**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO**

**Polimorfismo da região do Fator de Necrose Tumoral (TNF)
na síndrome da lipodistrofia associada à terapia anti-
retroviral em portadores do HIV-1**

Mariana Machado da Silva

RIBEIRÃO PRETO

2008

Mariana Machado da Silva

**Polimorfismo da região do Fator de Necrose Tumoral (TNF)
na síndrome da lipodistrofia associada à terapia anti-
retroviral em portadores do HIV-1**

Dissertação apresentada à Escola de
Enfermagem de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Enfermagem Fundamental,
junto ao Departamento de Enfermagem Geral e
Especializada, inserido na linha de pesquisa:
Ciência e Tecnologia em Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Morais Fernandes

RIBEIRÃO PRETO

2008

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Mariana Machado da

Polimorfismos da região do Fator de Necrose Tumoral (TNF) na
síndrome da lipodistrofia associada à terapia anti-retroviral em
portadores do HIV-1.

Ribeirão Preto, 2008.

154 p.:IL.; 30 cm

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão
Preto/USP. Área de concentração: Ciência e tecnologia em saúde.

Orientadora: Fernandes, Ana Paula Moraes

1. Microssatélites. 2. TNF. 3. HIV. 4. Síndrome da Lipodistrofia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariana Machado da Silva

Polimorfismos da região do Fator de Necrose Tumoral (TNF) na síndrome da lipodistrofia associada à terapia anti-retroviral em portadores do HIV-1.

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Enfermagem Fundamental, junto ao Departamento de Enfermagem Geral e Especializada, inserido na linha de pesquisa: Ciência e Tecnologia em Saúde.

Aprovada em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Dedico este trabalho àqueles que, mesmo de longe, fizeram-me forte. Meus pais,
Luiz e Keila, e ao meu amor, Flaviano.**

**Agradeço à Prof^a. Dr^a. Ana Paula Moraes Fernandes por ser minha orientadora,
minha chefe, minha amiga e, sempre que necessário, minha mãe. Por ter me
deixado livre o suficiente para fazer minhas escolhas e por ter me cobrado na
hora certa para que eu não esquecesse daquilo que escolhi.**

Ao Prof. Dr. Donadi pela co-orientação e pelo sorriso sempre aberto.

**Aos meus queridos e inesquecíveis amigos de laboratório, Renata, Erick. Neifi,
Gustavo, Isabela e Emília.**

Às minhas amigas Andressa, Iara, Isabela, Luciana e Roberta.

A toda minha família, meus avós, minha irmã, tios e primos.

Obrigada!

O Anjo Mais Velho

O dia mente a cor da noite
E o diamante a cor dos olhos
Os olhos mentem dia e noite a dor da gente

Enquanto houver você do outro lado
Aqui do outro eu consigo me orientar
A cena repete a cena se inverte
enchendo a minha alma d'aquilo que outrora eu deixei de acreditar

tua palavra, tua história
tua verdade fazendo escola
e tua ausência fazendo silêncio em todo lugar

metade de mim
agora é assim
de um lado a poesia o verbo a saudade
do outro a luta, a força e a coragem pra chegar no fim
e o fim é belo incerto... depende de como você vê
o novo, o credo, a fé que você deposita em você e só

Só enquanto eu respirar
Vou me lembrar de você

RESUMO

SILVA, M.M. **Polimorfismo do Fator de Necrose Tumoral (TNF) na síndrome da lipodistrofia associada à terapia anti-retroviral em portadores do HIV-1**. 2008. 154 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Apesar de causar um enorme impacto na história da evolução e prognóstico a partir da infecção pelo HIV, a terapia anti-retroviral altamente potente prolongada apresenta vários efeitos colaterais. Dentre esses, a síndrome da lipodistrofia (SL) caracterizada por alterações metabólicas e morfológicas. Embora tenha sido descrito que a adesão à terapia esteja associada, sua patogenia ainda permanece desconhecida. Um enfoque têm sido dado aos mediadores pró-inflamatórios, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF), sugerindo que o aumento nos níveis dessa citocina esteja associado com o desenvolvimento da SL. Como os sítios polimórficos têm sido associados com a magnitude da produção de citocinas, no presente estudo avaliamos a frequência de alguns sítios polimórficos na região do gene que codifica o TNF em portadores do HIV/aids apresentando ou não a SL.

Para avaliar o polimorfismo genético dos microssatélites TNFa-e e da região promotora do TNF (TNF-308 e TNF-238) foram estudados 117 portadores do HIV-1 usando terapia anti-retroviral (67 com SL e 50 sem SL) e 131 controles saudáveis. Os microssatélites e região promotora do TNF foram tipificados usando DNA genômico hibridizado com iniciadores específicos. Os pacientes foram arrolados no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP).

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher. Quando consideramos as comparações das frequências dos alelos dos microssatélites da região do TNF podemos inferir que a presença do alelo TNFa5 pode conferir proteção aos indivíduos portadores do HIV/aids no desenvolvimento da SL. Já as comparações dos alelos da região promotora do TNF nos sugerem que a presença do alelo TNF-308G, assim como seu homozigoto TNF-308GG, podem conferir susceptibilidade para o desenvolvimento da SL. A presença do haplótipo TNFe3 d3 -238G -308A c1 a5 b7 sugere proteção para o desenvolvimento dessa síndrome.

Esse é o primeiro estudo associando o polimorfismo dos microssatélites do TNF com a SL e aponta diversas associações entre alelos da região do gene que codifica o TNF com a SL. Embora os mecanismos relacionados com a participação do TNF no desenvolvimento da SL não estejam bem esclarecidos, este estudo sugere que fatores imunogenéticos associados com a magnitude de expressão do TNF e, provavelmente da expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, estejam envolvidas no desenvolvimento da SL em portadores do HIV/aids.

Descritores: Microssatélites. TNF. HIV. Síndrome da Lipodistrofia

ABSTRACT

SILVA, M.M. **Polymorfism of the Tumoral Necrosis Factor (TNF) in antiretroviral-associated lipodystrophy syndrome in HIV-1-infected patients**. 2008. 154 p. Thesis (Master's) – University of São Paulo at Ribeirão Preto College of Nursing, Ribeirão Preto, 2008.

Despite causing a significant impact in the history of evolution and prognosis after HIV infection, the highly potent antiretroviral therapy causes various side effects, which include lipodystrophy syndrome (LS), characterized by metabolic and morphologic changes. Although it has been reported that treatment compliance is associated, LS pathogenesis remains unknown. Special attention has been given to proinflammatory mediators, such as the Tumoral Necrosis Factor (TNF), suggesting that the increase in levels of this cytokine is associated with the development of LS. Since polymorphic sites have been associated with the magnitude of cytokine production, in the present study we evaluated the frequency of some polymorphic sites in the gene region that codes TNF in HIV/aids-infected patients presenting LS or not.

In order to evaluate the genetic polymorphism of TNFa-e microsatellites and of the TNF promoter region (TNF-308 and TNF-238), 117 HIV-1 infected patients using antiretroviral therapy (67 with LS and 50 without LS) and 131 healthy controls were studied. Microsatellites and the TNF promoter region were typified using hybridized genomic DNA with specific initiators. Patients were selected at the Clinics Hospital of the University of São Paulo (HCFMRP-USP).

Statistical analysis was performed using the Fisher's exact test. Comparisons of the frequencies of microsatellite alleles of the TNF region suggest that the presence of the TNFa5 allele could provide HIV/aids patients with protection against developing LS. In addition, comparisons of alleles of the TNF promoter region suggest that the presence of TNF-308G allele, as well as of its homozygote TNF-308GG could pose susceptibility to developing LS. The presence of the haplotype, TNFe3 d3 -238G -308A c1 a5 b7, suggests protection against developing that syndrome.

The present study is the first to associate TNF microsatellite polymorphism with LS, indicating several associations among alleles of the gene region that codes TNF

with LS. Although the mechanisms regarding the participation of TNF in the development of LS are not clear, this study suggests that immunogenetic factors associated with the TNF expression magnitude and probably the expression of other proinflammatory cytokines are involved in the development of LS in HIV/aids infected patients.

Descriptors: Microsatellites. TNF. HIV. Lipodystrophy Syndrome

RESUMEN

SILVA, M.M. **Polimorfismo del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) en el síndrome de la lipodistrofia asociada a la terapia antiretroviral en portadores de VIH-1.** 2008. 154 h. Tesis (Maestría) - Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A pesar del gran impacto que causa en la historia de la evolución y el diagnóstico en la infección por VIH, el tratamiento antiretroviral de acción prolongada presenta varios efectos colaterales. Dentro de los cuales, el síndrome de lipodistrofia (SL) el cual se caracteriza por alteraciones metabólicas y morfológicas. En la actualidad se ha descrito que la adhesión al tratamiento esta asociada con dicha patología, lo cual aun permanece desconocido. Un enfoque ha sido brindado por los mediadores pro-inflamatorios, como es el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), sugiriendo que el aumento en los niveles de esa citocina esta asociado con el desarrollo de SL. Los sitios polimorficos han sido asociados con una magnitud en la producción de citocinas, es así que en el presente estudio validamos la frecuencia de algunos sitios polimorficos en la región del gen que codifica a TNF en portadores de VIH/aids que presentan o no SL.

Para validar el polimorfismo genético de los microsatelites TNFa-e y de la región promotora de TNF (TNF-308 y TNF-238) fueron estudiados 117 pacientes portadores de VIH-1 quienes tenían tratamiento antiretroviral (67 con SL y 50 sin SL) y 131 controles saludables. Los microsatélites y la región promotora de TNF fueron tipificados usando híbridos de DNA genómico con iniciadores específicos. Los pacientes acudieron al Hospital de las Clínicas de la Universidad de São Paulo (HCFMRP-USP).

El análisis estadístico fue realizado utilizando la prueba de Fisher. Cuando consideramos las comparaciones de las frecuencias de los alelos de los microsatélites de la región de TNF podemos inferir que la presencia del alelo TNFa5 puede conferir protección a los individuos portadores de VIH/aids en el desarrollo de SL. Las comparaciones de los alelos de la región promotora de TNF nos sugieren que la presencia del alelo TNF-308G, así como su homocigoto TNF-308GG pueden conferir susceptibilidad para el desarrollo de SL. La presencia del haplotipo TNFe3 d3 -238G - 308A c1 a5 b7, sugiere protección para el desarrollo de este síndrome.

El presente estudio es el primero asociado a polimorfismo de microsatélites de TNF con SL, aquí se establecen diversas asociaciones entre los alelos de la región del gen que codifica a TNF con SL. Así mismo los mecanismos relacionados con la participación de TNF en el desarrollo de SL no están bien claros, este estudio sugiere que los factores inmunogenéticos asociados con la magnitud de la expresión de TNF, y probablemente de la expresión de otras citocinas pro inflamatorias, están involucradas en el desarrollo de SL en pacientes con VIH/aids.

Palabras claves: Microsatélite. TNF. VIH. Síndrome de la Lipodistrofia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de Replicação do HIV e mecanismo de ação dos anti-retrovirais.....	29
Figura 2- Lipoatrofia facial.....	33
Figura 3- Lipoatrofia facial.....	33
Figura 4- Hipertrofia abdominal e lipoatrofia de membros superiores.....	34
Figura 5- Lipoatrofia de membros inferiores.....	34
Figura 6- Hipertrofia da região dorso cervical.....	35
Figura 7- Localização dos microssatélites na região do TNF.....	40
Figura 8- Gel de poliacrilamida 12% mostrando a mobilidade eletroforética dos alelos do STR TNFb.....	71
Figura 9- Gel de poliacrilamida 12% mostrando a mobilidade eletroforética dos alelos do STR TNFe.....	71
Figura 10- Gel de poliacrilamida 10% mostrando a mobilidade eletroforética dos SNPs - 308 do gene TNF.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais características dos microssatélites (STRs) do gene TNF.....	40
Tabela 2- Valores de referência dos lipídeos para indivíduos adultos.....	59
Tabela 3- Reagentes utilizados para a primeira amplificação dos microssatélites TNFa/b e TNFd/e.....	64
Tabela 4- Reagentes utilizados para a segunda amplificação dos microssatélites TNFa, TNFb, TNFd e TNFe.....	65
Tabela 5- Reagentes utilizados para a amplificação do microssatélite TNFc.....	66
Tabela 6- Relação dos iniciadores sequência - específicos utilizados.....	66
Tabela 7- Condições de amplificação do loco do TNFc e primeira amplificação dos loci dos TNFa/b e TNFd/e.....	67
Tabela 8- Condições da segunda amplificação dos loci dos TNFa, TNFb, TNFd e TNFe.....	67
Tabela 9- Condições específicas para eletroforese de cada STR.....	69
Tabela 10- Relação dos iniciadores utilizados para a detecção dos polimorfismos dos SNPs -308 do gene TNF.....	73
Tabela 11- Relação dos iniciadores utilizados para a detecção dos polimorfismos dos SNPs -238 do gene TNF.....	73
Tabela 12- Reagentes utilizados para a amplificação dos SNPs -308 e -238 do TNF.....	74
Tabela 13- Condições de amplificação dos SNPs -308 e -238 do TNF.....	74

Tabela 14- Condições específicas para eletroforese de cada loco.....	75
Tabela 15- Características dos pacientes com e sem a Síndrome da Lipodistrofia: dados demográficos, terapia anti-retroviral e parâmetros metabólicos.....	83
Tabela 16- Comparações das frequências relacionadas ao esquema terapêutico adotado.....	84
Tabela 17- Distribuição das frequências alélicas dos microssatélites do TNFa, TNFb, TNFc, TNFd, TNFe entre o grupo de pacientes com ou sem a síndrome da lipodistrofia e controles saudáveis.....	94
Tabela 18- Distribuição das frequências dos alelos do TNF -238 entre os grupos de pacientes com e sem a síndrome da lipodistrofia e controles saudáveis.....	102
Tabela 19- Distribuição das frequências dos alelos do TNF -308 entre os grupos de pacientes com e sem a síndrome da lipodistrofia e controles saudáveis.....	102

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Comparações das frequências relacionadas ao esquema terapêutico adotado entre os grupos de pacientes com ou sem a síndrome da lipodistrofia.....	85
Gráfico 2- Comparações das frequências relacionadas ao esquema terapêutico adotado - Presença ou não de medicamento da classe dos inibidores da protease.....	86
Gráfico 3- Distribuição das frequências alélicas para o loco TNFa em pacientes com ou sem a síndrome da lipodistrofia e controles saudáveis.....	95
Gráfico 4- Distribuição das frequências alélicas para o loco TNFb em pacientes com ou sem a síndrome da lipodistrofia e controles saudáveis.....	96
Gráfico 5- Distribuição das frequências alélicas para o loco TNFc em pacientes com ou sem a síndrome da lipodistrofia e controles saudáveis.....	97
Gráfico 6- Distribuição das frequências alélicas para o loco TNFd em pacientes com ou sem a síndrome da lipodistrofia e controles saudáveis.....	98
Gráfico 7- Distribuição das frequências alélicas para o loco TNFe em pacientes com ou sem a síndrome da lipodistrofia e controles saudáveis.....	99
Gráfico 8- Distribuição das frequências alélicas do TNF -238 em pacientes com ou sem a síndrome da lipodistrofia e controles saudáveis.....	103
Gráfico 9- Distribuição das frequências alélicas do TNF -308 em pacientes com ou sem a síndrome da lipodistrofia e controles saudáveis.....	104
Gráfico 10- Distribuição haplotípica dos microssatélites do TNF em pacientes com ou sem a síndrome da lipodistrofia e controles saudáveis.....	107

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	22
1.1- HIV e aids.....	22
1.2- Síndrome da Lipodistrofia.....	30
1.3- Marcadores Genéticos Polimórficos.....	36
1.4- Fator de Necrose Tumoral.....	37
<i>1.4.1- Complexo Principal de Histocompatibilidade.....</i>	<i>37</i>
<i>1.4.2- Polimorfismo do gene TNF.....</i>	<i>38</i>
<i>1.4.3- Função Biológica do TNF.....</i>	<i>41</i>
<i>1.4.4- Associação do Polimorfismo do gene TNF com Doenças.....</i>	<i>42</i>
<i>1.4.4.1- Genótipo TNF e Câncer.....</i>	<i>42</i>
<i>1.4.4.2- Genótipo TNF e Doença Auto Imune.....</i>	<i>43</i>
<i>1.4.4.3- Genótipo TNF e Infecção Viral.....</i>	<i>44</i>
1.5- Síndrome da Lipodistrofia e TNF.....	45
2- JUSTIFICATIVA.....	48
3- OBJETIVOS.....	50
3.1- Geral.....	50
3.2- Específicos.....	50
4- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	52
4.1- Delineamento do Estudo e Aspectos Éticos.....	52
4.2- Local de Estudo.....	52
4.3- Indivíduos Estudados.....	53

4.4- População de Estudo.....	54
4.4.1- <i>Critérios de Inclusão.....</i>	<i>54</i>
4.4.2- <i>Critérios de Exclusão.....</i>	<i>54</i>
4.5- Controle Patológico.....	55
4.5.1- <i>Critérios de Inclusão.....</i>	<i>55</i>
4.5.2- <i>Critérios de Exclusão.....</i>	<i>55</i>
4.6- Controles Saudáveis.....	55
4.7- Variáveis do Estudo.....	56
4.7.1- <i>Variáveis Sócio Demográficas.....</i>	<i>56</i>
4.7.2- <i>Variáveis Relacionadas à Infecção pelo HIV e ao Tratamento.....</i>	<i>56</i>
4.7.3- <i>Variáveis Relacionadas aos Dados Somatométricos.....</i>	<i>57</i>
4.7.4- <i>Variáveis Relacionadas as Alterações Clínico Laboratoriais e Condições Atuais de Infectologia.....</i>	<i>57</i>
4.7.5- <i>Variáveis Relacionadas as Alterações Morfológicas da Síndrome da Lipodistrofia.....</i>	<i>60</i>
4.8- Instrumento de Coleta de Dados.....	60
4.9- Coleta, Processamento das Amostras Biológicas, e Padronização das Técnicas para Detecção dos Polimorfismos.....	61
4.9.1- <i>Obtenção de Sangue Periférico e DNA.....</i>	<i>61</i>
4.9.2- <i>Tipificação dos Microssatélites do Gene do TNF.....</i>	<i>62</i>
4.9.2.1- <i>Amplificação do DNA.....</i>	<i>62</i>
4.9.2.2- <i>Análise do Produto Amplificado.....</i>	<i>68</i>

4.9.2.3- Coloração com Nitrato de Prata.....	70
4.9.2.4- Registro dos Resultados.....	71
4.9.3- Tipificação da Região Promotora do TNF.....	72
4.10- Análises Estatísticas.....	76
4.10.1- Estimativa das Frequências Alélicas e Genotípicas.....	76
4.10.2- Teste Exato de Diferenciação Populacional.....	77
4.10.3- Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	77
4.10.4- Desequilíbrio de Ligação entre os Locos e Inferência de Haplotipos STR...78	
5- RESULTADOS.....	80
5.1- Caracterização das Amostras.....	80
5.1.1- Pacientes com a Síndrome da Lipodistrofia.....	80
5.1.2- Pacientes sem a Síndrome da Lipodistrofia.....	81
5.1.3- Comparações do Esquema Terapêutico Adotado entre Pacientes apresentando ou não a Síndrome da Lipodistrofia.....	83
5.2- Tipificação dos STRs do Loco Codificante do TNF.....	87
5.2.1- Comparações das Frequências dos Alelos de Microssatélites do TNF.....	89
TNFa.....	89
TNFb.....	90
TNFc.....	92
TNFd.....	93
TNFe.....	93
5.2.2- Tipificação do Polimorfismo da Região Promotora do TNF -308 e TNF- 238.....	100

<i>TNF -238.....</i>	<i>100</i>
<i>TNF -308.....</i>	<i>100</i>
5.3- Inferência de Haplótipos e Análise da Diversidade Haplotípica.....	105
6- DISCUSSÃO.....	109
7- CONCLUSÃO.....	120
8- APLICABILIDADE PARA ENFERMAGEM.....	122
9- REFERÊNCIAS.....	123
APÊNDICE.....	142
<i>APÊNDICE A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Apresentado aos Pacientes.....</i>	<i>143</i>
<i>APÊNDICE B- Instrumento de Coleta de dados.....</i>	<i>144</i>
<i>APÊNDICE C- Caracterização dos Pacientes.....</i>	<i>145</i>
ANEXOS.....	152
<i>ANEXO A- Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....</i>	<i>153</i>
<i>ANEXO B- Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....</i>	<i>154</i>

Introdução

1- INTRODUÇÃO

1.1- HIV e aids

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um retrovírus com genoma RNA, da Família Retroviridae (retrovírus) e subfamília *Lentivirinae*. Pertence ao grupo dos retrovírus citopáticos e não-oncogênicos que necessitam, para multiplicar-se, de uma enzima denominada transcriptase reversa, responsável pela transcrição do RNA viral para uma cópia DNA, que pode, então, integrar-se ao genoma do hospedeiro (HENRY, 2006). Estruturalmente, o HIV constitui-se de partícula icosaédrica, composta de um envelope fosfolipídico, onde estão inseridas proteínas virais como as glicoproteínas, gp120 e gp41, essenciais para a sua replicação (VALENTE et al., 2005).

Em 1983, o HIV-1 foi isolado de pacientes com aids pelos pesquisadores Luc Montaigner, na França, e Robert Gallo, nos EUA, recebendo os nomes de LAV (Lymphadenopathy Associated Virus ou Vírus Associado à Linfadenopatia) e HTLV-III (Human T-Lymphotropic Virus ou Vírus T-Linfotrópico Humano tipo III) respectivamente nos dois países. Em 1986, foi identificado um segundo agente etiológico, também retrovírus, com características semelhantes ao HIV-1, denominado HIV-2. Nesse mesmo ano, um comitê internacional recomendou o termo HIV (Human Immunodeficiency Virus ou Vírus da Imunodeficiência Humana) para denominá-lo, reconhecendo-o como capaz de infectar seres humanos (VALENTE et al., 2005).

O HIV provoca importantes alterações no sistema imunitário dos indivíduos por ele infectados, levando à deficiência da imunidade celular e conseqüente suscetibilidade a uma série de infecções oportunistas (LANE et al., 1985).

O sistema imunitário consiste em um sofisticado meio de vigilância do organismo. Composto por células e proteínas, tanto circulantes como de superfície das membranas, seu funcionamento vem sendo melhor entendido nos últimos 20 anos, em grande parte, por conta do avanço nas pesquisas para o combate à epidemia do HIV/aids (BERNARDI, 2005).

