Embora esse diagnóstico tenha sido feito de modo subjetivo, a menor porcentagem de gordura das pernas observada nesse grupo é um indicativo de perda de gordura subcutânea nos membros inferiores.

Sabe-se que a redistribuição anormal de gordura corporal em PVHIV contribui para o desenvolvimento das disfunções mitocondriais e das alterações metabólicas observadas na SLHIV (Fitch *et al.*, 2012). No entanto, em nosso estudo, não observamos diferenças na composição corporal, no metabolismo lipídico e da glicose, na insulina e no perfil inflamatório entre as PVHIV com e sem lipodistrofia. Foi observado que o grupo CTRL possuía valores de LDL colesterol mais elevado que o grupo HIV+. É importante salientar que, embora não tenha alcançado significância estatística ($p=0,08$), o grupo CTRL possuía o dobro de indivíduos com % de gordura corporal elevada (quando comparado aos grupos soropositivos para HIV), a qual está associada ao desenvolvimento de alterações metabólicas (Elffers *et al.*, 2017). Uma possível justificativa para esses achados é que os homens soropositivos para HIV, deste estudo, são seguidos e avaliados frequentemente (no mínimo a cada 6 meses) por médicos infectologistas e equipe multiprofissional, os quais reforçam a importância da adesão à TARV e a manutenção de um estilo de vida saudável. Intervenções precoces no estilo de vida, incluindo alimentação saudável e prática de exercícios físicos, são estratégias importantes no manejo das alterações metabólicas e morfológicas observadas em PVHIV (Loonam e Mullen, 2012). Em contrapartida, homens “saudáveis” são muito menos

propensos a buscar serviços de saúde preventivos (Leone et al., 2017), negligenciando, muitas vezes, seu estado de saúde.

Srinivasa *et al.*, (2015) observou que PVHIV, em uso de TARV, com lipodistrofia e diagnóstico de síndrome metabólica, apresentavam valores mais elevados de triglicérides, glicose, e FGF21, e mais baixos de HDL quando comparado a indivíduos não infectados pelo HIV. Os autores avaliaram então, os efeitos da mudança de estilo de vida (aconselhamento dietoterápico + exercício físico) em PVHIV, e constataram que após 12 meses, o grupo que recebeu as intervenções apresentou redução significativa de FGF21. As alterações nas concentrações de FGF21 foram associadas com melhora nos parâmetro metabólicos incluindo aumento no GER e redução do QR, em todos os indivíduos do estudo. As maiores concentrações de FGF21 tem sido associadas à síndrome metabólica (Ajala e Mora, 2019). Vale mencionar que nenhum dos indivíduos avaliados em nosso estudo faziam uso de hipolipemiantes e antidiabéticos orais (critérios de exclusão), e consequentemente, podem ter sido incluídas neste estudo PVHIV menos propensas a ter síndrome metabólica.

Em nosso estudo o GER e o QR foram semelhantes entre os grupos de estudo. É sabido que 60% do GER provêm da atividade metabólica do fígado, cérebro, coração, rins, que representam apenas 5,5% do peso corporal. O tecido muscular constitui cerca de 40% do peso corporal e conta com outros 20% do GER, enquanto o tecido adiposo influencia em torno de 4% do GER em indivíduos magros (Chang, *et al.*, 2007). Nossos resultados apontaram que a MLG foi preditora do GER no grupo CTRL e HIV+, no entanto, no grupo HIV+LIPO+ a % de gordura foi preditora do GER, apontando desta maneira, que a gordura corporal na lipodistrofia influencia o GER.

Alguns estudos têm apontado que PVHIV com lipodistrofia apresentam maior GER (ajustado para massa magra), quando comparado a indivíduos sem lipodistrofia (Kosmiski *et al.*, 2011) e aos não infectados pelo HIV (Vassimon *et al.*, 2012). No entanto, outros estudos têm apontado resultados contraditórios, não verificando diferenças no GER entre PVHIV com e sem lipodistrofia (Guimarães *et al.*, 2017). As diferenças encontradas entre os estudos poderiam ser justificadas pela heterogeneidade dos indivíduos avaliados, por exemplo, quanto à carga viral e à contagem de T-CD4 (Palmer *et al.* 2016), à ingestão energética (Kosmiski *et al.*, 2007), ou ainda à própria disfunção no tecido adiposo.

Fitch *et al.*, (2009) observou que a MLG a gordura corporal e a gordura visceral foram preditoras do GER tanto em indivíduos soropositivos para HIV (n=283) quanto em negativos

para HIV (n=146). Além disso, os autores observaram maior GER e menor RQ (maior oxidação de gorduras) em PVHIV quando comparado aos não infectados, sugerindo que as alterações na oxidação de substratos poderiam contribuir com o aumento do GER em PVHIV. Outro estudo observou maior GER e uma elevada lipólise em PVHIV quando comparado aos indivíduos não infectados pelo HIV (Seckar *et al.*, 2002).

A atividade mitocondrial, por meio da oxidação de substratos e produção de calor, é um mecanismo chave do gasto de energia no estado basal (Chang *et al.*, 2007). Disfunções mitocondriais no tecido adiposo estão envolvidas com a redistribuição anormal de gordura corporal em PVHIV (Giralt, Domingo e Villarroja, 2011), e poderiam ser causas prováveis de aumento do GER observadas em PVHIV com lipodistrofia.

Muitos fatores podem contribuir com as disfunções mitocondriais observadas em PVHIV. Entre eles estão: o próprio HIV, pela sua proteína viral R (Vpr) que pode reduzir o potencial da membrana mitocondrial, induzindo tanto o vazamento de prótons quanto a apoptose de adipócitos; o uso de antrirretrovirais da classe dos ITRNs, que inibem a DNA polimerase γ e portanto, a atividade transcricional da mitocôndria, reduzindo seu conteúdo, a função da cadeia transportadora de elétrons e consequentemente a eficiência na produção de ATP; e o aumento do ciclo fútil dentro do adipócito (aumento da produção de calor e redução da produção de energia) devido ao aumento da lipólise (Chang *et al.*, 2007).

No presente estudo, não encontramos diferenças no conteúdo mitocondrial avaliado pela atividade da citrato sintase e tampouco encontramos alterações nos estados L (*proton leak*), P (fosforilado), E (desacoplado), na funcionalidade mitocondrial (razão P/L) e no desacoplamento (razão L/E) do tecido adiposo subcutâneo supraclavicular de PVHIV, com e sem lipodistrofia, quando comparados a indivíduos não infectados pelo HIV, não evidenciando assim, disfunção mitocondrial no tecido adiposo analisado.

Sevastianova *et al.* (2011) observou redução de mtDNA nos pacientes com lipodistrofia, sendo que essa redução foi maior no tecido adiposo abdominal, quando comparado ao dorsocervical. Já Cereijo *et al.* (2015) encontrou menor expressão de mtDNA em amostras de gordura dorsocervical e maior expressão de MT-CO2 (citocromo c oxidase subunidade 2) na gordura lipomatosa de outros locais (como pescoço e região púbica), quando comparado a gordura dorsocervical e indivíduos saudáveis. No entanto, os autores observaram que, em nível proteico, ambos os tipos de tecido (dorsocervical e lipomatoso de outros locais) apresentaram redução de MT-CO2, sendo este um indicativo de toxicidade mitocondrial.

As diferentes metodologias para avaliar as disfunções mitocondriais, o tipo de tecido (lipoatrofiado ou lipoipertrofiado) e o local das biópsias do tecido adiposo podem contribuir para a discrepância entre os resultados na literatura. Kim *et al.*, (2008) avaliou alterações mitocondriais em amostras de tecido adiposo subcutâneo abdominal de PVHIV com lipoatrofia e constatou: preservação de proteínas e atividades dependentes de mtDNA, apesar da grave depleção de mtDNA; proliferação mitocondrial (como aumento da atividade da citrato sintase) sem regulação positiva dos fatores de transcrição envolvidos na biogênese mitocondrial (como a PGC1 α , que apresentou-se reduzida frente ao controle); ocorrência de apoptose e estresse oxidativo apesar da compensação da função respiratória ao nível tecidual global; e notável ausência de correlação entre o conteúdo de mtDNA do tecido adiposo e quaisquer outras características mitocondriais. A partir destes resultados os autores concluíram que a redução da expressão de mtDNA no tecido adiposo, não pode ser considerado um biomarcador acurado das alterações mitocondriais no tecido adiposo desses indivíduos.

