Joel da Cunha

Estudo da atividade e polimorfismos da paraoxonase-1 em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo-1 (HIV-1) tratados com inibidores de protease

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cunha, Joel da
Estudo da atividade e polimorfismos da Paraoxonase-1 em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo-1 (HIV-1) tratados com inibidores de protease / Joel da Cunha. -- São Paulo, 2012.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientador: Sérgio Paulo Bydlowski.

Descritores: 1.PON1 proteína humana 2.Paraoxon/sangue 3.Polimorfismo genético 4.Lipoproteína de baixa densidade oxidada 5.Proteínas LDL 6.HIV-1 7.Anti-retrovirais 8.Inibidores de proteases

USP/FM/DBD-223/12

Tenho apenas duas mãos e o sentimento do mundo.

CARLOS DRUMMOND DE ANDRADE

*A minha digníssima **Vó Elfrida**, por seu exemplo de honestidade,*

retidão, e princípios que norteiam minha caminhada.

(in memoriam)

*A minha **Mãe Vilma**, por seu exemplo de amor incondicional ao próximo,*

mesmo tendo "a vida" lhe impingido obstáculos desnecessários,

e irreparáveis.

Te amo!

*A minha **Irmã Silvana**, e ao meu cunhado **Mathias Claudio Paganelli**,*

que sempre estiveram ao meu lado,

e com a presença de Deus.

Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.

ANTOINE DE SAINT-EXUPÉRY

Agradecimentos

- Ao caro orientador **Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski**, por me doar seu tempo, e ter compartilhado conhecimentos e valores nesta importante fase da minha vida. Minha sincera e eterna gratidão:.

- Ao amigo e irmão **Prof. Dr. Celso Spada**, pela irrestrita confiança e respeito aos meus anseios como homem e pesquisador, e por sua incrível capacidade de ensinar e compartilhar valores de retidão e honestidade. Minha sincera e eterna gratidão:.

- À colega e **Dra. Luciana Morganti Ferreira Maselli**, por sua incondicional e franca amizade. Qualquer palavra seria pouco para demonstrar meu respeito e minha gratidão por você. Minha sincera gratidão.

- Ao **Prof. Dr. Jorge Kalil Filho**, titular da disciplina de Imunologia Clínica da FMUSP, e coordenador da pós-graduação na área de Alergia e Imunopatologia, por sua generosidade e capacidade de difundir conhecimento entre todos os alunos da pós-graduação.

- Ao **Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão** do Laboratório de Lípides do INCOR, pela confiança e apoio desde o início desta caminhada.

- Ao **Prof. Dr. Ali Saïb** e **Profa. Dra. Pascale Lesage**, Université Paris-Diderôt VII, Institut Universitaire d'Hématologie (IUH), Laboratoire de

Patholgie et Virologie Moléculaire, Hôpital Saint Louis, Paris - França. Obrigado por terem me recebido calorosamente em meu estágio doutoral, 2011-2012, naquilo que foi uma das maiores experiências da minha vida.

– Aos irmãos e colegas do Departamento de Análises Clínicas, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina (CCS-UFSC), do Banco de Sangue e do Hospital Universitário desta maravilhosa Universidade, que me receberam e me acolheram todos estes longos e felizes anos de estudo e trabalho.

– À **Profa. Dra. Maria Luiza Bazo**, chefe do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, por seu irrestrito apoio durante os trabalhos do doutorado.

– Em especial, aos indivíduos soropositivos para o HIV-1 atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, pela compreensão, participação, e apoio aos estudos realizados. Ainda, por terem humildemente compartilhado de suas angustias e anseios por uma vida mais feliz.

– Aos doadores de sangue do Banco de Sangue do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, pelos atos altruístas de doação de sangue e da participação neste estudo.

- À colega **Dra. Débora Levy**, **Dra. Adriana de Aguiar Debes,** e **Dra. Lina Akemi Fukuya**, vocês fizeram parte desta importante etapa da minha vida, e estão guardadas em um lugar especial da minha história. Meu muito obrigado.

- À colega **Cleide Menarbini Appolonio**, por sua constante e importante orientação e participação nesse período de estudos. Muitíssimo obrigado.

- A todos os colegas do laboratório LIM-31 que contribuíram de alguma maneira neste projeto.

- À **Tânia Joyce**, minha ilustre colega, que realiza seus trabalhos na secretária da pós-graduação em Alergia e Imunopatologia da FMUSP.

- Aos meus amigos do Jiu-Jitsu e do Surf na praia da Joaquina: Hugo Carioni, Saldanha, Leo Carpeggiani, Santiago Glauco, Marcelo Tonon (Bugika), Rodrigo Motta, Markus Alperstedt, Samuel (Samuka), Mohamad Ghandour, Guilherme Rosa (Salsicha), Maykon Rodrigues, Felipe e Diogo Souza (Gêmeos), Eduardo Mangueira e Matheus Fayad, e todos aqueles que estão/estarão comigo no tatame ou nas águas da Joaquina. Vocês são “os caras”! Vamos vender o capa-preta para pagar a conta.

Lista de tabelas

Tabela 1. Características gerais dos grupos estudados..... 31

Tabela 2. Classificação e divisão dos grupos estudados..... 32

Tabela 3. Protocolos de terapias antirretrovirais..... 32

Tabela 4. Valores de referência para os parâmetros linfócito T-CD4+, T-CD8+, e carga viral (RNA-HIV-1)..... 35

Tabela 5. Valores de referência para os parâmetros CT, HDL, LDL, TG, índices de risco aterogênico CT:HDL e LDL:HDL, ApoA1 e ApoB100..... 38

Tabela 6. Valores de média ± desvio padrão e mediana (valor mínimo e valor máximo) para os marcadores da infecção para o HIV-1..... 52

Tabela 7. Correlação entre os parâmetros lipídicos e os marcadores da infecção pelo HIV-1..... 62

Tabela 8. Frequências alélicas: PON1 192Q e 192R, e PON1 55L e PON1 55M nos grupos de soropositivos e soronegativos para o HIV-1 72

Tabela 9. Distribuição dos genótipos 192QR e 55LM da PON1 nos grupos de soropositivos e soronegativos..... 73

Tabela 10. Associações dos genótipos 192 e 55 da PON1 nos indivíduos soropositivos para o HIV-1..... 74

Tabela 11. Características gerais dos indivíduos soronegativos para o HIV-1 estudados: gênero, etnia, faixa etária e índice de massa corporal (IMC)..... 124

Tabela 12. Características gerais dos indivíduos soropositivos para o HIV-1

estudados: gênero, faixa etária, índice de massa corporal (IMC) e terapia antirretroviral (TARV) empregada..... 125

Tabela 13. Níveis plasmáticos de RNA do HIV-1 (cópias/mL), carga viral, nos indivíduos estudados..... 129

Tabela 14. Número de linfócitos T-CD4+ (células/mm^3) nos indivíduos soropositivos estudados..... 131

Tabela 15. Número de linfócitos T-CD8+ (células/mm^3) nos indivíduos soropositivos estudados..... 133

Tabela 16. Relação linfócitos T-CD4+:CD8+ (células/mm^3) nos indivíduos soropositivos estudados..... 135

Tabela 17. Níveis séricos de colesterol total (mg/dL) nos indivíduos estudados..... 137

Tabela 18. Níveis séricos de HDL (mg/dL) nos indivíduos estudados.... 139

Tabela 19. Níveis séricos de LDL (mg/dL) nos indivíduos estudados... 141

Tabela 20. Níveis séricos de triglicérides (mg/dL) nos indivíduos estudados..... 143

Tabela 21. Índide de risco aterogênico: relação colesterol total:HDL nos indivíduos estudados..... 145

Tabela 22. Índice de risco aterogênico: relação LDL:HDL nos indivíduos estudados..... 147

Tabela 23. Níveis séricos do anticorpo IgG anti-oxLDL nos indivíduos estudados..... 149

Tabela 24. Níveis séricos de apolipoproteína-A1 (mg/dL) nos indivíduos estudados..... 151

Tabela 25. Níveis séricos de apolipoproteína-B100 (mg/dL) nos indivíduos estudados..... 151

Tabela 26. Atividade sérica da paraoxonase-1 (PON1) nos indivíduos estudados..... 155

Tabela 27. Atividade sérica da arilestearase (ARE) nos indivíduos estudados..... 157

Lista de figuras

Figura 1. Amostras de DNA genômico extraído a partir de amostras de sangue total..... 43

Figura 2. Esquema de perfis eletroforéticos possíveis para produtos amplificados na detecção de PON1 192QR e PON1 55LM..... 46

Figura 3. Pesquisa das mutações da PON1 192 e PON1 55..... 47

Figura 4. Gráfico (A) representa os níveis séricos de colesterol total (mg/dL), e em (B), os níveis séricos de HDL (mg/dL) nos grupos sem TARV e tratados com ITRN+ITRNN IP..... 55

Figura 5. Gráfico (A) representa os níveis séricos de LDL (mg/dL), e em (B), os níveis séricos dos triglicérides (mg/dL) nos grupos sem TARV e tratados com ITRN+ITRNN e IP..... 58

Figura 6. Gráfico (A) representa a relação colesterol total:HDL, e em (B), a relação entre LDL :HDL nos grupos sem TARV e tratados com ITRN+ITRNN e IP..... 60

Figura 7. Gráfico representa os níveis séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL nos grupos sem TARV, e tratados com ITRN+ITRNN e IP..... 63

Figura 8. O gráfico (A) representa os níveis séricos de apolipoproteína A1 (mg/dL), e em (B), os níveis séricos de apolipoproteína B100 (mg/dL) nos grupos sem TARV e tratados com ITRN+ITRNN e IP..... 66

Figura 9. O gráfico (A) representa a atividade sérica da

paraoxonase-1 (U/L), e em (B), a atividade sérica da arilestearase (U/L), nos grupos sem TARV e tratados com ITRN+ITRNN e IP..... 68

Figura 10. O gráfico (A) e (B) representam, respectivamente, a atividade sérica da paraoxonase-1 (U/L) e atividade sérica da arilestearase (U/L) nas diferentes contagens de linfócitos T-CD4+ dos indivíduos soropostivos..... 70

Figura 11. O gráfico (A) apresenta a atividade sérica da paraoxonase-1 (U/L) para os genótipos QQ, QR e RR da PON1 191, e o gráfico (B) apresenta a atividade sérica da arilestearase para os mesmos genótipos da PON1 192..... 76

Figura 12. O gráfico (A) apresenta a atividade sérica da paraoxonase-1 (U/L) para os genótipos LL, LM e MM da PON1 55, e o gráfico (B) apresenta a atividade sérica da arilestearase para os mesmos genótipos da PON1 55..... 78

Figura 13. O gráfico (A) apresenta os níveis séricos de colesterol total para os genótipos QQ, QR e RR da PON1 192. O gráfico (B) apresenta os níveis séricos de HDL, o gráfico (C) os níveis séricos de LDL, e o gráfico (D) os níveis séricos de TG para os mesmos genótipos da PON1 192..... 80

Figura 14. O gráfico (A) apresenta os níveis séricos de colesterol

total para os genótipos LL, LM e MM da PON1 55. O gráfico (B) apresenta os níveis séricos de HDL, o gráfico (C) os níveis séricos de LDL, e o gráfico (D) os níveis séricos de triglicérides para os mesmos genótipos da PON1 55..... 82

Lista de tabelas

Tabela 1. Características gerais dos grupos estudados..... 31

Tabela 2. Classificação e divisão dos grupos estudados..... 32

Tabela 3. Protocolos de terapias antirretrovirais..... 32

Tabela 4. Valores de referência para os parâmetros linfócito T-CD4+, T-CD8+, e carga viral (RNA-HIV-1)..... 35

Tabela 5. Valores de referência para os parâmetros CT, HDL, LDL, TG, índices de risco aterogênico CT:HDL e LDL:HDL, ApoA1 e ApoB100..... 38

Tabela 6. Valores de média ± desvio padrão e mediana (valor mínimo e valor máximo) para os marcadores da infecção para o HIV-1..... 52

Tabela 7. Correlação entre os parâmetros lipídicos e os marcadores da infecção pelo HIV-1..... 62

Tabela 8. Frequências alélicas: PON1 192Q e 192R, e PON1 55L e PON1 55M nos grupos de soropositivos e soronegativos para o HIV-1 72

Tabela 9. Distribuição dos genótipos 192QR e 55LM da PON1 nos grupos de soropositivos e soronegativos..... 73

Tabela 10. Associações dos genótipos 192 e 55 da PON1 nos indivíduos soropositivos para o HIV-1..... 74

Tabela 11. Características gerais dos indivíduos soronegativos para o HIV-1 estudados: gênero, etnia, faixa etária e índice de massa corporal (IMC)..... 124

Tabela 12. Características gerais dos indivíduos soropositivos para o HIV-1

estudados: gênero, faixa etária, índice de massa corporal (IMC) e terapia antirretroviral (TARV) empregada..... 125

Tabela 13. Níveis plasmáticos de RNA do HIV-1 (cópias/mL), carga viral, nos indivíduos estudados..... 129

Tabela 14. Número de linfócitos T-CD4+ (células/mm^3) nos indivíduos soropositivos estudados..... 131

Tabela 15. Número de linfócitos T-CD8+ (células/mm^3) nos indivíduos soropositivos estudados..... 133

Tabela 16. Relação linfócitos T-CD4+:CD8+ (células/mm^3) nos indivíduos soropositivos estudados..... 135

Tabela 17. Níveis séricos de colesterol total (mg/dL) nos indivíduos estudados..... 137

Tabela 18. Níveis séricos de HDL (mg/dL) nos indivíduos estudados.... 139

Tabela 19. Níveis séricos de LDL (mg/dL) nos indivíduos estudados... 141

Tabela 20. Níveis séricos de triglicérides (mg/dL) nos indivíduos estudados..... 143

Tabela 21. Índide de risco aterogênico: relação colesterol total:HDL nos indivíduos estudados..... 145

Tabela 22. Índice de risco aterogênico: relação LDL:HDL nos indivíduos estudados..... 147

Tabela 23. Níveis séricos do anticorpo IgG anti-oxLDL nos indivíduos estudados..... 149

Tabela 24. Níveis séricos de apolipoproteína-A1 (mg/dL) nos indivíduos estudados..... 151

Tabela 25. Níveis séricos de apolipoproteína-B100 (mg/dL) nos indivíduos estudados..... 151

Tabela 26. Atividade sérica da paraoxonase-1 (PON1) nos indivíduos estudados..... 155

Tabela 27. Atividade sérica da arilestearase (ARE) nos indivíduos estudados..... 157

Lista de anexos

Anexo A. Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq)..... 112

Anexo B. Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEP-UFSC)..... 114

Anexo C Modelos dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)-CAPPesq-HCFMUSP/CEP-UFSC..... 116

Anexo D Tabelas com as características individuais gerais e resultados individuais para todos os patâmetros avaliados nos grupos estudados..... 123

Resumo

CUNHA J. Estudo da atividade e polimorfismos das Paraoxonase-1 em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo-1 (HIV-1) tratados com inibidores de protease. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

A enzima Paraoxonase-1 (PON1) possui atividades paraoxonase, arilestearase e lactonase, entre outras. É a mais estuda da família das PONs que é composta pela PON1, PON2 e PON3. Sugere-se, que todas atuam inibindo o processo de peroxidação lipídica de moléculas como a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e alta densidade (HDL), caracterizando assim um possível papel anti-aterogênico. O gene da PON1 apresenta dois sítios polimórficos, com a troca de uma $Gln^{192}Arg$ (Q/R) e $Met^{55}Leu$, que estão associados com diferenças na atividade e concentrações séricas da enzima. Por sua vez, indivíduos soropositivos para o HIV-1 apresentam alterações do metabolismo lipídico, que poderiam estar associados a alterações na atividade da PON1 e a terapia antirretroviral (TARV) com inibidores de protease (IP). O objetivo do estudo foi determinar as atividades séricas da PON1 e da arilestearase (ARE), e as freqüências alélicas dos polimorfismos genéticos da PON1 192QR e 55LM, e ainda, avaliar a correlação destes parâmetros com as alterações lipídicas em indivíduos soropositivos para o HIV-1 tratados com IP. No período de Setembro de 2009 até Junho de 2012, 174 indivíduos soropositivos e 46 soronegativos para o HIV-1 foram estudados. Foi realizada a genotipagem dos polimorfismos da PON1 192QR e 55LM através de PCR-RFLP. A atividade sérica da PON1/ARE foi avaliada por espectrofotometria empregando-se como substratos o paraoxon e o fenilacetato, respectivamente. O RNA-HIV-1 foi quantificado pelo método NASBA, e os linfócitos T-CD4+ e T-CD8+ por citometria de fluxo. Os níveis séricos de colesterol total, HDL, LDL, triglicérides (TG), ApoA1 e ApoB100 foram determinados e os anticorpos IgG anti-oxLDL por ELISA. A atividade sérica da PON1 foi inferior nos grupos de soropositivos, $p<0,05$, porém, a atividade ARE não apresentou diferenças entre os grupos estudados, $p>0,05$. Ambas as atividades não apresentaram relação com os genótipos PON1 192QR e 55LM, e estes genótipos apresentaram uma freqüência alélica semelhante ao grupo de soronegativos. Os níveis séricos de TG foram superiores nos grupos de soropositivos com TARV, $p<0,05$, enquanto o grupo tratado com IP apresentou níveis séricos de HDL e Apo-A1 inferiores aos demais grupos, $p<0,05$. Níveis séricos de Apo-B100, IgG anti-oxLDL, e o índice de risco aterogênico foram superiores no grupo tratado com IP, $p<0,05$. Concluí-se, que indivíduos soropositivos para o HIV-1 apresentaram alterações no metabolismo lipídico, principalmente nos tratados com IP, que adicionalmente apresentaram um maior índice de risco aterogênico e maiores níveis de anticorpos IgG anti-oxLDL. Estas alterações não apresentaram relação com os polimorfismos PON1 192QR e 55LM da PON1, e demonstraram que a atividade da enzima PON-1 esta diminuída em indivíduos soropositivos para o HIV-1

Descritores: 1.PON1 proteína humana 2.Paraoxon/sangue 3.Polimorfismo genético 4.Lipoproteína de baixa densidade oxidada 5.Proteínas LDL 6.HIV-1 7.Anti-retrovirais 8.Inibidores de proteases.

CUNHA J. Study of activity and polymorphisms of Paraoxonase-1 in individuals infected with human immunodeficiency vírus type-1 (HIV-1) treated with protease inhibitors [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

The enzyme Paraoxonase-1 (PON1) has paraoxonase (PON), arylesterase (ARE) and lactonase activities, among others. It is the most studied member of PON family which is composed of PON1, PON2 and PON3. It is suggested that all members acts by inhibiting the peroxidation of lipid molecules as the low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL), characterizing a potential anti-atherogenic effect. The PON1 gene has two mainly polymorphic sites, with an exchange of $Gln^{192}Arg$ (Q/R) and $Met^{55}Leu$ (L/M), which are associated with differences in activity and serum concentrations of the enzyme. In turn, seropositive individuals for HIV-1 show changes in lipid metabolism, which could be associated with changes in the activity of PON1 and highly active antiretroviral therapy (HAART) with protease inhibitors (PI). The aim of this study was to determinate the serum PON and ARE activities of PON1, the allele frequencies of PON1 192QR and PON1 55LM genetic polymorphisms and evaluate the correlation between these parameters and lipid abnormalities in seropositive patients for HIV-1 treated with IP. In the period from September 2009 until June 2012, 174 seropositive individuals and 46 soronegative individuals for HIV-1 were studied. We performed PON1 192QR and 55LM genotyping by PCR-RFLP. Serum activities PON and ARE of PON1 were evaluated by spectrophotometry using paraoxon and phenylacetate, respectively, as substrates. The HIV-1-RNA was quantified by the NASBA method, and lymphocytes T-CD4+ and T-CD8+, by flow cytometry. Serum levels of total cholesterol, HDL, LDL, triglycerides (TG), apoA1 and ApoB100 were determined. IgG anti-oxLDL antibodies were quantified by ELISA. The serum PON1 activity was lower in the seropositive group, $p<0.05$, however, ARE activity did not differ between groups, $p>0.05$. Both activities had no relation with the PON1 192QR and PON1 55LM genotype, and these individuals showed an allele frequency similar to the seronegative group. Serum levels of TG were higher in groups of HIV-positive with HAART, $p<0.05$, while the IP-treated group showed serum levels of HDL and ApoA1 lower than other groups, $p <0.05$. Serum levels of ApoB100, IgG anti-oxLDL antibodies, and atherogenic risk indices were higher in the group treated with PI, $p<0.05$. It was concluded that individuals HIV-1-infected showed changes in lipid metabolism, especially in those treated with IP, which additionally showed a higher rate of atherogenic risk and higher levels of IgG anti-oxLDL antibodies. These changes did not correlated with PON1 192QR and 55LM polymorphisms and demonstrated that the activity of PON1enzyme is decreased in individuals seropositive for HIV-1.

Descriptors: 1.PON1 protein,human 2.Paraoxon/Blood 3.Genetic polymorphism 4.Oxidized low-density lipoprotein 5.LDL proteins 6.HIV-1 7.Antiretrovirals 8.Protease inhibitors.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de anexos

Resumo

Sumário

1. Introdução..... 1

1.1 Paraoxonase..... 2

1.1.1 PON1 e HDL..... 3

1.1.2 PON1, polimorfismos e atividade enzimática..... 5

1.1.3 PON1 e aterosclerose..... 8

1.2 Lípides e doenças cardiovasculares..... 10

1.3 Aterosclerose e LDL oxidada (oxLDL)..... 12

1.4 Dislipidemia e o processo infeccioso..... 14

1.5 Lípides, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e terapia antirretroviral (TARV)..... 16

2. Objetivos..... 26

3. Pacientes, materiais e métodos..... 28

3.1 Comitê de Ética..... 29

3.2 Casuístca..... 29

3.3 Critérios de exclusão..... 30

3.4 Coleta e fracionamento de amostras biológicas..... 33

3.5 Quantificação do RNA do HIV-1..... 33

3.6. Quantificação dos linfócitos T-CD4+ e T-CD8+..... 34

3.7 Determinação dos níveis séricos de colesterol total, HDL, LDL e Triglicérides..... 35

3.8 Determinação dos índices de risco aterogênico..... 36

3.9 Determinação dos níveis séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL... 50

3.10 Determinação dos níveis séricos de Apolipoproteínas A1 e B100..... 38

3.11 Determinação da atividade sérica da PON1..... 39

3.12 Determinação da atividade sérica da arilestearase..... 40

3.13 Extração de DNA genômico de células do sangue periférico..... 41

3.14 Quantificação de DNA genômico..... 42

3.15 Genotipagem: Polimorfismos 192QR e 55LM do gene da enzima PON1 (PCR multiplex)..... 44

4. Análise estatística..... 48

5. Resultados..... 50

5.1 Marcadores da indfecção: níveis plasmáticos de RNA do HIV-1, número de linfócitos T-CD4+ e T-CD8+..... 51

5.2 Perfil lipídico: níveis séricos de colesterol total, frações de colesterol e triglicérides..... 52

5.2.1 Índices de risco aterogênico: relação CT:HDL e LDL:HDL..... 59

5.2.2 Correlação entre os parâmetros lipídicos e os marcadores da infecção..... 61

5.2.3 Níveis séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL..... 61

5.3 Apolipoproteínas A1 e B100..... 64

5.4 Paraoxonase..... 67

5.4.1 Atividade sérica da PON1..... 67

5.4.2 Atividade sérica da ARE..... 67

5.4.3 Atividade sérica da PON1 e linfócitos T-CD4+..... 69

5.4.4 Atividade sérica da ARE e linfócitos T-CD4+..... 69

5.4.5 Atividade PON1 e ARE. e correlação com parâmetros lipídicos. 71

5.4.6 Polimorfismos PON1 192QR e PON1 55LM..... 71

5.4.7 Atividades séricas da PON1 e ARE, e polimorfismos PON1 192QR..... 74

5.4.8 Atividades séricas da PON1 e ARE, e polimorfismos PON1 55LM..... 77

5.4.9 Parâmetros lipídicos e o polimorfismo PON1 192QR..... 79

5.4.10 Parâmetros lipídicos e o polimorfismo PON1 55LM..... 81

6. Discussão..... 83

7. Conclusões..... 110

8. Anexos..... 112

9. Referências bibliográficas..... 159

1
Introdução

1. Introdução

1.1 Paraoxonase

A paraoxonase (PON) é uma família multigene de enzimas composta de três diferentes membros, PON1, PON2 e PON3, que compartilham considerável homologia estrutural e estão localizados adjacentemente ao braço longo do cromossomo 7 (entre q21.3 e q22.1) em humanos e no cromossomo 6 de ratos (Primo-Parmo et al., 1996; Précourt et al., 2011). Por sua similaridade e homologia estrutural sugere-se que tenham sido originados pela duplicação gênica de um precursor evolucionário comum. Sua estrutura gênica é caracterizada por nove exons, oito introns e vários promotores TATA-less, indicando que esta família de enzimas possa contribuir para algumas importantes funções fisiológicas, de maneira independente da capacidade da PON1 de hidrolisar organofosfatos, carbamatos e ésteres aromáticos (La Du et al., 1999; Draganov et al., 2000; Campo et al., 2004).

A PON2 sugere-se ser a mais antiga, seguida por PON3 e finalmente por PON1 (Draganov, La Du, 2004), primeira a ser identificada, mais estudada e descoberta através de sua capacidade em hidrolisar organofosfatos xenobióticos no soro humano. Sabe-se, no entanto, que PON2 e PON3 não exibem atividade paraoxonase ou arilesterase (ARE), mas assim como a PON1, hidrolisam lactonas aromáticas, alifáticas de cadeia longa e possuem propriedades para prevenção da oxidação de lípides nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de alta densidade

(HDL), bem como para inativação de lípides oxidados da LDL (Draganov, La Du, 2004; Serdar et al., 2006).

Todas as proteínas PONs têm apresentado capacidade anti-aterogênica, impedindo o desenvolvimento da aterosclerose, contudo, os mecanismos envolvidos neste processo anti-aterogênico permanecem desconhecidos, embora já esteja evidenciada a capacidade de proteção das células contra o estresse oxidativo (Reddy et al., 2008; Aviram, Rosenblat, 2009).

1.1.1 PON1 e HDL

A enzima PON1 é uma esterase capaz de hidrolisar organofosfatos, bem como ésteres aromáticos como o p-nitrofenil acetato. Foram chamadas de “A-esterases” (paraoxonase) para distinguir destas, as “B-esterases”, representadas por serina carboxilesterases e colinesterases, inibidas pelo paraoxon e outros organofosfatos (Aldridge, 1953; Mackness et al, 1991a; Marsillach et al, 2008).

Estudo mostrou que as duas atividades, PON e ARE, pertencem à mesma enzima PON1, cujo nome deriva de paraoxon, o metabólito tóxico do pesticida parathion e um de seus substratos mais bem estudados in vitro (Sorenson et al., 1995). A PON1 tem capacidade de hidrolisar uma ampla variedade de substratos, como metabólitos ativos de vários outros inseticidas organofosforados (ex.: clorpirifos, oxon, diazoxon), “agentes nervosos” (sarin, soman e VX), ésteres aromáticos (fenilacetato, tiofenilacetato e 2-naftilacetato), diversas lactonas aromáticas e alifáticas

(dihidrocumarina, g-butirolactona e homocisteína tiolactona) (khersonsky e Tawfik, 2005; Perla-Kajan, Jakubowski, 2010).

A PON1 está presente no soro, fortemente associada à apolipoproteína A1 (ApoA1) integrante da HDL e que possui o papel fisiológico principal de proteger a LDL contra modificações oxidativas (Aviram, 1999). O interesse científico pela enzima cresceu quando Mackness et al. (1991b) demonstraram que PON1 poderia prevenir o acúmulo de lipoperóxidos na LDL, correlacionando-a, assim, com a aterosclerose (La Du, 1996; Aviram, Rosenblat, 2004).

Em humanos, possui uma massa molecular de 43 a 45 kDa, contendo três cadeias de carboidrato que correspondem a 15,8% de seu peso (Mackness et al., 1998). É uma glicoproteína com atividade esterase, aparentemente sintetizada e secretada pelo fígado e completamente dependente de cálcio para sua ação hidrolítica contra substratos organofosforados (Aviram et al., 2005; Marsillach et al., 2008).

Recentemente, foi sugerido que a atividade hidrolítica contra lactonas (ésteres cíclicos) constitua a atividade nativa de PON1. Estudos sobre sua atividade e estrutura demonstram que as lactonas são o substrato preferido para hidrólise pela enzima (Khersonsky, Tawfik, 2005). Mais ainda, todos os membros da família de enzimas PON apresentam atividade lactonase, sugerindo que esta atividade tenha sido conservada durante a evolução da enzima (Draganov et al., 2005). O desequilíbrio da atividade lactonase de PON1, através de mutações em sua díade catalítica (Khersonsky, Tawfik, 2006), reduz sua habilidade em prevenir a oxidação da

LDL e estimula o efluxo de colesterol dos macrófagos, indicando que todas as funções potencialmente anti-aterogênicas de PON1 são mediadas pela atividade lipolactonase (Rosenblat et al., 2006b; NG et al., 2008).

1.1.2 PON1, polimorfismos e atividade enzimática

Mais de 160 polimorfismos já foram descritos neste *gene*, alguns em regiões codificadoras, outros em introns e regiões reguladoras, necessitando serem mais adequadamente caracterizados (Costa et al., 2005).