Três grupos de células participam da defesa do organismo contra agentes estranhos. Dois deles, os neutrófilos e os monócitos/macrófagos, agem através da fagocitose. O terceiro é constituído pelos linfócitos, que participam de outras reações de proteção denominadas resposta imune adquirida (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003). Os linfócitos são as células capazes de reconhecer especificamente e responder aos agentes estranhos. Existem distintas subpopulações de linfócitos que diferem no modo pelo qual reconhecem e combatem os agentes estranhos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003).

Os linfócitos B são aqueles capazes de reconhecer patógenos extracelulares e de superfície celular e produzir anticorpos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003). Os linfócitos T são os mediadores da imunidade celular, e são também divididos em subpopulações funcionalmente distintas. As células TCD4⁺ ou auxiliares são células centrais da resposta imune adquirida, pois interagem com as demais células do sistema imunitário do hospedeiro. As células TCD8⁺ ou citotóxicas agem sobre as células que produzem antígenos estranhos, como é o caso das células infectadas por vírus e outros micróbios intracelulares (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003).

Além das células TCD4⁺, o HIV também tem efeitos marcantes em outras células do sistema imunológico, especialmente as TCD8⁺. A relação CD4/CD8 altera-se gradativamente na infecção pelo HIV, inicialmente pelo aumento de células TCD8⁺,

como resposta à infecção inicial e, posteriormente, pela diminuição intensa de células TCD4+ (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003).

A infecção pelo HIV pode ser dividida em quatro fases clínicas: 1) infecção aguda; 2) fase assintomática, também conhecida como latência clínica; 3) fase sintomática inicial ou precoce; e 4) aids. A fase de infecção aguda ocorre em cerca de 50% a 90% dos pacientes, sendo que o tempo entre a exposição e o aparecimento dos sintomas é de cinco a 30 dias. As manifestações clínicas podem variar, desde quadro gripal até síndrome mononucleose com febre, adenopatia, exantema e faringite. Após a resolução da fase aguda, ocorre a estabilização da viremia. A queda da contagem de linfócitos TCD4+, de 30 a 90 células por ano, está diretamente relacionada à velocidade da replicação viral e progressão para a aids (KAHN, 1998).

Na fase assintomática o estado clínico básico é mínimo ou inexistente, podendo alguns pacientes apresentar linfadenopatia generalizada persistente. A fase sintomática inicial caracteriza-se pelo início do desenvolvimento de sintomas como sudorese noturna, fadiga, emagrecimento, diarreia, candidíase oral, herpes simples e herpes zoster. A aids culmina no aparecimento de doenças que se desenvolvem em decorrência a alteração imunitária do hospedeiro. As doenças oportunistas são geralmente de origem infecciosa, porém várias neoplasias também podem ser consideradas doenças oportunistas (BARTLETT; GALLANT, 2005).

A infecção pelo HIV-1, quando não tratada, é marcada pelo declínio progressivo das células que compõem o sistema imune, especialmente no número de linfócitos TCD4+ circulantes, o que em um período variável de anos pode ocasionar a morte por falência imune e infecções oportunistas (HAYNES; PANTALEO; FAUCI, 1996).

O ciclo vital do HIV na célula humana ocorre de acordo com os seguintes passos: 1) ligação de glicoproteínas virais (gp120) ao receptor específico da superfície celular (principalmente linfócitos T-CD4); 2) fusão do envelope do vírus com a membrana da célula hospedeira; 3) liberação do material genético do vírus para o citoplasma da célula hospedeira; 4) transcrição do RNA viral em DNA complementar, dependente da enzima transcriptase reversa; 5) transporte do DNA complementar para o núcleo da célula, onde pode haver integração no genoma celular (provírus), dependente da enzima integrase, ou a permanência em forma circular, isoladamente; 6) o provírus é reativado, e produz RNA mensageiro viral, indo para o citoplasma da célula; 7) proteínas virais são produzidas e quebradas em subunidades, por intermédio da enzima protease; 8) as proteínas virais produzidas regulam a síntese de novos genomas virais e formam a estrutura externa de outros vírus, que serão liberados pela célula hospedeira; e 9) o vírion recém-formado é liberado para o meio circundante da célula hospedeira, podendo permanecer no fluído extracelular, ou infectar novas células (Figura 1).

A interferência em qualquer um destes passos do ciclo vital do vírus impediria a multiplicação e/ou a liberação de novos vírus. O tratamento do HIV/aids é feito com medicamentos anti-retrovirais, drogas que inibem a reprodução do HIV no sangue. A associação desses medicamentos com fins terapêuticos recebe o nome de terapia anti-retroviral, e conta com 17 medicamentos que estão divididos em quatro classes: 1) Os Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos (ITRAN), que inibem a enzima transcriptase reversa viral por competição com o seu substrato natural (desoxinucleosídeos trifosfatados), sendo incorporados à cadeia de DNA viral em

transcrição, causando a terminação precoce da cadeia (YARCHOAN et al., 1989).; 2) Os Inibidores da Transcriptase Reversa Não-análogos de Nucleosídeos (ITRNN) compõem um grupo de anti-retrovirais com estruturas químicas bastante divergentes (De CLERCQ, 1995). Atuam através da inibição não-competitiva da enzima transcriptase reversa. Essas drogas se ligam em um sítio próximo ao de ligação dos nucleosídeos, causando uma inibição alostérica da função enzimática. Esta ligação é capaz de bloquear a atividade da enzima transcriptase reversa viral (HANNA; HIRSH, 2000); 3) Os Inibidores da Protease (IP) inibem a enzima protease viral, atuam bloqueando a clivagem das poliproteínas virais, levando à produção de partículas virais imaturas e defeituosas; e 4) os Inibidores de Fusão (IF), que impedem a interação das proteínas do envelope viral (gp120) com os receptores da superfície da célula CD4 (CCR5 ou CXCR4), comprometendo o processo de entrada do vírus na célula (DELICATO, 2005).

De acordo com os dados do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/aids (UNAIDS), contabilizados até dezembro de 2006, existem atualmente 39,5 milhões de pessoas no mundo vivendo com HIV, sendo 63% delas na África Subsaariana. Desses, 37,2 milhões são indivíduos adultos, 17,7 milhões representam mulheres (maior número de mulheres até hoje reportado) e 2,3 milhões referem-se a crianças com menos de 15 anos. As mortes por aids somam 2,9 milhões, sendo 2,6 milhões adultos e 380 mil, crianças.

Em toda a América Latina a soma de casos de HIV compreendendo adultos e crianças passam dos 1,7 milhões. O uso de drogas injetáveis e sexo sem preservativo são as mais importantes causas de infecções em diversos países da América Latina (UNAIDS, 2006).

No Brasil, a história da epidemia tem início em 1982, com a identificação dos primeiros casos (BRASIL, 2000). A partir daí, observa-se sua rápida progressão, representando hoje uma das condições clínicas mais discutidas pela comunidade científica e pela sociedade em geral (BRITO; CASTILHO; SZWARCOWALD, 2001).

No início, a epidemia atingia principalmente as regiões metropolitanas de São Paulo e Rio de Janeiro e os casos caracterizavam-se, em sua maioria, por serem do sexo masculino, por terem alto nível socioeconômico e por pertencerem às categorias de transmissão homossexuais/bissexuais, além dos casos portadores de hemofilia ou em receptores de sangue (CASTILHO; CHEQUER, 1997; CASTILHO; CHEQUER; SZWARCOWALD, 1999).

Contudo, de marcadamente regionalizada e restrita a determinados segmentos populacionais, a epidemia passou a se expandir por todo território nacional nos anos 90 (SZWARCOWALD et al., 2000), demonstrando um padrão de crescimento acelerado entre mulheres, jovens e pobres, traduzido como feminização, juvenescimento e pauperização, além da expansão da epidemia entre indivíduos com parceria sexual estável (BRASIL, 1998). Segundo dados do Programa Nacional de DST/aids, em 1985 a taxa de infecção entre homens e mulheres era de 26,5 homens para cada mulher. Em 2006, essa mesma taxa cai para 1,5 (UNAIDS, 2006).

Atualmente, o Brasil possui mais de um terço do total de pessoas vivendo com HIV na América Latina. De acordo com os últimos dados do Programa Nacional de DST/aids, o número de pessoas vivendo com HIV soma os 620 mil, desses, 220 mil são mulheres (UNAIDS, 2006).

O município de Ribeirão Preto, situado na região nordeste do Estado de São Paulo, assume, isoladamente, a liderança no ranking da aids no Interior de São Paulo.

Desde agosto de 1986, quando foi detectado o primeiro caso de aids na cidade, foram registradas 4.532 infecções, com 2.474 óbitos. Permanecem vivos 1.973 portadores do HIV e de 85 não se tem mais notícia (www.aids.gov.br).

Em 1996, de modo inovador e pioneiro, o governo brasileiro sancionou uma lei dispondo sobre a obrigação do Estado de distribuir, de forma universal e gratuita, os medicamentos para o tratamento dos portadores do HIV/aids. O acesso à terapêutica beneficia atualmente cerca de 180 mil pacientes, 83% do total de homens e mulheres infectados pelo HIV no Brasil. São 17 anti-retrovirais disponíveis, representando um gasto anual de aproximadamente US\$ 450 milhões (BARTH-JONES et al., 2005; UNAIDS, 2006; Programa Nacional de DST/aids, 2007).

Assim, a terapia anti-retroviral tem prolongado, significativamente, a expectativa de vida de pacientes, determinando um impacto semelhante ao verificado nos países desenvolvidos, no que diz respeito à redução das mortes causadas pela aids, à ocorrência de infecções oportunistas e às internações hospitalares. (LOUIE et al., 2002; MENG et al., 2002).

Figura 1: Ciclo de replicação do HIV e local de ação dos anti-retrovirais (adaptado de SOUZA, 2005). 1) ligação de glicoproteínas virais; 2) fusão do envelope do vírus com a membrana da célula hospedeira; 3) liberação do material genético do vírus para o citoplasma da célula hospedeira; 4) transcrição do RNA viral em DNA complementar; 5) transporte do DNA complementar para o núcleo da célula; 6) o provírus é reativado, e produz RNA mensageiro viral, indo para o citoplasma da célula; 7) proteínas virais são produzidas e quebradas em subunidades, por intermédio da enzima protease; 8) as proteínas virais produzidas regulam a síntese de novos genomas virais; 9) o vírion recém-formado é liberado para o meio circundante da célula hospedeira.

1.2- Síndrome da Lipodistrofia

A terapia anti-retroviral de alta potência (Highly Active Antiretroviral Therapy - HAART) conseguiu modificar o curso da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), de uma doença fatal para uma doença crônica. Além de causar um enorme impacto na história de sua evolução e prognóstico, a HAART aumentou a sobrevida e promoveu a melhoria da qualidade de vida e redução dos episódios mórbidos (MOCROFT et al., 1998; BEHRENS et al., 2000; FERNANDES; GIR, 2002).

Infelizmente, diversos efeitos colaterais têm sido associados à terapia anti-retroviral prolongada, particularmente com o uso de inibidores da protease viral (VIRABEN; AQUILINA, 1998). Dentre esses, a síndrome da lipodistrofia com alterações na distribuição corpórea de gorduras e várias anormalidades metabólicas, incluindo a dislipidemia, acompanhada de hiperlipidemia com aumento nos níveis sanguíneos de colesterol e triglicérides, resistência à insulina, acidemia láctica e osteopenia (HUI, 2003; MILLER et al., 2003; CARR, 2003b).

A síndrome da lipodistrofia foi oficialmente descrita em 1997, pelo *Food and Drug Administration* (FDA), órgão norte-americano regulador da liberação e uso de medicamentos (LUMPKIN, 1997). Essa síndrome foi inicialmente denominada de "*Crixbelly*", pois os primeiros casos de redistribuição da gordura corporal foram observados após a utilização do Crixivan® (Indinavir), medicamento da classe dos inibidores da protease (VALENTE et al., 2005).

Miller, Dykes e Polesky (1988), após observarem as semelhanças clínicas entre pacientes com síndrome da lipodistrofia e síndrome de Cushing, passaram a denominá-la de "pseudo-síndrome de Cushing". Contudo, estudos posteriores não demonstraram

alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal dos pacientes soropositivos para o HIV, sendo então essa denominação abandonada (LO et al., 1998).

Algumas sinônimas são encontradas na literatura para a síndrome da lipodistrofia, tais como síndrome de redistribuição da gordura corporal (GERVASIONI et al., 2004; HADIGAN et al., 2003), síndrome metabólica associada à terapia anti-retroviral (MONTESSORI et al., 2004) ou ainda, lipodistrofia dislipidêmica associada ao tratamento para a infecção pelo HIV (BALASUBRAMANYAN et al., 2004).

Não existem estudos acerca da prevalência da síndrome da lipodistrofia no Brasil, entretanto, alguns trabalhos em outros países apontam grande variação de frequência, cujo acometimento pode ser observado em cerca de 4 a 84% dos pacientes (MALLAL et al., 2000; KINGSLEY, 2001; CARR, 2003a; MILLER et al., 2003).

A dislipidemia, observada em cerca de 70% dos pacientes (MILLER et al., 2000), foi primeiramente demonstrada em pacientes recebendo inibidores da protease, apresentando níveis plasmáticos aumentados de colesterol e triglicérides quando comparados aos pacientes que ainda não tinham iniciado a terapia (ECHEVARRIA; HARDIN; SMITH, 1999; PURNELL et al., 2000). Uma das principais conseqüências da dislipidemia é o surgimento precoce de doença coronariana em pacientes portadores da infecção pelo HIV tratados com a terapia anti-retroviral, a exemplo da aterosclerose (DUCOBU; PAYEN, 2000; BOCCARA; TEIGER; COHEN, 2002; SEMINARI et al., 2002). Ademais, outro efeito colateral associado ao uso prolongado de inibidores da protease é a resistência à insulina, com risco aumentado para o surgimento da diabetes mellitus, cuja prevalência atinge 8-10% desses pacientes (DEPAIRON et al., 2001; HADIGAN et al., 2001).

Adicionalmente, a síndrome da lipodistrofia apresenta alterações morfológicas como: lipoatrofia com perda de tecido adiposo no rosto (Figura 2 e 3); hipertrofia do tecido adiposo

com distribuição centrípeta na região abdominal e torácica (Figura 4); lipoatrofia de nádegas, membros superiores (Figura 4) e inferiores (Figura 5), com conseqüente realce da circulação venosa periférica; e aumento da gordura visceral e surgimento da pelota cervical (Figura 6) (CARR et al., 1998; DUCOBU; PAYEN, 2000; KOTLER, 2003; MILLER et al., 2003). Apesar de inicialmente associada ao uso de inibidores da protease viral, atualmente a síndrome também tem sido encontrada em pacientes utilizando inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (LO et al., 1998; MADGE et al., 1999; CHRISTEFF et al., 1999) e geralmente verificada após doze meses de tratamento anti-retroviral (HEATH et al., 2002).

Figura 2- Lipoatrofia facial com redução do tecido adiposo subcutâneo nas regiões periorbital, bucal e temporal (adaptado de WATERS; NELSON, 2007).

Figura 3- Lipoatrofia facial com redução do tecido adiposo subcutâneo nas regiões periorbital, bucal e temporal (adaptado de JAMES; CARRUTHERS; CARRUTHERS, 2002).

Figura 4- Hipertrofia adiposa abdominal e lipoatrofia de membros superiores (adaptado de WATERS; NELSON, 2007).

Figura 5- Lipoatrofia dos membros inferiores com conseqüente realce da circulação venosa periférica (adaptado de WATERS; NELSON, 2007).

Figura 6- Hipertrofia da região dorso cervical (adaptado de WATERS; NELSON, 2007).

Esse conjunto de alterações morfológicas é relatado pelos pacientes portadores da infecção pelo HIV como um visível marcador para a sua identificação. Essas alterações parecem constituir elementos perturbadores para o bem-estar psicossocial dos pacientes, afetando a sua qualidade de vida. (COLLINS; WAGNER; WALMSLEY, 2000; POWER et al., 2003).

Embora os efeitos diretos do tratamento anti-retroviral no surgimento da síndrome da lipodistrofia tenham sido descritos (CARR et al., 1998; BRINKMAM et al., 1999), sua patogenia permanece desconhecida. Por outro lado, a adequada adesão à terapia anti-retroviral está fortemente associada com o risco aumentado para a ocorrência da lipodistrofia (AMMASSARI et al., 2002; GUARALDI et al., 2003), já que o tecido adiposo parece ser altamente sensível à infecção pelo HIV e à sua terapêutica (GIRALT et al., 2006).

1.3- Marcadores Genéticos Polimórficos

A maior parte do genoma eucarioto contém seqüências repetidas que são herdadas, de modo estável, de geração para geração (CHARLESWORTH et al., 1994). Os polimorfismos de DNA caracterizados pela repetição consecutiva (*in tandem*) de uma seqüência de nucleotídeos que varia em número, de indivíduo para indivíduo, em um determinado loco, são chamados de VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*). Estes marcadores contêm muitos alelos em cada loco, o que não é devido à presença ou ausência de sítios de restrição, mas sim à variabilidade do número de repetições entre dois pontos no genoma (SCHUMM, 1996).

Os VNTRs que apresentam seqüências repetidas de 11 a 60 pares de bases (pb) são conhecidos como minissatélites (NAKAMURA et al., 1987); quando estas seqüências apresentam de 2 a 6 pb elas são chamadas de Repetições Curtas *in tandem* (*Short Tandem Repeats* - STRs) ou microssatélites. Pouco se sabe sobre o comportamento genético de elementos de DNA que apresentam unidades de repetição que vão de 7 a 10 pb. Sua classificação ainda não foi feita, pois seu processo mutacional não foi bem estudado (CHAMBERS; MACAVOY, 2000; EDWARDS et al., 1991). No genoma humano encontra-se aproximadamente um microssatélite a cada 6 kilobases (HEARNE et al., 1992).

Os STRs são seqüências de DNA que variam entre 100 e 300 pb (SCHUMM, 1996) e por isso são facilmente analisados em amostras onde o DNA encontra-se escasso, parcialmente degradado ou em más condições de estocagem, podendo também ser analisados em amostras onde o DNA tenha sido obtido por metodologias de extração rápida (KASAI; WAGNER; WALMSLEY, 1990). Estes STRs se tornaram

uma poderosa ferramenta para a identificação humana, uma vez que os resultados podem ser obtidos de qualquer fonte de material biológico, desde que este possua células nucleadas de onde possa ser obtido o DNA genômico. Os resultados das análises de DNA não dependem da natureza do material ou célula analisada, pois a informação genética está contida integralmente em todas as células somáticas de um indivíduo (SCHNEIDER, 1997).

1.4- Fator de Necrose Tumoral

1.4.1- Complexo Principal de Histocompatibilidade

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) e a Linfotoxina- β (LT- β ou TNF- β) são citocinas envolvidas na resposta inflamatória. Os genes que codificam estas proteínas estão localizados dentro do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) em todas as espécies de vertebrados (HAJEER; HUTCHINSON, 2000; SPIES et al., 1986). O CPH compreende um segmento cromossômico de 4000 kilobases (kb) e é considerado a região mais polimórfica de todo o genoma. Dentro dele são encontradas as regiões de classe I, II e III do complexo de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA). A região de classe I está localizada na porção mais telomérica do complexo HLA e contém os loci clássicos (HLA-A, -B, e -C), frequentemente avaliados em transplantes. No lado mais centromérico está a região de classe II, onde se encontram os genes que codificam os antígenos HLA-DP, -DO, -DV, -DQ e -DR. Entre estas duas regiões está a região de classe III, caracterizada pela presença de genes que codificam fatores do

sistema complemento (CARROLL et al., 1990; VERJANS et al., 1992), proteínas de Choque Térmico (HSP 70) e os genes codificadores do TNF e LT- β (Figura 7).

O gene TNF está localizado em 6p21.3, imediatamente ao lado do gene codificador da LT- β . Vários polimorfismos foram identificados dentro ou ao redor do loco TNF. Estudos indicam que estes polimorfismos têm relação com o nível de produção da citocina TNF, que apresenta mediação importante na resposta inflamatória (HAJEER; HUTCHINSON, 2000).

1.4.2- Polimorfismos do gene TNF

O loco TNF tem cerca de 12 kb de comprimento e contém várias áreas polimórficas. Diversas substituições únicas de nucleotídeos (*single nucleotide polymorphisms-SNP*) têm sido identificadas na região do TNF. Até o momento, foram descritos 9 SNPs no gene do TNF, sendo um na posição +489, outro na +70 e sete na região reguladora da transcrição do TNF: -1031 T/C, -863 C/A, -857 C/T, -376 G/A, -308 G/A, -244 G/A e -238 G/A. Evidenciando maior importância, os SNPs localizados na região promotora do gene, nas posições -238 e -308, são relacionados em diversos estudos à susceptibilidade de doenças. Nessas posições é comum a presença de uma guanina (G). Em alguns alelos esta posição é substituída pela adenina (A). A presença de uma adenina (A) na posição -308 tem sido associada ao aumento no nível da transcrição de TNF (KROEGER; CARVILLE, ABRAHAM, 1997).

Ainda, 6 microssatélites foram descritos na região do loco TNF (MAKHATADZE, 1998) (Figura 7), os quais foram chamados de TNFa, TNFb, TNFc, TNFd, TNFe e TNFf

(UDALOVA et al., 1993). Esses microssatélites se expandem por cerca de 12 kb ao redor dos genes TNF e das linfotoxinas $-\alpha$ e $-\beta$ (LT- α e LT- β), sendo caracterizado por repetições curtas de nucleotídeos. Os STRs TNFa e TNFb são repetições (GT) $_n$ e (GA) $_n$, respectivamente, localizados 3,5 kb teloméricas ao gene da LT- β . O TNFc é uma repetição (GA) $_n$, localizada dentro do primeiro intron do gene LT- β . Os microssatélites TNFd e TNFe são repetições (GA) $_n$ situadas entre 8 e 10 kb centroméricas ao gene TNF e abaixo do gene da LT- β (JONGENEEL et al., 1991; NEDOSPASOV et al., 1991). O microssatélite TNFf é uma repetição (CA) $_n$ localizada acima do gene da LT- β (TSUKAMOTO, 1998).

Cada microssatélite possui um número mínimo de alelos (UDALOVA et al., 1993). A Tabela 1 mostra a seqüência repetida, o número de alelos e o tamanho de cada um deles.

Localização dos microssatélites do TNF no cromossomo 6p21

Figura 7- Localização dos microssatélites da região do TNF (adaptado de HAJEER; HUTCHINSON, 2000; TSUKAMOTO et al., 1998). TNF: Fator de Necrose Tumoral; LT: Linfotóxina; HSP: Proteína de Choque Térmico; HLA: Antígeno Leucocitário Humano.