Alguns autores sugerem que a redução da expressão de mtDNA está associada a alterações na expressão de genes codificados pelo mtDNA e ao aumento compensatório da massa mitocondrial, que provavelmente reduzem a capacidade oxidativa do tecido adiposo (Villarroya, Domingo e Giralt, 2007). No entanto, em nosso estudo não observamos alterações na capacidade oxidativa do tecido adiposo e tampouco observamos diferenças na expressão dos genes *PGC1 α* e *COX4/I* entre os grupos HIV+LIPO+, HIV+, e CTRL.

Importante mencionar que, assim como na lipodistrofia, o excesso de gordura (obesidade) também está associada a disfunções no TAB, que incluem aumento da inflamação e disfunções mitocondriais (Boengler *et al.*, 2017; Montgomery e Turner, 2014). O maior vazamento de prótons (*próton leak*), observado em estados de alta disponibilidade de nutrientes e baixo consumo de oxigênio (como na obesidade), está associado à maior produção de espécies reativas de oxigênio (Liesa e Shirihai, 2013), sendo um dos mecanismos relacionados à desregulação de adipocinas e desenvolvimento de síndrome metabólica (Furukawa *et al.*, 2004).

Em nosso estudo não observamos diferenças no perfil inflamatório, avaliado pelas concentrações de TNF α e MCP1, tampouco na % de gordura corporal entre os grupos (como já discutido anteriormente). No entanto, observamos que, no grupo CTRL, a funcionalidade mitocondrial (razão P/L) correlacionou-se negativamente com a % de gordura e com as

concentrações séricas de TNF α , sugerindo que o excesso de peso e o estado inflamatório podem influenciar o metabolismo mitocondrial do tecido adiposo subcutâneo em indivíduos não infectados pelo HIV (Alcalá *et al.*, 2017). Em PVHIV, no entanto, essas variáveis parecem não exercer influência no metabolismo mitocondrial, sugerindo que outros fatores podem estar envolvidos nesta disfunção, como por exemplo, a própria infecção pelo HIV e/ou uso de alguns tipos de ARV (Finkelstein *et al.*, 2015; Giralt *et al.*, 2010).

A função mitocondrial está ligada a síntese de adiponectina no tecido adiposo e a disfunção mitocondrial pode explicar a diminuição das concentrações plasmáticas de adiponectina na obesidade (Koh *et al.*, 2007). A adiponectina exerce ação benéfica na homeostase energética, uma vez que age na melhora da sensibilidade insulina, na inibição da morte celular e na supressão da inflamação (Wang e Scherer, 2016). Concentrações de adiponectina são inversamente associadas ao IMC, glicemia, insulinemia, trigliceridemia e conteúdo de gordura visceral (Nigro *et al.*, 2014).

Outra importante adipocina relacionada com a homeostase energética é a leptina. Concentrações séricas de leptina são proporcionais à quantidade de tecido adiposo, sinalizando o armazenamento de energia a longo prazo. (Farr, Gavrieli e Mantzoros, 2015). Concentrações elevadas de leptina estão associadas ao desenvolvimento de alterações metabólicas associadas a obesidade, como a resistência a insulina, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (Ghadg e Khaire, 2019).

Assim como na obesidade, PVHIV apresentam secreção alterada de adiponectina e leptina, que estão associadas ao desenvolvimento de síndrome metabólica e aumento do risco cardiovascular nesses pacientes (Palios, Kadoğlu e Lampropoulos, 2012). Contudo, não encontramos diferenças nas concentrações séricas de adiponectina e leptina, entre os grupos, e tampouco observamos associações entre essas duas adipocinas e o metabolismo energético. Paralelamente, também não observamos diferenças na expressão dos genes *ADIPOQ* e *PPAR γ* (principal regulador de diferenciação do adipócito), não apontando desta maneira, disfunção do tecido adiposo analisado, o que vai ao encontro dos resultados observados nas análises mitocondriais.

Assim, como as disfunções mitocondriais, as disfunções no tecido adiposo subcutâneo de PVHIV também parecem ser distintas entre os diferentes depósitos de gordura. Enquanto alguns apontam disfunção no tecido adiposo lipoatrófico, evidenciado pelas alterações na

expressão de *PPAR γ* (Kannisto *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2008), outros não têm evidenciado alterações na expressão de marcadores de adipogênese e inflamação (Guallar *et al.*, 2008).

Como mencionado anteriormente, em nosso estudo, todos os indivíduos do grupo HIV+LIPO+ apresentavam lipoatrofia. No entanto, a região supraclavicular posterior é um local onde, assim como a dorsocervical, pode ocorrer acúmulo de gordura em pessoas que apresentam a lipoipertrofia. Um discreto acúmulo de gordura dorsocervical foi identificado, de forma subjetiva, em apenas um indivíduo avaliado, e portanto, nós não acreditamos que o tecido adiposo analisado seja um tecido lipoipertrofiado.

A região supraclavicular é um local onde TAM frequentemente é encontrado de forma dispersa. No entanto, a expressão de *UCP1* foi detectada em apenas 31% das amostras analisadas, sugerindo que nem todas as amostras apresentavam adipócitos marrom ou bege, mesmo que a densidade do tecido adiposo avaliada pela tomografia computadorizada fosse indicativo de TAM (Ahmadi *et al.*, 2013).

Sabe-se que durante o inverno e em locais onde as temperaturas médias ao ar livre são menores durante o ano, a detecção de TAM nos indivíduos é aumentada (Sampath *et al.*, 2016). É importante mencionar que, embora os dados tenham sido coletados no período de outono/inverno, as temperaturas médias na cidade de Ribeirão Preto são consideradas elevadas, apresentando mínimas entre 15 a 20°C, e máximas de 25 a 27°C (Climatempo, 2019), o que pode ter contribuído para não termos detectado adipócitos marrons/bege em todos os indivíduos do estudo.

Em acordo com o observado em nosso estudo, Cereijo *et al.*, (2015) também não encontraram alterações na expressão gênica e proteica de *PPAR γ* e adiponectina, em biópsias de tecido adiposo lipomatoso. No entanto, os autores observaram aumento da expressão de marcadores de adipócitos marrons e bege, como *UCP1*, e *PGC1 α* nas amostras de gordura dorsocervical de PVHIV, sugerindo um fenótipo de gordura marrom nesse depósito.

Diferentemente da *UCP1*, a expressão de *DIO2* foi detectada em todas as amostras. A *DIO2* é uma selenoenzima que participa da conversão de T4 em sua forma ativa T3, sendo essencial para a termogênese adaptativa no TAM, frente a exposição ao frio. Ela tem um papel importante tanto na indução de *UCP1* quanto na função do TAM (Germain, Galton e Hernandez, 2009). Outro estudo observou aumento da expressão de *DIO2* em amostras de gordura dorsocervical de PVHIV com lipohipertrofia, que não parece ser TAM, sugerindo que a expressão de *DIO2* é encontrada em outros tecidos que não são TAM, ou ainda que o tecido

analisado é tecido adiposo branco tradicional, com TAM intercalado em baixas concentrações em algumas amostras (Torriani *et al.*, 2012). Embora os autores deste estudo não tenham comparado a expressão de *DIO2* entre as PVHIV e controles não infectados pelo HIV, foi observado que os valores de *DIO2* no grupo com lipoatrofia se encontravam próximos aos valores dos indivíduos não infectados pelo HIV ($4,2 \pm 2,7$ e $6,8 \pm 3,6$, respectivamente). Os autores observaram ainda associação significativa entre a expressão de *DIO2* e *UCP1* (em todas as PVHIV), que foram associadas positivamente com o GER (Torriani *et al.*, 2012).