A base molecular dos polimorfismos na atividade da PON1 baseia-se em uma mutação missense que faz com que sua atividade seja parcialmente determinada de modo genético: uma substituição de aminoácido na posição 192, onde há a troca de uma glicina (Q) por uma arginina (R) (A/G: Gln/Arg), origina duas aloenzimas cujas atividades relativas são substrato dependentes (Costa et al., 2005). Assim, substratos como paroxon e fenitroxon, organofosfatos amplamente empregados como inseticidas, são hidrolisados mais rapidamente pela aloenzima R, e outros, como o fenilacetato, são hidrolisados igualmente por ambas, e outros ainda, como diazoxon e gases nervosos como soman e sarin são mais rapidamente hidrolisados pela aloenzima Q.

A isoforma PON1 Q, in vitro, promove melhor proteção da LDL contra o acúmulo de peróxidos lipídicos (Mackness et al**.,** 2003). Por sua vez, o alelo R parece constituir fator de risco independente para doença coronariana justamente dada a essa menor capacidade antioxidativa. Experimentos empregando camundongos PON1 *knock-out* já demonstraram

uma maior susceptibilidade à toxicidade por organofosfatos, bem como a aterosclerose produzida por dieta aterogênica nestes animais (Draganov et al., 2000).

O gene da PON1 possui ainda um segundo polimorfismo exônico, em sua posição 55, onde há a troca de um aminoácido leucina (L) por metionina (M) (T/A: Leu/Met), a qual também afeta menos intensamente e de modo independente quanto ao primeiro polimorfismo a atividade da enzima PON1 no plasma (Mackness et al., 2003). A presença do alelo PON1 M55 está associada, assim, à alteração nas concentrações séricas e à baixa eficiência da PON1 plasmática (Costa et al., 2005), provavelmente dada a localização estratégica da leucina na estrutura da enzima, bem como de sua interação com aminoácidos próximos ligados aos dois íons cálcio presentes em PON1 (Costa et al., 2005; Harel et al., 2004).

A possibilidade desse polimorfismo ser um fator genético de risco para a doença cardiovascular foi colocada por Garin et al. (1997) ao relatarem que a homozigose para o alelo Leu55 foi fator de risco independente para doença cardiovascular em pacientes com diabetes.

O alelo R no gene da PON1 parece ser mais frequente na África Central, em alguns aborígenes ou regiões isoladas, enquanto que o alelo Q parece ser mais frequente em regiões temperadas da Europa e da América do Norte, entretanto, também aqui maiores estudos seriam necessários para determinar se esta distribuição estaria relacionada com migrações populacionais, influências climáticas, bem como com fatores ambientais (Draganov et al., 2000).

Em 2003, uma pesquisa sobre a distribuição mundial do polimorfismo 192 na PON1 também apresentou o alelo R como o de maior frequência na maioria das populações estudadas, inferindo, por este motivo, que talvez este seria o alelo ancestral. Neste estudo, o alelo Q apresentou frequência mais alta apenas em europeus e índios asiáticos, sem contudo, ser possível justificar esta distribuição alélica (Scacchi et al., 2003; Ginsberg et al., 2009).

Na região promotora e adjacente ao sítio de ligação para o fator de transcrição Sp1, o polimorfismo C108T no gene de PON1 também influencia a expressão do *gene*, uma vez que a presença do alelo PON1 108T confere redução nos níveis de PON1. É considerado o polimorfismo mais influente na região promotora, contribuindo em 22-25% das variações na expressão de PON1 em adultos de raça branca. Comparativamente aos adultos homozigotos para PON1 108CC, os adultos homozigotos para PON1 108TT apresentam redução na atividade enzimática de PON1 de 33 a 45% (Brophy et al., 2001; Leviev, James, 2000). Esta redução em neonatos chega a 63% (Chen et al., 2003).

A atividade da PON1 já está presente em recém-nascidos, atingindo os níveis encontrados em adultos a partir de 1 ano de vida. Estes níveis parecem ser constantes por toda a vida (Mackness et al., 1998), não tendo sido relatadas diferenças de atividade da PON1 entre os sexos. Entretanto, já foi relatado que a atividade enzimática da PON varia de 10 a 40 vezes entre populações com diferentes formações étnicas, bem como se apresenta diminuída em pacientes portadores de certas doenças, como infarto do

miocárdio, diabetes, hipercolesterolemia familiar, derrame, doença coronariana, cirrose hepática, doença renal, entre outras, podendo caracterizar, inclusive, fator de risco, apesar de dados ainda conflitantes (Li et al., 2003; Ayanacioglu et al., 1999). A atividade da PON1 pode também ser diminuída por tabagismo, gravidez, menopausa, dieta aterogênica, e aumentada pela ingestão moderada de álcool, polifénois e de vitaminas C e E (Van der Gaag et al., 1999; Li et al., 2003; Rainwater et al., 2009).

1.1.3 PON1 e aterosclerose

A ação da PON1 sérica se dá, muito provavelmente, pelo envolvimento da enzima no transporte reverso do colesterol, uma propriedade anti-aterogênica bem estabelecida da HDL (Noto et al., 2001). A PON1 inibe a oxidação da LDL e reduz de modo significativo a enzima peroxidase lipídica, o que, por sua vez, diminui o acúmulo de colesterol nos tecidos periféricos (Mackness et al., 1993). Sabe-se que a modificação oxidativa da LDL na parede arterial tem papel central na patogênese da aterosclerose, a qual se caracteriza pela deposição de lipídios, formando placas que causam o estreitamento dos vasos sangüíneos (Mackness et al., 1999; Aviram, Rosenblat, 2004).

É conhecido que a inibição da oxidação da LDL pela HDL é atribuída pelo alto conteúdo de antioxidantes nesta lipoproteína, pelas propriedades antioxidativas da ApoA1 e pela presença de muitas enzimas, como a PON, a acetil-hidrolase fator ativador de plaquetas (PAF-AH), e a glutationa peroxidase (GPX), enzimas estas que previnem a formação ou degradam

produtos bioativos da oxidação da LDL (Assman, Nofer, 2003; Liu et al., 2008). Já foram relatadas várias funções antioxidativas para a PON, ligada à HDL, as quais incluem inibir a geração induzida por cobre de peróxidos lipídicos na LDL, e catalisar a quebra dos fosfolipídios oxidados na LDL (Marathe et al., 2003; Précourt et al., 2011).

Também já foi reportado um papel peroxidativo (peroxidase-like) para a PON, dado a sua capacidade de inibir a oxidação também da HDL, preservando assim suas funções anti-aterogênicas e a habilidade para eliminar oxidantes potentes, como os hidroperóxidos e o peróxido de hidrogênio, os quais estão envolvidos na aterosclerose (Li et al., 2003; Aviram et al.,1998).

Observou-se que a PON1 inibe o influxo de colesterol através da redução da formação de LDL oxidada (oxLDL), inibindo a liberação pelos macrófagos do ânion superóxido e sua conseqüente oxidação da LDL mediada por células, e ainda, pelo aumento da quebra de lípides oxidados específicos na oxLDL e pela diminuição da captação, pelos macrófagos, da oxLDL (Aviram, Rosenblat, 2004; Rozenberg et al., 2003). Também já foi relatado que a enzima, associada à HDL, pode estimular o efluxo de colesterol mediado pela HDL em macrófagos, através da proteína de membrana transportadora A1 da família de ligação de ATP, efeitos estes que poderiam estar relacionados à capacidade de PON1 de induzir a formação de lisofosfatidilcolina nestas células (Rosenblat et al., 2005).

A lisofosfatidilcolina, originária de lipoproteínas contentoras de fosfatidilcolina (como resultado da ativação endógena da fosfolipase A2) e

da fosfatidilcolina derivada da membrana celular (como resultado de sua hidrólise pela fosfolipase A2 secretória), parece também inibir a biosíntese de colesterol em macrófagos (Rozenberg et al., 2003; Rosenblat et al., 2006a). Estes achados reforçam a função anti-aterogênica e de redução do estresse oxidativo da enzima PON1.

1.2 Lípides e doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares, incluindo aquelas consideradas de caráter degenerativo, estão associadas à elevação dos níveis séricos de colesterol total (CT), triglicérides (TG), e das frações HDL e LDL, e são de extrema gravidade, uma vez que não possuem cura. Além disto, em estágios mais avançados são de caráter incapacitante e consequentemente alteram a qualidade e o tempo de vida (Lorenz et al., 2007; Juonala et al., 2010).

Um dos processos mais agressivos que conduz às doenças cardiovasculares é a aterosclerose, uma condição que evolve lesão arterial e que provoca várias alterações como cardiopatia isquêmica, infarto do miocárdio e acidentes vasculares (Leeson et al., 2000; Tsimikas, 2008). A compreensão sobre o metabolismo lipídico e sua relação com doenças cardiovasculares nos leva a buscar uma melhor compreensão sobre o colesterol e suas frações lipoproteicas, assim como das apolipoproteínas.

No que se refere ao colesterol, este está presente nas lipoproteínas plasmáticas e em todas as células de eucariontes, desempenhando papel indispensável na regulação da permeabilidade da membrana plasmática das células (Simons, Ikonem, 2000).

Sua síntese ocorre em todas as células do organismo humano, a partir de uma enzima denominada acetil-coenzima A (acetil-CoA) presente no retículo endoplasmático. Após a sua síntese, o colesterol é captado pelas células e transportado por moléculas chamadas lipoproteínas. A sua concentração plasmática é regulada por mecanismo de esterificação, controle da transcrição gênica de sua síntese e por expressão de receptores celulares para lipoproteínas transportadoras. Neste processo, há uma outra enzima de grande importância, a colesterol acil-transferase (ACAT) que catalisa a conversão de colesterol em éster de colesterol no interior das células. Este processo é necessário para o armazenamento do colesterol e para proteção da própria célula, uma vez que o colesterol é considerado uma molécula tóxica (Buhman et al., 2000).

Uma das características dos lipídeos é sua insolubilidade em meio aquoso, o que torna necessário sua complexação com moléculas hidrofílicas para ser transportado pelo organismo, as lipoproteínas. As lipoproteínas são complexos moleculares com composição altamente hidrofóbica na parte interior do complexo, e têm como componentes os ésteres de colesterol, os TG, além de vitaminas lipossolúveis. Outras moléculas adicionais e menos hidrofóbicas são os fosfolipídeos e o colesterol não esterificado, além de proteínas (Apolipoproteínas ou Apoproteínas) (Simons, Ikonem, 2000; Santos, 2001).

As lipoproteínas como transportadores de lipídeos possuem a função primordial de suprir os tecidos com lipídeos da síntese endógena assim como provenientes da dieta. Um componente adicional que auxilia na

regulação do metabolismo das lipoproteínas são as apoliporpoteínas, que atuam modulando a atividade de enzimas, direcionando as lipoproteínas aos locais de catabolismo e interagindo com receptores específicos e de alta afinidade (Nissen et al., 2003).

1.3 Aterosclerose e LDL oxidade (oxLDL)

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica e progressiva caracterizada pelo estreitamento, espessamento e acúmulo de lipídeos e elementos fibrosos nas artérias. Há também a produção de moléculas inflamatórias e o recrutamento e migração de células inflamatórias para a íntima arterial, principalmente monócitos (Lusis, 2000; Navab et al., 2004).

Em humanos as lesões ateroscleróticas caracterizadas pelo rico conteúdo de colesterol em células macrofágicas, que se acumulam no sub-endotélio, podem ser encontradas na aorta ainda na primeira década de vida, e em artérias coronárias na segunda década, e por fim nas artérias cerebrais na terceira e/ou quarta década de vida. As diferenças na dinâmica do fluxo sanguíneo é que permitem a formação destas lesões dentro das artérias (Ross, 1999; Lusis, 2000)

As altas concentrações de colesterol, e as modificações de suas frações lipoprotéicas, principalmente LDL, permanecem como hipótese principal para formação das placas ateromatosas. O processo de modificação de lipoproteínas pode ser atribuído ao mecanismo de oxidação por agentes como ânions superóxido, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, que transformam a LDL em oxLDL (Kádar, Glasz, 2001).

Estas oxLDLs se depositam na camada íntima arterial, onde são capazes de provocar citotoxicidade no endotélio vascular, além de se acumularem na parede do vaso. Numa fase posterior e de caráter inflamatório, células como monócitos se aderem ao local e migram para a camada íntima se transformando em macrófagos que fagocitam as partículas de oxLDL, originando o acúmulo de vesículas citosólicas, contendo éster de colesterol no seu interior, formando as *foam cells* que se acumulam na camada íntima. Neste local, liberam agentes quimiotáticos, que são capazes de aumentar o recrutamento das LDLs plasmáticas, e fatores de crescimento, que levam à migração e proliferação das células musculares lisas, formando a placa ateromatosa (Buhman et al., 2000; Navab et al., 2004).

Todo este processo metabólico oxidativo resultante da ação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre as frações lipídicas, proteínas e DNA são controlados pela ação de alguns compostos antioxidantes. Estes antioxidantes possuem a capacidade de inibir a aterogênese e preservar a função vascular por diferentes mecanismos, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR) e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (Serdar et al., 2006; Lind et al., 2008).

É neste contexto de estresse oxidativo e aterosclerose que vários estudos vêm demonstrando o papel da enzima PON e sua reconhecida capacidade antioxidante e anti-aterogênica (Reddy et al., 2008; Jayakumari, Thejassebai, 2009).

1.4 Dislipidemia e o processo infeccioso

Em diversos processos infecciosos são observadas alterações no metabolismo lipídico, e, em geral, estas alterações estão associadas à gravidade, duração e estágios da infecção (Shor-Posner et al., 1993; Grunfeld et al., 1992)

Reduções dos níveis séricos de CT são frequentes em infecções por parasitas, vírus e bactérias, bem como uma hiperlipidemia associada ao acúmulo de TG, acúmulo este dado ao aumento da VLDL (Shor-Posner et al., 1993; Grunfeld et al., 1992). O aumento dos níveis plasmáticos de TG observados no processo infeccioso se dá através da redução do *clearance* das lipoproteínas circulantes, processo resultante da diminuição da lipoproteína lipase, ou ainda pelo estímulo da síntese de lipídios hepáticos, pelo aumento da síntese de ácidos graxos hepáticos ou da reesterificação dos ácidos graxos provenientes da lipólise (Grunfeld et al., 1992).

As lipoproteínas, particularmente a HDL, apresentam propriedades adicionais que poderiam influenciar o curso das infecções (Grunfeld et al., 1992). Além de sua importante função no transporte reverso de colesterol (Noto et al., 2001), a HDL é relatada como colaboradora em um sistema imune inato não-específico ao exercer ação antioxidante, resultado de sua associação com as enzimas PON, LCAT e glutationa seleno-peroxidase (GPX) (Mackness et al., 1999; Alonso-Villaverde et al., 2003). A HDL também tem a capacidade de modular diretamente as citocinas inflamatórias, aumentando interleucina-2 (IL-2) sem a indução de fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e que pode, ainda, inibir a expressão de moléculas de adesão

induzida por citocinas, como acontece com as moléculas de adesão celular-1 (VCAM-1) e intracelular (ICAM-1), bem como a E-selectina (Alonso-Villaverde et al., 2003).

Adicionalmente, o metabolismo lipídico da membrana celular é modulado pelo efluxo de colesterol da membrana das células plasmáticas através das partículas de HDL (Aviram et al., 1998) e que a ApoA1, maior componente protéico desta lipoproteína sérica, consegue inibir a fusão celular induzida pelo vírus *herpes simplex* (Alonso-Villaverde et al., 2003).

Com relação à partícula LDL, as modificações observadas nessa fração em diversos processos patológicos, incluem metilação, acetilação e mais comumente, alterações geradas por estresse oxidativo. As alterações induzidas por oxidação, associadas às mudanças enzimáticas subsequentes resultam em uma partícula de LDL completamente degradada (Noto et al., 2001; Mackness et al., 1993), entretanto, biologicamente ativa, cujos efeitos estendem-se à indução de apoptose, bem como à produção de citocinas com propriedade vasoativas para estímulo e indução de resposta imune (Ronchini et al., 2004). A presença de LDL modificada está associada ao desenvolvimento de patologias como aterosclerose e artrite reumatóide, bem como a fatores predisponentes à doença coronariana isquêmica (Ronchini et al., 2004). Mais ainda, estudos recentes sugerem a existência de pelo menos duas classes funcionais de anticorpos anti-oxLDL, os quais podem induzir e propagar a doença ou serem protetores, através da remoção ou neutralização desta oxLDL (Ronchini et al., 2004).

1.5 Lípides, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e terapia antirretroviral (TARV)

O vírus da imunodeficiência humana tipo-1 (HIV-1) é um retrovírus com genoma RNA, da família *Lentiviridae*, pertencente ao grupo dos retrovírus citopáticos e não oncogênicos, os quais necessitam da enzima transcriptase reversa para transcrever o RNA viral em uma cópia DNA, permitindo assim, sua integração ao genoma do hospedeiro. O HIV é um retrovírus envelopado, possuidor de duas moléculas de RNA dispostas no interior do capsídeo, conjunto este que se encontra envolto por outra camada protéica, gerando uma estrutura chamada core. O envelope envolve o core, sendo composto por uma camada dupla de fosfolipídios, na qual várias moléculas protéicas específicas do vírus encontram-se imersas; no interior do vírus encontram-se também as moléculas de transcriptase reversa (Libman, 1995).

Na infecção pelo HIV-1, o estágio inicial da infecção viral consiste na adsorção do vírus aos receptores da membrana plasmática da célula suscetível. O vírus HIV-1 apresenta grande afinidade pela proteína CD4, presente na membrana plasmática de células humanas, principalmente em linfócitos T e macrófagos, mas encontrada também em monócitos, linfócitos B, timo, pele, encéfalo, medula óssea e intestino. Os linfócitos T CD4+, fisiologicamente, são células chaves no desenvolvimento da resposta imune humoral. Por sua vez, a infecção pelo HIV, o qual mata as células T CD4+, pode ser dividida em quatro fases clínicas: infecção aguda, fase assintomática ou latência clínica, fase sintomática inicial ou precoce e

síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Ronchini et al., 2004). Assim, a gravidade da infecção pelo HIV é refletida pela diminuição da contagem de células T CD4+.

A infecção pelo vírus HIV consiste em uma infecção viral crônica, observando-se juntamente com a progressão da doença, além de hipertrigliceridemia, uma alteração significativa dos níveis séricos de CT, HDL, LDL, ApoA1, ApoB100, e diminuição no tamanho das partículas de LDL, tanto nos portadores quanto na AIDS já estabelecida (Stein et al., 2003).

Nos pacientes com AIDS, a hipertrigliceridemia também está associada ao aumento da VLDL, de conteúdo lipídico normal, assim como à presença de partículas de LDL e HDL ricas em TG (Stein et al., 2003). Nos pacientes soropositivos e com AIDS há predomínio de LDL com fenótipo pequeno e denso (fenótipo B), sobretudo nas hipertrigliceridemias com baixos níveis de HDL. Este fenótipo de LDL oxida-se mais facilmente e é reconhecido pelos macrófagos, colaborando na aterogênese. É provável que o sistema retículo-endotelial, estimulado pela infecção por HIV-1, exerça ação na captação destas oxLDL. Indivíduos soropositivos apresentam taxas de hidroperóxidos lipídicos mais elevadas e capacidade antioxidante total diminuída, quando comparado a indivíduos controles. Sabe-se que a meia vida das partículas ricas em TG em pacientes com HIV-1, é três vezes maior que a de indivíduos controle, aparentando a elevação dos TG estar relacionada à diminuição das atividades da lipoproteína lipase e da lipase hepática (Grunfeld et al., 1992).

Entretanto, a redução destes níveis, especialmente dos níveis de HDL, nos pacientes HIV+ que não desenvolvem hipertrigliceridemia é indicativo de que as alterações no metabolismo do colesterol, incluindo as alterações na HDL, precedem as grandes elevações dos TG séricos durante a infecção pelo HIV (Grunfeld et al., 1992).

A hipertrigliceridemia torna-se proeminente, com a transição da infecção assintomática pelo HIV para a AIDS, na presença de uma maior carga viral e de maiores níveis de interferon-α. Durante a AIDS, observa-se também a redução das atividades das enzimas lipoproteína lipase, lipoproteína lipase hepática e lipase (Grunfeld et al., 1992; Stein et al., 2003).

A HDL, possuidora de propriedades antinflamatórias, antioxidantes e metabólicas, entre outros mecanismos, parece alterar o curso da infecção do HIV em humanos (Alonso-Villaverde et al., 2003): seu efeito antioxidante induz à inibição da replicação do vírus, sua já mencionada modulação de citocinas pode induzir uma resposta imunocelular contra o HIV através da produção de IL-2 (Alonso-Villaverde et al., 2003) e, finalmente, a HDL pode interferir na inicialização da replicação viral pelo TNF-α (Alonso-Villaverde et al., 2003). Mais ainda, sabe-se que a ApoA1, componente protéico da HDL, apresenta similaridade de 34% em uma área de 50 aminoácidos com a proteína de matriz gag p17 do HIV (ou seja, 50% da proteína gag e 20% da sequência codificada pelo éxon 4 do gene da apo-A1), correspondente a uma região essencial ao ciclo de vida do vírus (Alonso-Villaverde et al., 2003). As proteínas gag são primordiais ao assentamento e maturação da partícula viral, associando-se especificamente aos microdomínios colesterol

presentes na superfície da membrana plasmática, com p17 mediando esta associação, indicativos da necessidade do metabolismo do colesterol celular para a replicação do vírus (Alonso-Villaverde et al., 2003). Assim, interações entre ApoA1 proveniente do efluxo do colesterol e a gag p17 presente na superfície das células infectadas seriam passíveis de ocorrer dentro dos microdomínios ricos em colesterol, permitindo a interferência da apo-A1 no estabelecimento das partículas do HIV e promovendo associação significativa entre a HDL e o período de não detecção da carga viral. Desta forma, níveis séricos elevados de HDL estariam, uma vez iniciado um tratamento com TARV, relacionados a uma melhor resposta em pacientes portadores de HIV, dado à similaridade na seqüência e na homologia estrutural entre estas duas proteínas, ApoA1 e gag p17 (Alonso-Villaverde et al., 2003).

Como descrito, em indivíduos soropositivos para o HIV-1, as alterações do metabolismo lipídico apresentam alta prevalência (Dubé et al., 2003, Riddler et al., 2008; Wohl et al., 2008), e estudos mostram que a TARV, adicionalmente, pode aumentar o risco de dislipidemia em soropositivos tratados (Grispoon, Carr 2005; Stein et al., 2008; Dubé et al., 2008).

A terapia contra o HIV-1 foi iniciada em 1987 com o primeiro antirretroviral, a zidovudina (AZT), e atualmente apresenta várias classes de antirretrovirais: inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleosídios (ITRN), inibidores de transcriptase reversa não nuclosídeos (ITRNN), inibidores de protease (IP), inibidor de fusão (IF) (Chaix et al., 2000; Lalezari

et al., 2003), além dos atuais inibidores da integrase e CCR-5 (Thompson et al., 2010).

O uso de combinação de antirretrovirais permitiu um melhor prognóstico para os indivíduos infectados pelo HIV-1, que está associado a uma redução do risco de doenças oportunistas, uma redução no índice de morbidade e mortalidade, e um aumento da sobrevida (Panel, 2009). Entretanto, esta maior sobrevida vem acompanhada de outros fatores de risco, que são decorrentes da própria infecção pelo HIV, assim como por fatores associados à terapia (Riddler et al., 2007; Dubé, Cadden, 2011).

Entre as alternativas e estratégias de terapias disponíveis, os IPs são considerados atualmente os mais potentes contra o HIV-1, uma vez que potencialmente impedem a maturação das partículas virais, controlando de maneira eficaz a infecção de novas células pelo vírus HIV. Entretanto, estes benefícios são acompanhados por diversas alterações no metabolismo lipídico, gerando efeitos adversos como resistência à insulina, hipertrigliceridemia acompanhada ou não de hipercolesterolemia, lipodistrofia e redução da fração HDL (Monier, Wilcox, 2004; Carr, Ory, 2006; Wang et al., 2007).

Os mecanismos pelos quais estes IPs promovem as alterações ainda são desconhecidos e vêm sendo estudados. Contudo, seu maior efeito parece se dar pela supressão da quebra da forma nuclear do elemento regulador de esterol ligado a proteínas (nSREBP) no fígado e tecido adiposo. Este regulador constitui um elemento chave na via proteolítica responsável

pela regulação dos níveis celulares e plasmáticos de gordura e de colesterol (Kuhel et al., 2000; Hui, 2003).

No fígado, o acúmulo de nSREBP resulta no aumento da biosíntese de ácidos graxos e colesterol, enquanto no tecido adiposo causa lipodistrofia, redução da expressão de leptina e resistência à insulina (Hui, 2003). Sugere-se ainda, que os IPs suprimam a quebra da apolipoproteína B (ApoB) nascente mediada pelos proteassomos, resultando, assim, no aumento da produção e secreção de lipoproteínas ricas em TG, bem como inibição inespecífica da proteína relacionada ao receptor de LDLr, que com ela competem, como ocorre para a região catalítica da protease do HIV-1 (Malavazi et al., 2004).

Cerca de 50-70% dos pacientes tratados com TARV contendo IP apresentam alterações do perfil lipídico, normalmente caracterizadas pelo aumento em 50-300% dos níveis de TG e em 20-50% dos níveis de CT, bem como por alterações nas frações VLDL, LDL e nas apoproteínas associadas (Riddler et al., 2003). A presença de hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia em indivíduos infectados pelo HIV-1 com reduzida contagem de linfócitos T-CD4+, indica que a própria infecção pelo HIV-1 poderia induzir a uma dislipidemia, mesmo antes da introdução da TARV (Constans et al., 1994; Manfredi, Chiodo, 2001).

Por fim, é relatado que os IPs suprimem a inibição do transportador de glicose GLUT-4, o qual age no tecido adiposo e muscular, contribuindo diretamente também para a resistência de insulina e diabetes (Hui, 2003). Recentemente Mujawar et al. (2006) investigaram se a diminuição das

quantidades de HDL seria devida ao desequilíbrio no efluxo de colesterol de macrófagos, processo mediado pelo transportador ABCA-1 de colesterol entre célula e superfície, o qual promove a incorporação de lípides na ApoA1 e tem papel central na formação da HDL nascente. Observaram que a expressão da proteína *nef* do HIV, a qual potencializa a replicação e a infectividade, inibe de modo específico o efluxo de colesterol a partir de macrófagos e realoja ABCA1 em uma distribuição única na membrana plasmática. Enquanto células transfectadas com *nef* apresentaram aumento da ligação de apo-A1, sua internalização encontrava-se bloqueada, sugerindo que a proteína consegue evitar a internalização de ABCA-1 e a subsequente incorporação de lípides pela ApoA1. Desta forma, o redirecionamento promovido pelo vírus visa assegurar colesterol suficiente para o seu assentamento e replicação (Mujawar et al., 2006), conduzindo à diminuição da HDL e aterosclerose acelerada (Aiello et al., 2002).

Este conjunto de alterações promove uma redução na qualidade de vida destes pacientes, além da redução na adesão à TARV e riscos potenciais a longo prazo. É grande o risco de desenvolver diabetes e aterosclerose acelerada, doenças que, prolongadas, podem alterar significativamente o prognóstico e a expectativa de vida dos indivíduos infectados pelo HIV, com aumento, inclusive, do risco cardiovascular. É provável também que uma predisposição genética para um mecanismo lipídico anormal contribua para o desenvolvimento da dislipidemia relacionada ao uso de IP (Monier, Wilcox, 2004).

Há forte correlação entre a duração da TARV e o risco de infarto do miocárdio, associação em parte promovida pelas altas concentrações de CT e TG, bem como pela diminuição da quantidade de HDL (Friis-Moller et al., 2003). Paradoxalmente, a interrupção da TARV também aparenta estar associada ao aumento a curto prazo deste risco, sugerindo que o HIV-1 por si mesmo é capaz de elevar este risco e que o controle da replicação poderia reduzi-lo (Carr, Ory, 2006). A quantidade de HDL está diminuída na infecção pelo HIV-1 não tratada (Grunfeld et al., 1992), bem como em voluntários saudáveis expostos por curto período à IP (Lopinavir e ritonavir associado ao atazanavir) (Noor et al., 2004; Shafran et al., 2005). Em portadores de HIV-1 que iniciam TARV, que suprime eficazmente a replicação do vírus, observa-se aumento das quantidades de HDL mesmo ao se utilizar um IP (Johnson et al., 2006; van der Valk et al., 2001), indicando que o efeito do HIV-1 sobre as taxas de HDL poderia ser maior do que o acarretado pelo efeito da TARV.

A tendência ao desenvolvimento de dislipidemia durante a doença causada pelo HIV-1 pode ser detectada mesmo antes da introdução da TARV, com a frequência e a severidade da hipertrigliceridemia e da hipercolesterolemia sendo inversamente relacionadas a uma contagem de linfócitos T CD4+ diminuída (Manfredi, Chiodo, 2001; Constans et al., 1994). Cerca de 50-70% dos pacientes tratados com TARV contendo IP apresentam alterações do perfil lipídico, normalmente caracterizadas pelo aumento em 50-300% dos níveis de TG e em 20-50% dos níveis de CT, bem como por alterações nas frações VLDL, LDL e nas apoproteínas associadas,

enquanto os níveis de HDL séricos permanecem quase inalterados (Manfredi, Chiodo, 2001; Riddler et al., 2003). Segundo um estudo suíço em pacientes HIV, a ocorrência de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia foi 1,7 a 2,3 vezes mais frequente em usuários da TARV com IP (Fellay et al., 2001), dados concordantes com estudo realizado em outro centro médico, onde se observaram taxas de 60% para hipercolesterolemia (> 240 mg/dL) e 75% para hipertrigliceridemia (> 500 mg/dL), com taxas de incidência de 2,8 e 6,1 respectivamente, atribuídas ao uso desta terapia (Tsiodras et al., 2000).