Tabela 1- Principais características dos microssatélites (STRs) do gene TNF.

MICROSSATÉLITE	TNFa	TNfb	TNfc	TNfd	TNFe	TNFf
Seqüência Repetitiva	(GT)n	(G/A)n	(GA)n	(GA)n	(GA)n	(CA)n
Tamanho dos Fragmentos	99-125	125-131	159-161	124-136	98-102	113-131
Número de alelos	14	7	2	7	3	10

(UDALOVA et al., 1993; TSUKAMOTO, 1998; HAJEER; HUTCHINSON, 2001)

1.4.3- Função Biológica do TNF

O TNF e as linfotoxinas (LT- α ou LT- β) são citocinas que estão envolvidas nas reações imunitárias celulares e inflamatórias. Estas citocinas são produzidas principalmente por macrófagos e linfócitos ativados (MATTHIAS et al., 1998).

A função biológica do TNF é complexa e está relacionada com a concentração e duração da exposição ao TNF (HAJEER; HUTCHINSON, 2000). Na situação aguda, a produção local de TNF é claramente benéfica. Ela aumenta a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, permitindo que células imunes, em particular neutrófilos e macrófagos, cheguem aos locais de inflamação e dano tecidual (BARBARA; VAN OSTADE; LOPEZ, 1996; GAMBLE et al., 1985); também ativa fagócitos para englobar e eliminar agentes infecciosos e debris celulares. Entretanto, a exposição sistêmica ou prolongada ao TNF pode ser prejudicial. Altos níveis de TNF circulante estão associados ao choque tóxico induzido por endotoxinas bacterianas (TRACEY et al., 1986) e transtornos do metabolismo (HAJEER; HUTCHINSON, 2000). Da mesma forma que o TNF pode ter um efeito citotóxico sobre células tumorais (LOCHEAD et al., 1983; LORINCZ et al., 1992), ele também pode atuar regulando substâncias importantes para a implantação tumoral, tendo assim um papel pró-tumorigênico (COTTAM; REES, 1993; GALLAGHER et al., 1997; MALIK et al., 1989).

O TNF também é considerado uma adipocina, ou seja, um fator secretado pelo tecido adiposo relacionado direta ou indiretamente a processos que contribuem para a aterosclerose, hipertensão arterial, resistência insulínica, diabetes tipo 2 e dislipidemias, representando o importante elo entre adiposidade, síndromes metabólicas e doenças cardiovasculares. Essa citocina age diretamente no adipócito, promovendo indução de

apoptose, inibição da lipogênese e aumento da lipólise, desempenhando papel regulador no acúmulo de gordura no tecido adiposo (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004).

Ademais, o TNF inibe a expressão gênica para a produção de adiponectina, uma proteína com ação anti-inflamatória expressa nos adipócitos que age como fator protetor para doenças cardiovasculares e aumenta a sensibilidade a insulina (HALLEUX et al., 2001).

As fases crônicas da infecção pelo HIV associam-se a um declínio moderado na proporção de células T que produzem o TNF. Após a administração de inibidores de protease há um aumento absoluto e proporcional de células T sintetizando TNF em todos pacientes, contribuindo provavelmente com a restauração imune nesses indivíduos. Essa polarização de células T para síntese de TNF seria favorável ao desenvolvimento da síndrome da lipodistrofia (LEDRU et al., 2000).

1.4.4- Associação do Polimorfismo do Gene TNF com Doenças

1.4.4.1- Genótipos TNF e Câncer

Há evidências de que o TNF tenha um potencial pró-tumorigênico no câncer de cabeça e pescoço por uma variedade de mecanismos, incluindo angiogênese tumoral, tecido conectivo e destruição óssea (HONCHEL et al., 1996; KNERER et al., 1996). Em pacientes jovens com Carcinoma de Células Escamosas (SCC) de cabeça e pescoço, a frequência do alelo TNFb3 foi significativamente diferente em pacientes e controles. A

homozigose b3,3 foi mais freqüente em pacientes com carcinoma laringeal do que nos controles, enfatizando a associação da homozigose deste locus na suscetibilidade a estes cânceres (MATTHIAS et al., 1998).

O microssatélite TNFa2 foi associado ao adenocarcinoma gástrico proximal (KASEM et al., 1998). Nos cânceres gastrointestinais, a inflamação crônica é um fator predisponente. Desta forma, a alta produção de TNF pode promover a principal condição para o desenvolvimento do câncer, um fator indireto à suscetibilidade para estas doenças (HAJEER; HUTCHINSON, 2000).

Em estudos com pacientes com linfoma de Hodgkin, os níveis TNF foram maiores naqueles com uma adenina na posição -308 (JUSZCZNSKI et al., 2002). Estudos também têm sido realizados com o intuito de verificar associações das posições -238 e -308 da região promotora do TNF no desenvolvimento de câncer gástrico. Jang et al. (2001) observaram que a freqüência do alelo do TNF-238A era muito baixa no grupo com câncer gástrico.

1.4.4.2- Genótipos TNF e Doenças Auto Imunes

As citocinas produzidas pelos genes TNF e LT- β foram identificadas em lesões agudas e crônicas do cérebro de portadores de Esclerose Múltipla (EM) (HOFMAN et al., 1989; SELMAJ et al., 1991). Pesquisa com pacientes suecos com EM e controles etnicamente combinados mostrou significantes diferenças nas freqüências dos alelos TNFa e TNFb entre pacientes e controles (SANDBERG-WOLLHEIM et al., 1995). A distribuição dos alelos TNFa 118 pb (TNFa11) e TNFb 127 pb (TNFb4) foi mais

freqüente nos pacientes com EM que nos controles. Os marcadores TNFc e TNFd não mostraram diferença significativa na distribuição dos seus alelos (KIRK et al., 1997).

Em indivíduos caucasóides com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), a adenina na posição -308 conferiu susceptibilidade ao LES independentemente da presença do alelo HLA-DR3 (ROOD et al., 2000). Em um estudo dos polimorfismos dos microssatélites TNF e sua associação com os alelos HLA de classe II na expressão da LES (foram analisados um total de 91 caucasóides afetados e 109 controles), verificou-se que as freqüências dos alelos TNFa2, TNFb3 e TNFd2 foram significativamente maiores em pacientes, sugerindo que o polimorfismo do gene TNF pode influenciar na expressão clínica da doença (HAJEER et al., 1997).

Em indivíduos europeus, a freqüência do genótipo -308G/A estava aumentada, conferindo assim susceptibilidade ao LES (LEE; HARLEY; NATH, 2006).

1.4.4.3- Genótipos TNF e Infecção Viral

Os genótipos de TNF podem influenciar na resposta inicial à infecção viral, tal como na neutralização do vírus e sua eliminação, ou pode afetar em longo prazo no efeito da infecção (HAJEER; HUTCHINSON, 2000; HOHLER et al., 1998). Em pacientes portadores do HIV a taxa de deterioração imunológica e progressão para a aids difere entre os indivíduos infectados. Esta progressão pode ser influenciada pelo fenótipo do vírus, pela resposta imune do hospedeiro e por fatores genéticos. Uma associação feita entre os microssatélites do gene TNF e a taxa de progressão para a aids mostrou que o alelo TNFc2 conferia proteção aos pacientes, por estar relacionado

ao desenvolvimento mais lento da doença. Este alelo foi muito mais comum em pacientes com progressão lenta para a aids (60%) do que nos que a desenvolveram mais rapidamente (15%) (KHOO et al., 1997).

1.5- Síndrome da Lipodistrofia e TNF

Atualmente, tem sido relatado que as células adiposas não são apenas componentes associados à estrutura e sustentação, mas órgãos dotados de intensa atividade endócrina e metabólica (BARROSO; ABREU; FRANCISCETTI, 2002). Várias investigações mostram que as células adiposas produzem mediadores imunológicos associados às respostas pró-inflamatórias como os componentes C3, fator B e D do sistema complemento (CIANFLONE et al, 1994), e as citocinas TNF e interleucina 18 (IL-18) (KERN et al, 1995; ESPOSITO et al, 2002; ESPOSITO et al, 2003). Igualmente, níveis séricos aumentados de TNF são encontrados em diversos modelos de obesidade em roedores e em humanos (KERN et al., 1995; PAUSOVA et al., 2000).

Ademais, várias investigações têm sugerido a associação entre atividade inflamatória elevada e alterações no tecido adiposo de portadores do HIV. Assim, tem sido relatado que mecanismos endocrinológicos e imunológicos estão associados aos distúrbios metabólicos das gorduras (MAHER et al., 2002; GALLI et al., 2003), sendo que as citocinas pró-inflamatórias como o TNF participam no metabolismo de lipídios (LEDRU et al., 2000; GALLI et al., 2003; KERN et al., 2003; VIGOUROUX et al., 2003) e induzem hiperlipidemia e resistência à insulina (HOTAMISLIGIL et al., 1994).

Com respeito à produção de TNF, estudos observaram que após a utilização da terapia anti-retroviral, com conseqüente aumento do número de linfócitos T-CD4+ e redução da carga viral, os níveis séricos de TNF aumentavam (MYNARCIK et al., 2000; LICHTENSTEIN et al., 2001), sugerindo que o aumento nos níveis desta citocina esteja associado com o desenvolvimento da dislipidemia e da lipodistrofia (LEDRU et al., 2000; GALLI et al., 2003; JOHNSON et al., 2004).

Ademais, tem sido sugerido que fatores genéticos também possam estar associados com a patogenia da síndrome da lipodistrofia. Entretanto, poucos estudos avaliando o polimorfismo do TNF foram realizados. Dois estudos prévios relatam que o SNP situado na região promotora do gene TNF (-238 G/A) está associado com o desenvolvimento da síndrome da lipodistrofia em pacientes portadores do HIV/aids, em tratamento com anti-retrovirais (MAHER et al., 2002; NOLAN et al., 2003).

Apesar de estudos descreverem que alguns polimorfismos do TNF, particularmente aqueles encontrados na região promotora, têm relação com o nível de produção das citocinas (POCIOT et al., 1993; WESTENDORP et al., 1997), não existem estudos do polimorfismo de microssatélites do TNF com a síndrome da lipodistrofia em pacientes infectados pelo HIV tratados com anti-retrovirais.

Justificativa

2- JUSTIFICATIVA

Recentemente, estudos têm demonstrado a ocorrência crescente de casos da síndrome da lipodistrofia em portadores do HIV/aids.

A síndrome da lipodistrofia é uma doença progressiva, cuja prevalência pode chegar até 84%, em pacientes recebendo tratamento anti-retroviral (HEAT, 2002; KINGSLEY et al., 2001; LICHTENSTEIN et al., 2001; MILLER et al., 2003). Como foi dito anteriormente, as causas dessa síndrome não são bem conhecidas, assim como o modo pelo qual ela se desenvolve, o que torna as tentativas de tratamento difíceis de serem delineadas.

Um enfoque tem sido dado aos mediadores pró-inflamatórios, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF), sugerindo que o aumento nos níveis dessa citocina esteja associado com o desenvolvimento da síndrome da lipodistrofia. Adicionalmente, existe a descrição de que o polimorfismo do TNF tenha relação com o nível de sua produção.

Posto isso, este estudo tipificou polimorfismos da região do TNF, incluindo os microsatélites TNF a,b,c,d,e e os polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism* - SNPs) da região promotora do TNF, em pacientes portadores da infecção pelo HIV, apresentando ou não a síndrome da lipodistrofia pós-terapia anti-retroviral e em controles saudáveis.

Objetivos

3- OBJETIVOS

3.1- Geral:

Avaliar o polimorfismo do TNF em pacientes infectados pelo HIV em tratamento anti-retroviral, apresentando ou não a síndrome da lipodistrofia, e em indivíduos saudáveis.

3.2- Específicos:

- Associar os diferentes anti-retrovirais (inibidores da transcriptase reversa análogos e não análogos de nucleosídeos e inibidores da protease) com o desenvolvimento da síndrome da lipodistrofia;
- Tipificar o polimorfismo dos microssatélites do TNF (TNFa-e) em pacientes apresentando ou não a síndrome da lipodistrofia associada à terapia anti-retroviral e em indivíduos saudáveis;
- Tipificar o polimorfismo da região promotora do TNF (SNPs -238 e -308) em pacientes apresentando ou não a síndrome da lipodistrofia associada à terapia anti-retroviral e em indivíduos saudáveis;
- Detectar associações entre os polimorfismos acima mencionados com a ocorrência ou não da síndrome da lipodistrofia em pacientes portadores do HIV, utilizando anti-retrovirais, e em indivíduos saudáveis;
- Inferir haplótipos dos microssatélites e SNPs do TNF em portadores da infecção pelo HIV apresentando ou não a síndrome da lipodistrofia e em indivíduos saudáveis;

Casuística e Métodos

4- CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1- Delineamento do Estudo e Aspectos Éticos

Trata-se de estudo transversal, comparativo, descritivo, visando a determinação do polimorfismo dos microssatélites do TNF (TNF α , b, c, d, e) e da região promotora dos genes codificadores do TNF (SNPs -308A/G e -238A/G) em pacientes portadores da infecção pelo HIV-1, apresentando ou não a síndrome da lipodistrofia e em indivíduos saudáveis.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa, do HCFMRP-USP, e aprovado de acordo com o processo HCRP número 7355/2004 (ANEXO A). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A) foi apresentado e assinado, conforme Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que trata da ética em pesquisa com seres humanos (BRASIL, 1996).

4.2- Local de Estudo

O estudo foi realizado no ambulatório da Unidade Especial de Terapia de Doenças Infecciosas (UETDI) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Trata-se de um hospital geral universitário, situado na cidade de Ribeirão Preto, integrado ao Sistema Único de

Saúde (SUS), onde são desenvolvidas, desde 1956, atividades de assistência, ensino e pesquisa.

A UETDI foi inaugurada em agosto de 1996, e atende especificamente pessoas portadoras do HIV/aids. Seu espaço físico divide-se em dois pisos, sendo a área de internação no piso superior e o ambulatório e o hospital-dia no inferior. No ambulatório, são realizadas consultas médicas, odontológicas e nutricionais, além de atendimento psicossocial. A assistência de enfermagem é realizada pela equipe de enfermagem entre as consultas médicas (pré e pós-consulta).

Esse ambulatório constitui um serviço de referência para a assistência aos portadores do HIV/aids para a cidade de Ribeirão Preto e região. Nele, o paciente é atendido de maneira personalizada, sendo assistido por um único médico infectologista durante todo o acompanhamento ambulatorial.

Não existe delimitação de faixa etária para o atendimento na unidade, já que também são atendidas crianças portadoras do HIV/aids. A unidade tem cerca de 1000 pacientes cadastrados, atendendo, em média, 350 indivíduos adultos por mês, de segunda à sexta-feira, das 7:30 h às 18:00 h.

4.3- Indivíduos Estudados

De acordo com os critérios de inclusão e exclusão, e conforme preceitos éticos, foram selecionados 117 indivíduos portadores do HIV, sendo 67 pacientes apresentando a síndrome da lipodistrofia (SL) com alterações morfológicas e/ou metabólicas e 50 pacientes sem a SL, atendidos na Unidade Especial de Terapia de

Doenças Infecto-contagiosas (UETDI) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP). Ademais, foram selecionados 131 indivíduos controle saudáveis pareados aos pacientes em termos de sexo e idade. Os dados foram colhidos no período de janeiro de 2005 a janeiro de 2007.

4.4- População de Estudo

4.4.1- Critérios de inclusão

- Pacientes com sorologia positiva para o HIV-1;
- Pacientes de ambos sexos, adultos, com idades entre 18 e 65 anos;
- Pacientes que estejam recebendo terapia anti-retroviral por no mínimo 18 meses;
- Pacientes que apresentem a síndrome da lipodistrofia;
- Pacientes que concordarem em participar do estudo.

4.4.2- Critérios de exclusão

- Pacientes com sorologia negativa para o HIV-1;
- Pacientes com sorologia positiva para o HIV-1 e que não estejam recebendo terapia anti-retroviral;
- Pacientes que não apresentem a síndrome da lipodistrofia;
- Pacientes que não concordarem em participar do estudo.

4.5– Controles Patológicos

4.5.1- Critérios de inclusão:

- Pacientes com sorologia positiva para o HIV-1;
- Pacientes de ambos sexos, adultos, com idades entre 18 e 65 anos;
- Pacientes que estejam recebendo terapia anti-retroviral por no mínimo 18 meses;
- Pacientes que não apresentem a síndrome da lipodistrofia;
- Pacientes que concordarem em participar do estudo.

4.5.2- Critérios de exclusão

- Pacientes com sorologia negativa para o HIV-1;
- Pacientes com sorologia positiva para o HIV-1, que não estejam recebendo terapia anti-retroviral;
- Pacientes que apresentem a síndrome da lipodistrofia;
- Pacientes que não concordarem em participar do estudo.

4.6- Controles Saudáveis

Foram utilizadas, para as análises do polimorfismo, amostras do sangue periférico de 131 indivíduos saudáveis, sendo 28 do sexo feminino e 103 do sexo masculino, com idades que variaram de 21 a 51 anos (média de 33,46 anos), todos sem história prévia e/ou atual de doenças infecto-contagiosas e/ou crônicas. Estes indivíduos controle

fazem parte do Banco de Amostras do Núcleo em Pesquisas Imunogenéticas, aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa com o n° 7581/2007 (ANEXO B).

4.7– Variáveis do Estudo

4.7.1– Variáveis Sócio-Demográficas

- **Sexo:** foram considerados sexo feminino e masculino.
- **Idade:** foram considerados anos completos.
- **Raça:** foram consideradas raças branca, negra e oriental.
- **Escolaridade:** foram considerados analfabeto, ensino fundamental, médio e superior completos.

4.7.2- Variáveis Relacionadas à Infecção pelo HIV e ao Tratamento

- **Tempo de diagnóstico:** foi considerado o tempo em anos, registrado no prontuário do paciente.
- **Medicamentos utilizados:** foram consideradas todas as drogas anti-retrovirais referidas pelo paciente, e confirmadas através da consulta ao seu prontuário.
- **Tempo de utilização de anti-retrovirais:** foi considerado o tempo em anos, registrado no prontuário do paciente.

4.7.3– Variáveis Relacionadas aos Dados Somatométricos

- **Altura:** foi considerada altura em metros, registrada no prontuário do paciente.
- **Peso:** foi considerado peso em kilogramas, registrado no prontuário do paciente.

4.7.4- Variáveis Relacionadas às Alterações Clínico-Laboratoriais e Condições Atuais de Infectologia

- **Células TCD4+ e TCD8+:** a contagem de células TCD4+ em sangue periférico tem implicações prognósticas na evolução da infecção pelo HIV, pois é a medida de imunocompetência celular; é mais útil no acompanhamento de pacientes infectados pelo HIV. Foram considerados o número de células TCD4+ e TCD8+ por microlitro de sangue. O valor utilizado foi aquele registrado no prontuário, referente ao mês em que se deu a realização da entrevista.
- **Carga Viral:** o nível de RNA viral no plasma é um parâmetro clínico importante para avaliar a progressão da doença, sendo que níveis elevados da replicação do vírus e o aumento da carga viral estão associados à deterioração acelerada do sistema imunitário. Os exames de carga viral quantificam as partículas que estão sendo produzidas e lançadas na circulação sanguínea (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003). Foi considerado o número de cópias do RNA do HIV por mililitro de plasma. O valor utilizado foi aquele registrado no prontuário, referente ao mês em que se deu a realização da entrevista.

- **Lípídes Sanguíneos:** o colesterol total refere-se ao nível de gordura transportado no sangue pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e pelas proteínas de alta densidade (HDL). O LDL transporta o colesterol para o organismo e é conhecido popularmente como “colesterol ruim”, enquanto o HDL carrega o colesterol até o fígado onde este será eliminado no chamado transporte reverso do colesterol, sendo conhecido, portanto, como “colesterol bom”.

Os triglicérides são lipoproteínas que transportam as gordura no sangue, e consistem na mais importante forma de armazenamento energético do organismo, constituindo depósitos no tecido adiposo e muscular.

Para a avaliação dos resultados de colesterol total, LDL, HDL e triglicérides, foram utilizadas as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia, conforme quadro abaixo. Cabe ressaltar que foram considerados os valores registrados no prontuário, referente ao mês em que se deu a realização da entrevista.

Tabela 2- Valores de referência dos lípides para indivíduos adultos.

Lípides	Valores (mg/dL)	Categorias
Colesterol Total	<200	Ótimo
	200-239	Limítrofe
	≥240	Alto
LDL-Colesterol	<100	Ótimo
	100-129	Desejável
	130-159	Limítrofe
	160-189	Alto
	≥190	Muito Alto
HDL-Colesterol	<40	Baixo
	>60	Alto
Triglicérides	<150	Ótimo
	150-200	Limítrofe
	201-499	Alto
	≥500	Muito Alto

Fonte: III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2001.

- **Glicemia:** foi considerada a glicemia plasmática de jejum, que se refere à concentração de glicose no sangue, em mg/dL, após jejum de no mínimo 8 horas. Para a avaliação dos resultados, foram empregadas as recomendações do Consenso Brasileiro sobre Diabetes, que considera alterados valores de glicemia plasmática de jejum superiores a 110 mg/dL.

4.7.5– Variáveis Relacionadas às Alterações Morfológicas da Síndrome da Lipodistrofia

- **Modificações no corpo:** a síndrome da lipodistrofia se manifesta através de atrofia, quando ocorre perda de gordura periférica (membros superiores, inferiores, nádegas e face), ou de hipertrofia, com aumento de gordura central (abdome, mamas e dorso cervical). Considera-se síndrome da lipodistrofia mista quando ocorrem, simultaneamente, a lipoatrofia e a lipohipertrofia.

4.8- Instrumento de Coleta de Dados

Foi utilizado um roteiro de entrevista estruturado (APÊNDICE B) para a coleta de dados e análise de prontuário. As entrevistas foram realizadas em uma das salas do serviço de saúde descrito anteriormente, antes ou após a consulta médica, sendo que o sigilo e o anonimato dos pacientes foram preservados. A análise de prontuário foi realizada em um período de até 15 dias após a entrevista. Os dados coletados no prontuário referem-se aos fatores virais (carga viral), imunológicos (número de células TCD4+) e clínicos (dislipidemias e anti-retrovirais utilizados no tratamento).

4.9- Coleta, Processamento das Amostras Biológicas e Padronização das Técnicas para Detecção dos Polimorfismos

4.9.1- Obtenção de Sangue Periférico e DNA

Foram coletados 20 mL de sangue venoso periférico de cada indivíduo utilizando-se tubos Vacutainer (Beckton; Dickinson) contendo EDTA K3 (0.054 mL/tubo).