Em nosso estudo, não encontramos diferenças na expressão da *DIO2* entre os grupos avaliados, bem como não observamos correlações entre a expressão de *DIO2* e o GER em nenhum dos grupos. No entanto, observamos que a expressão de *UCP1* (em todos os indivíduos que expressaram esse marcador) foi associada ao IMC e ao peso, e positivamente associada com a expressão de *DIO2*, assim como observado em outros estudos (Lichtenbelt *et al.*, 2009).

Estudo conduzido por Torriani *et al.* (2016) avaliou biópsias de tecido adiposo abdominal de PVHIV com e sem lipohipertrofia (verificada pelo aumento da gordura dorso-cervical) e de controles não infectados pelo HIV, e observou redução na expressão de *DIO2*, *DICER* e de genes relacionados à gordura marrom e bege (incluindo *PGC1 α*) no grupo HIV+, sendo que essa redução foi ainda maior no grupo com lipodistrofia. Os autores observaram que a menor expressão da *DICER* entre os indivíduos positivos para HIV correlacionou-se com a baixa expressão de genes de gordura marrom e bege, sugerindo que a redução da *DICER* na gordura abdominal poderia representar um novo mecanismo para as alterações metabólicas nessa população, uma vez que estaria limitando a capacidade de *browning* no tecido adiposo branco. Neste estudo, os autores não observaram diferenças no GER e GER/MLG entre os grupos (HIV *versus* saudáveis, e HIV com lipodistrofia *versus* sem lipodistrofia). No entanto, eles observaram correlação entre o GER/MLG e a expressão de genes relacionados ao tecido adiposo marrom/bege em todos os indivíduos avaliados.

Torriani *et al.* (2016) sugere que o acúmulo de gordura dorsocervical (com fenótipo de TAM), em PVHIV com lipodistrofia, poderia se desenvolver como uma forma compensatória do organismo aumentar a termogênese e se proteger frente as disfunções mitocondriais do tecido adiposo (e a baixa capacidade termogênica) de outros depósitos de gordura, que podem propiciar doenças cardiometabólicas, sendo uma justificativa plausível de porque algumas PVHIV são propensas a desenvolver o acúmulo de gordura nessa região.

Em nosso estudo, não observamos diferenças na expressão de *DICER* entre os grupos e tampouco observamos correlações entre esse marcador e o GER. Como já mencionado anteriormente, as PVHIV avaliadas no presente estudo, não apresentavam acúmulo de gordura dorsocervical, o que pode ter contribuído para não termos encontrado diferenças, entre os grupos no metabolismo mitocondrial e na adipogênese do tecido adiposo subcutâneo, e consequentemente no metabolismo energético.

Langkilde *et al.* (2018) avaliou amostras de gordura subcutânea abdominal de PVHIV, que foram separadas de acordo com a presença ou ausência de lipodistrofia (avaliada de forma subjetiva) e posteriormente separadas de acordo com a presença ou ausência de síndrome metabólica, e comparou com amostras de controles saudáveis. Os autores observaram que a síndrome metabólica foi associada a maiores alterações no tecido adiposo subcutâneo abdominal (adipócitos maiores e expressão diminuída de genes relacionados à função do tecido adiposo, como *PPAR γ* , *ADIPOQ*, *SIRT1*) do que a lipodistrofia (que apresentou apenas aumento da infiltração de macrófagos no tecido adiposo), sugerindo que, no que diz respeito à disfunção do tecido adiposo e risco de complicações cardiometabólicas em PVHIV, pode ser mais relevante avaliar e direcionar as intervenções para a síndrome metabólica.

- Limitações do estudo:

Este estudo apresenta como limitação:

- o método utilizado para coletar as amostras de gordura, que permitia a coleta de pequenas quantidades de tecido adiposo (50 a 100 mg), e pode ter contribuído para algumas amostras não apresentarem respiração mitocondrial e/ou não possuírem RNA suficiente para as análises de expressão gênica;

- não ter separado as PVHIV com lipodistrofia entre as que apresentavam somente lipoatrofia e as que apresentavam lipoatrofia e lipoipertrofia, e não ter avaliado o tecido adiposo de outros depósitos, como o abdominal, uma vez que as alterações moleculares no tecido adiposo parecem se diferenciar entre o tecido adiposo lipoatrófico e lipoipetrófico de diferentes depósitos. No entanto, para que isso fosse feito, seria necessário um tamanho amostral maior. Além disso, a necessidade de realizar a biopsia em dois locais diferentes, aumentaria as dificuldades no recrutamento dos voluntários e os custos com o estudo.

- a inclusão de pessoas não infectados pelo HIV (grupo CTRL) que apresentavam elevada porcentagem de gordura corporal, a qual está associada ao desenvolvimento de alterações metabólicas. É importante mencionar que essas pessoas se enquadravam dentro dos critérios estabelecidos para IMC.

7 Conclusão:

O gasto energético de repouso em PVHIV, em uso da TARV, com lipodistrofia, não se diferenciou do encontrado em PVHIV, em uso da TARV, sem lipodistrofia e em indivíduos não infectados pelo HIV. A ausência de disfunção mitocondrial no tecido adiposo analisado pode ter contribuído para não termos evidenciado alterações no metabolismo energético de PVHIV.

O tecido adiposo subcutâneo supraclavicular posterior de PVHIV, em uso da TARV, com lipodistrofia, não apresenta alterações na adipogênese, na função adipocitária, no metabolismo e densidade mitocondrial e na expressão do gene *DICER*, quando comparado a PVHIV sem lipodistrofia e a indivíduos não infectados pelo HIV.

A expressão dos genes *DIO2* e *PGC1 α* (marcadores de TAM) esteve presente em todas as amostras analisadas, diferentemente do gene *UCPI* expresso em apenas um terço dos indivíduos avaliados, o que sugere que o tecido adiposo subcutâneo supraclavicular analisado era composto por adipócitos brancos com presença de adipócitos marrons/bege apenas em alguns indivíduos.

Mais estudo são necessários para avaliar se outros depósitos de gordura, como o abdominal, em PVHIV com as mesmas características deste estudo, apresentam disfunções adiposas e mitocondriais que estejam associadas ao metabolismo energético.

8 Referências Bibliográficas:

- AHMADI, N. *et al.* Accurate Detection of Metabolically Active “Brown” and “White” Adipose Tissues with Computed Tomography. *Academic Radiology*, v. 20, n. 11, p. 1443–1447, nov. 2013.
- ALCALÁ, M. *et al.* Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 16082, dez. 2017.
- BAECKE, J.A.; BUREMA, J.; FRIJTERS, J.E. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. *Am J Clin Nutr.*, v. 36, p. 936-42, 1982
- BAGGIO, F. *et al.* *Drosophila melanogaster* LRPPRC2 is involved in coordination of mitochondrial translation. *Nucleic Acids Res.*, v. 42, n. 22, p. 13920-382014, dez. 2014.
- BATTERHAM, M.J. Investigating heterogeneity in studies of resting energy expenditure in persons with HIV/AIDS: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* v.81, p.702–13, 2005.
- BEDIMO, R. J. Body-Fat Abnormalities in Patients With HIV: Progress and Challenges. *Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care*, v. 7, n. 6, p. 292–305, dez. 2008.
- BÉNARD, G. *et al.* Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *American journal of physiology. Cell physiology*, v. 291, n. 6, p. NaN-NaN, 2006.
- BOENGLER, K. *et al.* Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, v. 8, n. 3, p. 349–369, jun. 2017.
- CAMPOS, L. N., CESAR, C. C., GUIMARAES, M. D. C. Quality of life among HIV-infected patients in Brazil after initiation of treatment. *Clinics*, v.64, n.9, p. 867-875, 2009.
- CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*, v. 84, n. 1, p. 277–359, jan. 2004.
- CARR, A. HIV lipodystrophy: risk factors, pathogenesis, diagnosis and management. *AIDS*, n. 17, Suppl 1, p.S141- S148, 2003.
- CASTRO, A. V. B. *et al.* Obesity, insulin resistance and comorbidities ? Mechanisms of association. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 58, n. 6, p. 600–609, ago. 2014.
- CEREIJO, R. *et al.* The Molecular Signature of HIV-1-Associated Lipomatosis Reveals Differential Involvement of Brown and Beige/Brite Adipocyte Cell Lineages. *PLOS ONE*, v. 10, n. 8, p. e0136571, 25 ago. 2015.
- CHANG, E. *et al.* Dysregulated Energy Expenditure in HIV-Infected Patients: A Mechanistic Review. *Clinical Infectious Diseases*, v. 44, n. 11, p. 1509–1517, 1 jun. 2007.