Como demonstrado, é ampla a contribuição da oxidação lipídica, em especial das lipoproteínas, em patogenias como a inflamação vascular e aterogênese, processos estes que conduzem a outras doenças como a coronariana cardíaca e complicações vasculares de diabetes mellitus, entre outras.

Na infecção pelo HIV-1, como na AIDS já instalada, são observadas alterações relacionadas às doenças acima, tanto pelo processo infeccioso como pelo próprio tratamento disponível atualmente. Também são relatados nestes pacientes, dislipidemia caracterizada por aumento de CT, LDL e TG com diminuição da HDL, bem como aumento de estresse oxidativo, entre outras manifestações.

As enzimas PON, as quais aparentemente apresentam diferentes especificidades aos substratos, atuam de modo importante na proteção contra o dano tecidual da HDL e LDL oxidadas, estando, inclusive, aptas a inativar mediadores químicos responsáveis pelo dano cardiovascular. A atual diversidade de estudos e achados sobre esta família de enzimas busca

determinar suas possíveis funções biológicas, as quais, apesar de um maior conhecimento sobre PON1, a primeira a ser descoberta, possam até convergir em funções biológicas comuns (La Du, 2001).

Nesse contexto, o papel da PON1, que está presente no soro, fortemente associada à ApoA1 integrante da HDL e que possui o papel fisiológico principal de proteger a LDL contra modificações oxidativas (Aviram, 1999; Parra et al., 2007; Parra et al., 2010b) vem sendo estudado no âmbito da infecção pelo HIV-1 e nos diferentes regimes terapêuticos, principalmente naquelas terapias compostas por IP.

2

Objetivos

- Avaliar as atividades séricas da paraoxonase e arilestearase da enzima PON1 em soropositivos para o HIV-1 tratados com diferentes regimes de terapia antirretroviral (TARV).
- Determinar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos da PON1 192QR e PON1 55LM nos indivíduos soropositivos para o HIV-1.
- Avaliar a associação entre as atividades paraoxonase e arilestearase, com os polimorfismos descritos.
- Avaliar o impacto da TARV sobre as atividades da paraoxonase e arilestearase, e sobre o metabolismo lipídico de indivíduos infectados pelo HIV-1.
- Avaliar os níveis séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL nos indivíduos soropositivos para o HIV-1, tratados com diferentes regimes de TARV.

3

Pacientes, materiais e métodos

3. Pacientes, materiais e métodos

3.1 Comitê de ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq-HCFMUSP), com o protocolo de pesquisa número 1185/09, aprovado em 24 de março de 2010, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-HU-UFSC), com o protocolo de pesquisa número 289/09, e certificado número 274/09 de 31 de agosto de 2009 (Anexo A e B).

3.2 Casuística

O estudo foi realizado no período de Setembro de 2009 até Junho de 2012, e participaram deste estudo um total de cento e setenta e quatro (n = 174) voluntários comprovadamente soropositivos para o HIV-1, adultos, ambos os sexos, diagnosticados por dois métodos com princípios metodológicos distintos, e confirmados por imunofluorescência indireta (IFI) e Western Blot (WB), conforme recomendado pelo Ministério da Saúde (MS) e aceito pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

Após triagem clínica efetuada por médicos infectologistas, os indivíduos devidamente esclarecidos e que consentiram em participar do estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo C). Em seguida, eram encaminhados ao Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina (LAC-UFSC) para

realizarem a coleta de material biológico, sangue, com o objetivo de determinar os níveis basais dos parâmetros laboratoriais propostos. Ressalta-se, que o acompanhamento de todos os indivíduos soropositivos para o HIV-1, atendidos no HU-UFSC, é realizado em intervalos de 90 dias, e os indivíduos arrolados neste estudo não apresentavam sinais clínicos e/ou diagnóstico de infecções oportunistas.

Neste estudo, foram incluídos quarenta e seis (46) indivíduos comprovadamente soronegativos para o HIV-1, provenientes do Banco de Sangue do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (BS-HU/UFSC), que após serem esclarecidos do estudo assinaram o TCLE (Anexo C), e autorizaram a coleta de amostra biológica no momento em que realizavam a doação de sangue.

As características da população estudada, a classificação e divisão dos grupos, estão descritos nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Os protocolos de terapias antirretrovirais utilizados pelos indivíduos que participaram do estudo estão descritos na tabela 3, e os regimes terapêuticos utilizados em cada indivíduo estão descritos no anexo D.

3.3 Critérios de exclusão

Todos os indivíduos, soropositivos ou soronegativos para o HIV-1, que apresentassem diagnóstico de diabetes mellitus, hepatite, ou que estivessem fazendo uso de agentes hipoglicemiantes, anti-hipertensivos, antibióticos, anti-inflamatórios não esteroidais e esteroidais no período de 90 dias antecedentes ao dia da coleta de material biológico, foram excluídos do

estudo. A presença de infecções oportunistas foi outro fator de exclusão do estudo.

Tabela 1. Características gerais dos grupos estudados.

		HIV (+)		
Parâmetros	Soronegativos n = 46	sem TARV n = 45	ITRN+ITRNN n = 45	IP n = 84
Gênero . No., %				
Masculino	26 (56)	23 (51)	30 (66)	56 (66)
Feminino	20 (44)	22 (49)	15 (34)	28 (34)
Faixa etária, anos[1]	29 (19 - 58)	37 (20 - 68)	44 (22 - 74)	44 (18 - 69)
ÍMC[1, 2]	23 (20 - 29)	23 (17 - 33)	24 (18 - 32)	22 (17 - 36)
Etnia, No., %				
Branca	46 (100)	42 (94)	44 (98)	82 (98)
Negra	-	03 (6)	01 (2)	02 (2)
Fator de risco, No., %				
Sexo	-	32 (71)	29 (64)	49 (58)
Sangue/UDI[3]	-	9 (20)	12 (27)	24 (29)
Outros/desconhecido	-	4 (9)	4 (8)	11 (13)
Terapia antirretroviral, anos[1]	-	-	6,5 (1,4 - 21,5)	8,5 (1,5 - 21,5) 0,9 (0,2 - 9) [4]

[1]Mediana (Valor mínimo e valor máximo).
[2]Índice de massa corporal (IMC).
[3]Usuários de drogas injetáveis.
[4]Tempo de uso de inibidores de protease (IP).

Tabela 2. Classificação e divisão dos grupos estudados.

Grupo	Característica	n
Soronegativos	Indivíduos soronegativos para o HIV-1	46
Sem TARV	HIV (+) sem uso de terapia antirretroviral	45
ITRN+ITRNN	HIV (+) com TARV e sem inibidores de protease	45
IP	HIV (+) TARV com inibidores de protease	84

Nota: TARV=Terapia antirretroviral; ITRN=Inibidor da transcriptase reversa nucleosídico; ITRNN=Inibidor da transcriptase reversa não-nucleosídico; IP=Inibidor de protease.

Tabela 3. Protocolos de terapias antirretrovirais

Terapia Antirretroviral	
Protocolos	**No., %**
ABC+3TC+RTV+LPV	1
AZT+d4T	1 (2)
AZT+3TC	1 (2)
AZT+3TC+d4T	1 (2)
AZT+3TC+EFZ	30 (65)
AZT+3TC+NVP	8 (18)
AZT+3TC+ATV	4
AZT+3TC+RTV	14
AZT+3TC+RTV+ATV	12
AZT+3TC+RTV+LPV	43
3TC+TDF+EFZ	2 (9)
3TC+TDF+NVP	1 (2)
3TC+TDF+RAL	1
3TC+TDF+RTV+LPV	9
d4T+RTV+LPV	1

Nota: ABC=abacavir, AZR=zidovudina, d4T=estavudina, 3TC=lamivudina, EFV=efavirenz, NVP=nevirapina, RTV=ritonavir, ATV=atazanavir, LPV=lopinavir, TDF=tenofovir, RAL=raltegravir.

3.4 Coleta e fracionamento de amostras biológicas

As amostras biológicas (sangue) dos pacientes foram coletadas por punção anterocubital, pela manhã, após jejum de 12 a 14 horas, utilizando-se tubos com sistema a vácuo (Vacutainer®, Becton/Dickinson, NJ, USA). Um total de 6 tubos foram coletados de cada indivíduo, sendo: 01 tubo (10 mL) com heparina para isolamento de células mononucleares para avaliação da viabilidade celular e obtenção de plasma heparinizado; 3 tubos (4 mL) com anticoagulante EDTA para quantificação da RNA-HIV-1, linfócitos T-CD4+ e T-CD8+, hemograma, leucograma, isolamento de células da linhagem leucocitária (Buffy Coat) e obtenção de plasma-EDTA; 2 tubos (4mL) sem anticoagulante para obtenção de soro para dosagens bioquímicas e atividades enzimáticas.

As amostras de soro e plasma foram obtidas por centrifugação do sangue em centrífuga clínica Celm, modelo LS-II, a 2500 rpm (1050 x g), durante 10 minutos. Em seguida, eram novamente centrifugadas a 2500 rpm (1050 x g) por mais 10 minutos, para evitar a contaminação com hemácias e outras eventuais interferências nas determinações. Alíquotas de 200 µL foram transferidas para tubos criogênicos e em seguida armazenadas em freezer -70° C e/ou cilindro de nitrogênio líquido, -180° C.

3.5 Quantificação do RNA do HIV-1

As determinações foram realizadas utilizando-se sangue total, que foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos, para que fosse possível a separação do plasma. O plasma obtido da separação foi armazenado em

solução tampão de lise Tiocianato de guanidina para posterior determinação. A amostra armazenada é viável por 24 horas se armazenada a 20º C, por sete dias se armazenada a -8º C, e por tempo indeterminado se armazenada a -70º C ou –180° C. A quantificação das partículas virais foi realizada por metodologia Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA) através do teste NucliSens HIV-1 QT (Organon Teknika, Boxtel, NL). Esta é uma técnica de amplificação do RNA do HIV-1 presente na amostra. A quantidade do RNA amplificado é medida por eletroquimiluminescência (ECL). O método permite a detecção de RNA-HIV-1 acima de 50 cópias/mL (Tabela 4).

3.6 Quantificação dos linfócitos T-CD4+ e T-CD8+

As quantificações dos linfócitos T-CD4+ e T-CD8+ foram realizadas por citometria de fluxo, modelo FACS Calibur, com software BD Multi Set (Becton/Dickinson, NJ, USA). Amostras de sangue total foram colhidas em tubos contendo EDTA, sistema a vácuo (Vacutainer®, Becton/Dickinson, NJ, USA). A quantificação foi realizada com conjuntos reativos de anticorpos monoclonais CD4+:CD3+ e CD8+:CD3+ (Becton/Dickinson, NJ, USA) para os linfócitos T-CD3+, T-CD4+ e T-CD8+. A relação CD4+:CD8+ foi obtida pela divisão do número de linfócitos CD4+ pelo número de linfócitos CD8+. Para calibração do sistema utilizou-se os conjuntos FACSCount™ Control (Becton/Dickinson, NJ, USA) que contém os controles: zero, baixo, médio e alto. A tabela 4 descreve os valores de referência para as contagens de

linfócitos T CD4+, T CD8+, e de RNA-HIV-1, utilizados pelo Laboratório de Análises Clínicas do HU-UFSC.

Tabela 4. **Valores de referência para os parâmetros linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, e carga viral do HIV-1 (RNA-HIV-1).**

Grupo	Característica
Linfócitos T CD4+	410 a 1.590 células mm^3
Linfócitos T CD8+	190 a 1.140 células mm^3
Carga viral (RNA-HIV-1)	Indetectável: < 50 cópias/mL

3.7 Determinação dos níveis séricos de colesterol total, HDL, LDL e triglicérides

Os níveis séricos de colesterol total (CT) foram determinados por método enzimático (Dade Behring Inc., Newark, USA). Para determinação da lipoproteína de alta densidade (HDL), foi realizada a precipitação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e de muito baixa densidade (VLDL), em pH 5,7, pela adição do reativo fosfotúngstico tamponado (Dade Behring Inc., Newark, USA). A centrifugação do soro pré-tratado resulta em um sobrenadante límpido que contém a fração HDL. O HDL é determinado através do mesmo conjunto reagente utilizado para a determinação dos níveis séricos de colesterol total. Para obtenção dos níveis séricos de LDL utilizamos a fórmula de Friedewald (Friedewald, 1972). A tabela 5 descreve

os valores de referência para os parâmetros CT, HDL, LDL e TG, que foram utilizados neste estudo.

3.8 Determinações dos índices de risco aterogênico

As determinações dos índices de risco aterogênico foram realizadas a partir das relações CT:HDL e LDL:HDL (Castalli et al., 1983; Millan et al., 2009). A tabela 5 descreve os valores de referência.

3.9 Determinação dos níveis séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL

A determinação, indireta, dos níveis séricos de anticorpos IgG anti-LDL oxidada (oxLDL) foi realizada por método de imunoensaio (ELISA). A sensibilização da placa de ELISA com LDL oxidada foi realizada a partir de soro proveniente de indivíduos saudáveis que estavam em jejum de 12 horas. A fração LDL foi obtida por ultracentrifugação sequencial, usando um rotor 50Ti, 10º C, 100.000 x g. Inicialmente, o soro foi centrifugado por 12 horas para obtenção de VLDL (densidade = 1.063 g/mL). Em seguida, para obtenção da LDL, a densidade do infranadante foi ajustada para 1.063 pela adição de Kbr e centrifugada por 20 horas, 100000 x g (densidade menor que 1.063 g/mL). O sobrenadante de LDL foi retirado e dialisado em solução de fosfato de PBS (NaCl 0,9%, Na_2PO_4 0,2%, NaOH 0,38% e EDTA 0,01%, pH 7,4). Após este procedimento, a LDL foi filtrada com filtro de 0,20 micra. A oxidação da DL foi obtida conforme método descrito por Brandão et al.,

(2010) com 20µM de $CuSO_4$ por 18 horas a 37º C. Posteriormente, a oxidação foi bloqueada pela adição de EDTA 1mM.

A sensibilização da placa de ELISA com a LDL oxidada foi realizada por incubação por 18 horas a 4º C. Após este período, foram realizadas 3 lavagens com PBS e bloqueio com gelatina 1% por 2 horas. Em seguida, foram realizadas 3 novas lavagens da placa com PBS. Após este procedimento, as amostras diluídas de soro (1:400) foram adicionadas às placas e mantidas por 2 horas em temperatura ambiente. Um controle padrão de IgG anti-oxLDL oxidada foi utilizado. Prosseguiu-se novamente 3 lavagens com PBS-Tween (0,05%).

Na etapa seguinte foi adicionado o anticorpo para detecção da LDL oxidada (BD Biolabs, NJ, USA) e a placa incubada por mais 2 horas. Mais 3 lavagens com PBS-Tween (0,05%) foram realizadas, e em seguida adicionou-se a solução de revelação (BD Biolabs, NJ, USA). Após 30 minutos, foi realizada a leitura da reação em leitor de ELISA com comprimento de onda de 450nm. A densidade óptica foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{D.O. IgG anti-oxLDL} = \frac{\text{(D.O amostra - D.O branco)}}{\text{(D.O padrão – D.O branco)}}$$

Todas as amostras foram analisadas em triplicata, e a variação considerada aceitável não excedeu 5% entres os valores obtidos. Os títulos de anticorpos IgG anti-oxLDL foram expressos como índice de reatividade (IR).

3.10 Determinação dos níveis séricos de ApoA1 e ApoB100

As determinações de ApoA1 e ApoB100 foram realizadas por método turbidimétrico, com os reagentes Biotécnica® Apolipoproteína B e Biotécnica® Apolipoproteína A-1 Turbidimetria (Biotécnica, Varginha, Brasil). As dosagens foram realizadas em aparelho automatizado Cobas Mira Plus (Cobas Mira Plus®, Roche Diagnostics, Indiana, USA). A tabela 5 descreve os valores de referência para ApoA1 e ApoB100.

Tabela 5. **Valores de referência para os parâmetros CT, HDL, LDL, TG, índices de risco aterogênico CT:HDL e LDL:HDL, ApoA1 e ApoB100.**

Parâmetros	**Valor de referência, mg/dL**			
Colesterol total	Ideal	Limítrofe	Elevado	
	< 200	200 a 239	> 240	-
HDL	Ideal	Risco moderado	Risco elevado	
	> 40	35 a 40	< 35	-
LDL	Ideal	Risco moderado	Risco elevado	
	< 130	130 a 159	> 159	-
Triglicérides	Ideal	Limítrofe	Elevado	Alto risco
	< 190	200	200 a 499	> 500
CT:HDL	Ideal	Risco		
	Homem: até 4,9 Mulher: até 4,3	Homem: > 5 Mulher: > 4,4	-	-
LDL:HDL	Ideal	Risco		
	Homem: até 3,3 Mulher: até 2,9	Homem: > 3,3 Mulher: > 3	-	-
ApoA1	Ideal	Elevado		
	Homem: 107 a 214 Mulher: 90 a 170	Homem: > 214 Mulher: > 170	-	-
ApoB100	Ideal	Elevado		
	Homem: 51 a 171 Mulher: 56 a 162	Homem: > 171 Mulher: > 162	-	-

3.11 Determinação da atividade sérica da PON1

A atividade basal da PON1 sérica foi determinada conforme o método descrito por Senti et al. (2003) e Agachan et al. (2004), empregando-se como substrato o paraoxon (O,O dietil-O-paranitrofenil fosfato) (Sigma-Aldrich Chemical Inc., SL, USA). A hidrólise enzimática do paroxon libera *p-nitrofenol,* cuja taxa de formação foi determinada por espectrofotometria, é a forma mais comumente empregada para se medir a atividade da enzima PON1.

O ensaio foi realizado em duplicata para cada amostra avaliada. As amostras de soro foram descongeladas em temperatura ambiente, e 25 μL foram diluídas em 500 μL de tampão (Tris-HCl 0,1M pH 8,05, CaCl2 2 mmol/L e paraoxon 5,5 mmol/L). Em seguida, transferia-se 320 μL para uma microplaca de 96 poços com fundo chato. Após, procedia-se a leitura das absorbâncias a cada minuto, durante 10 minutos, em leitor de microplacas (Microplate Reader, Benchmark, Bio-RAD, Hercules, CA, USA), com comprimento de onda de 405 nm, à 37º C.

O resultado foi expresso em U/L (1 U/L é definida como 1μmol de *p-nitrofenol* formada por minuto por litro de soro), empregando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do p-nitrofenol (18,05 x 10^3). As equações abaixo demonstram os cálculos do fator e da atividade da PON1 sérica.

Cálculo do Fator:

$$FATOR = \frac{VTR(mL)}{\varepsilon_{405} \times VA(mL) \times E(cm)}$$

ε_{405} = 18050 L M^{-1} cm^{-1}

VTR (volume total da reação) = 500 µL solução + 25 µL da amostra = 525 µL

VA (volume da amostra) = 25 µL

E (espessura da cubeta) = 1 cm

Substituindo os valores e ajustando para as unidades internacionais temos:

Fator = 1163,43 nMol mL^{-1}

Cálculo da Atividade:

Atividade da PON1 = Fator x Δabs/min = 1163,43 x Δabs nMol min-1 mL-1, onde Δabs é igual a média da variação das absorbâncias medidas a cada 1 minuto.

3.12 Determinação da atividade sérica da ARE

A atividade basal da ARE sérica foi determinada conforme métodos de Lorentz et al. (1979), e modificado por Oliveira-Silva et al. (1998). A técnica consiste no preparo de um tampão de reação com 100 mL de Tris-CaCl2 e 13 µL de fenilacetato 99% (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, EUA). Uma alíquota de 5 µL de soro é diluída para 1:3 com tampão Tris-CaCl2 e adicionada em 3000 µL de tampão de reação contendo fenilacetato para dar início à reação enzimática, A atividade foi medida cineticamente por 5

minutos em λ:270nm, em intervalos de 30 segundos, com espectrofotômetro DU®-70 UV-vis Spectrophotometer (Beckman Coulter Inc., CA, USA)

CÁLCULO DA ATIVIDADE ARE

Atividade Arilestearase = Fator x Δ Abs/min x diluição

Fator = Vtr (ml) / ε 270 x Va (ml) x E (cm)

Vtr = volume total da reação (3ml)
Va = volume da amostra (0,005ml)
E = caminho óptico (1cm)
ε 270 do fenol = Coeficiente de absorção molar (1,310)

3.13 Extração de DNA genômico de células do sangue periférico

As amostras de sangue coletadas a vácuo, em tubo contendo anticoagulante EDTA (Vacutainer®, Becton/Dickinson, NJ, USA), foram processadas conforme descrito por Miller et al. (1998). Neste método, há remoção de proteínas celulares pela desidratação e precipitação com solução saturada de NaCl. A separação dos leucócitos e purificação do DNA genômico, foram realizadas em duplicata para cada amostra coletada. Uma alíquota de 1mL de sangue foi diluído com 1 mL de tampão de lise Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, sacarose 34 mM, MgCl2 10 mM, Triton X-100 1%, com obtenção do sedimento de leucócitos após centrifugação a 1.700 x g por 10 minutos, em temperatura de 4º C. Os leucócitos foram novamente

resuspendidos em tampão de lise e centrifugados por 5 minutos a 960 x g em temperatura ambiente. Após remoção do sobrenadante, o sedimento foi resuspendido em 750 μL de tampão TEN (Tris-HCl 10 mM, pH 8,2, EDTA 2 mM, NaCl 400 mM), mais 100 μL de SDS 10% e 125 μL de proteinase K 2mg/ml, com homogeneização e incubação da mistura por 1 hora a 56º C, visando a completa digestão das células lisadas. Em seguida, adicionava-se 250 μL de NaCl saturado, e agitação vigorosa por 15 segundos, e posterior sedimentação das proteínas através da centrifugação por 10 minutos a 960 x g. Por precipitação, o DNA era recuperado do sobrenadante, adicionando-se dois volumes de etanol absoluto e centrifugando-se por 5 minutos a 960 x g. Após, o DNA era lavado com etanol 70% a fim de remover o excesso de sal, submetido à secagem por 10 minutos em centrífuga a vácuo modelo Speed Vac AES1010 (Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA) e reidratado em TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM).

3.14 Quantificação de DNA genômico

A integridade do DNA genômico obtido a partir de leucócitos de sangue periférico foi avaliada em gel de agarose 1%. O gel empregado com 5 mm de espessura e medindo 7 x 15 cm, continha brometo de etídeo (0.5 μg/mL), o qual, durante a eletroforese, intercala-se entre os nucleotídeos formando um complexo fluorescente mediante exposição à luz ultravioleta. O tampão utilizado foi TAE (Tris 40 mM, Acetato de sódio 5 mM e EDTA 1 mM) e a voltagem, constante, de 75V por 40 minutos.

Junto às amostras, foram aplicadas também seis amostras de DNA de fago λ (clind 1ts 857 SAM 7) íntegro (48.502 pb), de concentrações conhecidas: 200 ng/ 5µL; 100 ng/ 5µL; 50 ng/ 5µL; 25 ng/ 5µL;12,5 ng/ 5µL e 6,25 ng/ 5µL, e, por comparação, foi possível estimar a concentração do DNA genômico. A verificação do tamanho do DNA, assim como sua integridade, foi feita pela comparação entre as migrações das amostras e dos fragmentos do λDNA digerido com Hind III (os quais variam entre 23.130 pb e 564 pb). A obtenção de DNA genômico íntegro obtido a partir de buffy coat de amostras de sangue total está apresentada na figura 1.

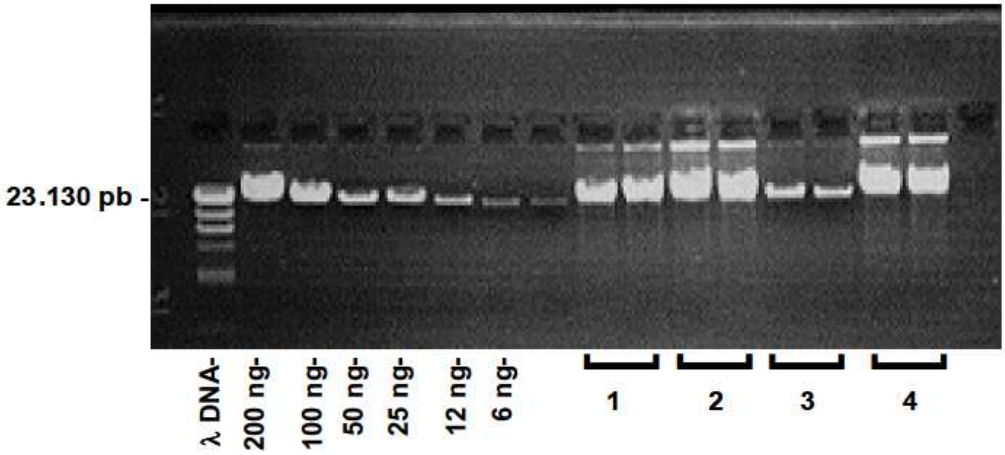

Figura 1. **Amostras de DNA genômico extraído de buffy coat obtido a partir de amostras de sangue total. DNA genômico separado em gel de agarose 1%. λ DNA: λ DNA digerido com Hind III(2 µg); 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12 ng e 6 ng: quantidades conhecidas de λ DNA em 5 µL. Amostras 1, 2, 3 e 4 obtidas em duplicatas.**

3.15 Genotipagem: Polimorfismos 192QR e 55LM do *gene* da enzima PON1 (PCR multiplex)

A genotipagem foi realizada a partir da amplificação de fragmentos específicos para cada região pesquisada, os quais foram posteriormente digeridos por enzimas de restrição adequadas, de modo a permitir diferenciarem-se os possíveis genótipos para cada polimorfismo estudado (análise do polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição - RFLP).

Realizou-se a análise destes polimorfismos, conforme descrito por Motti et al. (2001). A PCR, multiplex, utiliza iniciadores (primers) desenhados de modo a introduzir um sítio de reconhecimento para Hinf I em um alelo de cada produto da PCR. Esta estratégia permitiu a identificação simultânea dos dois polimorfismos da PON1 em um único ensaio de amplificação, seguido de uma única análise de restrição.

Os produtos amplificados possuíam 111 pb para o polimorfismo PON1 192, e 144 pb para o polimorfismo PON1 55. Após a digestão com Hinf I, o fragmento de 111 pb gerou os fragmentos de 77 e 34 pb no caso do alelo R, enquanto o fragmento de 144 pb apresentou os fragmentos de 122 e 22 pb no caso do alelo L.

As seqüências de primers (Motti et al., 2001) utilizadas foram:

PON1 55F (5’→3’): GAG TGA TGT ATA GCC CCA GTT TC;

PON1 55R (5’→3’): AGT CCA TTA GGC AGT ATC TCCg;

PON1 192F (5’→3’): TTG AAT GAT ATT GTT GCT GTG GGA CCT GAG;

PON1 192R (5’→3’): CGA CCA CGC TAA ACC CAA ATA CAT CTC CCA GaA;

As amostras de DNA genômico de cada indivíduo foram submetidas à PCR em uma reação feita em volume de amplificação de 25 μl contendo

Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH=8,3; 0,8 μg/μL final de albumina; MgCl2 7 mM; 600 μM de cada nucleotídeo trifosfato; 0,16 μM de cada primer PON1 192 e de cada primer PON1 55; 1 U de Taq polimerase e 1 μg de DNA genômico.

A amplificação envolveu uma desnaturação inicial das amostras a 95º C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94º C por 1 minuto para desnaturação, 61º C por 45 segundos para anelamento, e 72º C por 45 segundos de extensão. O termociclador empregado foi um Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research Inc., MA, USA).

Os produtos da PCR foram então digeridos por 3 horas a 37º C com 2 U de enzima Hinf I, preparada em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 60 mM, MgCl2 10 mM, β-ME 1mM. Após a digestão, foram diluídos 1:5 em tampão contendo 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol e glicerol 30%.

Foram a seguir analisados por separação em gel de acrilamida a 6% contendo uréia 8M em tampão TBE 0,5x, aplicando-se 5μl de cada amostra nos poços do gel de acrilamida. Também foram incluídos, no gel, 5μl de marcador de peso molecular de 50 pb e amostras de DNA genômico, obtidos a partir de sangue total representando os possíveis genótipos dos polimorfismos PON1 192 e PON1 55, como controles. A separação foi realizada empregando-se uma corrida de 60 minutos a 60 W constantes. Foi utilizado um sistema de sequenciamento modelo S2 (GIBCO Life technology, NY, USA). A posterior observação das bandas foi obtida pela coloração com nitrato de prata 0,1% (Bassam et al., 1991), obedecendo-se o seguinte

protocolo: ácido acético 10% durante 20 minutos; 3 lavagens com água deionizada durante 2 minutos cada uma; nitrato de prata 0,1% mais formaldeído 0,1% durante 30 minutos; lavagem com água deionizada durante 10 segundos; carbonato de sódio 3% mais formaldeído 0,1% durante 5 minutos; ácido acético 10% durante 5 minutos; lavagem com água deionizada durante 5 minutos. A figura 2 demonstra os possíveis perfis eletroforéticos de produtos amplificados empregando-se a PCR multiplex, e a figura 3 a amplificação por PCR multiplex das alterações PON1 192QR e PON1 55LM,

.