O DNA foi obtido por “salting out” a partir de células do sangue periférico, utilizando-se o procedimento descrito por Miller, Dykes e Polesky (1988). Resumidamente, cerca de 10 mL do sangue total foram transferidos para um tubo de polipropileno de 50 mL, sendo adicionados 4 volumes de tampão de lise de glóbulos vermelhos (sacarose 3M, TRIS-HCl 10 mM, MgCl 5 mM e TRITON X100 a 1%). A solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 2400xg, por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e ao precipitado foram adicionados 5 mL de tampão de lise de glóbulos brancos (NaCl 0,075 M, Na-EDTA 0,024 M, NaClO₄H₂O 25 mM e SDS a 2,5%). A preparação foi agitada vigorosamente por 10 segundos à temperatura ambiente. Para a extração de proteínas, foram adicionados 2,0 mL de NaCl a 6,0 mM, agitando-se os tubos vigorosamente por 15 segundos. Após a centrifugação a 1500xg por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi recolhido em um tubo de polipropileno de 50 mL, sendo adicionados 7 mL de isopropanol absoluto. A precipitação do

DNA ocorreu por inversão manual lenta. O DNA precipitado foi então retirado com auxílio de uma pipeta Pasteur selada. O DNA foi lavado 2 vezes em 3 mL de etanol a 70% e redissolvido em 100 a 300 μ L de água bidestilada desionizada esterilizada (H_2O_{dd}). O DNA foi então quantificado por espectrofotometria em 260 e 280 nm. O grau de pureza do DNA extraído foi calculado pela razão entre as absorvâncias obtidas em 260 e 280 nm ($A_{260}:A_{280}$), sendo considerada adequada entre os valores 1,6 a 2,0.

4.9.2- Tipificação dos Microssatélites do Gene TNF

4.9.2.1- Amplificação do DNA

A técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) foi utilizada para amplificação dos microssatélites de interesse. Esta técnica permite a produção de milhares de cópias de um segmento específico de DNA *in vitro*. Esse segmento é delimitado pelos iniciadores (pequenas seqüências simples de oligonucleotídeos - de 15 a 30 bases) utilizados na reação. Cada iniciador possui uma seqüência compatível e se liga ao DNA de amostra nas extremidades da seqüência de interesse. O DNA da amostra é desnaturado pelo calor, que rompe as pontes de hidrogênio que unem ambas as fitas (dupla fita de DNA). Em seguida, os iniciadores se ligam ao DNA da amostra em seus trechos compatíveis, e uma DNA polimerase termo-estável acopla-se a

esta seqüência temporária de fita dupla (formada pelo iniciador e pelo DNA da amostra desnaturado) e produz o complemento da fita de DNA com base na seqüência de nucleotídeos da amostra. Após vários ciclos de amplificação, milhares de cópias que se iniciam e terminam com os iniciadores utilizados são produzidas.

As reações de amplificação para os microssatélites foram realizadas utilizando-se 100 ng de DNA de cada amostra. Duas reações de amplificação foram utilizadas para obter os microssatélites TNFa, TNFb, TNFd e TNFe e uma reação de amplificação para obter os microssatélites TNFc. As reações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL, com volumes finais de 25 µL, e utilizando os reagentes e concentrações listados nas tabelas 3, 4 e 5.

A reação primeira amplificação dos microssatélites do TNFa, TNFb, TNFd e TNFe (TNFa/b e TNFd/e) foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 1X tampão de amplificação [20 mM Tris-Cl, pH 8.4, 50 mM KCl], 20 mM de cada dNTP, 10 mM de cada iniciador, 0,5 unidades de Taq DNA-polymerase (Invitrogen) e 100 ng de DNA genômico (Tabela 3).

Para a tipificação dos microssatélites do TNFa/b foram utilizados como iniciador 1 o IR1, e iniciador 2 o IR3. Para a tipificação dos microssatélites do TNFd/e foram utilizados como iniciador 1 o IR7, e iniciador 2 o IR10 (Tabela 6).

Tabela 3– Reagentes utilizados para primeira amplificação dos microssatélites do TNFa/b e TNFd/e.

Reagente	Concentração
Tampão ^a	1 X
MgCl ₂ ^b	1 mM
Iniciador 1	7,5 pmol
Iniciador 2	7,5 pmol
DNTP ^c	0,25 mM
Taq Polimerase	0,5 U
DNA	100 ng
Volume final	25 µL

^a 20 mM Tris-Cl, pH 8.4, 50 mM KCl, ^b cloreto de magnésio, ^c dNTP 2'deoxinucleosídeo 5' trifosfato.

A segunda reação de amplificação dos microssatélites do TNFa, TNFb, TNFd e TNFe foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 1X tampão de amplificação [20 mM Tris-Cl, pH 8.4, 50 mM KCl], 20 mM de cada dNTP, 10 mM de iniciador e 0,5 unidades de Taq DNA-polymerase (Invitrogen). Para cada reação foi adicionado 1 µL do material amplificado na primeira reação, conforme o microssatelite que se pretendia amplificar (Tabela 4). Para os microssatélites TNFa e b, acrescentou-se 1µL do produto da reação de amplificação TNFa/b, e para os TNFd e e acrescentou-se 1µL do produto da reação de amplificação TNFd/e.

Para a segunda amplificação do TNFa foi utilizado como iniciador 1 o IR2, para o TNFb o iniciador 1 foi o IR4, para a tipificação do TNFd o iniciador foi o IR8 e para o TNFe o iniciador foi o IR9 (Tabela 6).

Tabela 4– Reagentes utilizados para segunda amplificação dos microssatélites do TNFa, TNFb, TNFd e TNFe.

Reagente	Concentração
Tampão ^a	1 X
MgCl ₂ ^b	1 mM
Iniciador 1	7,5 pmol
DNTP ^c	0,25 mM
Taq Polimerase	0,5 U
Material Amplificado	1 µL do material da primeira amplificação ^a
Volume final	25 µL

^a 20 mM Tris-Cl, pH 8.4, 50 mM KCl, ^b cloreto de magnésio, ^c dNTP 2'deoxinucleosídeo 5' trifosfato

A reação de amplificação do microssatélite do TNFc foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 1X tampão de amplificação [20 mM Tris-Cl, pH 8.4, 50 mM KCl], 20 mM de cada dNTP, 10 mM de cada iniciador, 0,5 unidades de Taq DNA-polymerase (Invitrogen) e 100 ng de DNA genômico (Tabela 5). Para a amplificação do TNFc foram utilizados os iniciadores IR5 e IR6 (Tabela 6).

Tabela 5- Reagentes utilizados para amplificação do microsatélite do TNFc.

Reagente	Concentração
Tampão ^a	1 X
MgCl ₂ ^b	1,2 mM
Iniciador 1	7,5 pmol
Iniciador 2	7,5 pmol
DNTP ^c	0,25 mM
Taq Polimerase	0,5 U
DNA	100 ng
Volume final	25 µL

^a 20 mM Tris-Cl, pH 8.4, 50 mM KCl, ^b cloreto de magnésio, ^c dNTP 2'deoxinucleosídeo 5' trifosfato

Tabela 6– Relação dos iniciadores seqüência – específicos utilizados.

Locus	Seqüências iniciadoras
TNFa	IR1 - 5'-GCC TCT AGA TTT CAT CCA GCC ACA -3'
	IR2 – 5'-CCT CTC TCC CCT GCA ACA CAC A -3'
TNFb	IR3 - 5'- GCA CTC CAG CCT AGG CCA CAG A -3'
	IR4 - 5'-GTG TGT GTT GCA GGG GAG AGA G -3'
TNFc	IR5 - 5'-GGT TTC TCT GAC TGC ATC TTG TCC -3'
	IR6 - 5'-TCA TGG GGA GAA CCT GCA GAG AA -3'
TNFd	IR7 - 5'- AGA TCC TTC CCT GTG AGT TCT GCT -3'
	IR8 - 5'- CAT AGT GGG ACT CTG TCT CCA AAG -3'
TNFe	IR9 - 5'-GTG CCT GGT TCT GGA GCC TCT C -3'
	IR10 - 5'- TGA GAC AGA GGA TAG GAG AGA CAG -3'

(UDALOVA et al., 1993).

O perfil de ciclagem para a amplificação de cada loco está descrito nas Tabelas 7 e 8. O Termociclador utilizado foi Gradient Thermal Cycler MJ96+/MJ96G (Biocycler).

Tabela 7- Condições de amplificação do locus do TNFc e primeira amplificação dos loci dos TNFa/b e TNFd/e.

Estágio	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	5'	1X
Desnaturação	94 °C	1'	28X
Ligação dos Iniciadores	61 °C	1'	
Extensão	72 °C	1'	
Extensão Final	72 °C	10'	1X
	4 °C	∞	

Tabela 8- Condições da segunda amplificação dos loci do TNFa, TNFb, TNFd e TNFe.

Estágio	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	5'	1X
Desnaturação	94 °C	1'	32X
Ligação dos iniciadores	60 °C	1'	
Extensão	72 °C	1'	
Extensão final	72 °C	10'	1X
	4 °C	∞	

4.9.2.2- Análise do Produto Amplificado

Os produtos amplificados foram submetidos à separação eletroforética em condições desnaturantes, utilizando-se géis de poliacrilamida 12% acrescidos de uréia. Para preparação do gel de concentração 12%, foram utilizados os seguintes componentes:

- 4,0 mL de água desionizada;
- 8,0 mL de solução de acrilamida 30% (acrilamida + bis-acrilamida [29:1]);
- 9,6 g de uréia;
- 2,0 mL de tampão TBE 10X;
- 15 µL de TEMED;
- 300 µL de solução saturada de persulfato de potássio.

Após a preparação, o gel foi imediatamente aplicado a um cassete de tamanho determinado, previamente montado. Para a realização da corrida eletroforética, foram utilizados 3 µL do produto amplificado acrescidos a 7 µL de tampão de carregamento contendo formamida a 75%. Para a eletroforese dos STRs do TNFc, esta mistura foi aquecida à 94°C por 10 minutos e imediatamente colocada em banho de gelo, até o momento da aplicação. Todos os géis desnaturantes foram submetidos a uma corrente de 20mA, pelo tempo determinado para cada microssatelite (Tabela 9).

Tabela 9- Condições específicas para eletroforese de cada STR.

Loco	Tempo
TNFa	4:00h
TNFb	5:15h
TNFc	3:30h
TNFd	3:00h
TNFe	3:15h

Padrões de leitura previamente identificados em outras análises de microssatélites do TNF (1 padrão para cada 4 amostras) foram aplicados juntamente com as amostras, de modo a auxiliar a identificação de cada alelo. Esses padrões de leitura foram obtidos por meio de uma escada alélica realizada com centenas de amostras randomizadas, tipificadas previamente e comparadas entre si, objetivando-se a determinação dos alelos apresentando maiores ou menores números de repetições. A leitura prévia foi confirmada em novos géis, nos quais as amostras, que em princípio pareciam conter o mesmo alelo, foram aplicadas lado a lado, para que então uma amostra de cada alelo fosse escolhida para definir a escada alélica de cada sistema. Esta escada alélica vem sendo utilizada por nosso grupo como padrão para os microssatélites TNF em vários estudos prévios (SIMÕES et al., 2003; SIMÕES et al., 2005; WASTOWSKI et al., 2006). Em todas as análises de microssatélites realizadas pelo nosso grupo, as frequências alélicas obtidas coincidem com as frequências alélicas descritas

mundialmente em outras populações (REYNARD; TURNER; NAVARRETE, 2000). Além disso, alguns dos padrões do TNFd foram confirmados por seqüenciamento (WASTOWSKI et al., 2006).

Dessa forma, a escada alélica torna-se bastante útil em razão da dificuldade de se utilizar marcadores comerciais de peso molecular em géis de poliacrilamida desnaturantes, como os utilizados neste estudo para os microssatélites.

4.9.2.3- Coloração com Nitrato de Prata

Após a separação eletroforética, os géis foram corados por impregnação pela prata, de forma a viabilizar a visualização dos microssatélites. O gel foi colocado em 100 mL de solução fixadora (50 mL de álcool etílico, 2 mL de ácido acético e 300 mL de água deionizada) acrescida de 1 mL de nitrato de prata (20%) (solução a 0,1% em água destilada) e mantido sob agitação à temperatura ambiente por 5 minutos. Depois desse tempo, a solução fixadora com prata foi descartada e o gel lavado com água. A água foi descartada e adicionou-se 100 mL de solução reveladora (4,5 g de NaOH e 200 mL água deionizada) acrescida de 1 mL de formaldeído. O gel foi então colocado sob agitação até a revelação das bandas, sendo posteriormente descartada a solução reveladora com formaldeído.

4.9.2.4- Registro dos Resultados

Após a leitura, os géis foram secos e arquivados. A secagem foi realizada colocando-se o gel entre duas folhas de papel celofane embebidas em água, sobre uma placa de vidro, à temperatura ambiente, por 1 ou 2 dias. As imagens representativas dos géis para loco TNFb e TNFe são apresentadas nas Figuras 8 e 9.

Figura 8- Gel de poliacrilamida 12% mostrando a mobilidade eletroforética dos alelos do STR TNFb.

Figura 9 - Gel de poliacrilamida 12% mostrando a mobilidade eletroforética dos alelos do STR TNFe.

4.9.3- Tipificação da Região Promotora do TNF

O polimorfismo de genes promotores do TNF foi avaliado quanto à presença dos SNPs -308A/G e -238A/G, relacionados com atividade transcricional alterada.

Para a detecção destes polimorfismos, utilizamos sondas de oligonucleotídeos sequência específicas, hibridados com DNA amplificado pela reação em cadeia da polimerase, pela técnica de PCR-SSP. Os iniciadores específicos para cada variante estão descritos nas Tabelas 10 e 11. Adicionalmente, os iniciadores HGBA.A e HGBA.S (genes da Hemoglobina Humana) foram utilizados como controle interno de cada reação. Os reagentes utilizados e as condições para a amplificação estão descritos nas tabelas 12 e 13, respectivamente. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 10% corado por impregnação pela prata (Tabela 14). O gel não desnaturante 10% foi preparado da seguinte forma:

- 9,8 mL de água deionizada;
- 6,7 mL de acrilamida + bis-acrilamida (29:1);
- 1,4 mL de glicerol;
- 2,0 mL de tampão TBE 10x;
- 15 µL de TEMED;
- 300 µL de solução saturada de persulfato de potássio.

Tabela 10- Relação dos iniciadores utilizados para detecção dos polimorfismos dos SNPs -308 do gene TNF.

INICIADOR	SEQUÊNCIA	AMPLICON	ALVO	REFERÊNCIA
TNFAA308.2 TNF Genérico	5' CAGCGGAAAACTTCCTTGGT 3'	259 bp	TNF α - 308 AG	Tuglular, Berthoux e Berthoux (2003)
TNFAS308G TNF Específico	5' ATAGGTTTTGAGGGGCATGG 3'			Marsh et al. (2003)
TNFAS308A TNF Específico	5' ATAGGTTTTGAGGGGCATGA 3'			Marsh et al. (2003)
HGBA.S	5' CGGTATTTGGAGGTCAGCAC 3'	456 / 436 bp	Controle	Nosso Laboratório
HGBA.A	5'CCCACCACCAAGACCTACTT 3'		Controle	Nosso Laboratório

Tabela 11- Relação dos iniciadores utilizados para detecção dos polimorfismos dos SNPs -238 do gene TNF.

INICIADOR	SEQUÊNCIA	AMPLICON	ALVO	REFERÊNCIA
TNFAA238.2 TNF Genérico	5' AGGCAATAGGTTTTGAGGG 3'	175 bp	TNF α - 238 AG	Tuglular, Berthoux e Berthoux (2003)
TNFAS238G TNF Específico	5' CCCCATCCTCCCTGCTCC 3'			Marsh et al. (2003)
TNFAS238A TNF Específico	5' TCCCATCCTCCCTGCTCT 3'			Marsh et al. (2003)
HGBA.S	5' CGGTATTTGGAGGTCAGCAC 3'	456 / 436 bp	Controle	Nosso Laboratorio
HGBA.A	5'CCCACCACCAAGACCTACTT 3'		Controle	Nosso Laboratório

Tabela 12- Reagentes utilizados para a amplificação dos SNPs -308 e -238 do TNF.

Reagente	Concentração
Tampão ^a	1 X
MgCl ₂ ^b	1,5 mM
DNTP ^c	0,25 mM
HGBA S	2 pmol
HGBA A	2 pmol
308AA ou 308G	3 pmol
TNF 308.2	3 pmol
Taq Polimerase	0,75 U
DNA	100 ng
Volume final	10 µL

^a 20 mM Tris-Cl, pH 8.4, 50 mM KCl, ^b cloreto de magnésio, ^c dNTP 2'deoxinucleosídeo 5' trifosfato.

A reação de amplificação foi realizada em volume final de 10 µL, contendo 1X tampão de amplificação [20 mM Tris-Cl, pH 8.4, 50 mM KCl], 20 mM de cada dNTP, 10 µM de cada iniciador, 0,5 unidades de Taq DNA-polymerase (Invitrogen) e 100 ng de DNA genômico.

Tabela 13- Condições de amplificação do SNP -308 e -238 do TNF.

Estágio	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	5'	1X
Desnaturação	94 °C	45''	32X
Ligação dos Iniciadores	64 °C	45''	
Extensão	72 °C	1'	
Extensão final	72 °C	5'	1X
	4 °C	∞	

Tabela 14- Condições específicas para eletroforese de cada loco.

Loco	Gel	Voltagem	Tempo
TNF-308	10% não desnaturante	230V	1:00h
TNF-238			

Figura 10- Gel de poliacrilamida 10% mostrando a mobilidade eletroforética dos polimorfismos dos SNPs -308 do gene TNF. A banda de 456 pb é referente ao controle interno da reação (genes da Hemoglobina Humana, iniciadores HBBA.S/HGBA.A). As bandas de 259 pb representam o polimorfismo G/A da região promotora -308 do gene TNF.

4.10- Análise Estatística

4.10.1- Estimativa das Frequências Alélicas e Genotípicas

A frequência de cada alelo ou genótipo encontrado foi estimada pelo método de contagem direta, de acordo com a equação:

$$p_i = n_i / n ,$$

onde n_i é o número de ocorrências (frequência absoluta) do alelo ou genótipo i na amostra e n é o número total de alelos ou genótipos amostrados. As frequências alélicas e genotípicas para cada loco foram estimadas por contagem direta utilizando-se o programa GENEPOP 3.4 (RAYMOND; ROUSSET, 1995b).

Para comparação das distribuições das frequências foi aplicado o teste exato de Fisher (SIEGEL, 1975) e o *Odds Ratio* (OR), com auxílio do programa GraphPad InStat 3.01, de forma a detectar possíveis associações com alelos e genótipos de STR entre os três grupos avaliados (pacientes com a síndrome da lipodistrofia, pacientes sem a síndrome da lipodistrofia e controles saudáveis). Foram consideradas as associações com probabilidade menores que 5% ($p < 0,05$).

4.10.2- Teste Exato de Diferenciação Populacional

Esta análise testa a hipótese de distribuição aleatória de diferentes alelos (k) entre populações (r). O teste é análogo ao Teste Exato de Fisher em tabelas de contingência 2 x 2, estendido para tabelas de contingência r x k. Diversos potenciais estados desta tabela de contingência, mantendo os mesmos totais marginais, são explorados via Cadeia de Markov, sendo então estimada a probabilidade (p) de se observar uma tabela menos ou igualmente provável do que a tabela original, sob hipótese de panmixia. A fim de se assegurar que a Cadeia de Markov se iniciasse em posição aleatória, mil passos de desmemorização foram aplicados antes que os valores de p passassem a ser computados. Uma estimativa do erro padrão do valor de p é feita pela partição do número total de passos da Cadeia de Markov (30 mil) em B batches. Os testes exatos de diferenciação populacional foram realizados com o uso do programa GENEPOP 3.4 (RAYMOND; ROUSSET, 1995a).

4.10.3- Aderências ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi verificada pelo teste exato de Guo e Thompson (1992) utilizando-se o programa GENEPOP 3.4 (RAYMOND; ROUSSET, 1995b).

4.10.4- Desequilíbrio de Ligação entre os Locos e Inferência de Haplótipos STR

A presença de uma associação significativa entre os alelos STR foi verificada por meio de teste de desequilíbrio de ligação (EXCOFFIER; SLATKIN, 1998), utilizando-se o programa ARLEQUIN 3.11 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005). Dada uma associação positiva, porém fase gamética desconhecida, o algoritmo EM (EXCOFFIER; SLATKIN, 1995) implementado pelo programa Helixtree® (GoldenHelix, EUA) e o método PHASE (STEPHENS et al., 2001) foram utilizados para inferir os haplótipos.

Resultados

5- RESULTADOS

5.1- Caracterização das Amostras

5.1.1- Pacientes com a Síndrome da Lipodistrofia

Os pacientes selecionados para o estudo, caracterizados como portadores da SL, apresentavam idades variando de 28 a 61 anos (média=41,83 anos), níveis séricos de colesterol total variando de 98 a 295 mg/dL (média=200,8 mg/dL), níveis séricos de triglicerídeos variando de 53 a 1147 mg/dL (média=298,74 mg/dL), quantificação de carga viral variando de <50 a 324.144 cópias/mL (média=13.503,52 cópias/mL), contagem de células T CD4+ variando entre 6 e 1.134 cel/mL (média=439,08 cel/mL) e tempo de uso da terapêutica anti-retroviral variando de 2 a 15 anos (média=6 anos).

Em relação à presença de alterações morfológicas e metabólicas neste grupo de pacientes, 11,94% (8/67) apresentavam somente alterações morfológicas, 29,85% (20/67) apresentavam somente alterações metabólicas e 58,20% (39/67) apresentavam alterações morfológicas e metabólicas.

Entre os anti-retrovirais utilizados por ocasião da inclusão do paciente no estudo, foram identificados 16 tipos diferentes de drogas, sendo que 59,37% dos anti-retrovirais utilizados por estes pacientes pertenciam à classe Inibidores da Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeos (ITRN), 18,75% pertenciam à classe dos Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogo de Nucleosídeos

(ITRNN), 20,98% pertenciam à classe dos Inibidores da Protease (IP) e 0,89% pertenciam à classe de Inibidores da Fusão (IF). Relativo ao esquema terapêutico, 8,98% (6/67) dos pacientes utilizavam somente ITRN, 40,29% (27/67) utilizavam ITRN e ITRNN, 26,86% (18/67) utilizavam ITRN e IP, 20,89% (14/67) utilizavam ITRN, ITRNN e IP, e 2,98% (2/67) utilizavam ITRN, IP e IF. A análise específica ao uso dos IP revelou que, dos 67 pacientes apresentando SL, 34 (50,74%) utilizavam esquema terapêutico com algum anti-retroviral pertencente à classe dos IP, enquanto 33 (49,25%) não apresentavam IP no seu esquema terapêutico. Os dados com as características dos pacientes com a síndrome da lipodistrofia estão dispostos na Tabela 1 do APÊNDICE C.