CHANG, E.; SEKHAR, R.; PATEL, S.; BALASUBRAMANYAM, A. Dysregulated energy expenditure in HIV-infected patients: a mechanistic review. *Clin Infect Dis Oxford*, v. 44, n. 11, p. 1509-1517, 2007.

CHEN, K. Y. *et al.* Brown Adipose Reporting Criteria in Imaging STudies (BARCIST 1.0): Recommendations for Standardized FDG-PET/CT Experiments in Humans. *Cell Metabolism*, v. 24, n. 2, p. 210–222, ago. 2016.

CHONDRONIKOLA, M. *et al.* Brown Adipose Tissue Activation Is Linked to Distinct Systemic Effects on Lipid Metabolism in Humans. *Cell Metabolism*, v. 23, n. 6, p. 1200–1206, jun. 2016.

CHONDRONIKOLA, M. *et al.* Brown Adipose Tissue Improves Whole-Body Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Humans. *Diabetes*, v. 63, n. 12, p. 4089–4099, 1 dez. 2014.

CLIMATEMPO. Climatologia Ribeirão Preto - SP. Disponível em: <<https://www.climatempo.com.br/climatologia/530/ribeiraopreto-sp>>. Acesso em agosto 2019.

CYPESS, A. M. *et al.* Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *New England Journal of Medicine*, v. 360, n. 15, p. 1509–1517, 9 abr. 2009.

DE ANDRADE; BOLSONI-LOPES; ALONSO-VALE. Mitochondrial Actions for Fat Browning and Energy Expenditure in White Adipose Tissue. *Journal of Obesity and Overweight*, v. 2, n. 2, maio 2016.

DUARTE, A.C.; CASTELLANI, F.R. *Semiologia Nutricional*, editora axcel, 1ª edição, Rio de Janeiro, 2002.

ELFFERS, T. W. *et al.* Body fat distribution, in particular visceral fat, is associated with cardiometabolic risk factors in obese women. *PLoS ONE*, v. 12, n. 9, 28 set. 2017.

ELWYN, D.H., KINNEY, J.M., ASKANAZI, J. Energy expenditure in surgical patients. *Surg Clin North Am.* v. 61, p.545-56, 1981.

FARR, O. M.; GAVRIELI, A.; MANTZOROS, C. S. Leptin applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity? *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity*, v. 22, n. 5, p. 353–359, out. 2015.

FDA.U.S. Food and Drug Administration. Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection. Disponível em: <<https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/21/58/fda-approved-hiv-medicines>>. Acesso em agosto 2019.

FINKELSTEIN, J. L. *et al.* HIV/AIDS and lipodystrophy: Implications for clinical management in resource-limited settings. *Journal of the International AIDS Society*, v. 18, n. 1, 15 jan. 2015.

FITCH, K. *et al.* Effects of lifestyle modification and metformin on atherosclerotic indices among HIV-infected patients with the metabolic syndrome: AIDS, v. 26, n. 5, p. 587–597, mar. 2012.

FITCH, K. V. *et al.* Decreased respiratory quotient in relation to resting energy expenditure in HIV-infected and noninfected subjects. Metabolism, v. 58, n. 5, p. 608–615, maio 2009.

FITCH, K.; GRINSPOON, S. Nutritional and metabolic correlates of cardiovascular and bone disease in HIV-infected patients¹²³⁴. The American Journal of Clinical Nutrition, v. 94, n. 6, p. 1721S–1728S, dez. 2011.

FLORINDO, A.A. *et al.* Validity and reliability of the Baecke questionnaire for the evaluation of habitual physical activity among people living with HIV/AIDS. Cad Saude Publica, v. 22, n. 3, p. 535–41, mar 2006.

FRAY, K.N. Calculation of substrate oxidation rate in vivo from gaseous exchange. J Appl Physiol, v.55, n.2, p.628–34, 1983.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. p. 4, 1972.

FRIEDMAN, J. R.; NUNNARI, J. Mitochondrial form and function. Nature, v. 505, n. 7483, p. 335–43, jan 2014.

FURUKAWA, S. *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. Journal of Clinical Investigation, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, 15 dez. 2004.

GALLEGO-ESCUREDO, J. M. *et al.* Differentially Altered Molecular Signature of Visceral Adipose Tissue in HIV-1–Associated Lipodystrophy: JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, v. 64, n. 2, p. 142–148, out. 2013.

GARRABOU, G. *et al.* Mitochondrial damage in adipose tissue of untreated HIV-infected patients: AIDS, v. 25, n. 2, p. 165–170, jan. 2011.

GIRALT, M. *et al.* Lipotoxicity on the Basis of Metabolic Syndrome and Lipodystrophy in HIV-1-Infected Patients Under Antiretroviral Treatment. Current Pharmaceutical Design, v. 16, n. 30, p. 3372–3378, 1 out. 2010.

GIRALT, M.; DOMINGO, P.; VILLARROYA, F. Adipose tissue biology and HIV-infection. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 25, n. 3, p. 487–499, jun. 2011.

GRUNFELD, C. *et al.* Contribution of metabolic and anthropometric abnormalities to cardiovascular disease risk factors. Circulation, v. 118, n.2, p. e20–28, 2008.

GUALLAR, J. P. *et al.* Differential gene expression indicates that ‘buffalo hump’ is a distinct adipose tissue disturbance in HIV-1-associated lipodystrophy: *AIDS*, v. 22, n. 5, p. 575–584, mar. 2008.

HARRIS, J.A.; BENEDICT, F.G. A Biometric Study of Human Basal Metabolism. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 4, n. 12, p. 370-373, 1919.

HAUGEN, A. *et al.* Indirect calorimetry: a practical guide for clinicians. *Nutrition in clinical practice: official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, Thousand Oaks, v.22, n.4, p. 377-388, 2007.

KAJIMURA, S. Advances in the understanding of adipose tissue biology. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 13, n. 2, p. 69–70, fev. 2017.

KAJIMURA, S.; SAITO, M. A New Era in Brown Adipose Tissue Biology: Molecular Control of Brown Fat Development and Energy Homeostasis. *Annual Review of Physiology*, v. 76, n. 1, p. 225–249, 10 fev. 2014.

KAMIMURA, M.A. Avaliação Nutricional. In: Cuppari, L. *Guia de Nutrição: nutrição clínica no adulto*. São Paulo: Manole, 2006 (Guia de Medicina Ambulatorial e Hospitalar). Cap.6, p. 89-127.

KAMIMURA, M.A.; DRAIBE, S.A.; CUPPARI, L. Gasto energético de repouso em pacientes com doença renal crônica. *Revista de Nutrição de Campinas*, v.21, n.1, p.75-84, 2008.

KANNISTO, K. *et al.* Expression of adipogenic transcription factors, peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1, IL-6 and CD45 in subcutaneous adipose tissue in lipodystrophy associated with highly active antiretroviral therapy: *AIDS*, v. 17, n. 12, p. 1753–1762, ago. 2003.

KIM, M. J. *et al.* Mitochondrial DNA Content, an Inaccurate Biomarker of Mitochondrial Alteration in Human Immunodeficiency Virus-Related Lipodystrophy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 5, p. 1670–1676, 1 maio 2008.