Polimorfismo PON1 55: Fragmento amplificado (144 pb) digerido com Hinf I			
Genótipo	L/L	L/M	M/M
	↓	↓	↓
Fragmento 144 pb	Não	Sim	Sim
Fragmento 122 pb	Sim	Sim	Não
Fragmento 22 pb	Sim	Sim	Não
Polimorfismo PON1 192: Fragmento amplificado (111 pb) digerido com Hinf I			
Genótipo	Q/Q	Q/R	R/R
	↓	↓	↓
Fragmento 111 pb	Sim	Sim	Não
Fragmento 77 pb	Não	Sim	Sim
Fragmento 34 pb	Não	Sim	Sim

Figura 2. Esquema dos perfis eletroforéticos possíveis para produtos amplificados na detecção dos polimorfismos PON1 55LM e PON1 192QR (multiplex).

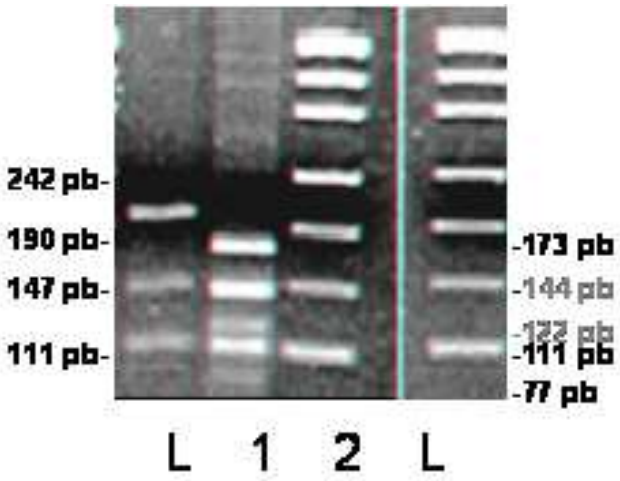

Figura 3. Pesquisa das mutações da PON1 55 e PON1 192, onde **L** é marcador de peso molecular de 100 pb. O marcador **1** caracteriza uma amostra amplificada por PCR e não digerida, onde se observa as bandas de 192 pb (PON1 192) e 144 pb (PON1 55). O marcador 2 apresenta a análise dos fragmentos após digestão com Hinf I, onde visualizam-se as bandas com 111 e 77 os (PON1 192QR), e de 144 e 122 pb (PON1 55LM).

4

Análise estatística

4. Análise estatística

Para todas as variáveis estudadas, os resultados foram expressos através de média aritmética e desvio padrão (m ± p) e mediana, expressa em valor máximo, valor mínimo, e interquartil range.

A análise comparativa entre o grupo de soronegativos, ITRN+ITRNN e IP foi realizada por teste *t-student* para comparação de médias de amostras independentes. A análise comparativa de todos os parâmetros entre todos os grupos estudados, foram realizada pela análise de variância univariada de múltiplas comparações das médias entre amostras independentes (ANOVA), seguido do teste de Tukey HSD (Honestly Significant Difference), LSD e Tamhane.

As análises das frequências dos alelos e genótipos da PON1 192QR e PON1 55 foram realizadas por teste Qui-quadrado e teste exato de Fisher.

As análises de correlação foram realizadas por teste de Spearman e/ou teste de Pearlson.

Para todos os valores obtidos neste estudo, foram utilizados níveis de significância de 95% ($p < 0,05$) e 99,9% ($p < 0,001$) de intervalo de confiança (IC). Todas as análises descritivas e estatísticas foram realizadas com programa, software, Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 11.5® e SAS 8®e, e os gráficos construídos a partir do programa GraphPad Prism versão 5.0.

5
Resultados

5.1 Marcadores da infecção: níveis plasmáticos de RNA do HIV-1, número de linfócitos T-CD4+ e T-CD8+

Os níveis plasmáticos de RNA do HIV-1 (cópias/mL), carga viral, dos grupos que fizeram uso de IP (n = 84) e ITRN+ITRNN (n = 45), apresentaram médias e medianas abaixo de < 50 cópias/mL, o que é considerado como indeterminado. O grupo sem TARV (n = 45) apresentou uma média de 36.167 ± 77.386 cópias/mL e uma mediana de 14.808 cópias/mL (50 – 500.000 cópias/mL). Estes resultados caracterizaram que o grupo sem TARV, apresentou diferenças significativas em relação aos grupos ITRN+ITRNN e IP, $p < 0,001$ (Tabela 6).

Quanto ao número de Linfócitos T-CD4+ (células/mm^3), os grupos de soropositivos não apresentaram diferenças significativas quando comparados, $p > 0,05$, e apresentaram médias e medianas consideradas dentro dos valores de referência, 410 a 1.590 células/mm^3 (Tabela 6).

O número de linfócitos T-CD8+ (células/mm^3) nos grupos tratados com ITRN+ITRNN e IP, e no grupo de soronegativos, apresentaram valores de médias e medianas que não caracterizaram diferenças significativas quando comparadas, $p > 0,05$, e consideradas dentro dos valores de referência, 190 a 1.140 células/mm^3 (Tabela 6).

Os valores das médias e medianas da relação CD4+:CD8+ nos grupos avaliados, não apresentaram diferenças significativas quando comparados, $p > 0,05$ (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de média ± desvio padrão (m ± dp) e mediana (valor mínimo e valor máximo) dos marcadores de infecção para o HIV-1 nos grupos estudados: RNA-HIV-1 (cópias/mL), linfócitos T-CD4+ (células/mm^3) e T-CD8+ (células/mm^3).

	Grupos			
Parâmetros	**sem TARV (n = 45)**	**ITRN + ITRNN (n = 45)**	**IP (n = 84)**	**p[(1)]**
RNA-HIV-1				
Média	36.167 ± 77.386	50 ± 00	50 ± 00	
Mediana	14.808 (50 - 500.000)	50 (50 - 50)	50 (50 - 50)	p < 0,05
T-CD4+				
Média	416 ± 196	526 ± 265	445 ± 267	p > 0,05
Mediana	420 (20 - 970)	440 (140 - 1.461)	394 (55 - 1.079)	
T-CD8+				
Média	1.089 ± 619	939 ± 383	977 ± 429	p > 0,05
Mediana	928 (144 - 3.346)	884 (361 - 1.834)	937 (182 - 2.084)	
CD4+:CD8+				
Média	0,49 ± 0,36	0,62 ± 0,35	0,51 ± 0,33	p > 0,05
Mediana	0,40 (0,10 - 2,17)	0,53 (0,18 - 2,26)	0,44 (0,10 - 1,79)	

[(1)]Teste ANOVA seguido de teste de Tukey HSD (Honestly Significant Difference), LSD e Tamhane, com índice de significância mínimo de p < 0,05.

5.2 Perfil lipídico: níveis séricos de colesterol total, frações de colesterol e triglicérides

No estudo foram avaliados os níveis séricos de colesterol total (CT) e suas frações lipídicas: lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicérides (TG).

Os resultados obtidos não caracterizam diferenças significativas para os níveis séricos de CT nos grupos estudados, p > 0,05 (Figura 4A).

No grupo que fazia uso de IP, a média de CT foi de 200 ± 43 mg/dL e a mediana de 198 mg/dL (125 – 334 mg/dL). Um total de 41 (48%) indivíduos apresentaram níveis séricos dentro do limite desejável, inferiores a 200 mg/dL, e 29 (34,5%) indivíduos apresentavam níveis acima do ideal, 200 até 239 mg/dL. Por sua vez, 14 (17,5%) indivíduos apresentaram níveis séricos elevados de CT, acima de 240 mg/dL (Figura 4A).

No grupo tratado com ITRN+ITRNN, a média de CT foi de 196 ± 42 mg/dL e a mediana 189 mg/dL (130 – 332 mg/dL). Neste grupo, 28 (62%) indivíduos apresentaram níveis séricos de CT inferiores a 200 mg/dL, 10 (22,5%) indivíduos apresentaram valores acima do ideal, e 7 (15,5%), apresentaram valores acima de 240 mg/dL (Figura 4A).

No grupo sem TARV, a média de CT foi de 171 ± 39 mg/dL, com uma mediana de 172 mg/dL (66 – 269 mg/dL). No grupo, 35 (77,7%) indivíduos apresentaram níveis séricos de CT inferiores a 200 mg/dL, 8 (17,7%) indivíduos apresentaram valores acima do ideal, e 2 (4,65) indivíduos apresentaram valores acima de 240 mg/dL (Figura 4A).

No grupo de soronegativos, a média de CT foi de 178 ± 33 mg/dL e a mediana de 180 mg/dL (107 – 272 mg/dL). Em 35 (78%) indivíduos os níveis séricos de CT se apresentaram com valores abaixo de 200 mg/dL, enquanto 8 (18%) indivíduos apresentaram níveis séricos entre 200 até 240 mg/dL, e 2 (4%), apresentaram níveis considerados elevados, 240 mg/dL) (Figura 4A).

Os níveis séricos de HDL foram significativamente inferiores no grupo tratado com IP, na comparação com o grupo de soronegativos, $p < 0,05$, porém, não apresentou diferenças significativas em relação aos grupos ITRN+ITRNN e sem TARV, $p > 0,05$ (Figura 4B).

Os níveis séricos de HDL no grupo IP apresentaram uma média 40 ± 12 mg/dL e uma mediana de 39 mg/dL (21 – 86 mg/dL). Neste grupo, 40 (48%) indivíduos apresentaram níveis séricos acima de 40 mg/dL, o que é considerado ideal, e 44 (52%) apresentaram níveis séricos de HDL abaixo de 40 mg/dL (Figura 4B).

No grupo tratado com ITRN+ITRNN, a média de HDL foi de 45 ± 12 mg/dL e a mediana 44 mg/dL (27 – 85 mg/dL). Um total de 29 (64,5%) indivíduos apresentaram valores superiores a 40 mg/dL, e 16 (35,5%) valores inferiores a 40 mg/dL (Figura 4B).

Naqueles indivíduos sem TARV, a média de HDL foi de 45 ± 13 mg/dL e a mediana 41 mg/dL (23 – 77 mg/dL). Um total de 24 (53%) indivíduos apresentaram valores de HDL superiores a 40 mg/dL, e 21 (47%) apresentaram valores inferiores a 40 mg/dL (Figura 4B).

No grupo de soronegativos, a média dos níveis séricos de HDL foi de 53 ± 9 mg/dL e a mediana 54 mg/dL (40 – 85 mg/dL). Neste grupo, os 46 (100%) indivíduos soronegativos apresentaram valores de HDL considerados ideais, superiores a 40 mg/dL (Figura 4B).

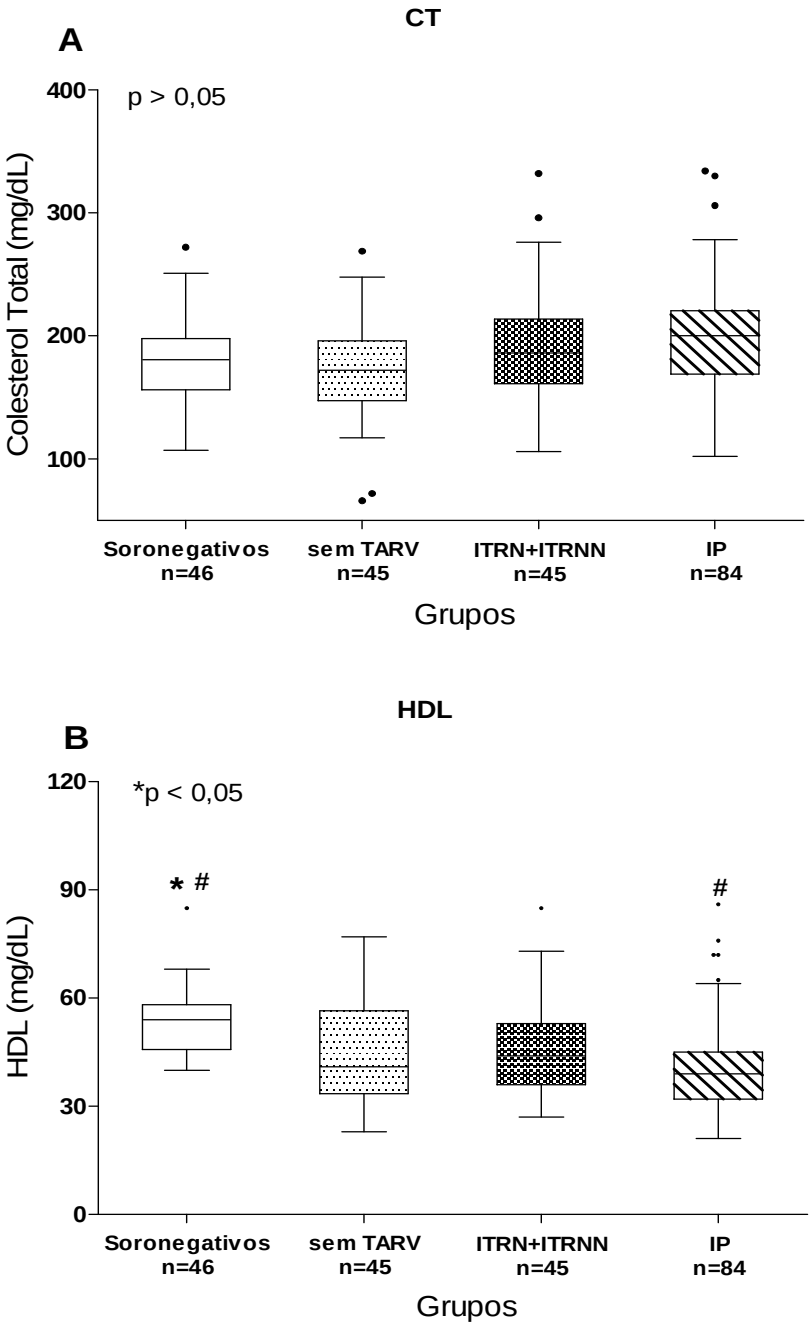

Figura 4. O gráfico (A) representa os níveis séricos de CT (mg/dL), e em (B), os níveis séricos de HDL (mg/dL) nos grupos sem TARV, e tratados com ITRN+ITRNN e IP. O (#) caracteriza a diferença significativa entre o grupo de soronegativos em relação ao grupo IP, *p < 0,05. Os valores apresentados são da mediana (valor máximo, valor mínimo, e interquartil superior e inferior). Existem diferenças significativas entre os grupos para p < 0,05. Análise estatística realizada por ANOVA, seguida do teste de Tukey HSD, LSD e Tamhane.

Em todos os grupos estudados os níveis séricos de LDL não apresentaram diferenças significativas, $p > 0,05$, e apresentaram valores de média e mediana considerados satisfatórios, 100 a 129 mg/dL (Figura 5A).

Os níveis séricos de LDL do grupo IP apresentaram uma média de 120 ± 30 mg/dL e uma mediana de 118 mg/dL (32 – 209 mg/dL). Um total de 66 (79%) indivíduos apresentaram valores de LDL acima do limite desejável de 100 mg/dL, e 18 (21%) indivíduos apresentaram valores inferiores a 100 mg/dL (Figura 5A).

No grupo que fazia uso de ITRN+ITRNN, a média de LDL foi de 112 ± 25 mg/dL e a mediana 109 mg/dL (66 – 202 mg/dL). Neste grupo, 15 (33%) indivíduos apresentaram valores de LDL abaixo de 100 mg/dL, e 30 (67%) apresentaram valores acima de 100 mg/dL (Figura 5A).

O grupo sem TARV apresentou uma média de LDL de 112 ± 44 mg/dL e uma mediana de 103 mg/dL (23 – 253 mg/dL). Neste grupo, um total de 26 (58%) indivíduos apresentaram valores de LDL superiores a 100 mg/dL, e 19 (42%), valores inferiores a 100 mg/dL (Figura 5A).

No grupo de soronegativos a média de LDL foi de 108 ± 30 mg/dL e a mediana 104 mg/dL (54 – 181 mg/dL). Neste, 28 (61%) indivíduos apresentaram valores de LDL superiores a 100 mg/dL, e 18 (39%), inferiores a 100 mg/dL (Figura 5A).

Quanto aos níveis séricos de TG, os grupos de soropositivos que receberam TARV, apresentaram médias e medianas significativamente superiores aos níveis séricos de TG do grupo sem TARV e de soronegativos, $p < 0,05$ (Figura 5B).

Os níveis séricos de TG no grupo tratado com IP apresentaram uma média de 237 ± 207 mg/dL e uma mediana de 177 mg/dL (66 – 1.337 mg/dL). Neste grupo, 54 (64%) indivíduos apresentaram níveis séricos de TG acima do limite ideal, com valores acima de 190 mg/dL, e 46 (36%) apresentaram valores de TG inferiores a 190 mg/dL (Figura 5B).

O grupo tratado com ITRN+ITRNN apresentou uma média para TG de 229 ± 266 mg/dL e uma mediana de 146 mg/dL (53 – 1499 mg/dL). Neste, 28 (62%) indivíduos apresentaram valores inferiores a 190 mg/dL, e 17 (38%) indivíduos apresentaram valores superiores a 190 mg/dL (Figura 5B).

No grupo sem TARV a média sérica de TG foi de 117 ± 60 mg/dL e a mediana 101 mg/dL (48 – 327 mg/dL). Somente 4 (9%) indivíduos apresentaram níveis séricos superiores a 190 mg/dL, e 41 (91%) níveis séricos inferiores a este valor (Figura 5B).

No grupo de soronegativos os níveis séricos de TG apresentaram uma média de 98 ± 48 mg/dL e uma mediana de 83 mg/dL (48 – 237 mg/dL). Neste grupo, 4 (9%) indivíduos apresentaram médias superiores a 190 mg/dL, e 42 (91%) níveis séricos inferiores a 190 mg/dL (Figura 5B).

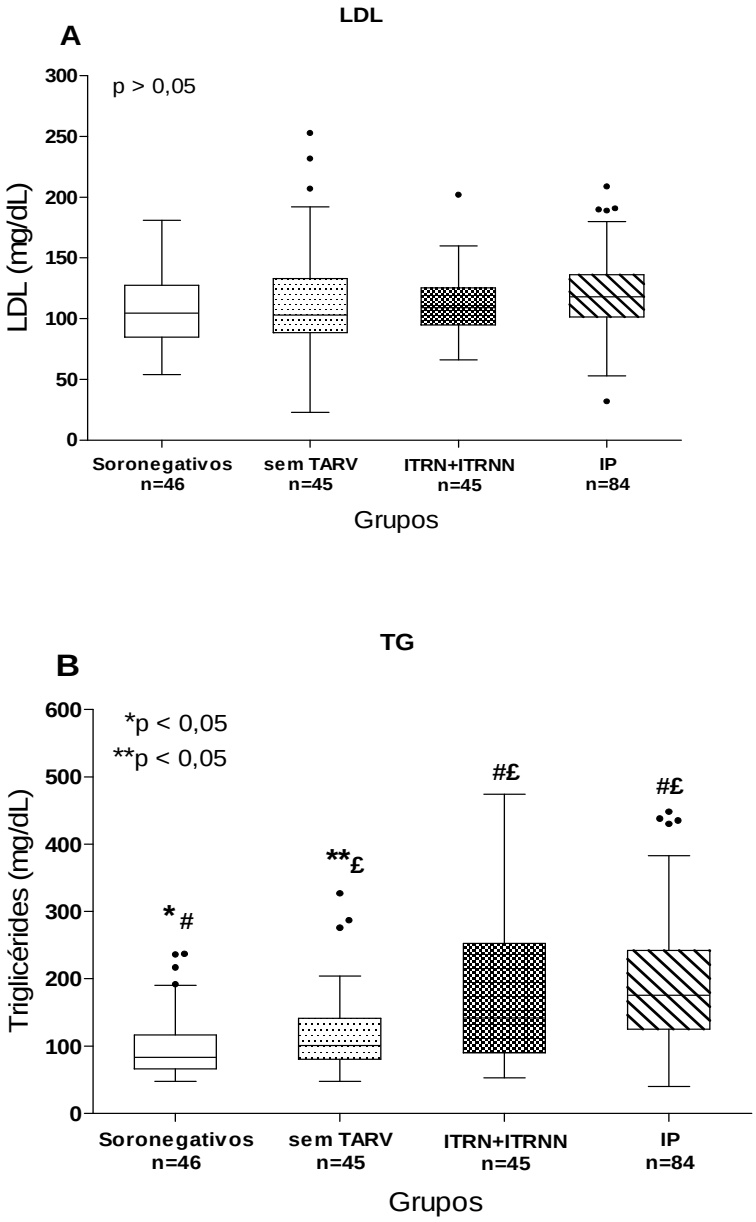

Figura 5. O gráfico (A) representa os níveis séricos de LDL (mg/dL), e em (B) os níveis séricos dos TG (mg/dL) nos grupos sem TARV, e tratados com ITRN+ITRNN e IP. Em (B), o (#) caracteriza as diferenças significativas entre o grupo de soronegativos em relação aos grupos ITRN+ITRNN e IP, *p < 0,05. O (£), as diferenças significativas entre o grupo sem TARV em relação aos grupos ITRN+ITRNN e IP, **p < 0,05. Os valores apresentados são da mediana (valor máximo, valor mínimo, e interquartil superior e inferior). Existem diferenças significativas entre os grupos para p < 0,05. Análise estatística realizada por ANOVA, seguida do teste de Tukey HSD, LSD e Tamhane.

5.2.1 Índices de risco aterogênico: relação CT:HDL e LDL:HDL

As relações CT:HDL e LDL:HDL são parâmetros conhecidos como índices de Castelli I e II, respectivamente, ou índices de risco aterogênicos e caracterizam um parâmetro para avaliar o risco aterogênico nos indivíduos estudados.

Quando avaliado a relação CT:HDL, que caracteriza o risco aterogênico nos indivíduos dos grupos estudados, todos os grupos apresentaram valores superiores ao grupo de soronegativos (Figura 6A).

O grupo com IP apresentou uma média de 4,7 ± 1,3 e uma mediana de 5,0 (2,0 – 8,0). Os demais grupos apresentaram uma relação de 4,0 ± 1,4 no grupo ITRN+ITRNN, 3,5 ± 1,1 no grupo sem TARV, e 3,0 ± 0,9 no grupo de soronegativos. Os valores da mediana nestes grupos foram de: 4,0 (2,0 – 8,0), 4,0 (1,0 – 6,0), e 3,0 (2,0 – 5,0), respectivamente.

Entretanto, o grupo de indivíduos tratados com IP foi o único que apresentou valores significativamente superiores aos demais grupos estudados, $p < 0,05$ (Figura 6A).

Na avaliação da relação LDL:HDL, o grupo tratado com IP apresentou valores significativamente superiores aos demais grupos, $p < 0,05$. Os demais grupos de soropositivos, sem TARV e tratados com ITRN+ITRNN, apresentaram valores superiores aos do grupo de soronegativos, porém, não caracterizaram diferenças significativas, $p > 0,05$ (Figura 6B).

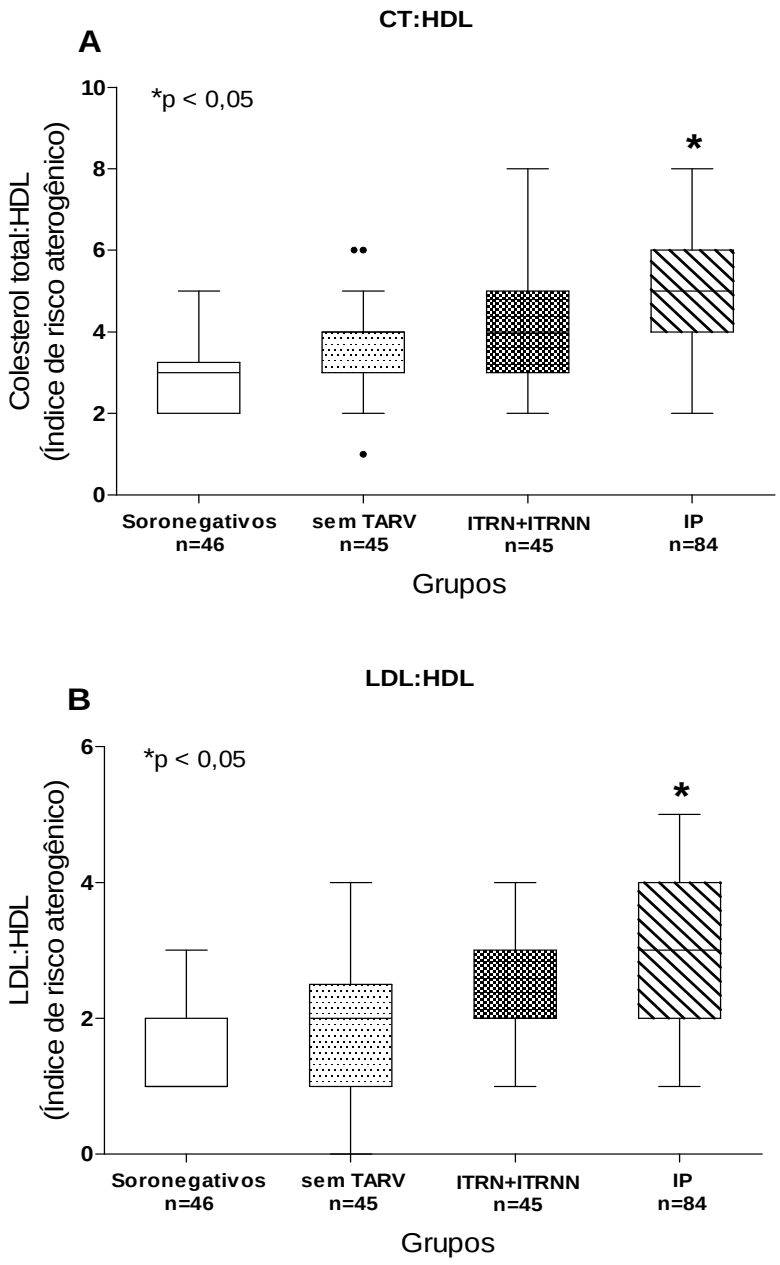

Figura 6. O gráfico (A) representa a relação CT:HDL, e em (B), a relação entre LDL:HDL nos grupos sem TARV, e tratados com ITRN+ITRNN e IP. O (*) caracteriza as diferenças significativas entre o grupo IP em relação aos demais grupos, *p < 0,05. Os valores apresentados são da mediana (valor máximo, valor mínimo, e interquartil superior e inferior). Existem diferenças significativas entre os grupos para p < 0,05. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Tukey HSD, LSD e Tamhane.

No grupo tratado com IP, a relação LDL:HDL apresentou uma média de 2,7 ± 1,0 e uma mediana de 3,0 (1,0 – 5,0), enquanto que o grupo tratado com ITRN+ITRNN apresentou uma média de 2,1 ± 0,7 e uma mediana de 2,0 (1,0 – 4,0) (Figura 6B).

Nos grupos sem TARV e de soronegativos, as relações apresentaram as médias 2,0 ± 0,9 e 1,6 ± 0,7, respectivamente, e suas medianas foram de 2,0 (0,1 – 4,0) e 1,0 (1,0 – 3,0), respectivamente (Figura 6B).

5.2.2 Correlação entre os parâmetros lipídicos e os marcadores da infecção

No grupo sem TARV, a análise de correlação (Teste de Spearman) entre os parâmetros lipídicos e os marcadores da infecção, não demonstrou correlação significativa para os parâmetros avaliados. No grupo tratado com ITRN+ITRNN, foi observada uma correlação negativa significativa entre os níveis séricos de HDL e o número de linfócitos T-CD8+ ($r = -0,309$; $p = 0,038$). Os demais parâmetros não apresentaram correlação significativa (Tabela 7).

5.2.3 Níveis séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL

O estudo mostrou que no grupo de soropositivos tratados com IP, e no grupo sem TARV, os níveis séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL foram significativamente superiores na comparação com o grupo de soronegativos, $p < 0,05$. O grupo tratado com IP apresentou uma média significativamente

superior ao grupo tratado com ITRN+ITRNN, mas não em relação à média do grupo sem TARV, p > 0,05 (Figura 7).

No grupo que recebeu IP, a média dos níveis séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL, expresso como índice de reatividade (IR), foi de 0,33 ± 0,09, e a mediana 0,329 (0,027 – 0,591). O grupo tratado com ITRN+ITRNN apresentou uma média de 0,269 ± 0,09 e uma mediana de 0,255 (0,131 – 0,630). Para os grupos sem TARV e de soronegativos, as médias foram 0,341 ± 0,09 e 0,186 ± 0,08, respectivamente, e as medianas, 0,338 (0,130 – 0,737) e 0,188 (0,040 – 0,380) (Figura 7).

Tabela 7. Correlação entre os parâmetros lipídicos e os marcadores da infecção pelo HIV-1[1,2].