5.1.2- Pacientes Sem a Síndrome da Lipodistrofia

Os pacientes selecionados para o estudo, caracterizados como não portadores da SL, tinham idades variando de 22 a 61 anos (média=39,92 anos), níveis séricos de colesterol total variando de 93 a 199 mg/dL (média=159,88 mg/dL), níveis séricos de triglicerídeos variando de 49 a 150 mg/dL (média=107,94 mg/dL), quantificação de carga viral variando de 38 a 75.347 cópias/mL (média=13.914,64 cópias/mL), contagem de células T CD4+ variando entre 32 e 1.221 cel/mL (média=437,4 cel/mL) e tempo de uso da terapêutica anti-retroviral variando de 2 a 18 anos (média= 5 anos). Nenhum dos pacientes sem a SL apresentava qualquer tipo de alteração morfológica e/ou metabólica. Entre os anti-retrovirais utilizados, por ocasião da inclusão do paciente no estudo, foram

identificados 14 tipos diferentes, sendo que 60,38% pertenciam à classe Inibidores da Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeos (ITRN), 23,37% pertenciam à classe dos Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogo de Nucleosídeos (ITRNN) e 16,23% pertenciam à classe dos Inibidores da Protease (IP). Em relação ao esquema terapêutico, 8% (4/50) dos pacientes utilizavam somente ITRN, 60% (30/67) utilizavam ITRN e ITRNN, 24% (12/50) utilizavam ITRN e IP, 6% (3/50) utilizavam ITRN, ITRNN e IP, e 2% (1/50) utilizavam ITRNN e IP. Dos 50 pacientes sem SL, 16 (32%) utilizavam esquema terapêutico com algum anti-retroviral pertencente à classe dos IP, enquanto 34 (68%) não tinham IP no seu esquema terapêutico.

Os dados com as características dos pacientes sem a síndrome da lipodistrofia estão dispostos na Tabela 2 do APÊNDICE C.

Tabela 15– Características dos pacientes com e sem a SL, dados demográficos, terapia anti-retroviral e parâmetros metabólicos.

Variável	Pacientes com SL n = 67	Pacientes sem SL n = 50
Dados demográfico		
Idade (anos)	28 – 61 (M=41,83)	22 – 61 (M=39,94)
Células TCD4+ (cel/mL)	6 – 1.134 (M=429,08)	32 – 1221 (M=437,4)
Carga Viral - HIV (cópias/mL)	<50 – 324.144 (M=13.503,52)	38 – 75347 (M=13.914,64)
Terapia anti-retroviral		
Duração total da terapia antiretroviral (anos)	2 – 15 (M=6)	2 – 18 (M=5)
ITRN (inserido na terapêutica)	59,37%	60,38%
ITRNN (inserido na terapêutica)	18,75%	23,37%
IP (inserido na terapêutica)	21,88%	16,23%
Parâmetros Metabólicos		
Colesterol total (mg/dL)	98 – 295 (M=200,80)	93 – 199 (M=159,88)
Triglicerídeos (mg/dL)	53 – 1147 (M=298,74)	49 – 150 (M=107,94)

ITRN= inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos; ITRNN= inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos; IP= inibidores da protease; M= média aritmética.

5.1.3- Comparações do Esquema Terapêutico Adotado entre Pacientes Apresentando ou não a Síndrome da Lipodistrofia

As comparações entre as freqüências relacionadas ao uso do esquema terapêutico adotado mostraram que:

- 1) O número de pacientes sem a SL que usavam em seu esquema terapêutico os ITRN e os ITRNN mostrou-se significativamente maior quando

comparados aos pacientes com a SL ($p=0.0411$, $OR=0.4500$, $IC95\%=0.2131$ a 0.9502).

2) O número de pacientes com a SL que usavam em seu esquema terapêutico os ITRN, ITRNN, e os IP mostrou-se significativamente maior quando comparados aos pacientes sem a SL ($p=0.0326$, $OR=4.138$, $IC95\%=1.119$ a 15.301).

3) O número de pacientes com a SL que usavam em seu esquema terapêutico pelo menos um tipo de medicamento incluído na classe dos IP (IP+) mostrou-se maior quando comparados aos pacientes sem a SL ($p=0.0587$, $OR=2.189$, $IC95\%=1.020$ a 4.697).

As comparações estão representadas na Tabela 16, assim como nos Gráficos 1 e 2.

Tabela 16- Comparações das frequências relacionadas ao esquema terapêutico adotado.

Variável	Pacientes com SL n = 67	Pacientes sem SL n = 50	Significância (p)
Esquema Terapêutico			
ITRN	8,98%	8,00%	p=0.0411
ITRN + ITRNN	40,29%	60,00%	
ITRN + IP	26,86%	24,00%	
ITRNN + IP	0,00%	2,00%	p=0.0326
ITRN + ITRNN + IP	20,89%	6,00%	
ITRN + IF + IP	2,98%	0,00%	p=0.0587
IP +	50,74%	32,00%	
IP -	49,25%	68,00%	p=0.0587

ITRN= inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos; ITRNN= inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos; IP= inibidores da protease; IP+= esquema terapêutico adotado com pelo menos um medicamento da classe dos IP; IP-= ausência de medicamento da classe dos IP no esquema terapêutico adotado; *p* value.

Gráfico 1– Comparações das frequências do uso de diferentes classes de anti-retrovirais relacionadas ao esquema terapêutico adotado entre os pacientes com ou sem a SL. ITRN= inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos; ITRNN= inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos; IP= inibidores da protease;

Gráfico 2- Comparações das freqüências do uso de diferentes classes de anti-retrovirais relacionadas ao esquema terapêutico adotado. IP= inibidores da protease, IP+= uso de pelo menos um medicamento da classe dos IP no esquema terapêutico, IP-= esquema terapêutico que não possui medicamento da classe dos IP.

5.2- Tipificação dos STRs dos Loci Codificantes do TNF

Em conjunto, os três grupos incluídos no estudo (pacientes com ou sem a SL e controles saudáveis) apresentaram 14 alelos para o microssatélite TNFa (Gráfico 3), 7 alelos para o microssatélite TNFb (Gráfico 4), 2 alelos para o microssatélite TNFc (Gráfico 5), 9 alelos para o microssatélite TNFd (Gráfico 6) e 3 alelos para o microssatélite TNFe (Gráfico 7). A Tabela 17 e os Gráficos de 3 a 7 mostram os resultados referentes às comparações das frequências dos microssatélites entre os pacientes com ou sem a SL e controles saudáveis. Para o TNFd, foram encontrados quatro indivíduos contendo o alelo de 120pb, recentemente descrito por Wastowski et al. (2006) denominado alelo zero (TNFd0).

Os genótipos dos grupos avaliados (pacientes com ou sem a SL e controles saudáveis), para todos os loci de microssatélites testados, aderiram às proporções teóricas do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com exceção do loco TNFc no grupo de pacientes sem SL ($p=0.0081$) e do loco TNF-308 para todos os grupos analisados ($p=0.0463$ para controles; $p=0.0002$ para pacientes com SL e $p=0.0113$ para pacientes sem SL).

Os testes exatos de diferenciação populacional mostraram diferenças significativas nas frequências gênicas para o loco TNFa, comparando-se os grupos de pacientes sem SL e indivíduos controle ($p=0.00841 \pm 0.00079$), e para o loco TNFb, comparando-se ambos grupos de pacientes com SL e sem SL com indivíduos controle ($p=0.00007 \pm 0.00004$ e $p=0.00029 \pm 0.00009$, respectivamente). Da mesma forma, diferenças na frequência gênica foram

detectadas para o loco TNFc entre os grupos de pacientes com SL e pacientes sem SL quando comparados ao grupo controle ($p=0.02028 \pm 0.00095$ e $p=0.05472 \pm 0.00172$, respectivamente), e para o loco TNFd no grupo de pacientes com SL quando comparados aos controles saudáveis ($p=0.02780 \pm 0.00162$).

Quanto às freqüências genotípicas, os testes revelaram diferenças significativas para o loco TNFb e TNFc quando foram comparados os grupos de pacientes com SL e sem SL com os controles saudáveis ($p= 0.01501 \pm 0.00061$ e $p=0.04031 \pm 0.00108$ para o TNFb; $p= 0.00000 \pm 0.00000$ e $p= 0.00012 \pm 0.00004$ para o TNFc, respectivamente). Da mesma forma, foram encontradas diferenças nas freqüências genotípicas do loco TNFa, comparando-se pacientes sem SL com indivíduos controle ($p=0.01879 \pm 0.00128$), e para o loco TNFd, comparando-se pacientes com SL com indivíduos controle ($p=0.02146 \pm 0.00120$).

Essas diferenças sugerem que os microssatélites de TNF podem influenciar o desenvolvimento da SL. Dessa forma, tabelas de contingência 2 x 2 foram criadas para cada alelo e genótipo, de forma a detectar possíveis diferenças nas freqüências entre os grupos através do teste exato de Fisher. A distribuição das freqüências alélicas entre os grupos estudados está descrita na Tabela 17.

Os alelos mais freqüentes encontrados em pacientes portadores da infecção pelo HIV-1, apresentando a SL, foram:

- TNFa: a2 (20,15%) e a7 (15,67%);
- TNFb: b5 (44,03%) e b4 (20,15%);
- TNFc: c1 (59,70%);
- TNFd: d3 (37,31%) e d4 (27,61%);
- TNFe: e3 (85,07%).

Dentre os pacientes sem a SL, os alelos mais freqüentes foram:

- TNFa: a2 (22%) e a5 (18%);
- TNFb: b5 (37%) e b4 (23%);
- TNFc: c1 (57%);
- TNFd: d3 (39%) e d4 (33%);
- TNFe: e3 (85%).

As análises das freqüências alélicas revelaram que, para o grupo de controles saudáveis, os alelos mais freqüentes foram:

- TNFa: a2 (20,23%), a6 (16,03%) e a10 (15,65%);
- TNFb: b4 (43,33%) e b5 (32,08%);
- TNFc: c1 (72,08%);
- TNFd: d3 (47,33%) e d4 (28,24%);
- TNFe: e3 (88,88 %).

5.2.1- Comparações das Freqüências dos Alelos de Microssatélites do TNF

TNFa

Comparações das freqüências encontradas nos grupos estudados mostraram que para o loco TNFa:

- 1) A freqüência do alelo TNFa3 apresentou-se significativamente aumentada entre pacientes com a SL quando comparada aos indivíduos saudáveis ($p=0.0184$, $OR(Odds\ Ratio)= 10.116$, $IC95\%(Confidence\ Interval)=1.169$ a 87.536).

- 2) O alelo TNFa5 apresentou aumento significativo de sua frequência entre pacientes sem a SL quando comparada aos controles saudáveis ($p=0.003$, $OR=3.889$, $IC95\%=1.852$ a 8.166).
- 3) A frequência do alelo TNFa5 está significativamente aumentada entre pacientes sem a SL em comparação aos pacientes com a SL ($p=0.0024$, $OR=3.983$, $IC95\%=1.593$ a 9.957).
- 4) O genótipo TNFa5,5 apresentou aumento significativo de sua frequência entre pacientes sem a SL quando comparada aos controles saudáveis ($p=0.0202$, $OR=19.379$, $IC95\%=0.9819$ a 382.46).

TNFb

As análises comparativas entre as frequências observadas no loco do TNFb mostraram que:

- 1) A frequência do alelo TNFb3 apresentou-se significativamente aumentada entre os pacientes sem a SL quando comparada aos controles saudáveis ($p=0.0112$, $OR=2.526$, $IC95\%=1.243$ a 5.135).
- 2) O alelo TNFb4 apresentou aumento significativo de sua frequência entre pacientes sem a SL quando comparada aos controles saudáveis ($p=0.004$, $OR=0.3906$, $IC95\%=0.2296$ a 0.6645).
- 3) A frequência do alelo TNFb2 estava significativamente aumentada entre os pacientes com SL quando comparados aos controles saudáveis ($p=0.0056$, $OR=20.429$, $IC95\%=1.120$ a 372.63).

- 4) A frequência do alelo TNFb4 estava significativamente aumentada entre os controles saudáveis quando comparados aos pacientes com SL ($p < 0,0001$, $OR = 0.3300$, $IC95\% = 0.2015$ a 0.5405).
- 5) O alelo TNFb5 apresentou-se significativamente aumentado entre pacientes com a SL em comparação aos controles ($p = 0.0250$, $OR = 1.665$, $IC95\% = 1.077$ a 2.575).
- 6) O alelo TNFb6 apresentou-se significativamente aumentado entre pacientes com a SL em comparação aos controles saudáveis ($p = 0.0453$, $OR = 12.802$, $IC95\% = 0.6558$ a 249.92).
- 7) O genótipo TNFb3,3 apresentou aumento significativo de sua frequência entre os pacientes com a SL quando comparada aos controles saudáveis ($p = 0.0155$, $OR = 17.079$, $IC95\% = 0.9045$ a 322.49).
- 8) O genótipo TNFb5,4 apresentou aumento significativo de sua frequência entre os controles saudáveis, quando comparada aos pacientes com a SL ($p = 0.0058$, $OR = 0.3380$, $IC95\% = 0.1564$ a 0.7307).
- 9) O genótipo TNFb5,5 apresentou aumento significativo de sua frequência entre os pacientes com a SL quando comparada aos controles saudáveis ($p = 0.0212$, $OR = 2.906$, $IC95\% = 1.211$ a 6.973).
- 10) O genótipo TNFb5,3 apresentou aumento significativo de sua frequência entre pacientes sem a SL quando comparada aos controles saudáveis ($p = 0.0161$, $OR = 4.721$, $IC95\% = 1.316$ a 16.940).
- 11) O genótipo TNFb5,4 apresentou aumento significativo de sua frequência entre controles saudáveis quando comparada aos pacientes sem a SL ($p = 0.0027$, $OR = 0.2627$, $IC95\% = 0.1034$ a 0.6679).

TNFC

As análises comparativas entre as frequências observadas no loco do TNFC mostraram que:

- 1) O alelo TNFC1 apresentou-se significativamente aumentado entre os controles saudáveis em comparação aos pacientes com a SL ($p= 0.0157$, $OR= 0.5738$, $IC95\%=0.3674$ a 0.8961).
- 2) O alelo TNFC2 apresentou-se significativamente aumentado entre os pacientes com a SL em comparação aos controles saudáveis ($p= 0.0157$, $OR= 1.743$, $IC95\%=1.116$ a 2.722).
- 3) O genótipo TNFC1,1 apresentou aumento significativo de sua frequência entre os controles saudáveis quando comparada aos pacientes sem a SL. ($p=0.0065$, $OR=0.3638$, $IC95\%=0.1782$ a 0.7428).
- 4) O genótipo TNFC1,1 apresentou aumento significativo de sua frequência entre os controles saudáveis quando comparada aos pacientes com a SL. ($p=0.0055$, $OR=0.3981$, $IC95\%=0.2111$ a 0.7506).
- 5) O genótipo TNFC1,2 apresentou aumento significativo de sua frequência entre os pacientes sem a SL quando comparada aos controles saudáveis ($p=0.0040$, $OR=2.813$, $IC95\%=1.412$ a 5.604).
- 6) O genótipo TNFC1,2 apresentou aumento significativo de sua frequência entre os pacientes com a SL quando comparada aos controles saudáveis ($p=0.0150$, $OR=2.147$, $IC95\%=1.167$ a 3.947).

TNFd

As análises comparativas entre as frequências observadas no loco do TNFd mostraram que:

- 1) O alelo TNFd7 apresentou-se significativamente aumentado entre pacientes com a SL em comparação aos controles saudáveis ($p=0.0382$, $OR=13.973$, $IC95\%=0.7159$ a 272.73).
- 2) O alelo TNFd7 apresentou-se significativamente aumentado entre pacientes sem a SL quando comparados aos controles saudáveis ($p=0.0206$, $OR=18.846$).
- 3) O genótipo TNFd4,2 apresentou-se significativamente aumentado entre pacientes com a SL quando comparados aos controles saudáveis ($p=0.0367$, $OR=3.417$, $IC95\%=1.072$ a 10.896).

TNFe

Quando comparadas as frequências referentes aos polimorfismos do TNFe entre os diversos grupos, nenhuma diferença significativa foi observada.

Gráfico 3- Distribuição das freqüências alélicas para o loco TNFa em pacientes com a SL, pacientes sem a SL e controles saudáveis.

Gráfico 4- Distribuição das freqüências alélicas para o loco TNFb em pacientes com a SL, pacientes sem a SL e controles saudáveis.

Gráfico 5- Distribuição das frequências alélicas para o loco TNF α em pacientes com a SL, pacientes sem a SL e controles saudáveis.

Gráfico 6- Distribuição das freqüências alélicas para o loco TNFd em pacientes com a SL, pacientes sem a SL e controles saudáveis.

Gráfico 7- Distribuição das freqüências alélicas para o loco TNFe em pacientes com a SL, pacientes sem a SL e controles saudáveis.

5.2.2- Tipificação do Polimorfismo da Região Promotora do TNF-308 e TNF-238

A tipificação do polimorfismo do TNF-308 para os alelos TNF-308G e TNF-308A, e do TNF-238 para os alelos TNF-238G e TNF-238A foi avaliada nos grupos de pacientes com ou sem a SL e controles saudáveis.

TNF-238

O alelo TNF-238G apresentou-se mais freqüente em relação ao alelo -238A nos três grupos analisados (Gráfico 9). Entretanto, quando a freqüência alélica foi comparada entre os diferentes grupos estudados, nenhuma diferença significativa foi observada. A distribuição da freqüência alélica do TNF-238 está demonstrada na Tabela 18.

Comparações da freqüência genotípica mostraram que o genótipo TNF-238GA apresenta-se significativamente aumentado entre os pacientes com a SL quando comparados aos controles saudáveis ($p=0.0192$, $OR= 2.913$, $IC95\%= 1.202$ a 7.057).

TNF-308

O alelo TNF-308G apresentou-se mais freqüente em relação ao alelo -308A nos três grupos analisados (Gráfico 10). A distribuição da freqüência alélica do TNF-308 está demonstrada na Tabela 19.

Comparações das freqüências encontradas nos grupos estudados mostraram que para o TNF-308:

- 1) O alelo TNF-308G apresentou-se significativamente aumentado entre pacientes com a SL quando comparados aos pacientes sem a SL ($p=0.0328$, OR= 2.203, IC95%= 1.094 a 4.435).
- 2) O alelo TNF-308G apresentou-se significativamente aumentado entre os controles saudáveis quando comparados aos pacientes sem a SL ($p<0.0001$, OR= 0.2618, IC95%=0.1353 a 0.5063).
- 3) O genótipo TNF-308GG apresentou-se significativamente aumentado entre pacientes com a SL quando comparados aos pacientes sem a SL ($p=0.0311$, OR= 2.623, IC95%= 1.096 a 6.273).
- 4) O genótipo TNF-308GG apresentou-se significativamente aumentado entre os controles saudáveis quando comparados aos pacientes sem a SL ($p=0.0060$, OR= 0.3293, IC95%= 0.1538 a 0.7049).
- 5) O genótipo TNF-308AA apresentou-se significativamente aumentado entre os pacientes sem a SL quando comparados aos controles saudáveis ($p=0.0004$, OR= 38.416, IC95%= 2.120 a 696.20).
- 6) O genótipo TNF-308AA apresentou-se significativamente aumentado entre os pacientes com a SL quando comparados aos controles saudáveis ($p=0.0040$, OR= 23.144, IC95%= 1.259 a 425.44).

Tabela 18– Distribuição das frequências dos alelos do TNF-238 entre o grupo de pacientes com ou sem a SL e controle saudável.

Alelos	TNF-238		
	Pacientes com SL	Pacientes sem SL	Controles (n=131)
	(n=67)	(n=50)	
	%	%	%
G	90,30	95,00	94,66
A	9,70	5,00	5,34
Total	100	100	100

Tabela 19– Distribuição das frequências dos alelos do TNF-308 entre o grupo de pacientes com ou sem a SL e controle saudável.

Alelos	TNF-308		
	Pacientes com SL	Pacientes sem SL	Controles (n=131)
	(n=67)	(n=50)	
	%	%	%
G	88,06	77,00	92,74
A	11,94	23,00	7,25
Total	100	100	100

Gráfico 8– Distribuição da freqüência alélica do TNF -238 em pacientes com a SL, sem a SL e controles saudáveis.

Gráfico 9– Distribuição da frequência alélica do TNF -308 em pacientes com a SL, sem a SL e controles saudáveis.

5.3- Inferência de Haplótipos e Análise de Diversidade Haplotípica

Dentre os indivíduos incluídos no estudo, 236 (95,16%) foram submetidos à inferência de haplótipos por métodos computacionais probabilísticos. Desses, 193 (81,77%) tiveram o mesmo haplótipo inferido por ambos os métodos utilizados. O algoritmo EM inferiu os haplótipos com probabilidade média de 0.97461, enquanto que o método Phase inferiu os haplótipos com probabilidade média de 0.87976.

Adotando-se uma postura conservadora, somente os 193 indivíduos que tiveram a mesma constituição haplotípica evidenciada pelos dois métodos foram considerados para as análises subsequentes.

Para detectar possíveis variações nas frequências dos haplótipos entre os grupos avaliados, tabelas de contingência 2 x 2 foram criadas e as frequências de tais haplótipos foram comparadas, utilizando o teste exato de Fisher e OR.

As comparações das frequências haplotípicas encontradas nos grupos estudados mostraram que:

- 1) O haplótipo TNF e3 d3 -238G -308A c1 a5 b7 estava significativamente aumentado entre pacientes sem a SL em comparação aos pacientes com a SL ($p=0.0319$, $OR=0.075$, $IC95\%=0.0039$ a 1.4536). Este dado está em parte relacionado com o aumento da frequência do alelo TNFa5 entre pacientes sem a SL em comparação aos pacientes com a SL ($p=0.0024$).
- 2) O haplótipo TNF e3 d3 -238G -308G c1 a10 b4 estava significativamente aumentado entre os controles saudáveis quando comparado aos pacientes sem a SL ($p=0.0436$, $OR=0.2374$, $IC95\%=0.05313$ a 1.061).