KOH, E. H. *et al.* Essential Role of Mitochondrial Function in Adiponectin Synthesis in Adipocytes. *Diabetes*, v. 56, n. 12, p. 2973–2981, 1 dez. 2007.

KOSMISKI, L. A. *et al.* Brown Fat Activity Is not Apparent in Subjects With HIV Lipodystrophy and Increased Resting Energy Expenditure. *Obesity*, v. 19, n. 10, p. 2096–2098, out. 2011.

KOSMISKI, L. Energy expenditure in HIV infection¹²³. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 94, n. 6, p. 1677S-1682S, dez. 2011.

KOSMISKI, L.A. *et al.* Fat distribution and metabolic changes are strongly correlated and energy expenditure is increased in the HIV lipodystrophy syndrome. *AIDS*, v.15, p.1993–2000, 2001.

LANGKILDE, A. *et al.* Histological and Molecular Adipose Tissue Changes Are Related to Metabolic Syndrome Rather Than Lipodystrophy in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients: A Cross-Sectional Study. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 218, n. 7, p. 1090–1098, 24 ago. 2018.

LICHTENBELT, W. D. VAN M. *et al.* Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England journal of medicine*, v. 360, n. 15, p. 1500–1508, 2009.

LIESA, M.; SHIRIHAI, O. S. Mitochondrial Dynamics in the Regulation of Nutrient Utilization and Energy Expenditure. *Cell Metabolism*, v. 17, n. 4, p. 491–506, abr. 2013.

LIVAK, K.G.; SCMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real- time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T) method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOHAMN, T.G.; ROCHE, A.F, MARTORELL, R. Anthropometric standardization reference manual. Abridged, 1991.

LOONAM, C. R.; MULLEN, A. Nutrition and the HIV-associated lipodystrophy syndrome. *Nutrition Research Reviews*, v. 25, n. 2, p. 267–287, dez. 2012.

Ministério da Saúde do Brasil - Programa Nacional de DST/AIDS. Ministério da Saúde do Brasil, 2008. Disponível em: www.aids.gov.br/main.asp?View={CEBD192A348E4E7E8735B30000865D1C}&Mode=1 >. Acesso em: setembro 2008.

Ministério da Saúde do Brasil - Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos; 2018. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos>>. Acesso em: agosto 2019.

Ministério da Saúde do Brasil. Boletim Epidemiológico – HIV/Aids; 2018. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-hiv-aids-2018>>. Acesso em agosto 2019.

MONTGOMERY, M. K.; TURNER, N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocrine Connections*, v. 4, n. 1, p. R1–R15, 9 dez. 2014.

MORI, M. A. *et al.* Altered miRNA processing disrupts brown/white adipocyte determination and associates with lipodystrophy. *Journal of Clinical Investigation*, v. 124, n. 8, p. 3339–3351, 1 ago. 2014.

PALIOS, J.; KADOGLU, N. P. E.; LAMPROPOULOS, S. The Pathophysiology of HIV-/HAART-Related Metabolic Syndrome Leading to Cardiovascular Disorders: The Emerging Role of Adipokines. *Experimental Diabetes Research*, v. 2012, 2012.

PARKER, N. *et al.* Uncoupling protein-1 (UCP1) contributes to the basal proton conductance of brown adipose tissue mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 41, n. 4, p. 335–342, ago. 2009.

RICHARD, D. Brown fat biology and thermogenesis. *Frontiers in Bioscience*, v. 16, n. 1, p. 1233, 2011.

RODRÍGUEZ DE LA CONCEPCIÓN, M.L. *et al.* Uncoupling protein 1 gene expression implicates brown adipocytes in highly active antiretroviral therapy-associated lipomatosis. *AIDS*, v. 18, n. 6, p.959-60, abril 2004.

SAITO, M.; YONESHIO, T.; MATSUSHITA, M. Activation and recruitment of brown adipose tissue by cold exposure and food ingredients in humans. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 30, n. 4, p. 537–547, ago. 2016.

SAMPATH, SRIHARI C. *et al.* Imaging of Brown Adipose Tissue: State of the Art. *Radiology*, v. 280, n. 1, p. 4–19, jul. 2016.

SCHAURICK, D.; COELHO, D.F.; MOTTA, M. da G.C. A cronicidade no processo saúde-doença: repessando a epidemia da Aids após os anti-retrovirais. *Rev. Enfermagem da UERJ*, v. 14, n. 3, p. 455-462, 2006.

SCHÖPF, B. *et al.* Oxidative phosphorylation and mitochondrial function differ between human prostate tissue and cultured cells. *The FEBS Journal*, v. 283, n. 11, p. 2181–2196, jun. 2016.

SEVASTIANOVA, K. *et al.* Comparison of Dorsocervical With Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue in Patients With and Without Antiretroviral Therapy-Associated Lipodystrophy. *Diabetes*, v. 60, n. 7, p. 1894–1900, 1 jul. 2011.

SHEVITZ, A.H., KNOX, T.A. Nutrition in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis*, v.32, n.12, v.1769-1775, 2001.

SHUTZ, Y. Elevated resting expenditure among HIV-seropositive persons receiving highly active antirretroviral therapy. *Aids, London*, v.13, n. 11, p. 1351-1357, 1999.

SRERE, P. A. Citrate Synthase. *Methods in Enzymology*, v. 13, p. 3-11, 1969.

SRINIVASA, S. *et al.* Effects of lifestyle modification and metformin on irisin and FGF21 among HIV-infected subjects with the metabolic syndrome. *Clinical Endocrinology*, v. 82, n. 5, p. 678–685, maio 2015.

SRINIVASA, S.; GRINSPOON, S. K. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Metabolic and body composition effects of newer antiretrovirals in HIV-infected patients. *European Journal of Endocrinology*, v. 170, n. 5, p. R185–R202, maio 2014.

SUTINEN, J. YKI-JARVINEN, H. Increased resting expenditure, fat oxidation, and food intake in patients with highly active antiretroviral therapy-associated lipodystrophy. *American journal of physiology, endocrinology and metabolism*, v. 292, n.3, p. E687-92, 2007.

SUTINEN, J.; YKI-JÄRVINEN, H. Increased resting energy expenditure, fat oxidation, and food intake in patients with highly active antiretroviral therapy-associated lipodystrophy. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 292, n. 3, p. E687–E692, mar. 2007.

SWEENEY, L. L.; BRENNAN, A. M.; MANTZOROS, C. S. The role of adipokines in relation to HIV lipodystrophy: *AIDS*, v. 21, n. 8, p. 895–904, maio 2007.

TORRIANI, M. *et al.* Deiodinase 2 Expression Is Increased in Dorsocervical Fat of Patients with HIV-Associated Lipohypertrophy Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 97, n. 4, p. E602–E607, abr. 2012.

TORRIANI, M. *et al.* Dysfunctional Subcutaneous Fat With Reduced Dicer and Brown Adipose Tissue Gene Expression in HIV-Infected Patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 101, n. 3, p. 1225–1234, 1 mar. 2016.

UNAIDS. Global HIV & AIDS statistics — 2019 fact sheet. Disponível em: <<https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>> . Acesso em: agosto 2019.

VALENCAK, T. G.; OSTERRIEDER, A.; SCHULZ, T. J. Sex matters: The effects of biological sex on adipose tissue biology and energy metabolism. *Redox Biology*, v. 12, p. 806–813, 13 abr. 2017.

VASSIMON, H. S. *et al.* Hypermetabolism and altered substrate oxidation in HIV-infected patients with lipodystrophy. *Nutrition*, v. 28, n. 9, p. 912–916, set. 2012.

VASSIMON, H.S.; DE PAULA, F.J.; MACHADO, A.A.; MONTEIRO, J.P.; JORDÃO, A.A. JR. Hypermetabolism and altered substrate oxidation in HIV-infected patients with lipodystrophy. *Nutrition*, v. 28, n. 9, p. 912-6, set. 2012.