		Marcadores da infecção		
Grupo	**Lipídios**	**RNA-HIV-1**	**T-CD4+**	**T-CD8+**
sem TARV	CT	r=0,039; p=0,796	r=0,283; p=0,059	r=0,206; p=0,174
	LDL	r=0,108; p=0,476	r=0,228; p=0,132	r=0,290; p=0,053
	HDL	r=-0,166; p=0,273	r=0,162; p=0,286	r=-0,135; p=0,376
	TG	r=-0,037; p=0,018	r=-0,124;p=0,416	r=-0,169; p=0,265
ITRN+ ITRNN	CT	-	r=0,140; p=0,356	r=-0,006; p=0,968
	LDL	-	r=0,107; p=0,481	r=-0,033; p=0,825
	HDL	-	r=-0,121; p=0,428	**r=-0,309; p=0,038***
	TG	-	r=0,065; p=0,667	r=0,086; p=0,571
IP	CT	-	r=0,133; p=0,227	r=-0,072; p=0,509
	LDL	-	r=-0,188; p=0,085	r=-0,047; p=0,669
	HDL	-	r=0,084; p=0,447	r=0,051; p=0,640
	TG	-	r=-0,106; p=0,334	r=-0,015; p=0,890

Nota: CT=colesterol total; LDL=lipoproteína de baixa densidade; HDL=lipoproteína de alta densidade, e TG=triglicérides.
(1) Os valores indetermiandos de RNA-HIV-1, <50 cópias/mL, nos grupos ITRN+ITRNN e IP, não permitem a realização de testes de correlação.
(2)Teste de correlação de Spearman.

Adicionalmente, a análise de correlação (Teste de Spearman) em todos os grupos não apresentou resultados significativos quando comparados os níveis séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL com os parâmetros lipídicos e os marcadores da infecção pelo HIV-1 (Figura 7).

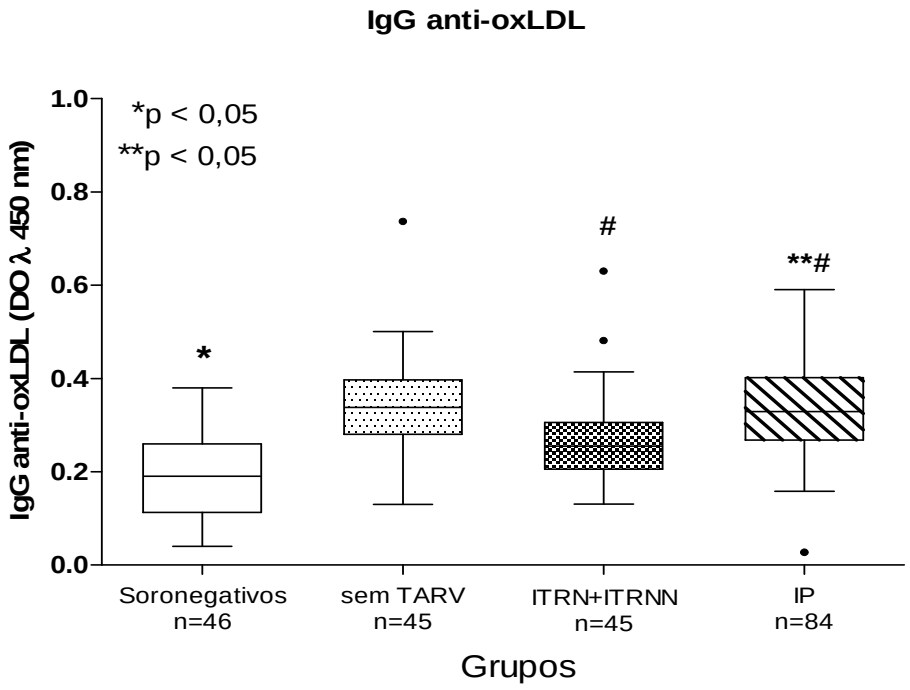

Figura 7. O gráfico representa os níveis séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL nos grupos sem TARV, e tratados com ITRN+ITRNN e IP. O (*) caracteriza as diferenças significativas entre o grupo de soronegativos em relação aos grupos sem TARV e IP, *p < 0,05. O (**) caracteriza a diferença significativa entre o grupo IP e o grupo ITRN+ITRNN, **p < 0,05. Os valores apresentados são da mediana (valor máximo, valor mínimo, e interquartil superior e inferior). Existem diferenças significativas entre os grupos para p < 0,05. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Tukey HSD, LSD e Tamhane.

5.3 Apolipoproteínas A1 e B100

A análise dos resultados mostrou que os níveis séricos da ApoA1 foram significativamente inferiores no grupo tratado com IP, na comparação com o grupo tratado com ITRN+ITRNN e de soronegativos, $p < 0,05$. Todavia, o grupo IP não apresentou uma diferença significativa em relação ao grupo sem TARV, $p > 0,05$. Os grupos sem TARV e tratados com ITRN+ITRNN não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo de soronegativos, $p > 0,05$ (Figura 8A).

O grupo tratado com IP apresentou uma média para a ApoA1 de 116 ± 26 mg/dL e uma mediana de 98 mg/dL (70 – 183 mg/dL). Quatro indivíduos (5%), três homens e uma mulher, apresentaram níveis séricos de ApoA1 inferiores aos valores de referência, 90 a 170 mg/dl para mulheres, e 107 a 214 mg/dL para homens (Figura 8A).

No grupo tratado com ITRN+ITRNN a média dos níveis séricos de ApoA1 foi de 134 ± 34 mg/dL, com uma mediana de 107 mg/dL (76 – 193 mg/dL). Apenas 4 (9%) indivíduos apresentaram níveis séricos inferiores aos valores considerados normais, e os demais, 41 (91%) indivíduos, apresentaram níveis séricos considerados normais (Figura 8A).

Nos indivíduos do grupo sem TARV, a média dos níveis séricos de ApoA1 foi de 130 ± 35 mg/dL e a mediana 99 mg/dL (82 – 206 mg/dL). Neste grupo, 2 (4%) indivíduos do sexo masculino apresentaram níveis séricos abaixo do valor de referência, e 2 (4%) indivíduos, também do sexo masculino, apresentaram valores superiores aos desejáveis, totalizando 4 (8%) indivíduos com níveis séricos alterados de ApoA1 (Figura 8A).

No grupo de soronegativos, a média para a ApoA1 foi de 146 ± 27 mg/dL e a mediana 152 mg/dL (91 – 192 mg/dL). Neste grupo, todos os 46 (100%) indivíduos estudados apresentaram níveis séricos de ApoA1 considerados normais (Figura 8A).

A análise sobre os resultados para a ApoB100, demonstrou que o grupo tratado com IP apresentou níveis séricos significativamente superiores aos demais grupos, $p < 0,05$. O grupo sem TARV apresentou níveis séricos significativamente superiores somente na comparação com o grupo de soronegativos, $p > 0,05$ (Figura 8B).

O grupo tratado com IP apresentou uma média para a ApoB100 de 142 ± 29 mg/dL, e uma mediana de 148 mg/dL (48 – 203 mg/dL). Apenas 1 (1,1%) indivíduo do sexo masculino (86H) apresentou um valor para a ApoB100 de 203 mg/dL, considerado acima do valor de referência, 56 a 162 mg/dL para mulheres, e 51 a 171 mg/dL para homens (Figura 8B).

No grupo tratado com ITRN+ITRNN, a média de ApoB100 foi de 120 ± 34 mg/dL, e a mediana 121 mg/dL (56 – 203 mg/dL) (Figura 8B). No grupo sem TARV, a média da ApoB100 foi de 131 ± 38 mg/dL e a mediana 134 mg/dL (59 – 221 mg/dL). Neste grupo, apenas 6 (13%) indivíduos, 3 do sexo masculino (12H, 16H e 57H) e 3 do sexo feminino (93H, 97H e 165H) apresentaram valores acima do limite máximo desejado (Figura 8B).

No grupo de soronegativos, a média dos níveis séricos de ApoB100 foi de 109 ± 19 mg/dL e a mediana 103 mg/dL (78 – 154 mg/dL), e todos os indivíduos apresentaram níveis séricos de ApoB100 considerados normais (Figura 8B).

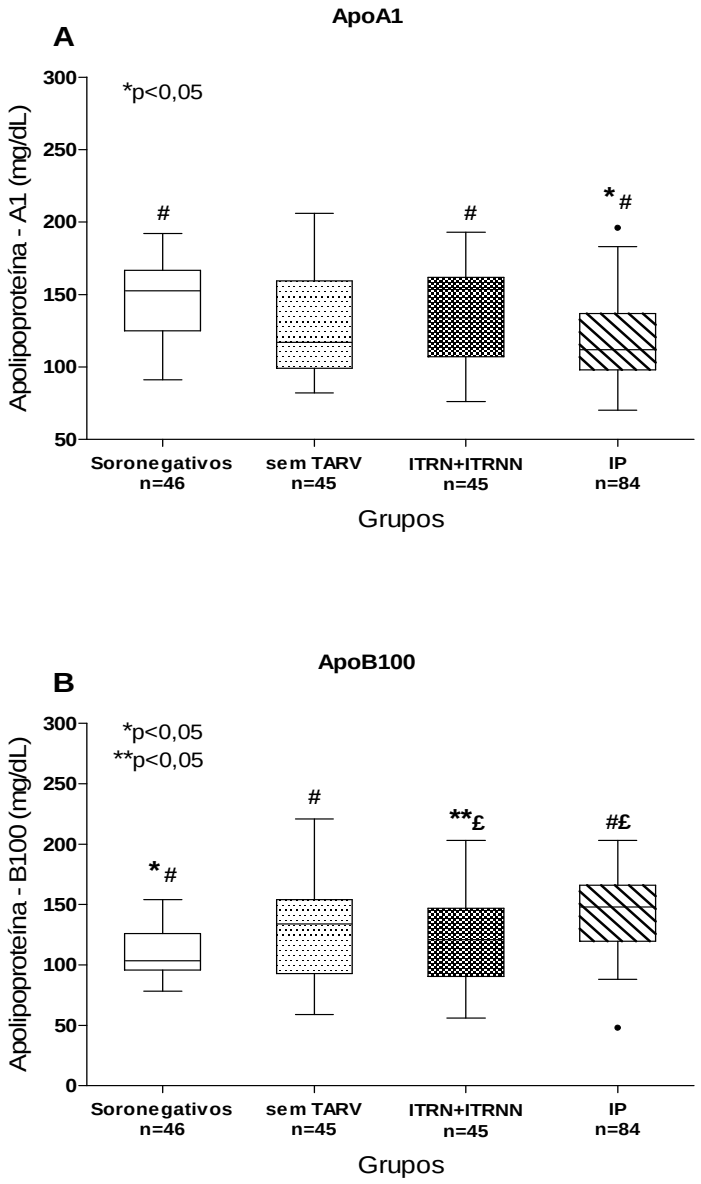

Figura 8. O gráfico (A) representa os níveis séricos de ApoA1 (mg/dL), e em (B), os níveis séricos de ApoB100 (mg/dL) nos grupos sem TARV, e tratados com ITRN+ITRNN e IP. Em (A), o (#) caracteriza as diferenças significativas entre o grupo IP em relação aos grupos ITRN+ITRNN e de soronegativos, *p < 0,05. Em (B), o (#) caracteriza as diferenças significativas entre o grupo de soronegativos em relação ao grupo sem TARV e IP, *p < 0,05. O (£), a diferença significativa entre o grupo ITRNN+ITRNN e o grupo IP, **p < 0,05. Os valores apresentados são da mediana (valor máximo, valor mínimo, e interquartil superior e inferior). Existem diferenças significativas entre os grupos para p < 0,05. Análise estatística: ANOVA seguido de teste de Tukey HSD, LSD e Tamhane.

5.4 Paraoxonase

5.4.1 Atividade sérica da PON1

A atividade sérica da PON1 (U/L) nos grupos de soropositivos apresentou valores médios de atividade inferiores ao do grupo de soronegativos. Porém, apenas os grupos sem TARV e o grupo IP apresentaram valores significativamente inferiores ao do grupo de soronegativos, $p < 0,05$ (Figura 9A).

No grupo que fazia uso de IP, a média da atividade sérica da PON1 foi de 99 ± 50 U/L e a mediana 93 U/L (22 – 234 U/L). O grupo ITRN+ITRNN apresentou uma média de atividade de 118 ± 56 U/L e uma mediana de 110 U/L (28 – 247 U/L). Naqueles indivíduos que não faziam uso de TARV, a média da atividade sérica foi de 104 ± 55 U/L e a mediana de 94 U/L (26 – 243 U/L). Por sua vez, o grupo de indivíduos soronegativos apresentou uma média de atividade de 143 ± 52 U/L e uma mediana de 154 U/L (44 – 218 U/L) (Figura 9A).

5.4.2 Atividade sérica da ARE

A atividade sérica da ARE (U/L) nos grupos estudados não apresentou diferenças significativas quando comparados, $p > 0,05$.

A atividade sérica média da ARE no grupo que recebeu IP foi de 73 ± 27 U/L, com uma mediana de 67 U/L (36 – 153 U/L). O grupo tratado com ITRN+ITRNN apresentou uma atividade de 75 ± 26 U/L, e uma mediana de 69 U/L (38 – 152 U/L). No grupo sem TARV, a média da atividade da ARE foi 74 ± 26 U/L e a mediana de 65 U/L (40 – 147 U/L). Os indivíduos

soronegativos apresentaram uma atividade média de 84 ± 26 U/L e uma mediana de 78 U/L (48 – 155 U/L) (Figura 9B).

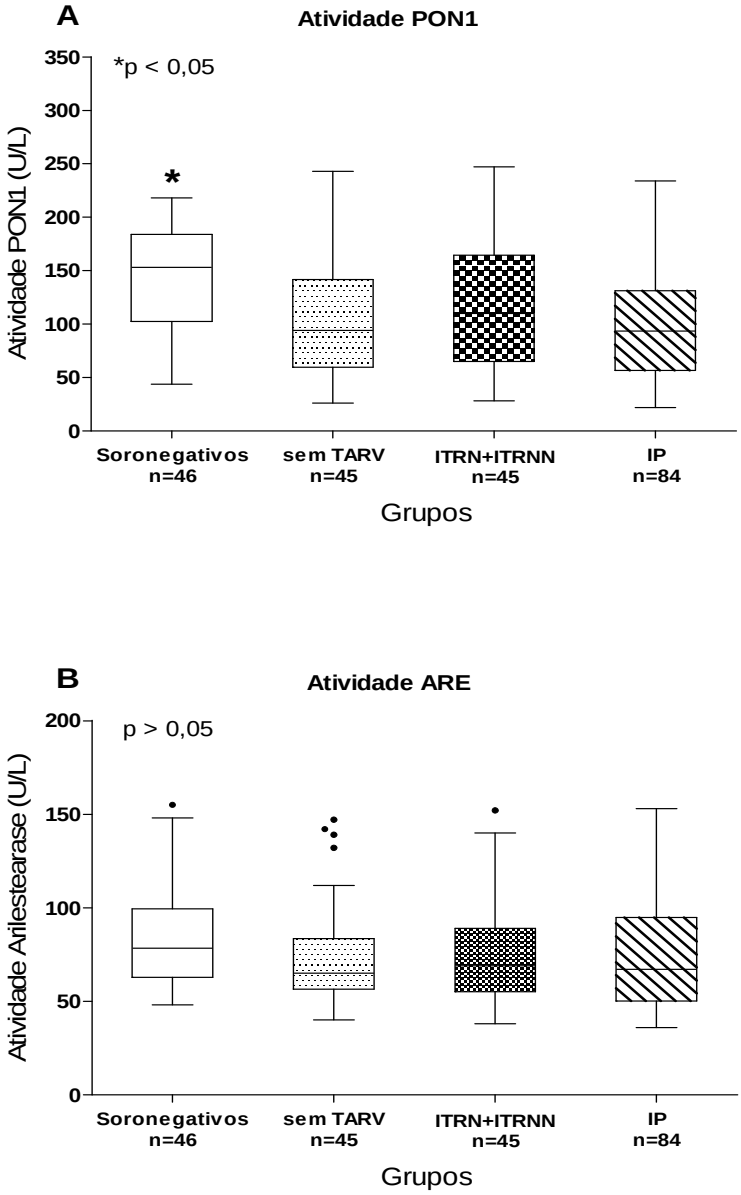

Figura 9: O gráfico (A) representa a atividade sérica da PON1 (U/L), e em (B), a atividade sérica da ARE (U/L) nos grupos sem TARV e tratados com ITRN+ITRNN e IP. O (*) caracteriza as diferenças significativas entre o grupo de soronegativos em relação aos demais grupos, *p < 0,05. Os valores apresentados são da mediana (valor máximo, valor mínimo, e interquartil superior e inferior). Existem diferenças significativas entre os grupos para p < 0,05. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Tukey HSD, LSD e Tamhane.

5.4.3 Atividade sérica da PON1 e linfócitos T-CD4+

A atividade sérica da PON1 e sua relação com o número de linfócitos T-CD4+, estratificados em menor que 200 células/mm^3, 200 a 350 células/mm^3, e maior que 350 células/mm^3, não apresentaram diferenças significativas quando comparadas, $p > 0,05$ (Figura 10A).

A atividade da PON1 no grupo de indivíduos que apresentaram um número de T-CD4+ inferior a 200 células/mm^3 (n = 23), foi de 92 ± 50 U/L, com uma mediana de 92 U/L (22 – 200 U/L). No grupo de indivíduos que apresentaram um número de linfócitos T-CD4+ de 200 a 350 células/mm^3 (n = 39), a atividade da PON1 apresentou uma média de 100 ± 52 U/L, e uma mediana de 89 U/L (31 – 215 U/L). Naqueles indivíduos que apresentaram uma contagem de linfócitos T-CD4+ superior a 350 células/mm^3 (n = 112) a atividade da PON1 foi de 109 ± 53 U/L, e mediana 98 U/L (27 – 247 U/L) (Figura 10A).

5.4.4 Atividade sérica da ARE e linfócitos T-CD4+

A atividade sérica da ARE e sua relação com o número de linfócitos T-CD4+, também não apresentaram diferenças significativas quando comparadas, $p > 0,05$ (Figura 10B). Assim como a PON1, a ARE não apresentou uma associação com o número de linfócitos T-CD4+, estratificados em menor que 200 células/mm^3, 200 a 350 células/mm^3, e maior que 350 células/mm^3. A atividade sérica da ARE apresentou uma média de 73 ± 28 U/L e uma mediana de 65 U/L (36 – 126 U/L) para um número de linfócitos T-CD4+ inferior a 200 células/mm^3 (n = 23).

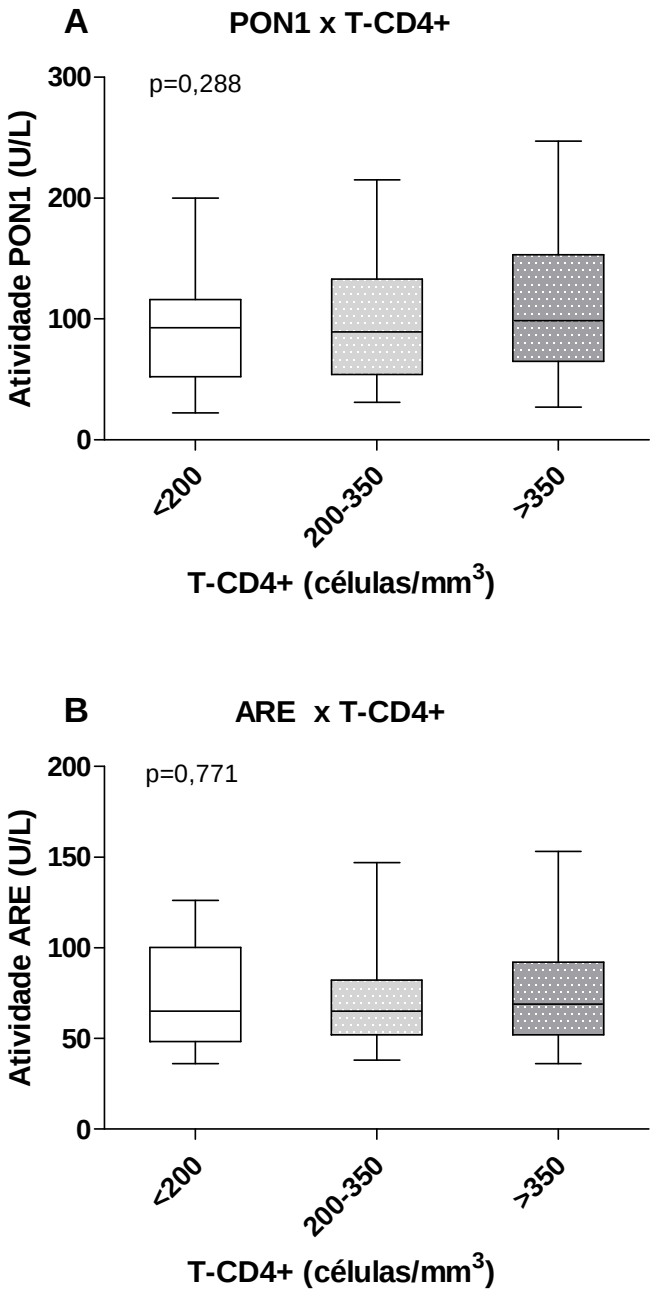

Figura 10. O gráfico (A) e (B) representam**,** respectivamente, a atividade sérica da PON1 (U/L) e atividade sérica da ARE (U/L) nas diferentes contagens de linfócitos T-CD4+ nos indivíduos soropositivos para o HIV-1. Os valores apresentados são da mediana (valor máximo, valor mínimo, e interquartil superior e inferior). Existem diferenças significativas entre os grupos quando $p < 0,05$. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Tukey HSD, LSD e Tamhane.

No grupo de indivíduos que apresentaram um número de linfócitos T-CD4+ de 200 a 350 células/mm^3 (n = 39), a atividade da ARE apresentou uma média de 71 ± 25 U/L e uma mediana de 65 U/L (38 – 147 U/L). Naqueles indivíduos que apresentaram uma contagem de linfócitos T-CD4+ superior a 350 células/mm^3 (n = 112) a atividade da ARE foi de 74 ± 27 U/L e a mediana de 69 U/L (36 – 153 U/L) (Figura 10B).

5.4.5 Atividade PON1 e ARE, e correlação com parâmetros lipídicos

A atividade sérica da PON1 apresentou uma correlação (Teste de Spearman) positiva significativa com os níveis séricos de HDL no grupo tratado com ITRN+ITRNN ($r = 0,3313$; $p = 0,026$). A atividade ARE apresentou uma correlação positiva significativa com os níveis séricos de HDL do grupo sem TARV ($r = 0,3382$; $p = 0,023$), e no grupo tratado com ITRN+ITRNN ($r = 0,6173$; $p < 0,001$), assim como, com os níveis de CT no grupo tratado com IP ($r = 0,2468$; $p = 0,023$). Para todos os outros parâmetros do perfil lipídico e dos marcadores da infecção, o estudo da correlação não apresentou resultados significativos, $p > 0,05$.

5.4.6 Polimorfismos PON1 192QR e PON1 55LM

No grupo de indivíduos soropositivos para o HIV-1, assim como para o grupo de soronegativos, foram estudados os polimorfismos PON1 192QR e PON1 55LM (Tabela 8 e 9).

No grupo de indivíduos soropositivos, a frequência dos alelos PON1 192Q, 192R, PON1 55L e PON1 55M, foi de 71,7%, 28,3%, 46,5% e 53,4%,

respectivamente. No grupo de soronegativos, a frequência dos alelos PON1 192Q, 192R, PON1 55L e PON1 55M, foi de 79,3%, 20,7%, 45,7% e 54,3% (Tabela 8).

No grupo de soropositivos, o genótipo QQ da PON1 192QR foi observado em 90 indivíduos (53,5%), o genótipo QR em 61 (36,3%), e o RR em 17 (10,1%) indivíduos. Por sua vez, no grupo de soronegativos, o genótipo QQ foi observado em 28 (60,8%) dos indivíduos, e o genótipo QR em 17 (36,9%). Apenas 1 (2,3%) apresentava o genótipo RR neste grupo (Tabela 9).

Tabela 8. Frequências alélicas: PON1 192Q, 192R, PON1 55L e PON1 55M nos grupos de soropositivos e soronegativos para o HIV-1.

	Polimorfismo	**Alelo**	**N**	**%**
	PON1 192QR	Q	241	71,7
HIV		R	95	28,3
n=174	PON1 55LM	L	150	46,5
		M	172	53,4
	PON1 192QR	Q	73	79,3
Soronegativos		R	19	20,7
n=46	PON1 55LM	L	42	45,7
		M	50	54,3

Em relação ao polimorfismo PON1 55LM no grupo de soropositivos para o HIV-1, 46 (29,4%) indivíduos apresentaram o genótipo LL, 52 (33,3%) indivíduos apresentaram o genótipo LM, e 58 (37,1%) o genótipo MM. O grupo de soropositivos apresentou uma freqüência de distribuição de genótipos semelhante, com 13 (28,2%) indivíduos apresentando o genótipo

LL, 16 (34,7%) apresentando o genótipo LM, e 17 (36,9%) indivíduos o genótipo MM (Tabela 9). A análise da frequência da associação entre os genótipos PON1 192 e PON1 55 nos indivíduos soropositivos esta apresentada na tabela 9.

Tabela 9. Distribuição dos genótipos 192QR e 55LM da PON1 nos grupos de soropositivos e soronegativos para o HIV-1.

	Polimorfismo	Alelo	N	%
	PON1 192QR	QQ	90	53,5
HIV-1		QR	61	36,3
n=174		RR	17	10,2
	PON1 55LM	LL	50	29,7
		LM	60	35,7
		MM	59	34,6
	PON1 192QR	QQ	28	60,8
Soronegativos		QR	17	36,9
n=46		RR	1	2,3
	PON1 55LM	LL	13	28,2
		LM	16	34,7
		MM	17	36,9

A análise estatística pelo teste do Qui-quadrado, comparando a frequência de distribuição genotípica e alélica entre os grupos de soropositivos e soronegativos, mostrou que os grupos não diferem quanto a distribuição dos genótipos Q e R da PON1 192 (p = 0,407) e seus alelos QQ, QR e RR (p = 0,511). Para o polimorfismo PON 55, os genótipos L e M também não apresentaram diferença significativa na sua distribuição (p = 1,00), assim com seus alelos LL, LM e MM (p = 0,979) (Tabela 10).

Tabela 10. Associações dos genótipos 192 e 55 da PON1 nos indivíduos soropositivos para o HIV-1.

PON1-192	Total	%	Associação	N	%

QQ	90	53,5	QQLL	19	21,1
			QQLM	29	32,2
			QQMM	42	44,9
QR	61	36,3	QRLL	23	37,7
			QRLM	22	36,0
			QRMM	16	26,2
RR	17	10,1	RRLL	9	53,0
			RRLM	4	23,5
			RRMM	4	23,5

5.4.7 Atividades séricas da PON1 e ARE, e polimorfismos PON1 192QR

A atividade sérica da PON1 e sua relação com os polimorfismos da PON1 192QR, assim como a atividade ARE, foram analisadas nos indivíduos soropositivos para o HIV-1, de maneira independente à terapia empregada, assim como naqueles que não faziam uso de TARV (Figura 11).

Nos indivíduos que apresentaram o genótipo PON1 192QQ (n = 90) a média da atividade da PON1 foi de 99 ± 51 U/L e a mediana 85 U/L (26 – 234 U/L) (Figura 11A). Para este genótipo, a atividade da ARE apresentou uma média de 70 ± 24 U/L e uma mediana de 63 U/L (36 – 153 U/L) (Figura 11B).

Naqueles indivíduos que apresentaram o genótipo PON1 192QR (n = 61), a média da atividade da PON1 foi de 105 ± 49 U/L, e a mediana 98 U/L (22 – 223 U/L) (Figura 11A). A atividade ARE apresentou uma média de 78 ± 30 U/L, com uma mediana de 73 U/L (36 – 151 U/L) (Figura 11B).

O genótipo RR foi encontrado em 17 indivíduos soropositivos, e a atividade da PON1 apresentou uma média de 158 ± 57 U/L e uma mediana de 205 U/L (101 – 247 U/L) (Figura 11A). A atividade ARE apresentou uma média de 86 ± 28 U/L e uma mediana de 84 U/L (52 – 132 U/L) (Figura 11B).

Estes resultados apontam que as atividades séricas da PON1 e da ARE, para estes polimorfismos estudados, não apresentaram diferenças significativas, $p > 0,05$ (Figuras 11A–B).