- 3) O haplótipo TNF e3 d3 -238G -308G c1 a11 b4 estava significativamente aumentado entre os controles saudáveis quando comparado aos pacientes com a SL ($p=0.0221$, $OR=0.2500$, $IC95\%=0.07163$ a 0.8725).
- 4) O haplótipo TNF e3 d3 -238G -308A c1 a5 b7 estava significativamente aumentado entre os pacientes sem a SL quando comparado aos controles saudáveis ($p=0.0421$, $OR=5.241$, $IC95\%=1.110$ a 24.740). Este dado está em parte relacionado com o aumento da frequência dos alelos TNFa5 entre pacientes sem a SL em comparação aos controles saudáveis ($p=0.003$).

Gráfico 10– Distribuição haplotípica dos microssatélites do TNF em pacientes com ou sem a SL e controles saudáveis.

Discussão

6– DISCUSSÃO

O tratamento do HIV/aids é feito com medicamentos anti-retrovirais, drogas que inibem a reprodução do HIV no sangue. A associação desses medicamentos com fins terapêuticos recebe o nome de terapia anti-retroviral, e conta com 17 medicamentos que estão divididos em quatro classes: os inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos, os inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos, os inibidores da protease e os inibidores de fusão (SOUZA, 2005).

Infelizmente, diversos efeitos colaterais têm sido associados à terapia anti-retroviral prolongada, particularmente com o uso de inibidores da protease viral (VIRABEN; AQUILINA, 1998). Dentre esses, a síndrome da lipodistrofia (SL) com alterações na distribuição corpórea de gorduras e várias anormalidades metabólicas, incluindo a dislipidemia, acompanhada de hiperlipidemia com aumento nos níveis sanguíneos de colesterol e triglicérides, resistência à insulina e acidemia láctica (HUI, 2003; MILLER et al., 2003; CARR, 2003b).

No presente estudo associamos os diferentes esquemas terapêuticos adotados com o desenvolvimento da síndrome da lipodistrofia, e podemos perceber que a frequência do uso de medicamentos pertencentes a classe dos ITRN e ITRNN foi significativamente maior entre pacientes sem a SL em comparação aos pacientes com a SL ($p=0.04$). Já o uso das drogas das três classes de anti-retrovirais (ITRN, ITRNN e IP) em conjunto foi significativamente maior entre pacientes com SL quando comparados aos pacientes sem a SL ($p=0.03$). Esses dados sugerem que os IP podem

estar envolvidos na patogenia da SL, conforme observamos em outros estudos (VIRABEN; AQUILINA, 1998; MILLER et al., 2000; VALENTE et al., 2005).

Adicionalmente, quando comparamos a presença de pelo menos um medicamento da classe dos IP no esquema terapêutico adotado, percebemos que o grupo de pacientes com a SL apresentava frequência aumentada para o uso de IP quando comparados aos pacientes sem a SL ($p=0.05$), reforçando a influencia dos IP na patogenia da SL.

Relativo aos mecanismos patogênicos da SL, diversos relatos têm demonstrado a contribuição do polimorfismo de genes que codificam citocinas na susceptibilidade ou gravidade de várias doenças, sendo o TNF particularmente importante (POCIOT et al., 1993; DERKX; BRUIN; JONGENEEL, 1995; TURNER et al., 1995; HAJEER; HUTCHINSON, 2001; WARLE et al., 2003; SOOKOIAN; GONZALEZ; PIROLA, 2005; LEDRU et al., 2000; GALLI et al., 2003; JOHNSON et al., 2004).

A associação do polimorfismo de genes de citocinas nas manifestações de doenças está pautada pelo fato de que as diferenças polimórficas podem influenciar o nível de produção dessas citocinas. Este fato é baseado na observação de que indivíduos com diferenças polimórficas de microssatélites e SNPs de citocinas também diferem nos níveis de citocinas produzidos em culturas de células *in vitro* (WARLE et al., 2003). Assim, os genes polimórficos de citocinas são denominados de “altos” ou “baixos” produtores, após a avaliação entre o genótipo e o padrão correspondente de produção de citocinas *in vitro* (REVIRON et al., 2001; TAMBUR et al., 2001).

Estudos têm demonstrado a associação de alguns polimorfismos da região promotora do gene do TNF com níveis de produção da citocina TNF (POCIOT et al., 1993; DERKX; BRUIN; JONGENEEL, 1995; TURNER et al., 1995; HAJEER; HUTCHINSON, 2000, 2001; WARLE et al., 2003; SOOKOIAN; GONZALEZ; PIROLA, 2005). Relativo aos polimorfismos de microssatélite do TNF e sua produção *in vitro*, nem todos os alelos polimórficos foram analisados e, para alguns alelos, os estudos têm mostrado resultados conflitantes. Pociot et al. (1993) relataram que os alelos TNFa2 e c2 estão associados à alta produção de TNF. Já os alelos TNFa6 e c1 estão associados à baixa produção de TNF. Por outro lado, Derkx, Bruin e Jongeneel (1995) mostraram que os alelos TNFa2, a6 e a10 estão associados à baixa produção de TNF, enquanto os alelos a4 e a11 estão associados à alta produção desta citocina. Nenhuma associação entre os alelos do TNFb com a produção do TNF foi encontrada. Estendendo as análises dos polimorfismos de microssatélites e a produção de TNF, (TURNER et al., 1995; YAQOOB et al., 1997), utilizando cultura *in vitro* e estimulação de células mononucleares com endotoxinas, tem sido sugerido que o alelo TNFd3 esteja associado com a alta produção da citocina (TURNER et al., 1995).

Apesar de apresentar a associação entre o polimorfismo e produção do TNF, as análises nem sempre são fáceis e podem ser avaliadas de maneira isolada. O gene do TNF está localizado na região de classe III do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH), no cromossomo 6p21, e apresenta forte ligação de desequilíbrio com certos alelos da região I e II do CPH, formando haplótipos (HAJEER; HUTCHINSON, 2001). Adicionalmente, estudos têm revelado a associação entre alelos do HLA-DRB1 e a produção *in vitro* do TNF.

Em geral, as famílias alélicas HLA-DR3, -DR1, -DR4 e -DR7 estão associadas com a alta produção de TNF e, em contraste, HLA-DR2 e -DR5 estão associados com a baixa produção da citocina (JACOB et al., 1990; POCIOT et al., 1993; BENDTZEN et al., 1998). Estas associações são importantes nos mecanismos de indução das respostas imunológicas, visto que a molécula HLA é importante para a ligação de peptídeos antigênicos e sua apresentação para linfócitos T. Ademais, o TNF é uma importante citocina pró-inflamatória relacionada às respostas imunológicas, seja infecciosa ou auto-imune, e a mecanismos metabólicos (HAJEER; HUTCHINSON, 2000; SKOOG et al., 2001). As funções biológicas do TNF são complexas e relacionadas com a concentração e duração da exposição à citocina (HAJEER; HUTCHINSON, 2000). Assim, tem sido descrito que, em situações agudas, a produção de TNF é benéfica, acarretando aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular e facilitando o tráfego de células imunitárias para o local de infecção, além de estimular a fagocitose, principalmente em neutrófilos e macrófagos (BARBARA; VAN OSTADE; LOPEZ, 1996). Entretanto, a exposição sistêmica e prolongada ao TNF pode ser prejudicial. Níveis circulantes elevados desta citocina estão associados ao choque tóxico, induzido por endotoxinas bacterianas (TRACEY et al, 1986) e alterações no metabolismo (HERMANN; RICARD; NICAUD, 1998).

A relação entre os polimorfismos com algumas patologias pode ser devida à influência direta da variabilidade genética sobre a expressão gênica, ao desequilíbrio de ligação dos genes de citocina com genes adjacentes, ou ainda, à influência de outros genes, situados em outros cromossomos, agindo epistaticamente.

A produção do TNF pode estar associada com as influências do polimorfismo de regiões promotoras e dos microssatélites encontrados na região do TNF, estando ou não em desequilíbrio de ligação com os alelos de classe I e II, tanto em doenças auto-imunes, doenças infecciosas, infecções parasitárias e transplantes (HAJEER; HUTCHINSON, 2001).

Concentrações séricas elevadas de TNF têm sido relatadas em pacientes portadores do HIV apresentando as alterações morfológicas e metabólicas da SL (MYNARCIK et al., 2000). Ainda com respeito à produção do TNF, estudos observaram que, após a utilização da terapia anti-retroviral, os níveis séricos de TNF aumentavam (MYNARCIK et al., 2000; LICHTENSTEIN et al., 2001), sugerindo que o aumento nos níveis dessa citocina esteja associado com o desenvolvimento da SL (LEDRU et al., 2000; GALLI et al., 2003).

Tem sido descrito por alguns autores que os níveis séricos de TNF (e em tecido adiposo subcutâneo) estão aumentados em pacientes com a SL (LEDRU et al., 2000; GALLI et al., 2003; KERN et al., 2003; VIGOUROUX et al., 2003; JOHNSON et al., 2004). Entretanto, não existem estudos prévios que avaliaram o polimorfismo de microssatélites do TNF em pacientes portadores do HIV com a SL. Neste estudo, os resultados mostram que o grupo composto por pacientes com a SL apresentou uma frequência significativamente aumentada para o alelo TNFa3, quando comparados ao grupo de controles saudáveis ($p=0.01$). A frequência do alelo TNFa5 estava significativamente aumentada entre os pacientes sem a SL, quando comparada aos pacientes com a SL ($p=0.002$) e controles saudáveis ($p=0.003$). Da mesma forma, o genótipo TNFa5,5 apresentou significativo aumento entre os pacientes sem a SL, quando comparados aos

controles saudáveis ($p=0.02$). Esses dados sugerem que o alelo TNFa5 pode estar envolvido na patogenia da SL, conferindo proteção em relação ao desenvolvimento dessa síndrome.

Comparações acerca do TNFb revelaram que a frequência da homozigose para os alelos b3,3 e b5,5 estava significativamente aumentada entre portadores da SL em comparação aos controles saudáveis ($p=0.01$ e $p=0.02$, respectivamente). Por outro lado, o genótipo b5,3 apresentou aumento significativo de sua frequência entre os pacientes sem SL quando comparados aos controles saudáveis ($p=0.01$). Os controles saudáveis apresentaram-se significativamente aumentados no genótipo b5,4 em relação aos pacientes com e sem a SL ($p=0.005$ e $p=0.002$, respectivamente). Para os alelos b3 e b4, a frequência estava significativamente aumentada entre pacientes sem a SL em comparação aos controles saudáveis ($p=0.01$ e $p=0.004$, respectivamente). Análise do alelo TNFb4 revela que sua frequência estava significativamente aumentada entre controles saudáveis quando comparada aos pacientes com a SL ($p=0.0001$). Para os alelos b2, b5 e b6, as análises mostraram que sua frequência estava significativamente aumentada entre os pacientes com a SL quando comparada aos controles saudáveis ($p<0.001$, $p=0.002$ e $p=0.004$, respectivamente).

A frequência para o alelo TNFc1 estava significativamente aumentada entre controles saudáveis quando comparada aos pacientes com a SL e, inversamente, a frequência do alelo c2 estava significativamente aumentada entre os pacientes com a SL em relação aos controles saudáveis ($p=0.01$ para ambos). A homozigose c1,1 mostrou que os controles saudáveis apresentavam-se

significativamente aumentados quando comparados aos pacientes com e sem a SL ($p=0.005$ e $p=0.006$, respectivamente). Em contrapartida, os pacientes com e sem a SL apresentavam aumento significativo de sua frequência para o genótipo c1,2 em relação aos controles saudáveis ($p=0,01$ e $p=0,004$).

A frequência do alelo TNFd7 estava significativamente aumentada em pacientes com e sem a SL quando comparada aos controles saudáveis ($p=0.03$ e 0.02 , respectivamente). O genótipo d4,2 mostrou aumento significativo entre os pacientes com a SL em comparação aos controles saudáveis ($p=0.03$).

Para o microssatélite TNFe, não foi observada associação entre seus alelos com susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento da SL, ou associação com o grupo de controles saudáveis.

Análises entre genótipo e produção de TNF não foram possíveis de serem realizadas devido à ausência de trabalhos que abordem os alelos encontrados no presente estudo.

De maneira distinta aos microssatélites, muitos estudos têm sido conduzidos para avaliar o polimorfismo da região promotora do gene TNF (nas posições -308 e -238), sendo bem reconhecida a participação desses sítios polimórficos em associação com a magnitude de produção do TNF *in vitro*. Embora resultados conflitantes sejam descritos, a maioria dos estudos descreve que os genótipos TNF-308AA e 308GA estão associados com a alta produção de TNF (POCIOT et al., 1993; BOUMA et al., 1996; LOUIS et al., 1998; PELLETIER et al., 2000; TAMBUR et al., 2001; REVIRON et al., 2001), ao passo que o genótipo -308GG está associado com baixa produção da citocina. Alguns estudos têm avaliado o polimorfismo da região promotora do TNF em indivíduos

portadores do HIV-1 apresentando a SL. De acordo com os resultados encontrados por Maher et al. (2002) não há diferença significativa na frequência do alelo -308A entre os pacientes com e sem a SL e entre controles saudáveis. No presente estudo observamos que o alelo TNF-308G apresentou significativo aumento de sua frequência entre os pacientes com a SL em relação aos pacientes sem a SL ($p=0.03$). Da mesma forma, o genótipo TNF-308GG mostrou aumento significativo entre os pacientes com a SL quando comparados aos pacientes sem a SL ($p=0.03$). Esses dados sugerem que o alelo -308G, assim como sua homozigose, podem conferir susceptibilidade ao desenvolvimento da SL.

Similarmente, os resultados nas avaliações do SNP do TNF-238 também têm sido conflitantes. Huizinga et al. (1997) sugerem que o alelo -238G está associado com a alta produção do TNF, o que não foi confirmado pelo estudo realizado por Pociot et al. (1993). Estudos prévios reportam que a frequência do genótipo TNF -238GA está aumentada nos pacientes com SL, sugerindo que o alelo -238A é um fator de susceptibilidade, enquanto o genótipo -238GG é um fator de proteção ao desenvolvimento dessa síndrome (MAHER et al., 2002). Nolan et al. (2003) sugerem que a presença do genótipo TNF -238GA pode influenciar na progressão para a SL. Neste estudo, os resultados mostram que a frequência do genótipo TNF-238GA está significativamente aumentada entre os pacientes com a SL quando comparados aos controles saudáveis ($p=0.01$). Entretanto, as comparações entre os grupos de pacientes não mostraram diferenças significantes.

O presente estudo também avaliou os haplótipos formados pelos microsatélites e região promotora do TNF. Os resultados mostraram que o

haplótipo formado pelo TNFe3 d3 -238G -308A c1 a5 b7 apresentou aumento significativo entre os pacientes sem a SL quando comparados aos pacientes com a SL e controles saudáveis ($p=0.03$ e $p=0.04$, respectivamente). Esses dados sugerem que a presença desse haplótipo pode conferir proteção ao portador de HIV/aids para o desenvolvimento da SL. O haplótipo TNFe3 d3 -238G -308G c1 a10 d4 apresentou aumento significativo entre os controles saudáveis quando comparados aos pacientes sem a SL ($p=0.04$). Já para o haplótipo TNFe3 d3 -238G -308G c1 a11 b4 o grupo de controles saudáveis apresentou aumento significativo de sua frequência em relação aos pacientes com a SL ($p=0.04$).

Finalmente, quando consideramos as comparações das frequências dos alelos dos microssatélites da região do TNF podemos inferir que a presença do alelo TNFa5 pode conferir proteção aos indivíduos portadores do HIV/aids no desenvolvimento da SL. Já as comparações dos alelos da região promotora do TNF nos sugerem que a presença do alelo TNF-308G, assim como seu homozigoto TNF-308GG, podem conferir susceptibilidade para o desenvolvimento da SL. A presença do haplótipo TNFe3 d3 -238G -308A c1 a5 b7 sugere proteção para o desenvolvimento dessa síndrome.

Embora os mecanismos relacionados com a participação do TNF no desenvolvimento da SL não estejam bem esclarecidos, este estudo sugere que fatores imunogenéticos associados com a magnitude de expressão do TNF e provavelmente da expressão de outras citocinas pró-inflamatórias estejam envolvidas no desenvolvimento da SL em pacientes com HIV/aids, sendo que estudos posteriores serão necessários para complementar os achados deste

estudo. Este é o primeiro trabalho que avalia a associação dos microssatélites da região do TNF ao desenvolvimento da SL.

Conclusões

7– CONCLUSÕES

1) Os medicamentos incluídos na classe dos inibidores da protease parecem estar relacionados à patogenia da SL.

2) Quando comparamos os pacientes com e sem a SL, o alelo TNFa5 sugere estar associado com a proteção para o desenvolvimento dessa síndrome. Já o alelo TNF-308G, assim como seu homozigoto TNF-308GG, podem estar associados com a susceptibilidade para o desenvolvimento da SL.

3) A presença do haplótipo TNFe3 d3 -238G -308A c1 a5 b7 sugere estar em associação com a proteção para o desenvolvimento da SL.

4) Este é o primeiro trabalho que avalia as frequências dos microssatélites da região do TNF em pacientes com SL, sendo possível identificar marcadores de proteção e de susceptibilidade para o desenvolvimento dessa síndrome, sugerindo que os alelos, relacionados a diferentes magnitudes de expressão da citocina, possam estar associados ao desenvolvimento da SL em portadores do HIV/aids.

Aplicabilidade para
Enfermagem

8- APLICABILIDADE PARA ENFERMAGEM

Torna-se imprescindível que a enfermagem atual, enquanto ciência, esteja envolvida e inserida em todas as questões relacionadas ao processo de desenvolvimento do conhecimento, o que pode ser favorecido pelo incremento da pesquisa clínica, envolvendo a área básica, abrindo perspectivas de avanços em múltiplas direções (FLÓRIA-SANTOS; SILVA, 2005; ALVES et al, 2004; BOND; HEITKEMPER, 2001).

O enfermeiro habilitado no desenvolvimento da pesquisa clínica, fundamentada no conhecimento das ciências básicas, pode oferecer importantes contribuições em diferentes áreas para a aplicação dos resultados da investigação, pois, conhecendo os mecanismos associados ao desenvolvimento de doenças, esse profissional pode ser capaz de refletir, de forma substancial, a respeito da intersecção entre os estados fisiológico e psicológico do paciente (ALVES et al, 2004; BOND et al, 2001).

Dessa forma, podemos pressupor que a inserção da enfermagem na pesquisa de área básica voltada para a elucidação da problemática que envolve a infecção pelo HIV/aids tem importante acréscimo no que diz respeito à melhoria da assistência aos portadores dessa patologia. Isso porque, o enfermeiro que acompanha ativamente a progressão da infecção pelo HIV entra em contato com a grande diversidade de problemas enfrentados pelo paciente, tanto em relação aos aspectos psicológico e sociais, quanto aos que dizem respeito a saúde biológica, como as questões imunológicas e genéticas.

Neste estudo, procuramos entender alguns aspectos associados à imunogenética da síndrome da lipodistrofia. Esta síndrome representa atualmente uma questão pouco elucidada pela ciência, possuindo inúmeros questionamentos provenientes dos próprios pacientes, portadores das alterações morfológicas e metabólicas que, presumivelmente, impulsiona a enfermagem para a melhor compreensão dessa patologia para que possa, dentro da sistematização de sua assistência, contribuir para a melhor condição de vida dessas pessoas.

Referências

9- REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e Molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

ALVES, L. M.; NOGUEIRA, M. S.; GODOY, S. et al. Basic Research in nursing. **Rev Latino-am Enfermagem**, v. 12, p. 122-127, 2004.

AMMASSARI, A.; ANTINORI, A.; COZZI-LEPRI, A. et al. Relationship between HAART adherence and adipose tissue alterations. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome Human Retroviral**, Philadelphia, v. 31, n. 3, p. 140-144, 2002.

BALASUBRAMANYAN, A.; SEKHAR, R. V.; JAHLOOR, F. et al. Pathophysiology of dyslipidemia and increased cardiovascular risk in HIV lipodystrophy: A model of "systemic steatosis". **Curr Op Lipidol**, v. 15, p. 59-67, 2004.

BARBARA, J. A.; VAN OSTADE, X.; LOPEZ, A. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective. **Immunol Cell Biol.**, v. 74, n. 5, p. 434-443, 1996 Oct..

BARROSO, S. G.; ABREU, V. G.; FRANCISCETTI, E. A. The adipose tissue in the genesis of hypertension and atherosclerotic cardiovascular disease. An emerging concept. **Arq Bras Cardiol**, v. 78, n. 6, p. 618-630, 2002.

BARTLETT, J. G.; GALLANT, J. E. **Medical Management of HIV Infection**. Health Publishing Business Group, 2005.

BENDTZEN, K.; HANSEN, M. B.; ROSS, C. et al. High-avidity autoantibodies to cytokines. **Immunol Today**, v. 19, n. 5, p. 209-211, 1998 May.

BEHRENS, G. M.; MEYER, D.; STOLL, M. et al. Immune reconstitution syndromes in human immuno-deficiency virus infection following effective antiretroviral therapy. **Immunobiology**, Jena, v. 202, p. 186-193, 2000.

BERNARDI, R. P. **Recuperação de pacientes com hiv/aids em botswana, áfrica, com o uso do medicamento homeopático canova**. 2006. 56 f. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

BOCCARA, F.; TEIGER, E.; COHEN, A. Stent implantation for acute left main coronary arteryocclusion in an HIV-infected patient on protease inhibitos. **J Invas Cardiol**, v. 14, n. 6, p. 343-346, 2002.

BOND E. F.; HEITKEMPER, M. M. Physiological nursing science: emerging directions. **Res Nurs Health**, v. 24, n. 5, p. 345-348, 2001 Oct.

BOUMA G, XIA B, CRUSIUS JB, BIOQUE G, KOUTROUBAKIS I, VON BLOMBERG BM, MEUWISSEN SG, PENA AS. Distribution of four polymorphism in the tumour necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). **Clin Exp Immunol**, P. 103:391, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. **DST a Aids nos jornais**. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/main.asp?ViewID=%7BDA56F374%2D128A%2D40FB%2DB16F%2DD08A1F5DD07B%7D&params=itemID=%7B908AB86E%2DF79B%2D4A62%2D9B0A%2D1B59F0F4389C%7D;&UIPartUID=%7BD90F22DB%2D05D4%2D4644%2DA8F2%2DFAD4803C8898%7D>>. Acesso em: 20 dez. 2007.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS Sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo seres humanos**. Diário Oficial da União, 10 de outubro de 1996.