VIDAL, F. *et al.* Adipogenic/Lipid, Inflammatory, and Mitochondrial Parameters in Subcutaneous Adipose Tissue of Untreated HIV-1–Infected Long-Term Nonprogressors: Significant Alterations Despite Low Viral Burden. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v. 61, n. 2, p. 131–137, out. 2012.

VILLARROYA, J.; CEREJO, R.; VILLARROYA, F. An endocrine role for brown adipose tissue? *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 305, n. 5, p. E567–E572, set. 2013.

VIRTANEN, K. A. *et al.* Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *New England Journal of Medicine*, v. 360, n. 15, p. 1518–1525, 9 abr. 2009.

VOLP, A.C.P.; OLIVEIRA, F.C.E; ALVES, R.D.M; ESTEVES, A.E; BRESSAN, J. Energy expenditure: components and evaluation methods. *Nutr Hosp*, v. 26, n.3, p. 430-440, 2011.

WEIR, J.B. New methods for calculating metabolic rate with special references to protein metabolism. J Physiol., v. 109, p. 1-9, 1949.

YONESHIRO, T.; SAITO, M. Activation and recruitment of brown adipose tissue as anti-obesity regimens in humans. Ann Med., v. 47, n. 2, p. 133-141, mar. 2015.

YOUNG, J.; *et al.* CD4 cell count and the risk of AIDS or death in HIV-Infected adults on combination antiretroviral therapy with a suppressed viral load: a longitudinal cohort study from COHERE. PLoS Med., v. 9, n. 3, 2012.

ZEVIANI, M. Mitochondrial disorders. Brain, v. 127, n. 10, p. 2153–2172, 13 set. 2004.

Anexos:

ANEXO 1

Saúde
Ministério da Saúde

REGISTRO BRASILEIRO DE
Ensaaios Clínicos

USUÁRIO
mpguimaraes

SENHA

ENTRAR

Esqueceu a senha?
Registre-se

PT | ES | EN

NOTÍCIAS | SOBRE | AJUDA | CONTATO

Buscar ensaios

BUSCA AVANÇADA

HOME / ENSAIOS REGISTRADOS /

RBR-4zrmm4
Influência do Tecido Adiposo Marrom no metabolismo energético de Pessoas vivendo com HIV/Aids
 Data de registro: 2 de Out. de 2017 às 12:05
 Last Update: 31 de Out. de 2017 às 13:25

Tipo do estudo:
 Estudos Observacionais

Campos de Estudos Observacionais:
 Temporalidade: Cross-sectional
 Desenho do estudo observacional: Case-control

Título científico:

PT-BR

Influência do Tecido Adiposo Marrom no metabolismo energético de Pessoas vivendo com HIV/Aids

EN

Influence of Brown Adipose Tissue in energetic metabolism of People living with HIV and Aids

Identificação do ensaio
 Número do UTN: U1111-1202-9596
 Título público:

ANEXO 2

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: INFLUENCIA DO TECIDO ADIPOSEO MARROM NO METABOLISMO ENERGÉTICO DE PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS

Pesquisador: Mariana Palma Guimarães

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 57946316.9.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.789.052

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram corrigidos.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, projeto de pesquisa versão 2 de 21/09/2016 e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido versão 3 de 13/10/16 e o cartaz de recrutamento podem ser considerados APROVADOS.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

ANEXO 3

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Tel: 3602-1000

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(de acordo com a Resolução CNS 466/12 do Conselho Nacional de Saúde)

TÍTULO DO PROJETO: Influência do tecido adiposo marrom no metabolismo energético de pessoas vivendo com HIV/aids

Responsável: Mariana Palma Guimarães

Contato dos Pesquisadores Responsáveis:

Av. Bandeirantes 3900, CEP 14049-900 Ribeirão Preto/SP, Tel: (16) 3315-3367/ (16) 992185800

Supervisor: Prof. Dr. Anderson Marliere Navarro

E-mail: ou mpguimaraes@usp.br

Você está sendo convidado a participar de um trabalho de pesquisa que será desenvolvido pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

1 Justificativa e Objetivo da Pesquisa

A terapia antirretroviral aumenta a expectativa de vida dos pacientes infectados pelo HIV. Entretanto, um dos efeitos colaterais é a possibilidade de desenvolver alterações na composição corporal, de influenciar o gasto de energia do corpo e modificar as gorduras presente no corpo e no sangue. Essas alterações aumentam o risco de desenvolver doenças cardíacas. O conhecimento sobre os motivos que levam a essas alterações pode contribuir para o controle e tratamento delas. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a influência do tecido adiposo marrom no gasto de energia de pessoas vivendo com HIV/Aids com alterações na composição corporal.

2 Participação

Esta pesquisa será realizada no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP). Não será necessário que fique internado para realizar os exames. No entanto, será necessário que o senhor disponha de aproximadamente 5 horas (uma manhã inteira) para realizar os exames da pesquisa.

O senhor deverá realizar alguns exames e responder algumas perguntas.

As perguntas serão sobre a sua saúde, atividade física e alimentação.

Os exames não serão repetidos. Você será avaliado apenas uma vez por cada exame.

Serão medidos seu peso, sua altura e algumas circunferências de seu corpo. Essas avaliações serão feitas pela responsável do projeto e terá uma duração de 5 minutos.

Para o cálculo do gasto de energia de repouso, será realizado um exame pela manhã, após jejum de 12 horas. O senhor ficará deitado em uma maca, e será colocado em cima de sua cabeça um capacete transparente, o senhor continuará respirando normalmente, permanecendo 30 minutos em repouso. A coleta será feita pela responsável do projeto.

Para analisar algumas substâncias produzidas pela sua gordura, será necessário coletar 2 amostras de sangue (5 ml cada) da veia do seu braço, após jejum de 12 horas. Este exame será realizado na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do HCRP por um profissional habilitado. Após as análises, as amostras serão descartadas.

Para verificar a quantidade e a distribuição de gordura e outros tecidos de seu corpo dois exames de imagem serão feitos. Cada exame terá duração de 20 minutos, aproximadamente. Nesses exames o senhor

ficara deitado e uma máquina passará por você a uma distância de 1 metro. Em um desses exames, no entanto, a sala é fechada e terá uma temperatura média de 20°C (um pouco fria), e o senhor ouvirá um barulho alto de aproximadamente 2 segundos produzido pela máquina, podendo gerar algum incômodo para você. Estes exames serão realizados por um técnico habilitado do HCRP.

Para análise da sua gordura, será retirada uma amostra de gordura, localizada abaixo da pele, na região das costas (atrás do pescoço), equivalente à metade de uma colher de café (0,5 g). Essa amostra será coletada com uma agulha própria por um médico da equipe de radiologia músculo-esquelética sob a orientação do Dr Marcelo Henrique Nogueira-Barbosa, experiente com tais habilidades, para garantir a sua segurança. Antes de realizar o procedimento, o senhor receberá uma anestesia local para diminuir a dor relacionada ao exame. Esse exame tem duração de 30 minutos. Após as análises, as amostras serão descartadas.

É importante que o senhor saiba que tem a garantia de acesso aos resultados de todos os exames, assim que eles forem obtidos.

3 Risco

De acordo com a resolução CNS 466/2012, toda pesquisa com seres humanos envolve riscos, embora possam ser mínimos.

Ao realizar os exames de imagem o senhor será exposto ao raio-x. No entanto, a quantidade de raio-x emitida nesses exames é considerada baixa.

A retirada de uma amostra de gordura será feita após aplicação de anestesia local para minimizar possíveis desconfortos. No entanto, após o exame o local pode ficar dolorido, com hematoma, levemente inchado e eventualmente pode apresentar inflamação local. Caso o senhor note qualquer alteração no local, o senhor deverá entrar em contato com a pesquisadora responsável para ser encaminhado para avaliação médica.