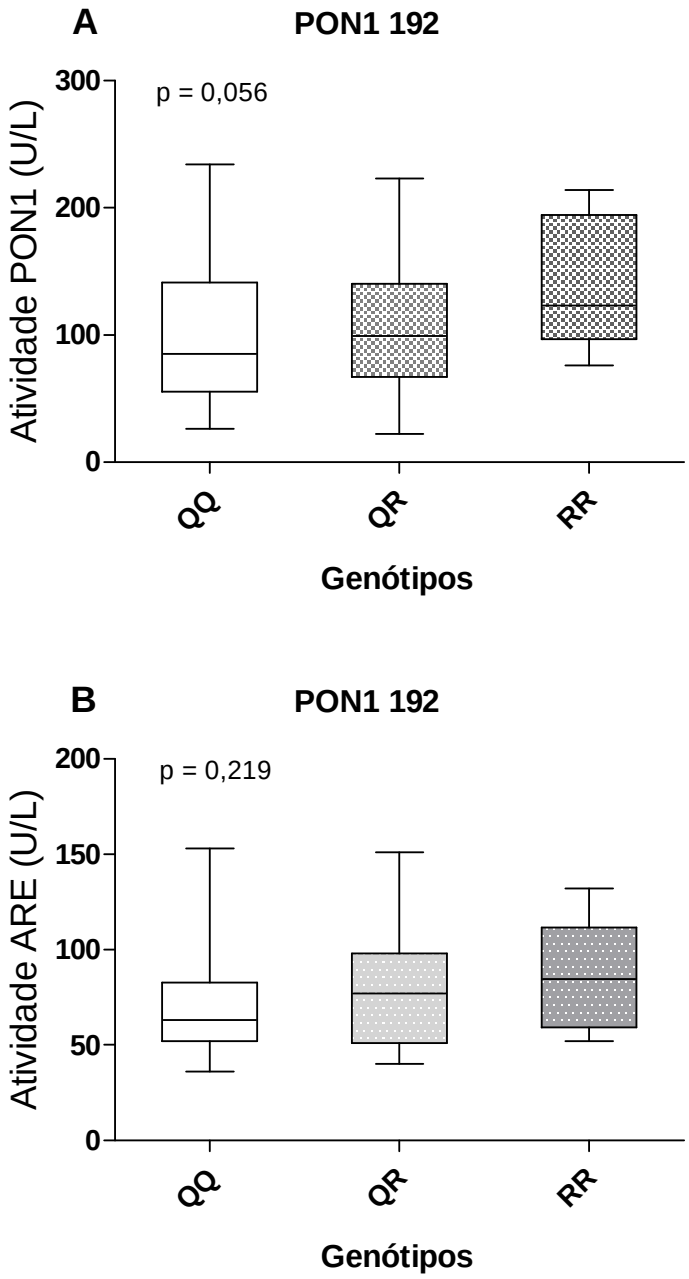

Figura 11: O gráfico (A) apresenta a atividade sérica da PON1 (U/L) para os genótipos QQ, QR e RR da PON1 191, e o gráfico (B) apresenta a atividade sérica da ARE para os mesmos genótipos da PON1 192. Análise realizada por ANOVA, seguido do teste de Tukey HSD, LSD e Tamhane. Para todos os testes foi considerado um índice de significância estatística de $p < 0,05$.

5.4.8 Atividades séricas da PON1 e ARE, e polimorfismos PON1 55LM

A atividade sérica da PON1 e sua relação com os polimorfismos da PON1 55LM, assim como a atividade ARE, foram analisadas nos indivíduos soropositivos para o HIV-1, de maneira independente à terapia empregada, assim como naqueles que não faziam uso de TARV (Figura 12).

Para o polimorfismo PON1 55, 50 indivíduos apresentaram o genótipo PON1 55LL, e a média de atividade da PON1 foi de 110 ± 57 U/L, com uma mediana de 92 U/L (40 – 147 U/L) (Figura 12A). A média da atividade sérica da ARE foi de 82 ± 28 U/L e a mediana 78 U/L (40 – 147 U/L) (Figura 12B).

A atividade da PON1 no genótipo PON1 55LM (n = 60) foi de 110 ± 51 U/L e a mediana de 99 U/L (36 – 151 U/L) (Figura 12A), enquanto a atividade sérica da ARE apresentou uma média de 71 ± 25 U/L, e uma mediana de 66 U/L (36 – 151 U/L) (Figura 12B).

Nos 59 indivíduos com genótipo PON1 55MM a média da atividade da PON1 foi de 119 ± 55 U/L, e a mediana 115 U/L (27 – 215 U/L) (Figura 12A). Para a atividade ARE, a média apresentada foi de 74 ± 34 U/L, com uma mediana de 64 U/L (41 – 142 U/L) (Figura 12B).

Com estes resultados, ficou demonstrado que as atividades séricas da PON1 e da ARE, para os genótipos estudados, não apresentaram diferenças significativas, $p > 0,05$.

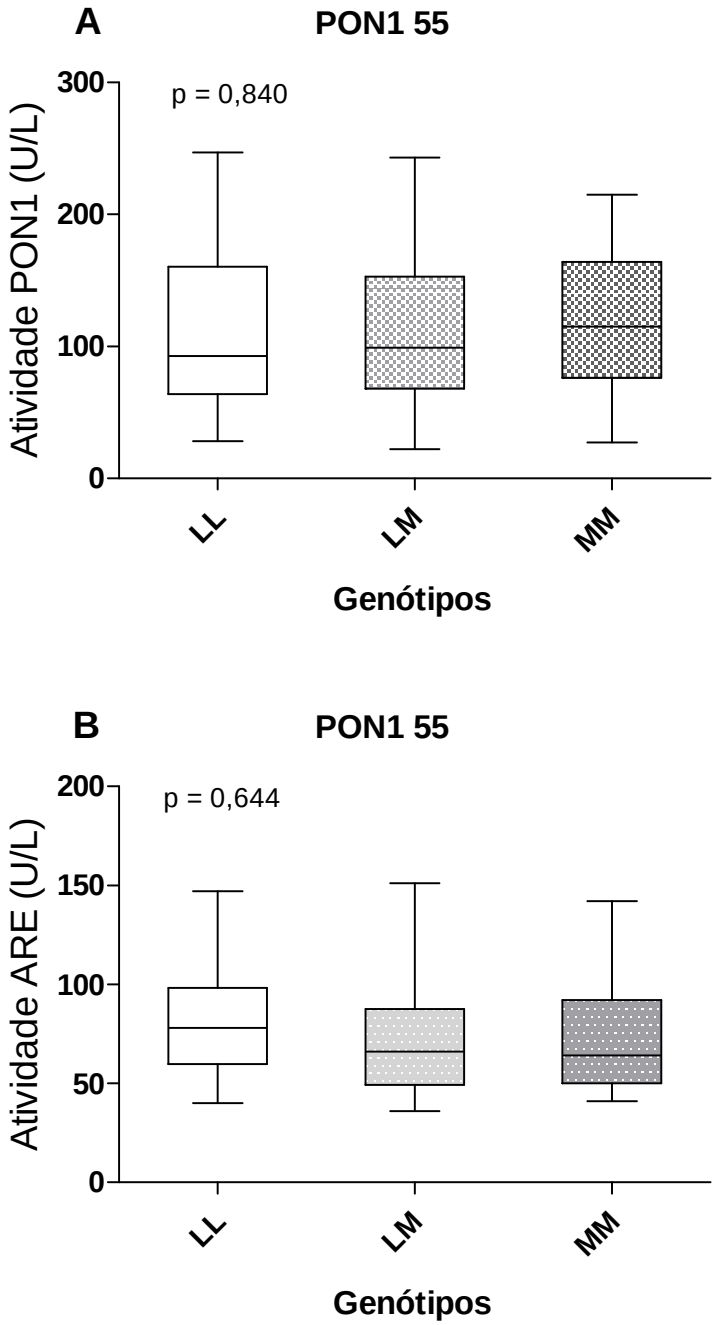

Figura 12: O gráfico (A) apresenta a atividade sérica da PON1 (U/L) para os genótipos LL, LM e MM da PON1 55, e o gráfico (B) apresenta a atividade sérica da ARE para os mesmos genótipos da PON1 55. Análise realizada por ANOVA, seguido do teste de Tukey HSD, LSD e Tamhane. Para todos os testes foi considerado um índice de significância estatística de $p < 0,05$.

5.4.9 Parâmetros lipidicos e o polimorfismo PON1 192QR

Para o genótipo QQ, a média dos níveis séricos de CT foi de 196 ± 44 mg/dL e a mediana de 190 mg/dL (117 – 334 mg/dL). Para o genótipo QR a média foi de 186 ± 39 mg/dL, com uma mediana de 182 mg/dL (66 – 270 mg/dL), enquanto que no genótipo RR a média dos níveis séricos de CT foi de 203 ± 64 mg/dL e sua mediana 183 mg/dL (148 – 330 mg/dL) (Figura 13 A).

Os níveis séricos HDL para o genótipo QQ apresentaram uma média 44 ± 12 mg/dL e uma mediana de 42 mg/dL (23 – 86 mg/dL). Para o genótipo QR, a média foi de 41 ± 13 mg/dL, com uma mediana de 36 mg/dL (21 – 49 mg/dL). Por sua vez, no genótipo RR a média de HDL foi de 45 ± 13 mg/dL e mediana de 41 mg/dL (30 – 66 mg/dL) (Figura 13B)

Quanto aos níveis séricos de LDL, no genótipo QQ a média foi de 116 ± 31 mg/dL e a mediana 115 mg/dL (51 – 207 mg/dL). Para o genótipo QR a média foi de 115 ± 38 mg/dL e a mediana, 111 mg/dL (23 – 253 mg/dL). No genótipo RR a média dos níveis séricos de LDL foi de 121 ± 31 mg/dL, e sua mediana 107 mg/dL (98 – 192 mg/dL) (Figura 13C).

Os níveis séricos de TG apresentaram uma média de 207 ± 234 mg/dL e uma mediana de 145 mg/dL (53 – 1.499 mg/dL) para o genótipo QQ. Para o genótipo QR a média foi de 204 ± 159 mg/dL, com uma mediana de 162 mg/dL (48 – 864 mg/dL). Por sua vez, no genótipo RR a média foi de 247 ± 349 mg/dL e a mediana 154 mg/dL (68 – 1.108 mg/dL) (Figura 13D).

A análise estatística não caracterizou diferenças estatísticas significativas nos níveis séricos de CT (p = 0,281), HDL (p = 0,456), LDL (p =

0,882) e TG (p = 0,249), quando avaliados em relação aos diferentes genótipos da PON1 192, QQ, QR e RR.

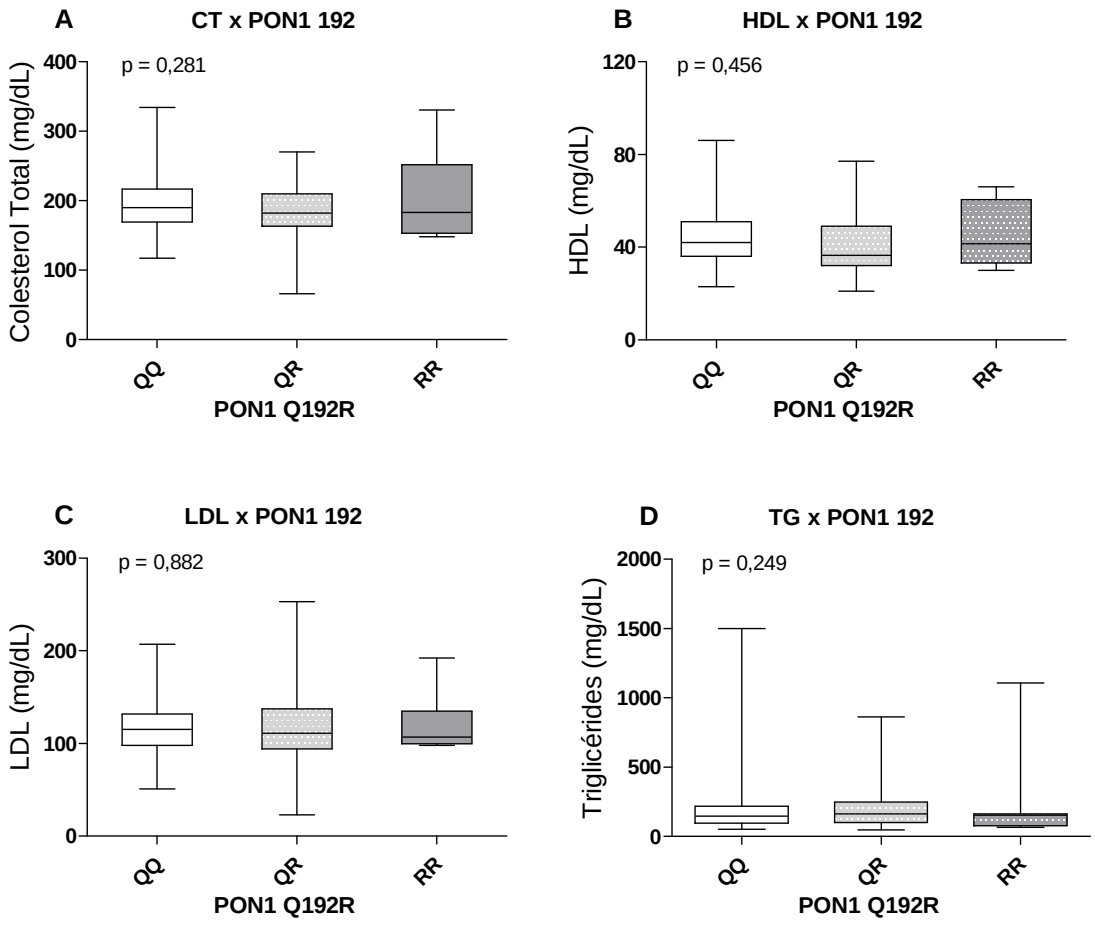

Figura 13: O gráfico (A) apresenta os níveis séricos de CT para os genótipos QQ, QR e RR da PON1 192. O gráfico (B) apresenta os níveis séricos de HDL, o gráfico (C) os níveis séricos de LDL, e o gráfico (D) os níveis séricos de TG para os mesmos genótipos da PON1 192. Análise realizada por ANOVA, seguido do teste de Tukey HSD, LSD e Tamhane. Para todos os testes foi considerado um índice de significância estatística de $p < 0,05$.

5.4.10 Parâmetros lipídicos e o polimorfismo PON1 55LM

Em relação aos genótipos da PON1 55, LL, LM e MM, os níveis séricos de CT apresentaram uma média de 180 ± 43 mg/dL e uma mediana de 170 mg/dL (66 – 330 mg/dL) para o genótipo LL. Para o genótipo LM, a média foi de 191 ± 36 mg/dL e a mediana de 191 mg/dL (72 – 269 mg/dL). Em relação ao genótipo MM, a média foi de 202 mg/dL, com uma mediana de 180 mg/dL (130 – 334 mg/dL) (Figura 14A).

Os níveis séricos de HDL para o genótipo LL apresentaram uma média de 44 ± 14 mg/dL, e uma mediana de 40 mg/dL (23 – 86 mg/dL). Para o genótipo LM, a média foi de 42 ± 12 mg/dL, com uma mediana de 38 mg/dL (25 – 72 mg/dL). No genótipo MM, a média observada foi de 43 ± 11 mg/dL, com uma mediana de 42 mg/dL (21 – 85 mg/dL) (Figura 14B).

Quanto aos níveis séricos de LDL, a média foi de 108 ± 31 mg/dL para o genótipo LL e a mediana 105 mg/dL (23 – 232 mg/dL). No genótipo LM, a média foi de 164 ± 29 mg/dL com uma mediana de 114 mg/dL (32 – 192 mg/dL). Por sua vez, a média para o genótipo MM foi de 123 ± 38 mg/dL e a mediana 119 mg/dL (32 – 253 mg/dL) (Figura 14C).

Para o parâmetro TG, a média dos níveis séricos para o genótipo LL foi de 171 ± 166 mg/dL e a mediana 125 mg/dL (54 – 1.108 mg/dL). Para o genótipo LM, a média obtida foi de 224 ± 269 mg/dL e a mediana 146 mg/dL (48 – 1.499 mg/dL). Para o genótipo MM, a média foi de 214 ± 184 mg/dL, e a mediana 163 mg/dL (56 – 980 mg/dL) (Figura 14D).

A análise estatística não caracterizou diferenças estatísticas significativas nos níveis séricos de CT (p = 0,281), HDL (p = 0,456), LDL (p =

0,882) e TG (p = 0,249), quando avaliados em relação aos diferentes genótipos da PON1 192, QQ, QR e RR.

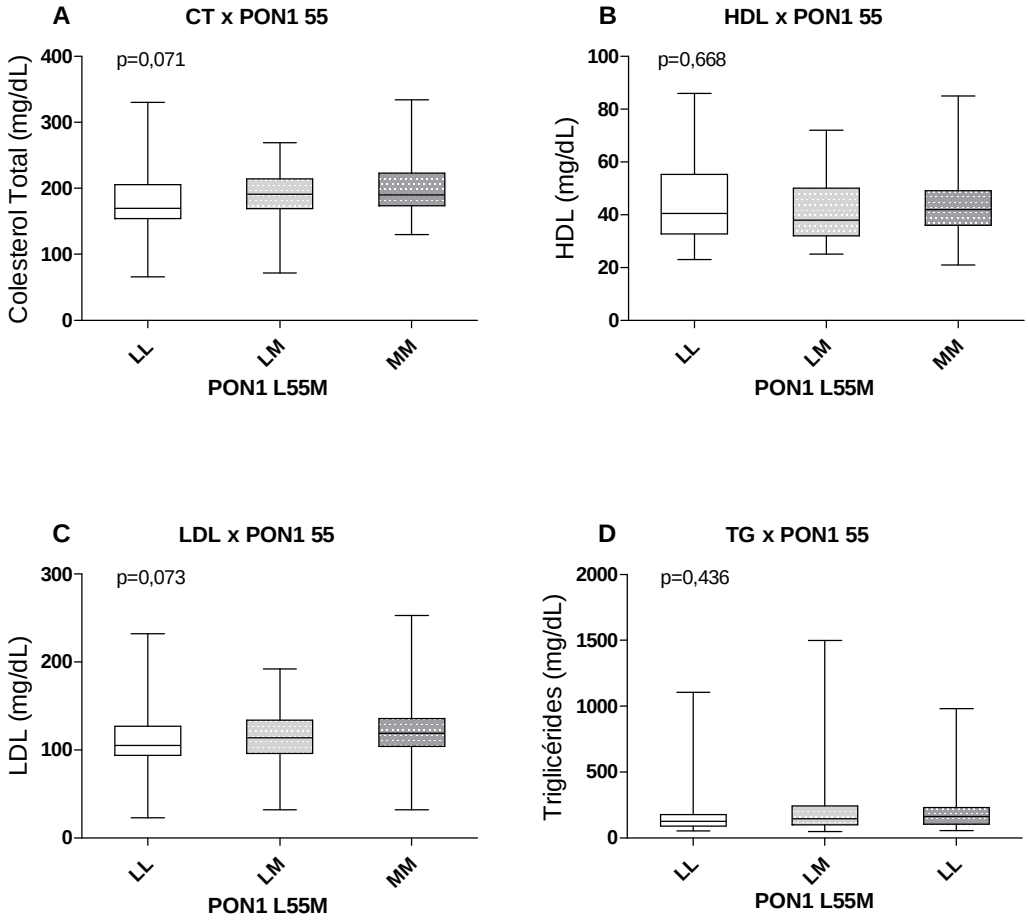

Figura 14: O gráfico (A) apresenta os níveis séricos de CT para os genótipos LL, LM e MM da PON1 55. O gráfico (B) apresenta os níveis séricos de HDL, o gráfico (C) os níveis séricos de LDL, e o gráfico (D) os níveis séricos de TG para os mesmos genótipos da PON1 55. Análise realizada por ANOVA, seguido do teste de Tukey HSD, LSD e Tamhane. Para todos os testes foi considerado um índice de significância estatística de $p < 0,05$.

6
Discussão

6. Discussão

A atividade paraoxonase e arilestearase da PON1, e seus polimorfismos PON1 192QR e PON1 55LM, foram avaliados neste estudo em indivíduos soropositivos para o HIV-1, tratados com diferentes regimes de TARV.

Como descrito na literatura, a PON é uma família multigene de enzimas composta de três diferentes membros, PON1, PON2 e PON3, que compartilham considerável homologia estrutural (Précourt et al., 2011). Os estudos sobre as PONs ganharam relevância quando se observou que elas poderiam apresentar uma capacidade anti-aterogênica. Contudo, os mecanismos envolvidos neste processo anti-aterogênico permanecem desconhecidos, embora já esteja evidenciada a capacidade de proteção das células contra o estresse oxidativo (Reddy et al., 2008; Aviram, Rosenblat, 2009).

A PON1 está associada à ApoA1 integrante da HDL, e sugere-se, possui a capacidade de impedir a peroxidação de moléculas LDL, prevenindo a formação e acúmulo de oxLDLs, fator este determinante no processo da aterosclerose (Mackness et al.,1991b; Aviram, 1999; Aviram, Rosenblat, 2004). Adicionalmente, evidenciou-se a associação entre os polimorfismos nas enzimas PON com as doenças ateroscleróticas, como a doença coronariana cardíaca e o acidente vascular isquêmico (Voetsch et al., 2002; Voetsch et al., 2004).

O *gene* PON1 apresenta dois polimorfismos comuns nos códons 192 [A/G: Gln (Q)/Arg (R)] e 55 [T/A: Leu (L)/Met (M)], os quais podem afetar sua

concentração e atividade enzimática (Costa et al., 2005; Mackness et al., 2000; Mackness et al., 2003; Mackness et al., 2004).

Neste contexto, a dislipidemia, um importante fator pré-estabelecido para o desenvolvimento da aterosclerose, tem sido relatada em indivíduos soropositivos para o HIV-1 (Riddler et al., 2008; Parra et al., 2010a). Esta dislipidemia que inicialmente está associada à própria infecção pelo HIV-1 em indivíduos sem TARV, também pode ser observada em indivíduos tratados com os diferentes regimes terapêuticos, principalmente naqueles com protocolos antirretrovirais compostos de IP (Dubé et al., 2008).

Neste estudo com 174 indivíduos soropositivos e 46 soronegativos para o HIV-1, mostramos que a atividade sérica paraoxonase, mas não a atividade arilestearase, se apresentou reduzida na comparação com o grupo de soronegativos (Figura 9). Adicionalmente, observou-se uma redução significativa dos níveis séricos de HDL no grupo tratado com IP (Figura 4), que foi acompanhada de maiores concentrações de TG (Figura 5), anticorpos IgG anti-oxLDL (Figura 7), e um maior índice de risco aterogênico (Figura 6). Estes achados, caracterizam que a terapia com IP, além do próprio efeito direto do HIV-1, sugere-se, pode apresentar um efeito pró-aterogênico.

É importante salientar que os grupos de indivíduos soropositivos arrolados no estudo, e que recebiam a TARV, apresentaram níveis de RNA-HIV-1 considerados indeterminados (< 50 cópias/mL), e que mesmo o grupo sem TARV apresentou níveis de RNA-HIV-1 considerados satisfatórios (Tabela 6). Os indivíduos soropositivos não apresentavam sinais e/ou sintomatologia de

infecções oportunistas, ressaltando que todos os indivíduos soropositivos para o HIV-1 atendidos no HU-UFSC, são acompanhados, clínico e laboratorialmente por infectologistas, em intervalos de noventa dias.

Os níveis plasmáticos de RNA-HIV-1, assim como o número de linfócitos T-CD4+ e o estágio clínico da infecção, são considerados como fatores prognósticos determinantes na avaliação do estágio e curso da infecção pelo HIV-1, em indivíduos que recebem ou não a TARV (Egger et al., 2002; May et al., 2007).

Uma vez que ocorre a infecção pelo HIV-1, o desenvolvimento para uma franca síndrome de imunodeficiência, AIDS, pode ocorrer num período de até 10 anos, tendo como maiores evidências a elevação dos níveis plasmáticos de RNA-HIV-1 e a queda no número de linfócitos T-CD4+. Estas características estão normalmente associadas às infecções oportunistas (Das, 2005; May et al., 2007).

A presença destas características conduz ao início da TARV, que geralmente é introduzida quando a contagem de linfócitos T-CD4+ alcança valores inferiores a 200 células/mm^3 (Ngondi et al., 2006). A classificação CDC (www.cdc.gov) divide, assim, os portadores do vírus HIV-1 em três grupos, conforme a quantidade de linfócitos T-CD4+: abaixo de 200 células/mm^3, entre 200 e 499 células/mm^3 e acima de 500 células/mm^3.

Numa avaliação inicial, os níveis plasmáticos de RNA-HIV-1 (carga viral) naqueles soropositivos tratados com TARV, independente do regime terapêutico, apresentaram carga viral com níveis plasmáticos

indeterminados, abaixo de 50 cópias/mL. Como esperado, o grupo sem TARV apresentou valores de média e mediana de RNA-HIV-1 superior a 30.000 cópias/mL (Tabela 6).

Esses resultados indicam, numa primeira análise, que naqueles pacientes tratados com TARV, houve uma efetiva inibição da replicação viral, uma adesão dos pacientes ao tratamento antirretroviral, ou ainda, uma possível ausência de resistência viral aos antirretrovirais empregados. As determinações dos níveis plasmáticos de RNA viral durante a TARV, são consideradas como uma grande ferramenta na avaliação da eficácia dos medicamentos que constituem a terapia antirretroviral, propiciando que a mesma seja individualizada (Palella et al., 1998; Martin et al., 2006).

A característica imunodeficiência verificada na progressão da infecção pelo HIV, é decorrente de alterações no controle do ciclo celular, observadas em linfócitos de pacientes infectados pelo HIV-1 que apresentam replicação viral ativa (Cannavo et al., 2001). A efetiva inibição da replicação viral condicionada ao uso da TARV, promove a recuperação e manutenção do sistema imunológico, permitindo sua reconstituição, o que pode ser avaliado pelo número de linfócitos T-CD4+, TCD8+ e pela relação CD4+:,CD8+ (Panel, 2009).

Em relação aos linfócitos T-CD4+, os indivíduos tratados e sem TARV apresentaram valores de média e mediana consideradas dentro do valor de referência (Tabela 6). Contudo, 44% (n = 20) dos indivíduos soropositivos sem TARV apresentaram um valor de Linfócitos T-CD4+ abaixo de 410 células mm^3 e elevação dos níveis de RNA-HIV-1, o que

levou a iniciarem a terapia antirretroviral baseada em ITRN+ITRNN. Estes indivíduos não chegaram a apresentar, todavia, sintomatologia grave para doenças oportunistas.

Nos grupos tratados com ITRN+ITRNN e IP, observou-se que 46% (n = 38) e 54% (n = 46) dos indivíduos, respectivamente, apresentaram valores de T-CD4+ abaixo de 410 células/mm^3, mostrando que mesmo durante a TARV, considerada efetiva na inibição da replicação viral, em muitos indivíduos soropositivos a recuperação imunológica não é completa e os níveis basais de linfócitos T-CD4+ não são alcançados (Bae et al., 2011) (Tabela 6).

Pakker et al. (1998) avaliaram indivíduos submetidos à TARV tripla, e Smith et al. (2003) estudaram pacientes submetidos à terapia antirretroviral altamente ativa, e confirmaram os presentes resultados, ao verificarem um aumento abrupto de linfócitos T-CD4+ após o início da TARV, seguido de uma estabilização e um lento aumento dessas células com a continuidade da terapia.

A manutenção do número de linfócitos T-CD4+ aqui observado, assim como em muitos outros estudos, sugere ser resultante da diminuição dos níveis plasmáticos do RNA-HIV-1, e consequentemente, da redução do efeito citopático sobre os linfócitos T-CD4+ (Garry, 1989; Rosenberg et al., 2000).

Os linfócitos T-CD8+ também se apresentaram com valores de média e mediana considerada dentro dos valores de referência (190-1.140

células/mm^3) nos grupos estudados, o que caracteriza a eficácia da TARV nestes indivíduos (Tabela 6).

Vários estudos que avaliaram a redução do número de linfócitos T-CD8+ em indivíduos tratados e não tratados com TARV, corroboram com os nossos resultados, ao demonstrarem que a redução e/ou manutenção dos valores de linfócitos T-CD8+, assim como a resolução de sintomas clínicos, e o subseqüente aumento do número de linfócitos T-CD4+, seriam provenientes, principalmente, da inibição da replicação viral pela TARV (Betts et al., 2001; Cao et al., 2003; Kassutto, 2004).

A TARV, que tem por objetivo a inibição da replicação viral, e com isso retardar a progressão da imunodeficiência e restaurar a imunidade, aumentando o tempo e a qualidade de vida dos indivíduos soropositivos para o HIV-1, mostrou-se efetiva. Todavia, possui como efeito negativo a capacidade de gerar alterações no metabolismo lipídico em indivíduos soropositivos, que são caracterizadas por uma hipercolesterolemia, principalmente naqueles indivíduos que recebem IP, acarretando com isso, um maior risco para doenças cardiovasculares e aterosclerose (Richter et al., 2005; Whol et al., 2008; Erron et al., 2011).

A hipercolesterolemia é um fator de risco importante e pré-estabelecido para a aterosclerose, podendo ser observada em portadores de HIV e de AIDS, bem como o excesso na produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 e o TNF-α (Das, 2005). Mais ainda, a adaptação da HDL aos estados crônicos inflamatórios e de oxidação, bem como os distúrbios metabólicos relacionados à infecção pelo HIV e aos

tratamentos disponíveis, vem sendo assunto com contínuo interesse. (Nakamura et al., 2002; Palella et al., 1998).

Entre as alterações lipídicas mais evidentes nos indivíduos soropositivos que recebem TARV, está a elevação dos níveis séricos de CT e TG, e uma considerável redução dos níveis de HDL (Mallon, 2006, Saint Martin et al., 2006). Acredita-se que a patogênese da dislipidemia associada ao uso de TARV possa estar relacionada aos efeitos induzidos pelas drogas em níveis molecular e celular (Mallon, 2006).

Neste estudo, os grupos de soropositivos não apresentaram alterações nos níveis séricos de CT e LDL, porém, os níveis séricos de HDL foram significativamente inferiores no grupo IP, na comparação com o grupo de soronegativos, e ainda, níveis séricos elevados de TG foram observados nos grupos ITRN+ITRNN e IP.