BRASIL, Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Prevenção às doenças sexualmente transmissíveis e Aids dirigida à população em situação de pobreza**. Brasília (DF), 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST e Aids. **Doenças sexualmente Transmissíveis**: manual de bolso. Brasília, 2000.

BRITO, A. M. de; CASTILHO, E. A. de; SZWARCOWALD, C. L. AIDS and HIV infection in Brazil: a multifaceted epidemic. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, n. 2, p. 207-217, 2001.

CARR, A.; SAMARAS, K.; CHISHOLM, D. J. et al. Abnormal fat distribution and use of protease inhibitors. **Lancet**, v. 351, n. 9117, p. 1736, 1998.

CARR, A. HIV lipodystrophy: risk factors, pathogenesis, diagnosis and management. **AIDS**, v. 17, Suppl. 1, p. S141-S148, 2003.

CARR, A. Lactic acidemia in infection with human immunodeficiency virus. **Clin Infect Dis**, v. 36, Suppl. 2, p. S96-S100, 2003.

CARROLL, M. C.; KATZMAN, P.; ALICOT, E. M. et al. Linkage or resistance to lysis by alloreactive natural killer cells is governed by agene in the humam major histocompatibility complex between BF and HLA-B. **Proc Nalt Acad Sci**, USA, v. 87, p. 9794-9799, 1990.

CASTILHO, E. A.; CHEQUER, P. A epidemia da aids no Brasil. In: MINISTÉRIO DA SAÚDE. Coordenação Nacional de DST e Aids. **A epidemia da aids no Brasil: situação e tendências**. Brasília, 1997. p. 9-12.

CASTILHO, E. A.; CHEQUER, P.; SZWARCOWALD, C. L. A aids no Brasil. In: ROUQUAYROL, E.; ALMEIDA, N. (Eds.). **Epidemiologia & Saúde**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 1999. p. 271-284.

CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.**, v. 126, n. 4, p. 455-476, 2000.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215-220, 1994.

CHRISTEFF, N.; MELCHIOR, J. C.; DE TRUCHIS, P. et al. Lipodystrophy defined by a clinical score in HIV-infected men on highly active antiretroviral therapy: correlation between dyslipidaemia and steroid hormone alterations. **AIDS**, London, v. 13, n. 16, p. 2251-2260, 1999.

CIANFLONE, K.; RONCARI, D. A.; MASLOWSKA, M. et al. Adipsin/acylation stimulating protein system in human adipocytes: regulation of triacylglycerol synthesis. **Biochemistry**, v. 33, n. 32, p. 9489-9495, 1994.

COLLINS, E.; WAGNER, C.; WALMSLEY, S. Psychosocial impact of the lipodystrophy syndrome in HIV infection. **AIDS Read**, New York, v. 10, n. 9, p. 546-550, 2000.

COTTAM, D. W.; REES, R. C. Regulation of matrix metalloproteinases: their role in tumor invasion and metastasis. **Int J Oncol**, v. 2, p. 861-872, 1993.

DE CLERQ, E. Antiviral therapy for human immunodeficiency virus infections. **Clin Microbiol Rev**, v.8, n.2, p.200-239, 1995.

DELICATO, L. S. **O papel dos co-receptores CCR5 e CXCR4 na infecção pelo vírus HIV**. 2005. Monografia – Fundação Faculdades Luiz Meneghel, Bandeirantes, Paraná, 2005.

DEPAIRON, M.; CHESSEX, S.; SUDRE, P. et al. Swiss HIV Cohort Study. Premature atherosclerosis in HIV-infected individuals-focus on protease inhibitor therapy. **AIDS**, v. 15, n. 3, p. 329-334, 2001.

DERKX, H. H.; BRUIN, K. F.; JONGENEEL, C. V. Familial differences in endotoxin-induced TNF release in whole blood and peripheral blood mononuclear cells in vitro: relationship to TNF gene polymorphism. **J Endothelial Res**, v. 2, p. 19-25, 1995.

DUCOBU, J.; PAYEN, M. C. Lipids and AIDS. **Revue Medicale de Bruxelles**, Bruxelles, v. 21, n. 1, p. 11-17, 2000.

ECHEVARRIA, K. L.; HARDIN, T. C.; SMITH, J. A. Hyperlipidemia associated with protease inhibitor therapy. **Ann Pharmacother**, v. 33, n. 7-8, p. 859-863, 1999.

EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H. A. et al. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **Am J Hum Genet**, v. 49, n. 4, p. 746-756, 1991.

ESPOSITO, K.; PONTILLO, A.; CIOTOLA, M. et al. Weight loss reduces interleukin-18 levels in obese women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 8, p. 3864-3866, 2002.

ESPOSITO, K.; PONTILLO, A.; DI PALO, C. et al. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. **JAMA**, v. 289, n. 14, p. 1799-1804, 2003.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

EXCOFFIER, L.; SLATKIN, M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. **Mol Biol Evol**, v. 12, p. 921-927, 1995.

EXCOFFIER, L.; SLATKIN, M. Incorporating genotypes of relatives into a test of linkage disequilibrium. **Am J Hum Genet**, v. 62, p. 171-180, 1998.

FERNANDES, A. P. M.; GIR, E. Adhesión a la terapia antiretroviral. **Informativo Latinoamericano de Enfermería**, v. 42, p. 5, 2002.

FLORIA-SANTOS, M.; SILVA, M. M. Integrando a Biologia molecular à ciência da enfermagem. In: 57º Congresso Brasileiro de Enfermagem, Goiânia, GO, CD Rom, 2005.

GALLAGHER G, LINDEMANN M, FERENCIK S, WALZ MK, SCHMITZ A, RICHARDS S, ESKDALE J, FIELD M, GROSSE-WILDE H. Association of the TNFa2 microsatellite allele with the presence of colorectal cancer. **Tissue Antigens**, 50(1): 47-51, 1997.

GALLI, M.; RIDOLFO, A. L.; ADORNI, F. et al. Correlates of risk of adipose tissue alterations and their modifications over time in HIV-1-infected women treated with antiretroviral therapy. **Antivir Ther**, v. 8, n. 4, p. 347-354, 2003.

GAMBLE, J. R.; HARLAN, J. M.; KLEBANOFF, S. J. et al. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 82, n. 24, p. 8667-8671, 1985.

GERVASONI, C.; RIDOLFO, A. L.; VACCAREZZA, M. et al. Long-term efficacy of the surgical treatment of buffalo hump in patients continuing anti-retroviral therapy. **AIDS**, v. 18, n. 3, p. 574-576, 2004.

GIRALT, M.; DOMINGO, P.; GUALLAR, J. P. et al. HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV-1/HAART-associated lipodystrophy. **Antivir Ther**, v. 6, n. 11, p. 729-740, 2006.

GUARALDI, G.; MURRI, R.; ORLANDO, G. et al. Morphologic alterations in HIV-infected people with lipodystrophy are associated with good adherence to HAART. **HIV Clin Trials**, v. 4, n. 2, p. 99-106, 2003.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361-372, 1992.

HADIGAN, C.; MEIGS, J. B.; CORCORAN, C. et al. Metabolic abnormalities and cardiovascular disease risk factors in adults with human immunodeficiency virus infection and lipodystrophy. **Clin Infect Dis**, v. 32, n. 1, p. 130-139, 2001.

HADIGAN, C.; MEIGS, J. B.; WILSON, P. W. F. et al. Prediction of coronary heart disease risk in HIV-infected patients with fat redistribution. **Clin Infect Dis**, v. 36, n. 7, p. 909-916, 2003.

HAJEER, A. H.; WORTHINGTON, J.; DAVIES, E. J. et al. TNF microsatellite a2, b3 and d2 alleles are associated with systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, v. 49, n. 3, Pt 1, p. 222-227, 1997.

HAJEER, A. H.; HUTCHINSON, I. V. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. **Microsc Res Tech**, v. 50, n. 3, p. 216-228, 2000.

HAJEER, A. H.; HUTCHINSON, I. V. Influence of TNF alpha gene polymorphism on TNF alpha production and disease. **Human Immunol**, v. 62, n. 11, p. 1191-1199, 2001.

HALLEUX, C. M.; TAKAHASHI, M.; DELPORTE, M. L. et al. Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 288, p. 1002-1007, 2001.

HANNA, G. J.; HIRSCH, M. S. Antiretroviral therapy of human immunodeficiency virus infection. In: Mandell, G. L.; Bennett, J. E.; Douglas, R. G., (Ed.). Principles and Practice of Infectious Diseases. 5. ed. Florida (USA): Churchill Livingstone, 2000. p. 1479-1500.

HAYNES, B. F.; PANTALEO, G.; FAUCI, A. S. Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. **Science**, v. 271, n. 5247, p. 324-328, 1996.

HEARNE, C. M.; GHOSH, S.; TODD, J. A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. **Trends Genet**, v. 8, n. 8, p. 288-294, 1992.

HEATH, K. V.; SINGER, J.; O'SHAUGHNESSY, M. V. et al. Intentional nonadherence due to adverse symptoms associated with antiretroviral therapy. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 31, n. 2, p. 211-217, 2002.

HENRY, I. Z. R. Worldwide Molecular Epidemiology of HIV. **Rev Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 331-345, 2006.

HERMSDORFF, H. H. M.; MONTEIRO, J. B. R. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 47, n. 6, 2004.

HERRMANN, S. M.; RICARD, S.; NICAUD, V. Polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. **Eur J Clin Invest**, v. 28, p. 59-66, 1998.

HOFMAN, F. M.; HINTON, D. R.; JOHNSON, K. et al. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. **J Exp Med**, v. 170, n. 2, p. 607-612, 1989.

HOHLER, T.; KRUGER, A.; GERKEN, G. et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -238 is associated with chronic active hepatitis C infection. **J Med Virol**, v. 54, n. 3, p. 173-177, 1998.

HONCHEL, R.; MCDONNELL, S.; SCHAID, D. J. et al. Tumor necrosis factor-alpha allelic frequency and chromosome 6 allelic imbalance in patients with colorectal cancer. **Cancer Res**, v. 56, n. 1, p. 145-149, 1996.

HOTAMISLIGIL, G. S.; MURRAY, D. L.; CHOY, L. N. et al Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 91, n. 11, p. 4854-4858, 1994.

HUI, D. Y. HIV protease inhibitors and atherosclerosis. **J Clin Invest**, v. 111, n. 3, p. 317-318, 2003.

HUIZINGA, T. W.; WESTENDORP, R. G.; BOLLEN EL, KEIJERS V. et al. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. **J Neuroimmunol**, v. 72, n. 2, p. 149-153, 1997 Feb.

JACOB, C. O.; FRONEK, Z.; LEWIS, G. D. et al. Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 87, n. 3, p. 1233-1237, 1990 Feb.

JAMES, J.; CARRUTHERS, A.; CARRUTHERS, J. HIV-Associated Facial Lipoatrophy. **Dermatol Surg**, v. 28, p. 979-986, 2002.

JANG, W. H.; YANG, Y. I.; YEA, S. S. et al. The -238 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with decreased susceptibility to cancers. **Cancer Lett.**, v. 166, n. 1, p. 41-46, 2001 May.

JOHNSON, J. A.; ALBU, J. B.; ENGELSON, E. S. et al. Increased systemic and adipose tissue cytokines in patients with HIV-associated lipodystrophy. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 286, n. 2, p. E261-71, 2004 Feb.

JONGENEEL, C. V.; BRIANT, L.; UDALOVA, I. A. et al. Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended HLA haplotypes. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 88, n. 21, p. 9717-9721, 1991.

JUSZCZYNSKI, P.; WOSZCZEK, G.; BOROWIEC, M. et al. Comparison study for genotyping of a single-nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor promoter gene. **Diagn Mol Pathol**, v. 11, n. 4, p. 228-233, 2002 Dec.

KAHN, J. O.; WALKER, B. D. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. **N Engl J Med.**, v. 339, n. 1, p. 33-39, 1998 Jul.

KASEM, H.; GALLAGHER, G.; OH, H. H. et al. Increased TNFa2 microsatellite allele frequency in proximal gastric adenocarcinoma. **Gastroenterology**, v. 114, pt. 2SS, p. G2542, 1998.

KERN, P. A.; SAGHIZADEH, M.; ONG, J. M. et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **J Clin Invest**, v. 95, n. 5, p. 2111-2119, 1995.

KERN, P. A.; DI GREGORIO, G. B.; LU, T. et al. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. **Diabetes**, v. 52, n. 7, p. 1779-1785, 2003 Jul.

KHOO, S. H.; PEPPER, L.; SNOWDEN, N. et al. Tumour necrosis factor c2 microsatellite allele is associated with the rate of HIV disease progression. **Aids**, v. 11, n. 4, p. 423-428, 1997.

KINGSLEY, L. A. Body habitus changes in HIV-associated lipodystrophy syndrome (HIV-LS). **IAPAC Mon**, v. 7, n. 8, p. 246-250, 2001.

KIRK, C. W.; DROOGAN, A. G.; HAWKINS, S. A. et al. Tumour necrosis factor microsatellites show association with multiple sclerosis [published erratum appears in: J Neurol Sci, v. 150, n. 2, p. 183, 1997 Sep.]. **J Neurol Sci**, v. 147, n. 1, p. 21-25, 1997.

KNERER, B.; HULLA, W.; MARTINEK, H. et al. IL-1 and TNF-alpha but no IL-2 expression is found in squamous cell carcinomas of the head and neck by RT-PCR. **Acta Otolaryngol**, v. 116, n. 1, p. 132-136, 1996.

KOTLER, D. P. HIV lipodystrophy etiology and pathogenesis. Body composition and metabolic alterations: etiology and pathogenesis. **AIDS Read**, Suppl 4, p. S5-9, 2003.

KROEGER, K. M.; CARVILLE, K. S.; ABRAHAM, L. J. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. **Mol Immunol.**, v. 34, n. 5, p. 391-399, 1997 Apr.

LANE, H. C.; DEPPER, J. M.; GREENE, W. C. et al. Qualitative analysis of immune function in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **N Engl J Méd**, v. 313, p. 79-84, 1985.

LEDRU, E.; CHRISTEFF, N.; PATEY, O. et al. Alteration of tumor necrosis factor-alpha T-cell homeostasis following potent antiretroviral therapy: contribution to the development of human immunodeficiency virus-associated lipodystrophy syndrome. **Blood**, v. 95, n. 10, p. 3191-3198, 2000.

LEE, Y. H.; HARLEY, J. B.; NATH, S. K. . Meta-analysis of TNF- α promoter – 308 A/G polymorphism and SLE susceptibility. **European J Human Genetics**, v. 14, p. 364-371, 2006.

LICHTENSTEIN, K. A.; WARD, D. J.; MOORMAN, A. C. et al Clinical assessment of HIV-associated lipodystrophy in an ambulatory population. **AIDS**, v. 15, n. 11, p. 1389-1398, 2001.

LO, J. C.; MULLIGAN, K.; TAI, V. W. et al. "Buffalo Hump" in men with HIV-1 infection. **The Lancet**, v. 351, p. 867-870, 1998.

LOCHEAD, J. A.; CHALMERS, I. M.; MARSHALL, W. H. et al. HLA-B27 haplotypes in family studies of ankylosing spondylitis. **Arthritis Rheum**, v. 26, n. 8, p. 1011-1016, 1983.

LORINCZ, A. T.; REID, R.; JENSON, A. B. et al. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. **Obstet Gynecol**, v. 79, n. 3, p. 328-337, 1992.

LOUIE, J. K.; HSU, L. C.; OSMOND, D. H. et al. Trends in causes of death among persons with acquired immunodeficiency syndrome in the era of highly active antiretroviral therapy, San Francisco, 1994 - 1998. **J Infect Diseases**, Chicago, v. 186, p. 1023-1027, 2002.

LOIS E, FRANCHIMONT D, PIRON A, GEVAERT Y, SCHAAF-LAFONTAINE N, ROLAND S, MAHIEU P, MALAISE M, DE GROOTE D, LOUIS R, BELAICHE J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. **Clin Exp Immunol**, P. 113:401, 1998.

LUMPKIN, M. FDA Public Health Advisory: Reports of diabetes and hyperglycemia in patients receiving protease inhibitors for the treatment of human immunodeficiency virus (HIV). **Washington: US Government Printing Office**, 1997.

YAQOOB, P.; KNAPPER, J. M.; WEBB, D. H. et al. The effect of chronic consumption of monounsaturated fat on immune function in middle-aged men. **Biochem Soc Trans.**, v. 25, n. 2, p. 350S, 1997 May.

YARCHOAN, R.; MITSUYA, H.; MYERS, C.E.; BRODER, S. Clinical pharmacology of 3 -azido-2 , 3 -dideoxythymidine (zidovudine) and related dideoxynucleosides. **N. Engl. J. Med.** 321: 726-738, 1989.

MADGE, S.; KINLOCH-DE-LOES, S.; MERCEY, D. et al. Lipodystrophy in patients naive to HIV protease inhibitors. **AIDS**, v. 13, n. 6, p. 735-737, 1999.

MAHER, B.; ALFIREVIC, A.; VILAR, F. J. et al. TNF-alpha promoter region gene polymorphisms in HIV-positive patients with lipodystrophy. **AIDS**, v. 16, n. 15, p. 2013-2018, 2002.

MAKHATADZE, N. J. Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications. **Hum Immunol**, v. 59, n. 9, p. 571-579, 1998.

MALIK, S. T.; GRIFFIN, D. B.; FIERS, W. et al. Paradoxical effects of tumour necrosis factor in experimental ovarian cancer. **Int J Cancer**, v. 44, n. 5, p. 918-925, 1989.

MALLAL, S. A.; JOHN, M.; MOORE, C. B. et al. Contribution of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors to subcutaneous fat wasting in patients with HIV infection. **AIDS**, v. 14, n. 10, p. 1309-1316, 2000.

MARSH, H. P.; HALDAR, N. A.; BUNCE, M. et al. Polymorphisms in tumour necrosis factor (TNF) are associated with risk of bladder cancer and grade of tumour at presentation. **Br J Cancer**, v. 89, p. 1096-1101, 2003.

MATTHIAS, C.; JAHNKE, V.; FRYER, A. et al. Influence of tumour necrosis factor microsatellite polymorphisms on susceptibility to head and neck cancer. **Acta Otolaryngol**, v. 118, n. 2, p. 284-288, 1998.

MENG, Q.; LIMA, J. A.; LAI, H. et al. Coronary artery calcification, atherogenic lipid changes, and increased erythrocyte volume in black injection drug users infected with human immunodeficiency virus-1 treated with protease inhibitors. **American Heart Journal**, Saint Louis, v. 144, p. 642-648, 2002.

MILLER, A. S.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA for human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**, v. 16, p. 1215, 1988.

MILLER, J.; CARR, A.; SMITH, D. et al. Lipodystrophy following antiretroviral therapy of primary HIV infection. **AIDS**, v. 14, n. 15, p. 2406-2407, 2000.

MILLER, J.; CARR, A.; EMERY, S. et al. HIV lipodystrophy: prevalence, severity and correlates of risk in Australia. **HIV Med**, v. 4, n. 3, p. 293-301, 2003.

MYNARCIK, D. C.; MCNURLAN, M. A.; STEIGBIGEL, R. T. et al. Association of severe insulin resistance with both loss of limb fat and elevated serum tumor necrosis factor receptor levels in HIV lipodystrophy. **J AIDS**, v. 25, p. 312-321, 2000.

MOCROFT, A.; VELLA, S.; BENFIELD, T.; et al. Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. EuroSIDA Study Group. **The Lancet**, United Kingdom, v. 352, p. 1725-1730, 1998.

MONTESSORI, V.; PRESS, N.; HARRIS, M. et al. Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection. **CMAJ**, v. 170, n. 2, p. 229-238, 2004.

NAKAMURA, Y.; LEPPERT, M.; O'CONNELL, P. et al. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**, v. 235, n. 4796, p. 1616-1622, 1987.

NEDOSPASOV, S. A.; UDALOVA, I. A.; KUPRASH, D. V. et al. DNA sequence polymorphism at the human tumor necrosis factor (TNF) locus. Numerous TNF/lymphotoxin alleles tagged by two closely linked microsatellites in the upstream region of the lymphotoxin (TNF-beta) gene. **J Immunol**, v. 147, n. 3, p. 1053-1059, 1991.

NOLAN, D.; MOORE, C.; CASTLEY, A. et al. Tumour necrosis factor-alpha gene -238G/A promoter polymorphism associated with a more rapid onset of lipodystrophy. **AIDS**, v. 17, n. 1, p. 121-123, 2003.

PAUSOVA, Z.; DESLAURIERS, B.; GAUDET, D. et al. Role of tumor necrosis factor-alpha gene locus in obesity and obesity-associated hypertension in French Canadians. **Hypertension**, v. 36, n. 1, p. 14-19, 2000.

PELLETIER R, PRAVICA V, PERREY C, XIA D, FERGUSON RM, HUTCHINSON I, OROSZ C. Evidence for a genetic predisposition towards acute rejection after kidney and simultaneous kidney-pancreas transplantation. **Transplantation**. Aug 27; 70(4): 674-80, 2000.

POCIOT, F.; BRIANT, L.; JONGENEEL, C. V. et al. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. **Eur J Immunol**, v. 23, n. 1, p. 224-231, 1993.

POWER, R.; TATE, H. L.; MCGILL, S. M. et al. A qualitative study of the psychosocial implications of lipodystrophy syndrome on HIV positive individuals. **Sexually Transmitted Infections**, London, v. 79, n. 2, p. 137-141, 2003.

PURNELL, J. Q.; ZAMBON, A.; KNOPP, R. H. et al. Effect of ritonavir on lipids and post-heparin lipase activities in normal subjects. **AIDS**, v. 14, n. 1, p. 51-57, 2000.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, v. 49, p. 1280-1283, 1995.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J Hered**, v. 86, p. 248-249, 1995.

REYNARD, M. P.; TURNER, D.; NAVARRETE, C. V. Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor- α , interleukin-10, interferon- α and interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK. **European J Immunogenetics**, v. 27, p. 241-249, 2000.

REVIRON, D.; DUSSOL, B.; ANDRE, M. et al. TNF- α and IL-6 gene polymorphism and rejection in kidney transplantation recipients. **Transplant Proc.**, v. 33, n. 1-2, p. 350-351, 2001 Feb-Mar.

ROOD, M. J.; VAN KRUGTEN, M. V.; ZANELLI, E. et al. TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v. 43, n. 1, p. 129-134, 2000 Jan.

SANDBERG-WOLLHEIM, M.; CIUSANI, E.; SALMAGGI, A. et al. An evaluation of tumor necrosis factor microsatellite alleles in genetic susceptibility to multiple sclerosis. **Mult Scler**, v. 1, n. 3, p. 181-185, 1995.