A coleta de sangue também pode deixar o local dolorido e com hematomas. No entanto, nenhuma dessas avaliações pode ser prejudicial à saúde e não haverá riscos para a sua integridade física, mental ou moral.

O senhor terá direito a indenização, conforme as leis vigentes no país, caso ocorra dano decorrente da sua participação na pesquisa.

4 Benefícios

Como benefício o senhor poderá conhecer sua composição corporal e seu gasto de energia em repouso e caso seja do seu interesse, você será orientado quanto a uma alimentação saudável compatível com seu gasto de energia e seu peso saudável.

Sua participação poderá ajudar outros indivíduos no futuro com os resultados e conhecimentos obtidos a partir deste estudo.

5 Privacidade

Os dados individualizados serão confidenciais e assim que obtidos serão enviados para o senhor. Os resultados coletivos serão divulgados nos meios científicos.

6 Contato com os pesquisadores

Os números de telefone dos responsáveis estão à disposição para esclarecimento de dúvidas ou reclamações referente ao estudo.

Pesquisadora responsável: Mariana Palma Guimarães

Telefone: (16) 992185800 (24 horas)

7 Desistência

É importante que o senhor saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que o senhor pode ter liberdade de recusar ou interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios, aos quais você tem direito. Se sentir incomodado com alguma pergunta dos questionários, você não precisará respondê-la.

Em caso do senhor decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

Se tiverem dificuldades para ler ou escrever haverá um pesquisador para preencher todos os questionários.

8 Ressarcimento

Qualquer custo durante a pesquisa será por conta dos pesquisadores.

O senhor poderá receber auxílio financeiro para despesas relacionadas ao projeto, como auxílio para alimentação nos dias que virá realizar os exames em jejum e auxílio para transporte.

O senhor terá direito a uma via deste termo de consentimento devidamente assinado e rubricado em todas as páginas, podendo entrar em contato com a pesquisadora responsável caso haja alguma dúvida relacionada à sua participação na pesquisa a qualquer momento.

Nome do participante: _____

assinatura: _____ data: _____

Nome da pesquisadora: Mariana Palma Guimarães

assinatura: _____ data: _____

Para dúvidas éticas:

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Telefone: (16) 3602-2228 (das 8:00 às 17:00 horas)

ANEXO 4

Protocolo Pesquisa Doutorado : Pesquisadora Mariana Palma Guimarães

Data:

Nome Completo:

Data de Nascimento:

Endereço:

Telefone:

Estado civil:

Escolaridade:

Renda familiar:

Fumo:

Etilista:

Registro HC:

Idade:

Email:

Cor:

drogas ilícitas:

Dados Clínicos:

Hipótese diagnóstica:

Patologias prévias:

Início HIV:

TARV:

Outros Medicamentos (tempo de uso):

Peso habitual (3 meses):

Início tratamento TARV:

Composição Corporal:

P= E=

CB (não dominante)=

Lipoatrofia:

Lipohipertrofia:

CA (ponto médio)=

Bioquímicos:

-TCD4= (data)

-CV=

-TSH=

Pratica exercício físico regularmente?

Tipo:

Frequência:

ANEXO 5

Questionario de AF Habitual

Por favor, cricule a resposta apropriada.

Nos últimos 12 meses:

1) Qual tem sido sua principal ocupação? (1, 3, 5)

2) No trabalho eu sento: (1, 2, 3, 4, 5)

nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / sempre

3) No trabalho eu fico em pé: (1, 2, 3, 4, 5)

nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / sempre

4) No trabalho eu ando: (1, 2, 3, 4, 5)

nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / sempre

5) No trabalho eu carrego carga pesada: (1, 2, 3, 4, 5)

nunca/ raramente/ algumas vezes/ frequentemente/ sempre

6) Após o trabalho eu estou cansado: (5, 4, 3, 2, 1)

muito freqüentemente / freqüentemente / algumas vezes / raramente / nunca

7) No trabalho eu suco: (5, 4, 3, 2, 1)

muito freqüentemente / freqüentemente / algumas vezes / raramente / nunca

8) Em comparação com outros da minha idade eu penso que meu trabalho é fisicamente:
(5, 4, 3, 2, 1)

muito mais pesado/ mais pesado / tão pesado quanto / mais leve / muito mais leve

9) Você pratica ou praticou esporte ou exercício físico nos últimos 12 meses: sim / não

-Qual esporte ou exercício físico você pratica ou praticou mais freqüentemente? (1, 3, 5)

-quantas horas por semana? <1, 1-2, 2-3, 3-4, >4

-quantos meses por ano? <1, 1-3, 4-6, 7-9, >9

-Se você faz um, fez segundo esporte ou exercício físico, qual o tipo? (1, 3, 5)

-quantas horas por semana? <1, 1-2, 2-3, 3-4, >4

-quantos meses por ano? <1, 1-3, 4-6, 7-9, >9

10) Em comparação com outros da minha idade eu penso que minha atividade física durante as horas de lazer é: (5, 4, 3, 2, 1)

muito maior / maior / a mesma / menor / muito menor

11) Durante as horas de lazer eu suoi: (5, 4, 3, 2, 1)

muito freqüentemente / freqüentemente / algumas vezes / raramente / nunca

12) Durante as horas de lazer eu pratico esporte ou exercício físico: (1, 2, 3, 4, 5)

nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / muito freqüentemente

13) Durante as horas de lazer eu vejo televisão: (1, 2, 3, 4, 5)

nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / muito freqüentemente

14) Durante as horas de lazer eu ando (1, 2, 3, 4, 5)

nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / muito freqüentemente

15) Durante as horas de lazer eu ando de bicicleta: (1, 2, 3, 4, 5)

nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / muito freqüentemente

16) Durante quantos minutos por dia você anda a pé ou de bicicleta indo e voltando do trabalho, escola ou compras? <5 / 5-15 / 16-30 / 31-45 / >45

Fórmulas para cálculo dos escores do questionário Baecke de AFH

ATIVIDADES FÍSICAS OCUPACIONAIS (AFO)	
$\text{Escore de AFO} = \frac{\text{questão 1} + (6 - \text{questão 2}) + \text{questão 3} + \text{questão 4} + \text{questão 5} + \text{questão 6} + \text{questão 7} + \text{questão 8}}{8}$	
Cálculo da primeira questão referente ao tipo de ocupação:	
<p>◆ Intensidade (tipo de ocupação)=1 para profissões com gasto energético leve ou 3 para profissões com gasto energético moderado ou 5 para profissões com gasto energético vigoroso (determinado pela resposta do tipo de ocupação: o gasto energético da profissão deve ser conferido no compêndio de atividades físicas de Ainsworth)</p>	
EXERCÍCIOS FÍSICOS NO LAZER (EFL)	
Cálculo da questão 9 referente a prática de esportes/exercícios físicos:	
<ul style="list-style-type: none"> Intensidade (tipo de modalidade)=0,76 para modalidades com gasto energético leve ou 1,26 para modalidades com gasto energético moderado ou 1,76 para modalidades com gasto energético vigoroso (determinado pela resposta do tipo de modalidade: o gasto energético da modalidade deve ser conferido no compêndio de atividades físicas de Ainsworth) Tempo (horas por semana)=0,5 para menos de uma hora por semana ou 1,5 entre maior que uma hora e menor que duas horas por semana ou 2,5 para maior que duas horas e menor que três horas por semana ou 3,5 para maior que três e até quatro horas por semana ou 4,5 para maior que quatro horas por semana (determinado pela resposta das horas por semana de prática) Proporção (meses por ano)=0,04 para menor que um mês ou 0,17 entre um a três meses ou 0,42 entre quatro a seis meses ou 0,67 entre sete a nove meses ou 0,92 para maior que nove meses (determinado pela resposta dos meses por ano de prática) 	

- ◆ Para o cálculo desta questão, os valores devem ser multiplicados e somados:

$$[\text{Modalidade 1}=(\text{Intensidade} \times \text{Tempo} \times \text{Proporção}) + \text{Modalidade 2}=(\text{Intensidade} \times \text{Tempo} \times \text{Proporção})]$$