Nos grupos estudados, o parâmetro CT não apresentou diferença quando comparado, considerando-se os valores de média e mediana. Entretanto, no grupo que fazia uso de IP, 52,8% (n = 43) dos soropositivos apresentaram valores considerados acima do valor ideal (< 200 mg/dL), enquanto que no grupo tratado com ITRN+ITRNN, 38% (n = 17) dos indivíduos soropositivos apresentaram níveis séricos acima de 200 mg/dL. No grupo sem TARV, 22,2% (n = 10) apresentaram valores acima de 200 mg/dL, e no grupo de soronegativos, 21,7% (n = 10) indivíduos apresentaram níveis séricos acima do ideal. Estes resultados mostram que mesmo não havendo diferenças significativas entre os grupos, um

considerável número de indivíduos que fizeram uso de IPs, apresentaram níveis séricos de CT acima do ideal.

Na avaliação dos níveis séricos de HDL, todos os grupos apresentaram valores de média e mediana iguais ou maiores que 40mg/dL, considerado o valor mínimo ideal. No grupo tratado com IP os níveis foram significativamente inferiores aos demais grupos, ressaltando que o grupo tratado com ITRN+ITRNN, assim como o grupo sem TARV, também apresentou redução dos níveis séricos de HDL, se comparado ao grupo de soronegativos, porém, sem diferenças estatísticas. Um total de 44% (n = 40) dos indivíduos do grupo tratado com IP apresentaram valores inferiores a 40mg/dL, enquanto que no grupo tratado com ITRN+ITRNN, 35,5% (n = 44) apresentaram níveis séricos inferiores a 40mg/dL. No grupo sem TARV, 44.4% (n = 20) dos indivíduos também apresentaram valores inferiores a 40 mg/dL.

Os resultados até aqui descritos, mostram que em indivíduos soropositivos sem o uso da TARV, mas principalmente dentre os indivíduos que fazem uso de IP, ocorrem alterações no metabolismo lipídico,

Os benefícios da TARV são evidentes, todavia, nossos resultados são semelhantes aos da literatura ao demonstrar o impacto sobre o metabolismo lipídico (Carr, 2000; Pereira et al., 2009). Isto inclui o aumento de frações consideradas de caráter aterogênico, como a fração CT e TG, além da redução dos níveis séricos de HDL, considerada de caráter anti-aterogênico (Behrens et al., 1999; van Leth et al., 2004).

Ao contrário do regime terapêutico contendo IP, que está associado com o aumento de CT, LDL e TG, o regime baseado em uma terapia apenas com ITRN+ITRNN está associado a um aumento da HDL, ou seja, uma terapia com caráter menos aterogênico (Negredo et al., 2004; van Leth et al., 2004; Fisac et al., 2005).

Alguns estudos sugerem que a própria infecção pelo HIV-1 reduz os níveis séricos de HDL (Riddler et al., 2008; Rose et al., 2008), e relacionam a replicação viral e seu processo de liberação de partículas virais infectantes com a quebra de colesterol das membranas plasmáticas, além de inferir sobre o papel de partículas virais como a *nef* no influxo de colesterol de macrófagos (Mujawar et al., 2006).

O papel da HDL como partícula anti-aterogênica, protegendo contra doenças cardiovasculares é bem documentado, e tem sido associado com um melhor curso da infecção pelo HIV, ao passo que se sugere que o acompanhamento contínuo dos níveis séricos de HDL possa ajudar na identificação de sujeitos com risco para doenças cardíacas (Alonso-Villaverde et al., 2003; Ansell et al., 2003).

Os níveis séricos alterados de TG podem ser encontrados em estágios avançados da infecção pelo HIV-1 e naqueles indivíduos que apresentam um grau elevado de imunossupressão, caracterizando assim um estado de ativação imune em indivíduos sem TARV (Midvan et al., 1992; Torriani et al., 2008).

As elevações dos níveis séricos de TG são observadas em processos infecciosos, e ocorrem possivelmente pela redução do *clearance*

das lipoproteínas circulantes, como resultado da diminuição da lipoproteína lipase, ou ainda pelo estímulo da síntese de lipídios hepáticos, pelo aumento da síntese de ácidos graxos hepáticos ou da reesterificação dos ácidos graxos provenientes da lipólise (Grunfeld et al., 1992).

As altas concentrações de TG decorrentes da redução do *clearence* de lipoproteínas são muito evidenciadas quando da redução da HDL. A HDL tem sido evidenciada como um elemento importante no curso das infecções (Grunfeld et al., 1992), uma vez que esta envolvida no transporte reverso de colesterol (Noto et al., 2001). A HDL possui um importante papel, pois colabora com o sistema imune inato não-específico ao exercer ação antioxidante, resultado de sua associação às enzimas PON, LCAT e glutationa seleno-peroxidase (GPX) (Mackness et al., 1999; Alonso-Villaverde et al., 2003). Assim, alterações nos níveis séricos de HDL acarretam alterações nos níveis séricos de TG, como já evidenciado por diferentes estudos (Grunfeld et al., 1992; Noto et al., 2001).

Nos grupos tratados com ITRN+ITRNN e IP, níveis séricos elevados de TG foram observados, achado concordante aos resultados obtidos por outros trabalhos (Grunfeld et al., 1991; Dubé et al., 2005; Backer et al., 2010).

Whol et al. (2008), e Currier et al. (2008), estudaram a dislipidemia em infectados pelo HIV-1, e demonstraram a ocorrência de altos níveis de TG e redução dos níveis séricos de HDL e LDL, quando comparados com indivíduos soronegativos. A presença de hipertrigliceridimia é comum em indivíduos que fazem uso de IP, particularmente naqueles indivíduos que

utilizam altas doses de ritonavir (Mary-Krause et al*.,* 2003; Stein et al., 2003; Tarr et al., 2010).

Entretanto, a tendência de um IP específico causar elevação dos níveis de TG é variável. A terapia composta por lopinavir/ritonavir tem apresentado um impacto negativo expressivo sobre o metabolismo lipídico, acarretando uma elevação significativa de triglicérides e uma redução de HDL (Eron et al., 2010; Mills et al., 2009). Por sua vez, a terapia com indinavir/ritonavir parece apresentar um menor impacto sobre o metabolismo lipidico, contudo, também tem um potencial de elevar os níveis séricos de TG e CT, e reduzir os níveis de HDL (Dragsted et al., 2003).

Diante destas evidências, as possíveis alternativas de uma terapia composta por IP, com menor impacto sobre o metabolismo lipídico, tem sido o uso do IP atazanavir, que usualmente é associado às baixas doses de ritonavir (Murphy et al., 2003; Noor et al., 2004), e o tratamento com darunavir/ritonavir. Ambas parecem afetar menos o metabolismo lipidico de indivíduos soropositivos (Noor et al., 2004; Mills et al., 2009).

Neste estudo, o grupo tratado com IP, 54 (64%) dos indivíduos faziam uso da associação dos inibidores lopinavir/ritonavir, 14 (17%) indivíduos faziam uso de ITRN+ritonavir, e 16 (19%) usavam a associação ritonavir/atazanavir. Neste grupo, os níveis séricos de CT do grupo tratado com ritonavir/atazanavir foram significativamente inferiores aos níveis do grupo tratado com lopinavir/ritonavir. Estes resultados mostram que a maior parte dos indivíduos tratados, fazia uso de lopinavir/ritonavir, o que poderia explicar, em parte, as alterações observadas no perfil lipídico.

Uma observação sobre os resultados obtidos, é que, mesmo sendo observadas alterações significativas apenas nos níveis séricos de HDL do grupo tratado com IP, nos demais grupos de soropositivos, um número elevado de indivíduos também apresentou alterações em seus níveis de HDL. A mesma observação pode ser feita para os parâmetros CT e LDL, que mesmo não apresentando diferenças significativas quando comparados ao grupo de soronegativos, apresentou um número considerável de indivíduos com concentrações elevadas em ambas as frações.

Um reflexo direto destes resultados é apresentado pela relação entre os níveis séricos de CT:HDL e LDL:HDL, que caracteriza o índice de risco aterogênico nos indivíduos soropositivos para o HIV-1. Estas relações CT:HDL e LDL:HDL são importantes parâmetros definidores de risco para doenças cardiovasculares de caráter aterogênico (Panagiotakos et al., 2003; Hsia, 2006; Millián et al., 2009).

O uso das relações TC:HDL e LDL:HDL como indicadores de risco aterogênico são bem estudadas. Os índices de risco aterogênico, por sua vez, caracterizam bem o risco aterogênico, e emergem como potenciais preditores metabólicos de doenças cardiovasculares, sendo eficientes indicadores da aterogênese lipídica, ao refletirem o balanço do transporte de colesterol na artéria íntima (Millán J et al., 2009; Rodríguez-Morán et al., 2012; Yildiz et al., 2012), São mais importantes que a avaliação de lipoproteínas de maneira isolada (Castelli et al., 1983; Sharma, Baliarsingh, 2012).

Neste estudo, o grupo tratado com IP em ambas as relações apresentou um índice significativamente superior aos demais grupos estudados, $p < 0,05$, mostrando que as alterações observadas nos níveis séricos de CT, LDL e HDL acarretaram um risco aterogênco evidente em pacientes soropositivos para o HIV-1, principalmente naqueles usuários de IP.

Estrada et al. (2011), mostraram que indivíduos soropositivos para o HIV-1 apresentavam um maior risco cardiovascular quando avaliada a relação CT:HDL, e que este risco fora mais evidente em indivíduos do sexo feminino. Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira et al. (2006), que demonstraram através do estudo da relação CT:HDL, que indivíduos usuários de ITRN+ITRNN apresentam melhores níveis séricos de HDL e menor risco para doenças ateroscleróticas.

A avaliação sobre a correlação entre os níveis séricos de CT, LDL, HDL e TG, com os marcadores da infecção, quando avaliados conjuntamente a todos os resultados, não demonstrou resultados significativos, com exceção dos níveis de HDL do grupo tratado com ITRN+ITRNN, que apresentaram uma correlação negativa significativa, $p < 0,05$. Esses resultados demonstram que, neste grupo, a manutenção dos valores de T-CD8+, associada aos valores de T-CD4+, poderia estar caracterizando um estado imunológico com menor estresse oxidativo, propiciando um aumento dos níveis séricos de HDL (Allard et al., 1998; Treitinger et al., 2000).

Além de alterações nos níveis séricos das lipoproteínas, também se evidenciam alterações nos níveis séricos de apolipoproteínas em indivíduos soropositivos para o HIV-1 (Podzamczer et al., 2011; Sankatsing et al., 2009).

Nos grupos estudados, os resultados mostraram que os níveis séricos de ApoA1 foram significativamente inferiores naqueles indivíduos soropositivos usuários de IP, quando comparados aos grupos de soronegativos e tratados com ITRN+ITRNN, os níveis séricos de ApoB100, por sua vez, foram significativamente superiores neste mesmo grupo IP. Estes resultados evidenciam que o grupo tratado com ITRN+ITRNN apresentou um perfil menos aterogênico que o grupo tratado com IP, quando da avaliação da relação entre as apolipoproteínas e o perfil lipidico de indivíduos soropositivos para o HIV-1.

Resultados semelhantes foram observados em estudos comparando a terapia composta por ITRN+ITRNN com a terapia com IP, mostrando que em indivíduos soropositivos tratados com IP, há uma redução dos níveis séricos de ApoA1 e de HDL, acarretando assim um maior risco para doenças cardiovasculares (Friis-Moller et al., 2003; Grinspoon, Carr, 2005).

Sankatsing et al. (2011) mostraram que em 130 indivíduos soropositivos tratados por um período de dois anos, com carga viral indeterminada, a terapia com IP apresentou um maior risco para doenças cardiovasculares quando comparados ao tratamento com ITR+ITRNN. Observaram, ainda, que no grupo tratado com IP houve uma redução dos níveis séricos de ApoA1 e de HDL, e um aumento da espessura da camada íntima da carótida.

Em indivíduos virgens de terapia, e que iniciam TARV com nevirapina ou efavirenz, os níveis séricos de ApoA1 e HDL aumentaram de forma que a posterior introdução de um IP resultou em redução dos níveis séricos de ambas (van der Valk et al., 2001; Tashima et al., 2003; Negredo et al., 2004). Estudo realizado por Franssen et al. (2001) mostrou que o uso do ITRNN nevirapina propiciou um aumento dos níveis séricos de ApoA1 e de HDL. No grupo ITRN+ITRNN, um total de 9 (20%) indivíduos fazia uso de nevirapina e 32 (71%) indivíduos utilizaram efevirenz, o que poderia justificar o achado de um melhor perfil lipídico e menor risco aterogênico.

O aumento dos níveis séricos de ApoB100 observado no grupo tratado com IP, apresentou uma significativa diferença em relação ao grupo tratado com ITRN+ITRNN. Petit et al. (2003), mostraram que em indivíduos tratados com IP, os níveis séricos de ApoB-IDL e ApoB-VLDL estavam significativamente superiores aos do grupo tratado com ITRN+ITRNN, concluindo que a terapia com IP está associada ao aumento de ApoB100 e ao maior risco cardiovascular.

De Carvalho et al. (2010), concluíram que os níveis séricos elevados de ApoB100 constituem um parâmetro adequado para avaliar distúrbios lipídicos em soropositivos para HIV-1, principalmente quando associados a altos níveis séricos de TG e LDL. A associação entre ApoB100 e TG caracterizaria um alto risco cardíaco nesses indivíduos, corroborando assim com as observações e os resultados aqui observados. Assim como Sankatsing et al. (2011), Badiou et al. (2008) mostraram uma relação entre o

aumento dos níveis séricos de ApoB100, LDL, e TG, a um aumento da camada íntima da carótida.

Os níveis séricos das ApoA1 e ApoB100 são reconhecidamente bons parâmetros para avaliação da dislipidemia e risco cardíaco, apresentando-se alterados nos indivíduos soropositivos, principalmente naqueles usuários de inibidores de protease (Currier et., 2003; Currier et al., 2008).

No que concerne as alterações nas lipoproteínas e apolipoproteínas em indivíduos soropositivos para o HIV-1, é consensual que a redução dos níveis séricos de HDL e ApoA1 apresenta impacto sobre o risco aterogênico nestes pacientes. A redução da HDL implica em um maior processo de oxidação da LDL, um dos principais fatores aterogênicos (Aviram et al., 1998; Stein et al., 2003; Ronchini et al., 2004)

As modificações oxidativas da LDL são observadas em diversos processos patológicos, e incluem mecanismos de metilação, acetilação e mais comumente, alterações geradas pelo estresse oxidativo. As alterações induzidas por oxidação, associadas às mudanças enzimáticas subsequentes resultam em uma partícula de LDL completamente oxidada e degradada (Noto et al., 2001; Mackness et al., 1993),

As modificações oxidativas da LDL, consideradas como evento inicial na patogênese da aterosclerose (Matsuura et al., 2008), são atribuídas aos mecanismos de estresse oxidativo iniciados por agentes, tais como superóxido, óxido nítrico e peróxido de hidrogénio, que transformam LDL em LDL oxidada (oxLDL) (Kadár, Glasz, 2001). A deposição de oxLDL na

camada da íntima arterial promove um efeito citotóxico sobre o endotélio vascular, seguido de inflamação e modificação de monócitos em macrófagos que fagocitam partículas oxLDL para formar as células espumosas, *foam cells*, que se acumulam na íntima e geram a formação de placas ateromatosas (Navab et al., 2004; Stocker, Keaney, 2004). As partículas oxLDL são imunogénicas e anticorpos anti-oxLDL presentes no soro podem ser utilizados como indicadores de estresse oxidativo (Faviou et al., 2005; Suzuki et al., 2004). Os anticorpos do isotipo IgG contra oxLDL são considerados pró-aterogênicos e podem predizer a progressão da aterosclerose coronária e carótida, enquanto o isotipo IgM anti-oxLDL parece estar associado a um possível papel de proteção contra o desenvolvimento de placas ateromatosas (Chou et al., 2008; Mertens et al*.,* 2003).

Assim como os níveis de TG e ApoB100, os níveis séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL também se apresentaram significativamente elevados nos grupos de soropositivos na comparação com o grupo de soronegativos, caracterizando assim, um maior risco para doenças cardiovasculares nestes indivíduos soropositivos para o HIV-1 . Por sua vez, o grupo tratado com IP apresentou níveis significativamente maiores de anticorpos IgG anti-oxLDL que o grupo tratado com ITRN+ITRNN.

Em indivíduos soropositivos, altas concentrações de oxLDL são associadas às manifestações clínicas de aterosclerose (Duong et al*.,* 2006). Estudo avaliando o processo aterosclerótico sub-clínico em 187 indivíduos soropositivos para o HIV-1, realizado por Parra et al. (2010a), ao observar níveis séricos elevados de anticorpos anti-oxLDL, acompanhados por

elevados níveis séricos de CT, TG e LDL, interleucina-6 e proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1), demonstraram que estes indivíduos apresentaram maior risco para doenças cardiovasculares, em parte pelo seu estado de estresse oxidativo e inflamatório.

Os níveis séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL são maiores em pacientes com doença cardiovascular (Medeiros et al., 2010). Em indivíduos infectados pelo HIV-1, níveis elevados de anticorpos IgG anti-oxLDL, sugere-se, estariam associados a diferentes graus de distúrbios do metabolismo lipídico, estando, assim relacioandos ao maior risco para doenças cardiovasculares (Parra et al., 2010a).

Os resultados obtidos neste estudo, corroboram aos achados da literatura, que mostram que em indivíduos soropositivos a presença de níveis séricos elevados de anticorpos IgG anti-oxLDL está associado à dislipidemia e ao maior risco para doenças cardiovasculares.

As alterações do metabolismo lipídico descritas aqui, com uma dislipidemia caracterizada por um aumento dos níveis de TG, ApoB100 e anticorpos IgG anti-oxLDL, e redução da fração HDL, principal carreador para a ação de PON1, levou-nos a investigar a atividade enzimática de PON1, mais conhecida e pesquisada até o momento, e a determinar os polimorfismos e as frequências alélicas da PON1 192QR e PON1 55LM.

O estudo de defeitos genéticos por genotipagem, assim como das alterações fenotípicas, determinada por alterações da atividade, dos níveis séricos de determinada proteína, e/ou análise de anormalidades na proteína ou na via envolvida, quanto pelo estudo do genótipo, através da avaliação

direta do DNA do paciente, são importantes ferramentas de análise (Crookston et al., 1998). A técnica de genotipagem consiste em um método rápido, sensível e confiável para a grande maioria das situações em que se necessite avaliar a presença ou ausência de uma alteração genética. Também a determinação da atividade de PON1 empregando-se o paraoxon é relatada como a forma mais comumente empregada para se avaliar a ação da enzima no soro (Mackness et al., 2001).

A determinação da atividade sérica paraoxonase da PON1, empregando-se o substrato paraoxon, e da atividade sérica arilestearase, com o substrato fenilacetato, é relatada como a forma mais comumente empregada para se avaliar a ação desta enzima no soro (Mackness et al., 2001; La Du, 1992). Além do efeito sobre a taxa de hidrólise de diferentes substratos, a atividade da PON pode sofrer influência de polimorfismos genéticos, como a que ocorre na troca de aminoácidos observada no polimorfismo PON1 192QR (Brophy et al., 2000 Richter et al., 2008).

O resultado da determinação da atividade paraoxonase da PON1 sérica nos grupos de soropositivos apresentou médias significativamente inferiores ao grupo de soronegativos, porém, a atividade arilestearase não apresentou diferenças entre os grupos estudados. Contudo, foi observada uma correlação positiva significativa entre atividade sérica paraoxonase da PON1 e os níveis séricos de HDL no grupo tratado com ITRN+ITRNN. O mesmo ocorreu com a atividade sérica da arilestearase, que apresentou uma correlação positiva significativa com os níveis séricos de HDL do grupo

sem TARV e do grupo tratado com ITRN+ITRNN, assim como, com os níveis de CT do grupo tratado com ITRN+ITRNN.

A PON1 humana, como descrito anteriormente, esta associada a fração HDL (Tomas et al., 2004). É uma lactonase que possui a capacidade de hidrolisar compostos organofosforados e ésteres de ácido carboxílico, como o paraoxon e o fenilacetato (Khersonsky, 2005; Richter et al., 2008). A PON1 é uma enzima antioxidante, altamente efetiva na prevenção da peroxidação lipidica de partículas LDL, e apresenta papel anti-aterogênico (Mackness, 1993; Bhattacharyya et al., 2008).

Neste estudo, a atividade arilestearase não mostrou alterações significativas na comparação entre os grupos, e a atividade paraoxonase foi significativamente inferior no grupo tratado com IP e no grupo sem TARV.

Em estudo realizado por Parra et al. (2006) em pacientes infectados pelo HIV-1, foram observadas alterações na atividade e concentração de PON1. Neste estudo, a atividade da enzima mostrou-se diminuída e a concentração aumentada, sugerindo que estes achados poderiam ser explicados por uma maior ligação de radicais livres à PON1, com consequente diminuição de sua atividade na circulação e/ou, pelas menores concentrações de HDL e ApoA1, dificultando o ancoramento da PON 1 à lipoproteína, bem como, por alterações hepáticas que influenciariam a concentração sérica da PON1 (Sinan et al., 2006).

Navab et al. (1997), mostraram que indivíduos com doença coronariana apresentavam níveis de atividade reduzidos da PON1 em

relação a um grupo de indivíduos saudáveis, mesmo estes grupos possuindo níveis séricos de HDL semelhantes.

Em indivíduos soropositivos para o HIV-1, a atividade sérica da PON1 pode estar reduzida, e certos polimorfismos genéticos estão relacionados à atividade e à concentração desta enzima, além de estarem associados a um processo aterosclerótico, possivelmente sub-clínico (Coll et al., 2007; Parra et al., 2010b).

A avaliação sobre a associação entre a atividade sérica da paraoxonase e da arilestearase, com o número de linfócitos T-CD4+, estratificados em menor que 200 células/mm^3, 200 a 350 células/mm^3, e maiores que 350 células/mm^3, não demonstrou relação com o número de linfócitos T-CD4. Esses resultados são provavelmente decorrentes do estado imunológico dos pacientes tratados, que apresentaram em todos os grupos um número de linfócitos T-CD4+ dentro dos valores de referência.

A atividade sérica da PON1 tem sido associada à gravidade da infecção, porém, os estudos mostram que a enzima apresenta níveis reduzidos em pacientes não tratados que apresentam reduzido número de linfócitos T-CD4+ (Pereira et al., 2006; Pereira et al., 2009; Parra et al., 2010). Assim, pode-se afirmar que existe uma forte relação entre o número de linfócitos e a atividade paraoxonase, que está diretamente ligada ao melhor curso da infecção pelo HIV (Allard et al., 1998; Treitinger et al., 2000).

No grupo tratado com ITRN+ITRNN as atividades séricas da paraoxonase e arilestearase mostraram correlação positiva com a fração HDL, e a atividade arilestearase com os níveis séricos de HDL no grupo sem

TARV, assim como com os níveis de CT no grupo tratado com IP. Estes resultados mostram que o grupo tratado com ITRN+ITRNN apresentou uma melhor relação entre a atividade paraoxonase e arilestearase com os níveis de HDL, provavelmente porque estes indivíduos recebem regimes compostos por ITRNN, como efavirenz e nevirapina, e apresentariam, assim, menor risco cardíaco, associado a uma maior atividade da paraoxonase (James, 2004; Holvoet, 2008).

A redução da atividade paraoxonase é correlacionada ao estresse oxidativo em indivíduos soropositivos não tratados com TARV, sendo que o emprego de TARV composta por ITRN+ITRNN altera este estado, propiciando uma elevação na atividade paraoxonase, e caracterizando, assim, uma diminuição nas concentrações de partículas oxidadas de LDL (Masiá et al., 2007)

Portanto, os resultados descritos neste estudo e pela literatura, sugerem uma predominância de alterações do metabolismo lipídico em indivíduos soropositivos para o HIV-1, principalmente naqueles tratados com IP, assim como alterações da atividade da PON1 que estariam associadas à infecção pelo HIV-1.

Em adição, alterações da atividade paraoxonase também podem estar relacionadas aos diferentes polimorfismos da PON1. No total de 174 indivíduos soropositivos, foram identificados 90 (53,5%) indivíduos com genótipo 192QQ, 61 (36,3%) com genótipo 192QR e 17 (10,2%) indivíduos identificados como possuidores de genótipo 192RR .

No grupo composto pelos 46 indivíduos soronegativos, em 28 (60,8%) deles foi detectado o genótipo PON1 192QQ, em 17 (36,9%) o genótipo PON1 192QR e em 1 (2,3%) indivíduo o genótipo PON1 192RR .

A frequência para o alelo PON1 192R no grupo de soropositivos foi de 28,3% (n = 95), e para o alelo PON1 192Q foi 71,7% (n = 241). Para a PON1 55LM, as frequências foram de 53,4 % (n = 172) para o alelo PON1 55M e 46,5% (n = 150) para o alelo PON1 55L. Estes resultados mostram que não houve diferenças em relação aos possíveis genótipos de PON1 192QR nos grupos de soropositivos e soronegativos.

Estes resultados nas distribuições alélicas são semelhantes aos observados em populações da Itália Central (Scacchi et al., 2003; Leus et al., 2001), Turquia (Ayanacioglu et al., 1999) e em etíopes (Scacchi et al., 2003), bem como com estudos em brasileiros (Allebrandt et al., 2002; Oliveira et al., 2004), mas não em indivíduos chineses (Zhang et al., 2006).

O estudo do genótipo PON1 55LM no grupo de soropositivos mostrou a seguinte distribuição: 50 (29,7%) indivíduos com genótipo PON1 55LL, 60 (35,7%) com genótipo PON1 55LM e 59 (34,6%) com o genótipo PON1 55MM. Dentre os indivíduos soronegativos, 13 (28,2%) foram identificados como portadores do genótipo PON1 55LL, 16 (34,7%) como heterozigotos (PON1 55LM) e outros 17 (36,9%), com genótipo PON1 55MM. As frequências alélicas determinadas para os alelos PON1 55L e PON1 55M foram de 46,5% e 53,4%, respectivamente, no grupo de soropositivos, e de 45,7% para o alelo PON1 55L e 54,3% para o alelo M dentre os soronegativos para o HIV-1. Não foi observada diferença na distribuição dos genótipos de PON1 55LM entre os grupos avaliados.

As distribuições alélicas se assemelham àquelas observadas em populações da Holanda (Leus et al., 2001), Turquia (Ayanacioglu et al., 1999), Chile (Acuna et al., 2004) e Brasil (Oliveira et al., 2004), diferindo de

estudos realizados em tailandeses, chineses (Zhang et al., 2006; Phuntuwate et al., 2005).

Não se observou uma relação entre os genótipos de PON1 192 e/ou PON1 55 com a atividade enzimática de PON1 e da arilestearase, nos grupos avaliados, o que é concordante com os achados de Charlton-Menys et al. (2006). Níveis séricos de CT, LDL, HDL e TG também não apresentaram relação com os genótipos da PON1 192QR e PON1 55LM.

Fatores genéticos, incluindo os polimorfismos, são associados a mais de 60% de variação fenotípica na atividade da PON1 (Rainwater et al., 2009), porém, fatores ambientais parecem modular a atividade da PON1, mostrando que não necessariamente os polimorfismos controlam a sua atividade (Brophy et al., 2001; Richter et al., 2008).

O polimorfismo 192QR não afeta as concentrações da PON1, entretanto, influencia sua atividade, e altas atividades da PON1 têm sido associadas ao alelo R, de modo que baixas atividades da PON1 e arilestearase têm sido encontradas para o genótipo QQ (Leviev et al., 2000; Brophy et al., 2001; Rainwater et al., 2009).

Para o polimorfismo PON1 55LM, o alelo L esta associado às altas concentrações da enzima PON1, assim como altas atividades são associadas aos indivíduos portadores do genótipo RR e LL, e alta atividade lactonase para o genótipo QQ (Rainwater et al., 2009). Com isso, diferentes isoenzimas codificadas pela PON1 192 têm apresentado diferentes funções antioxidantes (Mackness et al., 1998).

Uma menor atividade antioxidante tem sido associada ao alelo R na posição 192, que apresenta um menor efeito protetor contra a peroxidação lipídica (James et al., 2000). O alelo Q tem sido associado a um efeito antioxidante protetor contra a peroxidação lipidica, e está relacionado com altos níveis de HDL e ApoA1, e reduzidos níveis de TG, e assim, a uma melhor proteção contra o desenvolvimento da aterosclerose (Mackness, 1998; Parra et al., 2010).

Como descrito na literatura, os alelos da PON1 192QR estão associados aos níveis de HDL e ApoA1, com a presença da aterosclerose, e com o *status* imunológico (Parra et al., 2010), contudo, nossos resultados não apresentaram, como descrito, diferenças significativas nos parâmetros lipídicos quando associados aos polimorfismos PON1 192QR e PON1 55LM.

Por sua vez, é importante ressaltar que a sobrevida dos soropositivos para o HIV-1, é acompanhada por um processo infeccioso crônico e por tratamentos contínuos, com efeitos colaterais, expondo estes pacientes a situações complexas, multifatoriais e interrelacionadas como inflamação, aterosclerose e dislipidemia. Mais ainda, são observadas nestes indivíduos alterações importantes no metabolismo do colesterol e em suas frações, bem como nos triglicérides. Como exemplo, alterações genéticas, como polimorfismos na ApoC, também são associados ao aumento de TG em portadores e não portadores do vírus (Dammerman et al., 1993; Fauvel et al., 2001; Lai et al., 2005).