SCHNEIDER, P. M. Basic issues in forensic DNA typing. **Forensic Sci Int**, v. 88, n. 1, p. 17-22, 1997.

SCHUMM, J. W. Genetic identity: new approaches to DNA fingerprint analysis. **Promega Notes**, v. 58, p. 12-20, 1996.

SELMAJ, K.; RAINE, C. S.; CANNELLA, B. et al. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. **J Clin Invest**, v. 87, n. 3, p. 949-954, 1991.

SEMINARI, E.; PAN, A.; VOLTINI, G. et al. Assessment of atherosclerosis using carotid ultrasonography in a cohort of HIV-positive patients treated with protease inhibitors. **Atherosclerosis**, v. 162, n. 2, p. 433-438, 2002.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. Rio de Janeiro: Ed Macgraw Hill, 1975.

SIMOES, R. T.; BETTINI, J. S.; SOARES, E. G. et al. Tumour necrosis factor microsatellite association with human papillomavirus cervical infection. **Mol Pathol.**, v. 56, n. 5, p. 305-306, 2003 Oct.

SIMOES, R. T.; GONCALVES, M. A.; DONADI, E. A. et al. Association of tumor necrosis factor a-2 and a-8 microsatellite alleles with human papillomavirus and squamous intraepithelial lesions among women in Brazil. **J Clin Microbiol.**, v. 43, n. 8, p. 3932-3937, 2005 Aug.

SKOOG, T.; ERIKSSON, P.; HOFFSTEDT, J. et al. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) polymorphisms-857C/A and -863C/A are associated with TNF-alpha secretion from human adipose tissue. **Diabetologia**, v. 44, n. 5, p. 654-655, 2001 May.

SOOKOIAN, S. C.; GONZALEZ, C. C. J. Meta-analysis on the G-308A tumor necrosis factor alpha gene variant and phenotypes associated with the metabolic syndrome. **Obes Res.**, v. 13, n. 12, p. 2122-2131, 2005 Dec.

SOUZA, M. V. N. Fuzeon, o primeiro medicamento de uma nova classe anti-HIV denominada inibidores de fusão. **Rev. Bras. Fram.**, v. 86, n. 3, p. 112-116, 2005.

SPIES, T.; MORTON, C. C.; NEDOSPASOV, S. A. et al. Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 83, n. 22, p. 8699-8702, 1986.

STEPHENS M, SMITH NJ, DONNELLY P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **Am J Hum Genet**, v. 68: p. 978-89.

SZWARCWALD, C. L.; BASTOS, F. I.; ESTEVES, M. A. et al. A disseminação da epidemia da aids no Brasil, no período 1987-1996: uma análise espacial. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, suppl.1, p. 7-19, 2000.

TAMBUR, A. R.; YANIV, I.; STEIN, J. et al. Cytokine gene polymorphism in patients with graft-versus-host disease. **Transplant Proc.**; v. 33, n. 1-2, p. 502-503, 2001 Feb-Mar.

TRACEY, K. J.; LOWRY, S. F.; BEUTLER, B. et al. Cachectin/tumor necrosis factor mediates changes of skeletal muscle plasma membrane potential. **J Exp Med.**, v. 164, n. 4, p. 1368-1373, 1986 Oct .

TSUKAMOTO, K.; OHTA, N.; SHIRAI, Y. et al. A highly polymorphic CA repeat marker at the human tumor necrosis factor alpha (TNFA alpha) locus. **J Hum Genet**, v. 43, n. 4, p. 278-279, 1998.

TUGLULAR, S.; BERTHOUX, P.; BERTHOUX, F. Polymorphisms of the tumour necrosis factor alpha gene at position -308 and TNFd microsatellite in primary IgA nephropathy. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, p. 724-731, 2003.

TURNER, D. M.; GRANT, S. C.; LAMB, W. R. et al. A genetic marker of high TNF-alpha production in heart transplant recipients. **Transplantation.**, v. 60, n. 10, p. 1113-1117, 1995 Nov.

UDALOVA, I. A.; NEDOSPASOV, S. A.; WEBB, G. C. et al. Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. **Genomics**, v. 16, n. 1, p. 180-186, 1993.

UNAIDS. **Aids epidemic update**. UNAIDS: 2006. Disponível em: <http://www.unaids.org/en/Regions_Countries/Regions/LatinAmerica.asp> Acesso em: 2 ag. 2007.

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

VERJANS, G. M.; MESSER, G.; WEISS, E. H. et al. Polymorphism of the tumor necrosis factor region in relation to disease: an overview. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 18, n. 1, p. 177-186, 1992.

VIGOUROUX, C.; MAACHI, M.; NGUYEN, TH. et al. Serum adipocytokines are related to lipodystrophy and metabolic disorders in HIV-infected men under antiretroviral therapy. **AIDS**, v. 17, n. 10, p. 1503-1511, 2003.

VIRABEN, R.; AQUILINA, C. Indinavir-associated lipodystrophy. **AIDS Read**, New York, v. 16, p. 37-39, 1998.

WARLE, M. C.; FARHAN, A.; METSELAAR, H. J. et al. Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? **Liver Transpl.**, v. 9, n. 2, p. 170-181.

WASTOWSKI, I. J.; PERES, N. T.; SIMOES, R. T. et al. Identification of a novel 120 bp allele at the TNFd microsatellite locus. **Tissue Antigens**, v. 67, n. 4, p. 318-20, 2006 Apr.

WATERS, L.; NELSON, M. Long-term complications of antiretroviral therapy: lipoatrophy. Blackwell Publishing Ltd. **Int J Clin Pract**, v. 61, n 6, p. 999–1014, June 2007.

WESTENDORP, R. G.; LANGERMANS, J. A.; HUIZINGA, T. W. et al. Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. **Lancet**, v. 349, n. 9069, p. 1912-1913, 1997.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Os remédios usados para o tratamento da aids podem provocar, em algumas pessoas, uma deposição da gordura do corpo diferente, reduzindo a gordura do rosto, dos braços e das pernas, e aumentando a gordura no peito e na barriga, produzindo em, alguns casos, o que é chamado de síndrome da lipodistrofia. Os mecanismos para que ocorra a lipodistrofia, após o tratamento da aids, ainda não são entendidos.

Por esse motivo, estamos fazendo um estudo chamado “POLIMORFISMO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL NA SÍNDROME DA LIPODISTROFIA ASSOCIADA À TERAPIA ANTI-RETROVIRAL EM PORTADORES DO HIV-1”. Nesse estudo, estamos tentando identificar alguns fatores genéticos que possam estar associados com o desenvolvimento da lipodistrofia. Assim, gostaríamos que você participasse desse estudo. Se você aceitar, será colhido 10 mL de sangue da veia do seu braço para fazer a pesquisa. A coleta será realizada por mim, professora de enfermagem, em uma sala reservada, enquanto você espera pelo atendimento médico, o que levará no máximo 10 minutos.

Você não é obrigado a participar deste estudo e tem a liberdade de não participar. Caso isto ocorra, o atendimento neste hospital continuará ocorrendo da mesma forma. Você não gastará e nem ganhará nenhum dinheiro para participar deste estudo e será garantidos o sigilo e anonimato do seu nome e de seus exames.

Assim, Eu, _____, RG _____, abaixo assinado, após ter recebido as informações da enfermeira Mariana Machado da Silva concordo em participar dessa pesquisa, tendo garantido os meus direitos abaixo relacionados:

- Direito de receber resposta a qualquer pergunta ou dúvida sobre o tema;
- Direito de deixar de participar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo atual e futuro a minha assistência;
- Direito de não ser identificado e ter minha privacidade preservada.

Esclareço que em caso de dúvida, fui orientado a procurar a professora Ana Paula M Fernandes na Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto –USP, onde a mesma trabalha no horário das 8: 00h às 17:00h, de segunda a sexta-feira e/ou pelos telefones (16) 6023414 (sala) ou (16) 6023462 (secretária).

Declaro de que tenho conhecimento dos direitos acima descritos, e consinto em participar deste estudo, realizada pela pesquisadora que subscreve este termo de consentimento.

De acordo,
Ribeirão Preto, _____ de _____ de 2005.

_____
Assinatura do participante do estudo

APÊNDICE B — Instrumento de Coleta de Dados

Roteiro de Entrevista

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:

1- Iniciais _____ Reg: _____ Data: _____
 2- Data de nascimento: _____ / _____ / _____
 3- Idade (anos): _____
 (1) 15 l- 19 (4) 30 l- 34 (7) 45 l- 49 (h) 60 l- ou mais
 (2) 20 l- 24 (5) 35 l- 39 (8) 50 l-54
 (3) 25 l- 29 (6) 40 l- 44 (9) 55 l-59
 4- Sexo: (1) Masculino (2) Feminino (3) Transgênero
 5- Raça/cor: (1) Branca (2) Negra (3) Parda (4) Amarela
 6- Escolaridade: (1) Superior (2) Médio (3) Fundamental completo (4) Fundamental
 incompleto: série..... (5) Analfabeto

CONDIÇÕES ATUAIS DE INFECTOLOGIA

7- Carga viral: .....Data _____ / _____ / _____
 8- Número linfócitos T CD4+: .....Data _____ / _____ / _____

HISTÓRICO

9- Quanto tempo tem de diagnóstico HIV+? (1) Mais 10 anos (2) 9-6 anos (3) 5-2 anos
 (4) 1 ano (5) >1 ano a 6 meses (6) Menos de 6 meses (7) Outro.....
 10- Quanto tempo tem de tratamento ARV? (1) Mais 10 anos (2) 9-6 anos (3) 5-2 anos
 (4) 1 ano (5) >1 ano a 6 meses (6) Menos de 6 meses (7) Outro.....

MEDICAÇÃO

11- Esquema anti-retroviral:
 Medicação ARV em uso?
 a- Nome.....horário.....quantidade.....
 b- Nome.....horário.....quantidade.....
 c- Nome.....horário.....quantidade.....
 d- Nome.....horário.....quantidade.....

DADOS SOMATOMÉTRICOS:

12- Altura: _____ 12- Peso: _____

ALTERAÇÕES CLÍNICO-LABORATORIAIS

13- Alteração morfológica:
 (1) Circunf abdominal (2) Circunf torácica (3) Circunf MMSS (4) Pelota Cervical (5) Circunf MMII
 (6) Face (7) Nádegas (8) Realce venoso (9) Outro .....
 14- Alterações metabólicas:
 (1) Colesterol total.....
 (2) HDL colesterol.....
 (3) LDL colesterol.....
 (4) triglicérides.....
 (5) glicemia.....
 (6) outro.....

APÊNDICE C - Caracterização dos Pacientes

Tabela 1- Caracterização demográfica dos pacientes portadores da infecção pelo HIV apresentando a síndrome da lipodistrofia segundo idade, alterações morfológicas, níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos, carga viral, número de células TCD4+, tempo de uso da terapêutica anti-retroviral (ARV) e tipo de anti-retroviral utilizado pelos pacientes por ocasião da sua inclusão no estudo.

Paciente	Idade (anos)	Alterações Morfológicas	Colesterol Total (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	Carga Viral (cópias/mL)	CD4 (cel/mL)	Tempo de uso de ARV (anos)	ARV em uso
01	59	MMII, face	214	108	30447	53	8	3TC / RTV / ATV / TDF
02	39	Face	278	248	< 50	815	3	3TC / RTV / EFV
03	40	MMII, MMSS, abdome	222	654	< 50	411	8	TDF / 3TC / EFV
04	39	Face, abdome	189	360	5360	130	11	3TC / d4t / EFV / IDV
05	35	Abdome	227	258	< 50	522	11	NFV / BIOVIR
06	35	MMII, MMSS, abdome	256	300	< 50	513	5	EFV / d4t / 3TC
07	48	MMII, abdome	250	257	< 50	912	10	EFV / LPV
08	35	MMII, MMSS, face	261	258	< 50	890	11	RTV / EFV / IDV / AZT
09	34	Não apresenta alterações	177	244	562	243	5	RTV / 3TC / TDF / SQV / IDV
10	36	MMII, MMSS, face, abdome	214	1005	324144	6	4	EFV / 3TC / TDF / AZT / ATV
11	35	Não apresenta alterações	231	126	< 50	496	6	AZT / 3TC / EFV
12	44	MMSS, MMII	219	304	< 50	296	3	AZT / EFV
13	40	MMSS, MMII, face	186	222	13406	105	4	3TC / d4t / EFV
14	36	Não apresenta alterações	243	217	< 50	1019	7	EFV / AZT / 3TC
15	43	MMSS, MMII, face,	218	883	88289	24	9	AZT / 3TC /

16	61	abdomen MMSS, MMII, face, abdome	206	316	5532	342	6	EFV d4t / 3TC / EFV
17	50	Abdome, giba	249	238	< 50	686	6	AZT / 3TC / EFV
18	32	MMSS, MMII, face, abdome, mama, nádega	174	183	30000	435	10	ATV / BIOVIR
19	38	Não apresenta alterações	250	197	< 50	849	6	EFV / RTV / 3TC
20	45	Não apresenta alterações	289	1131	< 50	795	2	BIOVIR
21	42	MMSS, MMII, abdome	258	1147	< 50	833	6	3TC / d4t
22	48	Face	146	262	< 50	570	3	NFV / d4t / AZT
23	45	MMII, face	284	302	< 50	348	3	3TC / d4t
24	47	Não apresenta alterações	173	282	< 50	506	5	3TC / TDF / LPV
25	45	Não apresenta alterações	224	101	56	728	15	d4t / EFV / ddl / NFV
26	42	Não apresenta alterações	152	173	< 50	372	5	AZT / EFV / 3TC
27	39	MMSS, MMII, face	174	257	58568	216	8	3TC / EFV / NFV / ddl
28	50	Não apresenta alterações	221	485	< 50	778	5	ddl / 3TC / EFV
29	46	Não apresenta alterações	209	280	< 50	701	3	AZT / 3TC / EFV
30	35	Face, abdome	129	275	83	98	6	ATV / 3TC / TDF
31	42	Não apresenta alterações	187	382	620	156	4	ddl / EFV / RTV / d4t
32	34	MMII, face, abdome	99	211	23578	73	5	ddl / EFV / d4t
33	36	MMSS, MMII, face	98	86	73364	23	5	EFV / BIOVIR
34	38	Face, mamas	132	198	146828	210	5	EFV / 3TC / SQV / RTV
35	34	MMSS, MMII, face	163	174	210	454	6	IDV / ddl / d4t
36	46	Abdome, mamas	229	186	7020	461	4	AZT / ddl
37	44	MMSS, MMII, abdome, face, mamas	153	241	< 50	262	6	AZT / IDV / EFV
38	60	MMSS, MMII, abdome, face	257	229	< 50	162	7	LPV / TDF / 3TC / EFV
39	45	Abdome, face	115	350	469	132	9	3TC / TDF / ATV / RTV / Fuziom
40	39	MMSS, MMII, abdome, face, realce venoso	174	160	2154	311	5	EFV / ddl / AZT / LPV
41	45	Abdome	271	317	< 50	490	6	IDV / RTV / ddl /

66	29	Face	195	174	< 50	320	5	AZT/3TC / EFV
67	38	Face	119	394	406	527	10	EFV / BIOVIR

Legenda: **MMSS** – membros superiores; **MMII** – membros inferiores; **AZT** – zidovudina; **ddl** – didanozina; **d4t** – estavudina; **TDF** – tenofovir; **EFV** – efavirenz; **NVP** – nevirapina; **IDV** – indinavir; **ATV** – atazanavir; **NFV** – nelfinavir; **RTV** – ritonavir; **SQV** – saquinavir; **LPV** – lopinavir; **ABV** – abacavir.

Tabela 2- Caracterização demográfica dos pacientes, portadores da infecção pelo HIV que não apresentam a síndrome da lipodistrofia segundo idade, alterações morfológicas, níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos, carga viral, número de células TCD4+, tempo de uso da terapêutica anti-retroviral e tipo de anti-retroviral utilizado pelos pacientes por ocasião da sua inclusão no estudo.

Paciente	Idade (anos)	Alterações Morfológicas	Colesterol Total (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	Carga Viral (cópias/mL)	CD4 (cel/mL)	Tempo de uso de ARV (anos)	ARV em uso
1	44	Não apresenta alterações	178	124	75347	195	5	EFV / BIOVIR
2	36	Não apresenta alterações	143	125	< 50	741	6	NFV / BIOVIR
3	40	Não apresenta alterações	140	109	27450	229	7	IDV / NFV / BIOVIR
4	37	Não apresenta alterações	166	124	57359	220	4	EFV / BIOVIR
5	35	Não apresenta alterações	102	104	62046	304	3	NVP / BIOVIR
6	32	Não apresenta alterações	187	98	< 50	622	4	EFV / BIOVIR
7	32	Não apresenta alterações	135	98	42000	173	4	AZT / EFV
8	45	Não apresenta alterações	99	79	< 50	867	6	AZT / NVP
9	48	Não apresenta alterações	149	121	463	383	5	Novinavir / BIOVIR
10	40	Não apresenta alterações	178	133	< 50	498	3	AZT / NVP
11	43	Não apresenta alterações	200	150	< 50	178	3	AZT / 3TC
12	46	Não apresenta alterações	140	109	38	382	15	AZT / 3TC / NVP
13	36	Não apresenta alterações	156	140	< 50	432	2	EFV / RTV
14	42	Não apresenta alterações	162	83	< 50	341	2	3TC / TDF / EFV
15	44	Não apresenta alterações	191	138	< 50	234	7	3TC / NPV
16	45	Não apresenta alterações	200	144	< 50	199	10	LPV / RTV / EFV / AZT / 3TC
17	39	Não apresenta	143	84	16324	541	3	AZT / 3TC / EFV

18	24	alterações Não apresenta alterações	121	89	< 50	1114	15	d4t / 3TC / NVP
19	33	alterações Não apresenta alterações	160	56	< 50	617	5	BIOVIR / EFV
20	35	alterações Não apresenta alterações	199	84	< 50	438	3	AZT / 3TC / EFV
21	50	alterações Não apresenta alterações	187	110	< 50	302	2	AZT / 3TC / EFV
22	36	alterações Não apresenta alterações	174	62	< 50	1221	4	d4t / 3TC / EFV
23	36	alterações Não apresenta alterações	93	82	< 50	429	2	AZT / 3TC / EFV
24	41	alterações Não apresenta alterações	148	150	< 50	759	6	EFV / BIOVIR
25	35	alterações Não apresenta alterações	144	87	74532	64	2	EFV / BIOVIR
26	46	alterações Não apresenta alterações	193	101	19894	479	4	TDF / 3TC / LOP / RTV
27	40	alterações Não apresenta alterações	155	61	19089	974	4	AZT / 3TC / SQV / RTV
28	36	alterações Não apresenta alterações	200	108	19181	257	3	AZT / 3TC / EFV
29	38	alterações Não apresenta alterações	153	136	175389	33	4	AZT / EFV
30	47	alterações Não apresenta alterações	119	150	956	366	3	AZT / 3TC / TDF / EFV / LPV / RTV
31	46	alterações Não apresenta alterações	200	150	< 50	297	2	AZT / 3TC / TDF
32	61	alterações Não apresenta alterações	164	98	< 50	317	4	AZT / 3TC / EFV
33	40	alterações Não apresenta alterações	155	147	< 50	216	18	TDF / 3TC / ATV / RTV
34	43	alterações Não apresenta alterações	200	101	183	511	3	BIOVIR / EFV
35	35	alterações Não apresenta alterações	158	82	24581	436	3	EFV / AZT / 3TC
36	38	alterações Não apresenta alterações	131	70	503	541	6	AZT/3TC / TDF / LOP/ RTV
37	47	alterações Não apresenta alterações	144	93	343	197	6	d4T / EFV / TDF
38	34	alterações Não apresenta alterações	182	113	59	633	5	AZT / 3TC / NFV
39	37	alterações Não apresenta alterações	185	130	< 50	915	8	AZT / 3TC / NFV
40	39	alterações Não apresenta	190	129	< 50	1164	10	d4T / 3TC / AZT /

41	42	alterações Não apresenta alterações	195	88	1471	598	7	RTV d4T / ddl / EFV / NFV
42	39	alterações Não apresenta alterações	131	60	609	306	8	EFV / BIOVIR
43	39	alterações Não apresenta alterações	120	58	< 50	450	2	AZT / 3TC / EFV
44	40	alterações Não apresenta alterações	175	105	105	316	2	AZT / 3TC / EFV
45	41	alterações Não apresenta alterações	136	124	79415	32	6	AZT / 3TC / EFV
46	32	alterações Não apresenta alterações	183	145	< 50	425	4	AZT / 3TC / EFV
47	44	alterações Não apresenta alterações	197	99	< 50	190	2	AZT / EFV
48	38	alterações Não apresenta alterações	137	83	< 50	253	7	TDF / 3TC / ATV / RTV
49	50	alterações Não apresenta alterações	177	110	24072	216	10	ATZ / RTV / 3TC / TDF
50	30	alterações Não apresenta alterações	119	49	< 50	265	4	d4T / 3TC / NFV

Legenda: **MMSS** – membros superiores; **MMII** – membros inferiores; **AZT** – zidovudina; **ddl** – didanozina; **d4t** – estavudina; **TDF** – tenofovir; **EFV** – efavirenz; **NVP** – nevirapina; **IDV** – indinavir; **ATV** – atazanavir; **NFV** – nelfinavir; **RTV** – ritonavir; **SQV** – saquinavir; **LPV** – lopinavir; **ABV** – abacavir

ANEXO

ANEXO A - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 15 de setembro de 2004

Ofício nº 2621/2004
CEP/SPC

Senhora Professora:

O trabalho intitulado
"POLIMORFISMO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL NA
SÍNDROME DA LIPODISTROFIA ASSOCIADA À TERAPIA ANTI-
RETROVIRAL EM PORTADORES DO HIV-1" foi analisado pelo
Comitê de Ética em Pesquisa em sua 188ª Reunião Ordinária
realizada em 13.09.2004, e enquadrado na categoria: **APROVADO**,
de acordo com o Processo HCRP nº 7355/2004.

Aproveito a oportunidade para
apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
PROFª DRª ANA PAULA MORAIS FERNANDES
Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto-USP
Em mãos

ANEXO B - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 09 de outubro de 2007

Ofício nº 3520/2007
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 7581/2007

Prezado Professor,

O Comitê de Ética em Pesquisa em sua 256ª Reunião Ordinária realizada em 08.10.2007, recebeu a “Proposta de criação do banco de amostras do núcleo de pesquisa em imunogenética (BANPI)” e a enquadrrou na categoria: **APROVADO**, **bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor

PROF. DR. EDUARDO ANTONIO DONADI

Depto. de Clínica Médica – Laboratório de Imunologia Molecular