- ◆ Após o resultado deste cálculo, para o valor final da questão 9, deverá ser estipulado um escore de 0 a 5 de acordo com os critérios especificados abaixo:

$$[0 \text{ (sem exercício físico)}=1 / \text{entre } 0,01 \text{ até } <4=2 / \text{entre } 4 \text{ até } <8=3 / \text{entre } 8 \text{ até } <12=4 / \geq 12,00=5]$$

Os escores das questões dois a quatro serão obtidos de acordo com as respostas das escalas de Likert

O escore final de EFL deverá ser obtido de acordo com a fórmula especificada abaixo:

$$\text{Escore de EFL} = \frac{\text{questão 9} + \text{questão 10} + \text{questão 11} + \text{questão 12}}{4}$$

ATIVIDADES FÍSICAS DE LAZER E LOCOMOÇÃO (ALL)

Os escores das questões cinco a oito serão obtidos de acordo com as respostas das escalas de Likert

O escore final de ALL deverá ser obtido de acordo com a fórmula especificada abaixo:

$$\text{Escore de ALL} = \frac{(6 - \text{questão 13}) + \text{questão 14} + \text{questão 15} + \text{questão 16}}{4}$$

$$\text{ESCORE TOTAL DE ATIVIDADE FÍSICA (ET)} = \text{AFO} + \text{EFL} + \text{ALL}$$

QUADRO 1 Questionário de atividade física habitual					
Por favor, circule a resposta apropriada para cada questão pensando nos últimos 12 meses:					
1. Você pratica ou praticou esporte ou exercício físico nos últimos 12 meses: sim/não Qual esporte ou exercício físico você pratica ou praticou mais frequentemente?					
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> – quantas horas por semana? – quantos meses por ano? Se você faz ou fez um segundo esporte ou exercício físico, qual o tipo? – quantas horas por semana? – quantos meses por ano? </div> <div> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> </div> </div>					
2. Em comparação com outros da minha idade, eu penso que minha atividade física durante as horas de lazer é: muito maior/maior/a mesma/menor/muito menor	5	4	3	2	1
3. Durante as horas de lazer eu sou: muito frequentemente/freqüentemente/algumas vezes/raramente/nunca	5	4	3	2	1
4. Durante as horas de lazer eu pratico esporte ou exercício físico: nunca/raramente/algumas vezes/freqüentemente/muito frequentemente	1	2	3	4	5
5. Durante as horas de lazer eu vejo televisão: nunca/raramente/algumas vezes/freqüentemente/muito frequentemente	1	2	3	4	5
6. Durante as horas de lazer eu ando: nunca/raramente/algumas vezes/freqüentemente/muito frequentemente	1	2	3	4	5
7. Durante as horas de lazer eu ando de bicicleta: nunca/raramente/algumas vezes/freqüentemente/muito frequentemente	1	2	3	4	5
8. Durante quantos minutos por dia você anda a pé ou de bicicleta indo e voltando do trabalho, escola ou compras? < 5/5-15/16-30/31-45/> 45	1	2	3	4	5
Total em minutos					

QUADRO 2	
Fórmulas para cálculo dos escores do questionário Baecke de AFH	
Exercícios físicos no lazer (EFL)	
Cálculo da primeira questão referente à prática de esportes/exercícios físicos:	
<ul style="list-style-type: none"> • Intensidade (tipo de modalidade) = 0,76 para modalidades com gasto energético leve ou 1,26 para modalidades com gasto energético moderado ou 1,76 para modalidades com gasto energético vigoroso (determinado pela resposta do tipo de modalidade: o gasto energético da modalidade deve ser conferido no compêndio de atividades físicas de Ainsworth¹³⁾) • Tempo (horas por semana) = 0,5 para menos de uma hora por semana ou 1,5 entre maior que uma hora e menor que duas horas por semana ou 2,5 para maior que duas horas e menor que três horas por semana ou 3,5 para maior que três e até quatro horas por semana ou 4,5 para maior que quatro horas por semana (determinado pela resposta das horas por semana de prática) • Proporção (meses por ano) = 0,04 para menor que um mês ou 0,17 entre um e três meses ou 0,42 entre quatro e seis meses ou 0,67 entre sete e nove meses ou 0,92 para maior que nove meses (determinado pela resposta dos meses por ano de prática) 	
<p>Para o cálculo do escore desta questão, os valores devem ser multiplicados e somados: Modalidade 1 = (Intensidade*Tempo*Proporção) + Modalidade 2 = (Intensidade*Tempo*Proporção) Para o valor final, será estipulado um escore de acordo com os valores obtidos na fórmula: 0 (sem exercício físico) = 1/entre 0,01 até < 4 = 2/entre 4 até < 8 = 3/entre 8 até < 12 = 4/≥ 12,00 = 5</p>	
<p>Os escores das questões dois a quatro serão obtidos de acordo com as respostas das escalas de Likert O escore final de EFL deverá ser obtido de acordo com a fórmula especificada abaixo:</p>	
$\text{Escore de EFL} = \frac{\text{questão 1} + \text{questão 2} + \text{questão 3} + \text{questão 4}}{4}$	
Atividades físicas de lazer e locomoção (ALL)	
<p>Os escores das questões cinco a oito serão obtidos de acordo com as respostas das escalas de Likert O escore final de ALL deverá ser obtido de acordo com a fórmula especificada abaixo:</p>	
$\text{Escore de ALL} = \frac{(6 - \text{questão 5}) + \text{questão 6} + \text{questão 7} + \text{questão 8}}{4}$	
<p>Escore total (ET) = EFL + ALL</p>	

Retirado de Florindo, AA; Latorre, MRDO. Validação e reprodutibilidade do questionário de Baecke de avaliação da atividade física habitual em homens adultos. Rev Bras Med Esporte _ Vol. 9, Nº 3 – Mai/Jun, 2003.

ANEXO 6

Tabela 7 Expressão de mRNA dos genes *PPAR γ* , *ADIPOQ*, *PGC1 α* , *COX4/1*, *DIO2* e *DICER* no tecido adiposo subcutâneo dos grupos do estudo. Dados expressos em mediana e interquartil.

Genes	CTRL (n=8)	HIV+ (n=10)	HIV+LIPO+ (n=7)	p-valor
	mediana $\pm$ SEM (min-máx)	mediana $\pm$ SEM (min-máx)	mediana $\pm$ SEM (min-máx)	
<i>PPARγ</i>	1,02 $\pm$ 2,4 (0,18 - 19,8)	2,75 $\pm$ 1,5 (0,16 - 16,20)	3,1 $\pm$ 3,06 (0,03 - 22,8)	0,625
<i>ADIPOQ</i>	1,01 $\pm$ 6,7 (0,20 - 54,60)	2,9 $\pm$ 5,2 (0,17 - 54,10)	7,9 $\pm$ 3,9 (0,00 - 25,6)	0,845
<i>PGC1α</i>	1,02 $\pm$ 0,43 (0,25 - 3,25)	0,84 $\pm$ 0,60 (0,12 - 5,74)	0,70 $\pm$ 0,50 (0,17 - 3,9)	0,798
<i>COX4/1</i>	1,01 $\pm$ 0,79 (0,46 - 7,00)	2,24 $\pm$ 0,58 (0,32 - 5,69)	3,23 $\pm$ 0,95 (0,28 - 6,9)	0,817
<i>DIO2</i>	1,0 $\pm$ 0,27 (0,007 - 1,91)	0,62 $\pm$ 1,07 (0,006 - 10,82)	0,15 $\pm$ 0,79 (0,003 - 5,8)	0,841
<i>DICER</i>	1,0 $\pm$ 1,67 (0,21 - 14,24)	1,98 $\pm$ 0,99 (0,39 - 8,74)	2,29 $\pm$ 2,01 (0,26- 16,9)	0,570

Nota: Teste de Kruskal-Wallis. SEM, erro padrão da média.