Além disso, sabe-se hoje que os lípides, especialmente o colesterol, são matéria-prima essencial ao vírus para garantir etapas importantes de

seu ciclo, como seu estabelecimento e replicação (Alonso-Villaverde et al., 2003). São ainda escassas as informações sobre a atividade, concentração e genótipos de PON1 em portadores do vírus e inexistem estudos abrangendo PON2 cuja ação proposta é controlar o estresse oxidativo intracelular, ou mesmo em PON3 em infectados pelo HIV-1.

Contudo, não apodemos desconsiderar a possibilidade de que a presença de um ou mais dos polimorfismos descritos, além da atividade diminuída de PON1, associada(s) à algum(ns) dos fatores supracitados, possam acarretar, ainda que indiretamente, em uma contribuição adicional ao desenrolar desta infecção.

7
Conclusões

Em conclusão, demonstramos que indivíduos soropositivos para o HIV-1 apresentaram alterações no metabolismo lipídico, principalmente nos tratados com inibidores de protease. Este mesmo grupo, adicionalmente, apresentou um maior índice de risco aterogênico e um maior grau de peroxidação lipídica, caracterizado por maiores níveis de anticorpos IgG anti-oxLDL. Entretanto, estas alterações não apresentaram relação com as atividades paraoxonase e arilestearase da enzima PON1, e com os polimorfismos PON1 192QR e 55LM da PON1, mostrando que além da própria infecção pelo HIV-1, a TARV influenciou nas alterações observadas.

8

Anexos

Anexo A

Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq)

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24/03/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1185/09**, intitulado: "**INDIVÍDUOS HIV+ TRATADOS COM INIBIDORES DE PROTEASE: O PAPEL DA UPA E DA ATIVIDADE DA PON-1 NAS DISLIPIDEMIAS E COMO MARCADORES DE PROGRESSÃO DA INFECÇÃO**", apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. SÉRGIO PAULO BYDLOWSKI**
Pesquisador (a) Executante: **DR. JOEL DA CUNHA**

CAPPesq, 25 de março de 2010

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
matc

Anexo B

Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró- Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos

CERTIFICADO *Nº 274*

O Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.°0584/GR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

APROVADO

PROCESSO: 289/09 **FR- 277501**

TÍTULO: Indivíduos HIV+ tratados com inibidores de protease: O papel da uPA e da atividade da PON-1 nas dislipidemias e como marcadores de progressão da infecção.

AUTOR: Sérgio Paulo Bydlowski, Celso Spada e Joel da Cunha.

DPTO.: CCS/UFSC

FLORIANÓPOLIS, 31de agosto de 2009.

Coordenador do CEPSH/UFSC - Prof.° Washington Portela de Souza

Anexo C

Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - CAPPesq-HCFMUSP

Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentado aos indivíduos voluntários soropositivos para o HIV-1.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE .:..... .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M □ F □
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M □ F □
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO:..... Nº ..... APTO:.....
BAIRRO:..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Indivíduos HIV+ tratados com inibidores de protease: O papel da uPA e da atividade da PON-1 nas dislipidemias e como marcadores de progressão da infecção.

2. PESQUISADOR: Joel da Cunha

CARGO/FUNÇÃO: Pós-graduando INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº : CRF/SC 4365

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Imunologia Clínica e Alergia

UNIDADE DO HU-UFSC: Departamento de Análises Clínicas (Imunologia e Hemaologia)

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO □ RISCO MÍNIMO **X** RISCO MÉDIO □

RISCO BAIXO □ RISCO MAIOR □

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como conseqüência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 03 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa; **2**. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; **3**. Desconfortos e riscos esperados; **4**. Benefícios que poderão ser obtidos; **5**. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

1. Este estudo está sendo realizado em pacientes portadores do vírus HIV/AIDS, acompanhados pelos médicos infectologistas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC), em parceria com o departamento de Imunologia Clínica e Alergia do HCFMUSP; nós estudaremos as alterações nas "gorduras" de seu sangue (colesterol, triglicérides e frações de lipoproteínas), as células do seu sangue (hemácias, leucócitos, plaquetas), e o vírus que está no sangue. Também serão estudadas diferentes substâncias "protetoras" destas "gorduras do sangue", chamado paraoxonase, e uma outra substância chamada ativador de plasminogênio-tipo uroquinase, que ajuda na "produção" da gordura. Estas substâncias podem sofrer mudanças por causa da doença. É importante conhecer o quanto destas alterações acontecem, porque elas podem fazer com que a gordura do sangue comece a se depositar na parede das artérias ("veias"), o que pode provocar outras complicações e outras doenças (como por exemplo, infarto do coração).

2. Para isto, teremos de realizar os seguintes testes laboratoriais: pesquisa do "protetor de gorduras" e do "causador de gorduras" no seu sangue, dosagens das gorduras do sangue (colesterol, triglicérides, e frações de lipoproteínas), a capacidade destas gorduras em serem modificadas por substâncias conhecidas no laboratório, a quantidade de células e substâncias de defesa do seu sangue (imunoglobulinas), as "células afetadas" do sangue (células mononucleares) e quantidade de vírus.

3. O sangue necessário para fazer estes testes de laboratório será coletado uma única vez. Assim, os desconfortos e riscos serão mínimos, sendo apenas os de uma coleta de amostra de sangue.

4. O(A) senhor(a) não terá nenhum benefício imediato, mas estará ajudando uma pesquisa científica que, no futuro, poderá ajudar outras pessoas que tenham a mesma doença.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Serão dadas, a qualquer tempo, informações sobre os testes de laboratório, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer qualquer dúvida. Em caso de dúvida ou informações sobre a pesquisa, favor entrar em contato com Joel da Cunha, no telefone (48) 3721-9712 / 9989-1961, ou ainda do Prof. Dr. Celso Spada, no telefone (48) 3721-9712 / 99732656. Ambos estão disponíveis no Hospital da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC)

2. O paciente poderá retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto lhe traga qualquer prejuízo. Caso o senhor não queira participar do estudo, terá total liberdade de desistir do estudo, a qualquer momento, sem prejuízo do seu acompanhamento médico.

3. Haverá confidencialidade, sigilo e privacidade sobre as informações e resultados de exame. Seus dados pessoais e resultados de exames serão guardados de forma sigilosa, deixando a sua privacidade assegurada.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

4. Haverá assistência no HU-UFSC, por eventuais danos à saúde, devidos a pesquisa. Está garantida assistência médica nos Serviços de infectologia do HU-UFSC, conforme vínculo pré-existente do paciente com o HU-UFSC, caso ocorram problemas de saúde decorrentes da pesquisa.

5. Possibilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa. Como o único sofrimento que o(a) senhor(a) vai ter será o da picada da agulha para coletar a amostra de sangue (tubo sem anticoagulante e tubo com anticoagulante), e sendo o risco desta coleta mínimo, não está prevista indenização.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Prof. Dr. Celso Spada - Hospital Universitário (HU-UFSC): Depto. Análises Clínicas (Imunologia e Hematologia). Bairro Trindade - Florianópolis - Fone: (48) 3721-9712 / 9973-2656.

Joel da Cunha, M.Sc. – Hospital Universitário (HU-UFSC): Depto. Análises Clínicas (Imunologia e Hematologia). Bairro Trindade - Florianópolis - Fone: (48) 3721-9712 / 9989-1961.

Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski - Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 (PAMB) – 1 andar – sl 43 - fone: 3061-5544 r.264/ 3082-2398. São Paulo (SP)

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

Florianópolis, de de 20.....

_____ _____

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal — assinatura do pesquisador

Joel da Cunha
CPF: 81190514915

Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentado aos indivíduos voluntários SORONEGATIVOS para o HIV-1.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE .:..... .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO:..... CIDADE .....
CEP:.....TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: .....Nº ..... APTO: .....
BAIRRO:..... CIDADE: .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Indivíduos HIV+ tratados com inibidores de protease: O papel da uPA e da atividade da PON-1 nas dislipidemias e como marcadores de progressão da infecção.

2. PESQUISADOR: Joel da Cunha

CARGO/FUNÇÃO: Pós-graduando INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº : CRF/SC 4365

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Imunologia Clínica e Alergia

UNIDADE DO HU-UFSC: Depto. de Análises Clínicas (Imunologia e Hematologia)

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO **X** RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como conseqüência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 03 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa; **2**. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; **3**. desconfortos e riscos esperados; **4**. benefícios que poderão ser obtidos; **5**. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

2. A amostra de seu sangue que será coletada faz parte de uma etapa de um estudo que vem sendo realizado em pacientes portadores do vírus HIV/AIDS. **Sendo o(a) senhor(a) uma pessoa saudável**, estaremos estudando as mudanças nas gorduras de seu sangue (colesterol, triglicérides e frações de lipoproteínas), as células do seu sangue e substâncias "boas" e "ruins" para compararmos com o grupo de pacientes com HIV/AIDS. Este estudo é importante para conhecermos o quanto destas mudanças acontecem no portador de HIV/AIDS, já que elas podem fazer com que a gordura do sangue comece a se depositar na parede das artérias ("veias"). Ainda, como o tratamento pode "prejudicar" a produção de gorduras e provocar outras complicações e outras doenças (como por exemplo, infarto do coração) que podem piorar o estado de saúde destes pacientes. Ao aceitar participar do estudo, o(a) senhor(a) responderá à perguntas simples sobre a cor de sua pele e sua idade. Também perguntaremos de fuma, uma vez que o fumo altera a ação deste "protetor de gordura". Todas estas questões são também para comparação com o outro grupo.

3. Serão realizados testes laboratoriais para pesquisar o "protetor de gorduras" no seu sangue, medir as gorduras do sangue (colesterol, triglicérides, e frações de lipoproteínas) e a capacidade destas gorduras em serem modificadas por substâncias conhecidas no laboratório. Também será avaliando a quantidade de células e substâncias de defesa do seu sangue.

4. O sangue para estes testes será coletado só uma vez, junto com as amostras coletadas na sua doação para fazer os exames da sua bolsa de sangue. Assim, os desconfortos e riscos serão mínimos, sendo os mesmos da sua doação de sangue. Será utilizada a mesma picada feita em seu braço para a doação de sangue, não havendo outra picada de agulha em seus braços e nem outros pedidos de novas amostras de sangue ao senhor.

5. O(A) senhor(a) não terá nenhum benefício imediato, mas estará ajudando uma pesquisa científica que, no futuro, poderá ajudar outras pessoas.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Serão dadas, a qualquer tempo, informações sobre os testes de laboratório, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer qualquer dúvida. Em caso de dúvida ou informações sobre a pesquisa, favor entrar em contato com Joel da Cunha, no telefone (48) 3721-9712 / 9989-1961, ou ainda do Prof. Dr. Celso Spada, no telefone (48) 3721-9712 / 99732656. Ambos estão disponíveis no Hospital da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC)

2. O senhor terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade de assistência.

3. Haverá confidencialidade, sigilo e privacidade sobre as informações e resultados de exame. Seus dados pessoais e resultados de exames serão guardados de forma sigilosa, deixando a sua privacidade assegurada.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

4. Haverá assistência no HU-UFSC, por eventuais danos à saúde, devidos a pesquisa. Está garantida assistência médica nos Serviços do HU-UFSC, caso ocorram problemas de saúde decorrentes da pesquisa.

5. Possibilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa. Como o único sofrimento que o(a) senhor(a) vai ter será o da picada da agulha para coletar a amostra de sangue (tubo sem anticoagulante e tubo com anticoagulante), e sendo o risco desta coleta mínimo, não está prevista indenização.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Prof. Dr. Celso Spada - Hospital Universitário (HU-UFSC): Depto. Análises Clínicas (Imunologia e Hematologia). Bairro Trindade - Florianópolis - Fone: (48) 3721-9712 / 9973-2656.

Joel da Cunha, M.Sc. – Hospital Universitário (HU-UFSC): Depto. Análises Clínicas (Imunologia e Hematologia). Bairro Trindade - Florianópolis - Fone: (48) 3721-9712 / 9989-1961.

Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski - Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 (PAMB) – 1 andar – sl 43 - fone: 3061-5544 r.264/ 3082-2398. São Paulo (SP)

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

Florianópolis (SC), de de 20...

_____ _____

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal — assinatura do pesquisador

Joel da Cunha
CPF: 81190514915

Anexo D

Tabelas com as características gerais e resultados individuais para todos os parâmetros avaliados nos grupos estudados

9

Referências bibliográficas

Agachan B, Yilmaz H, Karaali Z, Isbir T. Paraoxonase 55 and 192 polymorphism and its relationship to serum paraoxonase activity and serum lipids in Turkish patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. Cell Biochem Funct. 2004;22(3):163-8.

Aiello RJ, Brees D, Bourassa PA, Royer L, Lindsey S, Coskran T, Haghpassand M, Francone O. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002; 22:630-37.

Allard JP, Aghdassi E, Chau J, Tam C, Kovacs CM, Salit IE, Walmsley SL. Effects of vitamin E and C supplementation on oxidative stress and viral load in HIV-infected subjects. AIDS. 1998;12(13):1653-9.

Aldridge WN. Serum esterases 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. Biochem J. 1953;53:110-7.

Alonso-Villaverde C, Segues T, Coll-Crespo B, Perez-Bernalte R, Rabassa A, Gomila M, Parra S, Gozalez-Esteban MA, Jimenez-Exposito MJ, Masana L. High-density lipoprotein concentrations relate to the clinical course of HIV viral load in patients undergoing antiretroviral therapy. AIDS.

2003;17(8):1173-8.

Ansell BJ, Navab M, Hama S, Kamranpour N, Fonarow G, Hough G, Rahmani S, Mottahedeh R, Dave R, Reddy ST, Fogelman AM. Inflammatory/anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favourably affected by simvastatin treatment. Circulation. 2003;108:2751-6.

Assmann G, Nofer JR. Atheroprotective effects of High-Density Lipoproteins. Annu Rev Med. 2003;54:321-41.

Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases role in the prevention of cardiovascular diseases. Biofactors. 2009;35(1):98-104.

Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Erogul J, Hsu C, Dunlop C, La Du BN. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its arylesterase/paraoxonase activities: selective active of human paraoxonase alloenzymes Q and R. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998;10:1617-24.

Aviram M, Kaplan M, Rosenblat M, Fuhrman B. Dietary antioxidants and paraoxonases against LDL oxidation and atherosclerosis development. Handb Exp Pharmacol. 2005;170:263-300.

Aviram M. Does paraoxonase play role in susceptibility to cardiovascular disease? Mol Med Today. 1999;3:381-6.

Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. Free Radic Biol Med. 2004;37(9):1304-16.

Aynacioglu AS, Cascorbl I, Mrozikiewicz PM, Nacak M, Tapanyigit EE, Roots I. Paraoxonase 1 mutations in a turkish population. Toxicol Appl Pharmacol. 1999;157:174-7.

Badiou S, Thiebaut R, Aurillac-Lavignolle V, Dabis F, Laporte F, Cristol JP, Mercie P. Association of non-HDL cholesterol with subclinical atherosclerosis in HIV-positive patients. J Infect. 2008;57(1):47-54.

Bae JW, Guyer W, Grimm K, Altice FL. Medication persistence in the treatment of HIV infection: a review of the literature and implications for future clinical care and research. AIDS. 2011;25(3):279-90.

Baker J, Ayenew W, Quick H, Hullsiek KH, Tracy R, Henry K, Duprez D, Neaton JD. High-density lipoprotein particles and markers of inflammation and thrombotic activity in patients with untreated HIV infection. J Infect Dis. 2010;15;201(2):285-92.

Bassam BJ, Caetano-Annoles G, Gresshof PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal Biochem. 1991;196:80-3.

Behrens G, Dejam A, Schmidt H, Balks HJ, Brabant G, Körner T, Stoll M, Schmidt RE. Impaired glucose tolerance, beta cell function and lipid metabolism in HIV patients under treatment with protease inhibitors. AIDS. 1999;13:F63-70.

Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, Casazza JP, Koup RA, Picker LJ. Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. J Virol. 2001;75(24):11983-91.

Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5′ Regulatory-Region Polymorphisms on Paraoxonase-Gene (PON1) Expression. Am J Hum Genet. 2001;68(6):1428-36.

Brandão SA, Izar MC, Fischer SM, Santos AO, Monteiro CM, Póvoa RM, Helfenstein T, Carvalho AC, Monteiro AM, Ramos E, Gidlund M, Figueiredo Neto AM, Fonseca FA. Early increase in autoantibodies against human oxidized low-density lipoprotein in hypertensive patients after blood pressure control. Am J Hypertens. 2010;23(2):208-14.

Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5′ Regulatory-Region Polymorphisms on Paraoxonase-Gene (PON1) Expression. Am J Hum Genet. 2001;68(6):1428-36.

Buhmann KF, Accad M, Farese Jr RV. Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases. Biochim Biophys Acta. 2000;1529:142-54.

Campo S, Sardo AM, Campo GM, Avenoso A, Castaldo M, D'ascola A, Giunta E, Calatroni A, Saitta A. Identification of paraoxonase 3 gene (PON3) missense mutations in a population of southern Italy. Mutation Research. 2004;546:75-80.

Cannavo G, Paiardini M, Galati D, Cervasi B, Montroni M, De Vico G, Guetard D, Bocchino ML, Picerno I, Magnani M, Silvestri G, Piedimonte G. Abnormal intracellular kinetics of cell-cycle-dependent proteins in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus: a novel biologic link between immune activation, accelerated T-cell turnover, and high levels of apoptosis. Blood. 2001;97(6):1756-64.

Cao J, McNevin J, Malhotra MJ. Evolution of CD8+ T-cell immunity and viral scape following acute HIV-1 infection. J Immunol. 2003;171:3837-46.

Carr A, Ory D. Does HIV cause cardiovascular disease? PLoS Med.

2006;(11):e496.

Carr A, Cooper DA. Adverse effects of antiretroviral therapy. Lancet. 2000;356:1423-30.

CASTELLI WP, ABBOTT RD, MCNAMARA PM. SUMMARY ESTIMATES OF CHOLESTEROL USED TO PREDICT CORONARY HEART DISEASE. CIRCULATION. 1983;67(4):730-4.

Chaix C, Grenier-Sennelier C, Clevenbergh P, Durant J, Schapiro JM, Dellamonica P, Durand-Zaleski I. Economic evaluation of drug resistance genotyping for the adaptation of treatment in HIV-infected patients in the VIRADAPT study. J Acquir Immune Defic Syndr. 2000;24(3)227-31.

Charlton-Menys V, Liu Y, Durrington PN. Semi-automated method for determination of serum paraoxonase activity using paraoxon as substrate. Clin Chem. 2006;52(3):453-7.

Chen Q, Reis SE, Kammerer CM, McNamara DM, Holubkov R, Sharaf BL, Sopko G, Pauly DF, Merz CN, Kamboh MI. WISE Study Group Association between the severity of angiographic coronary artery disease and paraoxonase gene polymorphisms in the National Heart, Lung, and Blood Institute-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. Am J Hum Genet. 2003;72:13-22.

Chou MY, Hartvigsen K, Hansen LF, Fogelstrand L, Shaw PX, Boullier A, Binder CJ, Witztum JL. Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity. J Intern Med 2008;26:479-88.

Coll B, Parra S, Alonso-Villaverde C, Aragonés G, Montero M, Camps J, Joven J, Masana L. The role of immunity and inflammation in the progression of atherosclerosis in patients with HIV infection. Stroke. 2007;38:2477-84.

Constans J, Pellegrin JL, Peuchant E, Dumon MF, Pellegrin I, Sergeant C, Simonoff M, Brossard G, Barbeau P, Fleury H. Plasma lipids in HIV-infected patients: a prospective study in 95 patients. Eur J Clin Invest. 1994;24(6):416-20.

Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. Biochem Pharmacol. 2005:69:541-50.

Currier JS, Lundgren JD, Carr A, Klein D, Sabin CA, Sax PE, Schouten JT, Smieja M. Epidemiological evidence for cardiovascular disease in HIV-infected patients and relationship to highly active antiretroviral therapy. Circulation. 2008;118:e29-35.

Currier JS, Taylor A, Boyd F, Dezii CM, Kawabata H, Burtcel B, Maa JF,

Hodder S. Coronary heart disease in HIV-infected individuals. J Acquir Immune Defic Syndr. 2003; 33:506-12.

Dammerman M, Sandkuijl LA, Halaas JL, Chung W, Breslow JL. An apolipoprotein CIII haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3' untranslated region polymorphisms. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(10):4562-6.

Das UN. Essential fatty acids and acquired immunodeficiency syndrome. Med Sci Monit. 2005;11(6):RA206-11.

De Carvalho EH, Miranda Filho Dde B, Ximenes RA, de Albuquerque Mde F, de Melo HR, Gelenske T, Medeiros Zde B, Montarroyos U, Bandeira F. Prevalence of hyperapolipoprotein B and associations with other cardiovascular risk factors among human immunodeficiency virus-infected patients in Pernambuco, Brazil. Metab Syndr Relat Disord. 2010;8(5):403-10.

Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high-density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. J Biol Chem. 2000;275(43):33435-42.

Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2004;369:78-88.

Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. J Lipid Res. 2005;46(6):1239-47.

Dragsted UB, Gerstoft J, Pedersen C, Peters B, Duran A, Obel N, Castagna A, Cahn P, Clumeck N, Bruun JN, Benetucci J, Hill A, Cassetti I, Vernazza P, Youle M, Fox Z, Lundgren JD. Randomized trial to evaluate indinavir/ritonavir versus saquinavir/ritonavir in human immunodeficiency virus type 1-infected patients: the MaxCmin1 Trial. J Inf Dis. 2003;188(5):635-42.

Dubé MP, Cadden JJ. Lipid Metabolism in treated HIV Infection. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2011;25(3):429-42.

Dubé MP, Parker RA, Tebas P, Grinspoon SK, Zackin RA, Robbins GK, Roubenoff R, Shafer RW, Wininger DA, Meyer WA 3rd, Snyder SW, Mulligan K. Glucose metabolism, lipid, and body fat changes in antiretroviral-naive subjects randomized to nelfinavir or efavirenz plus dual nucleosides. AIDS. 2005;19:1807-18.

Dubé MP, Stein JH, Aberg JA, Fichtenbaum CJ, Gerber JG, Tashima KT,

Henry WK, Currier JS, Sprecher D, Glesby MJ. Guidelines for the evaluation and management of dyslipidemia in HIV-infected adults receiving antiretroviral therapy. Recommendations of the HIV Medical Association of the Infectious Disease Society of America and the Adult AIDS Clinical Trials Group. Clin Infect Dis. 2003;37:613-27.

Dubé MP, Lipshultz SE, Fichtenbaum CJ, Greenberg R, Schecter AD, Fisher SD. Effects of HIV infection and antiretroviral therapy on the heart and vasculature. Circulation. 2008;118(2):e36-40.

Duong M, Petit JM, Martha B, Galland F, Piroth L, Walldner A, Grappin M, Buisson M, Duvillard L, Chavanet P, Portier H. Concentration of circulating oxidized LDL in HIV-infected patients treated with antiretroviral agents: relation to HIV-related lipodystrophy. HIV Clin Trials. 2006;7(2):41-7.

Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and Atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001;21:473-80.

EGGER M, MAY M, CHÊNE G, PHILLIPS AN, LEDERGERBER B, DABIS F, COSTAGLIOLA D, D'ARMINIO MONFORTE A, DE WOLF F, REISS P, LUNDGREN JD, JUSTICE AC, STASZEWSKI S, LEPORT C, HOGG RS, SABIN CA, GILL MJ, SALZBERGER B, STERNE JA. PROGNOSIS OF HIV-1-INFECTED PATIENTS STARTING HIGHLY ACTIVE ANTIRETROVIRAL THERAPY: A COLLABORATIVE ANALYSIS OF PROSPECTIVE STUDIES. LANCET. 2002;360(9327):119-29.

Eron JJ, Young B, Cooper DA, Youle M, Dejesus E, Andrade-Villanueva J, Workman C, Zajdenverg R, Fätkenheuer G, Berger DS, Kumar PN, Rodgers AJ, Shaughnessy MA, Walker ML, Barnard RJ, Miller MD, Dinubile MJ, Nguyen BY, Leavitt R, Xu X, Sklar P. Switch to a raltegravir-based regimen versus continuation of a lopinavir-ritonavir-based regimen in stable HIV-infected patients with suppressed viraemia (SWITCHMRK 1 and 2): two multicentre, double-blind, randomised controlled trials. Lancet. 2010;375(9712):396-407.

Estrada V, Geijo P, Fuentes-Ferrer M, Garcia AML, Rodrigo M, Galindo MJ, et al. Dyslipidemia in HIV-infected women on antiretroviral therapy. Analysis of 922 patients from the Spanish VACH cohort. BMC Womens Health. 2011;11:36.

Fauvel J, Bonnet E, Ruidavets JB, Ferrieres J, Toffoletti A, Massip P, Chap H, Perret B. An interaction between apo C-III variants and protease inhibitors

contributes to high triglyceride/low HDL levels in treated HIV patients. AIDS. 2001;15(18):2397-406.

Faviou E, Vourli G, Nounopoulos C, Zachari A, Dionyssiou-Asteriou A. Circulating oxidized low density lipoprotein, autoantibodies against them and homocysteine serum levels in diagnosis and estimation of severity of coronary artery disease. Free Radic Res. 2005;39:419-29.

Fellay J, Boubaker K, Ledergerber B, Bernasconi E, Furrer H, Battegay M, Hirschel B, Vernazza P, Francioli P, Greub G, Flepp M, Telenti A. Swiss HIV Cohort Study. Prevalence of adverse events associated with potent antiretroviral treatment: Swiss HIV Cohort Study. Lancet. 2001;358(9290):1322-7.

Fisac C, Fumero E, Crespo M, Roson B, Ferrer E, Virgili N, Ribera E, Gatell JM, Podzamczer D. Metabolic benefits 24 months after replacing a protease inhibitor with abacavir, efavirenz or nevirapine. AIDS. 2005;19:917-25.

Franssen R, Sankatsing RR, Hassink E, Hutten B, Ackermans MT, Brinkman K, Oesterholt R, Arenas-Pinto A, Storfer SP, Kastelein JJ, Sauerwein HP, Reiss P, Stroes ES. Nevirapine increases high-density lipoprotein cholesterol concentration by stimulation of apolipoprotein A-I production. Arterioscler thromb Vasc Biol. 2009;29(9):1336-41.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972;18:499-02.

Friis-Moller N, Sabin CA, Weber R, d'Arminio Monforte A, El-Sadr WM, Reiss P, Thiebaut R, Morfeldt L, De Wit S, Pradier C, Calvo G, Law MG, Kirk O, Phillips AN, Lundgren JD. Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (DAD) Study Group. Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. N Engl J Med. 2003;349(21):1993-2003.

Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, froguel P, Ruiz J. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. J Clin Invest. 1997;99(1)62-6.

Garry RF. Potential mechanisms for the cytopathic properties of HIV. AIDS. 1989; 3(11):683-94.

Ginsberg G, Neafsey P, Hattis D, Guyton KZ, Johns DO, Sonawane B. Genetic polymorphism in paraoxonase 1 (PON1): population distribution of PON1 activity. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2009;12:473-507.

Grinspoon S, Carr A. Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. N Engl J Med. 2005;352(1):48-62.

Grunfeld C, Pang M, Doerrler W, Shigenaga J, Jensen P, Feingold KR. Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 1992;74(5):1045-52.

Grunfeld C, Kotler DP, Shigenaga JK, Doerrler W, Tierney A, Wang J. Circulating interferon-alpha levels and hypertriglyceridemia in the acquired immunodeficiency syndrome. Am J Med. 1991;90(2):154-62.

Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. Nat Struct Mol Biol. 2004;11(5):412-9.

Holvoet P. Relations between metabolic syndrome, oxidative stress and inflammation and cardiovascular disease. Verh K Acad Geneeskd Belg. 2008;70(3):193-219.

Hsia SH, Pan D, Berookim P, Lee ML. A population-based, cross-sectional

comparison of lipid-related indexes for symptoms of atherosclerotic disease. Am J Cardiol. 2006;98:1047-52.

Hui DY. Effects of HIV protease inhibitor therapy on lipid metabolism. Prog Lipid Res. 2003;42(2):81-92.

James RW, Deakin SP. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. Free Radic Biol Méd. 2004;37:1986-94.

Jayakumari N, Thejassebai G. high prevalence of low paraoxonase-1 in subjects with coronary artery disease. J Clin Biochem Nutr. 2009;45:278-84.

Johnson MA, Gathe JC Jr, Podzamczer D, Molina JM, Naylor CT, Chiu YL, King MS, Podsadecki TJ, Hanna GJ, Brun SC. A once-daily lopinavir/ritonavir-based regimen provides noninferior antiviral activity compared with a twice-daily regimen. J Acquir Immune Defic Syndr. 2006;43(2):153-60.

Juonala M, Viikari JS, Kähönen M, Taittonen L, Laitinen T, Hutri-Kähönen N, Lehtimäki T, Jula A, Pietikäinen M, Jokinen E, Telama R, Räsänen L, Mikkilä V, Helenius H, Kivimäki M, Raitakari OT. Life-time risk factors and progression of carotid atherosclerosis in young adults: the Cardiovascular

Risk in Young Finns study. Eur Heart J. 2010;31(14):1745-51.

Kadár A, Glasz T. Development of atherosclerosis and plaque biology. Cardiovasc Surg. 2001;9(2):109-21.

Kassutto S, Rosenberg ES. Primary HIV type-1 infection. Clin Infect Dis. 2004;38:1447-53.

Khersonsky O, Tawfik DS. The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammaliam serum paraoxonases. J Biol Chem. 2006;281:7649-56.

Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. Biochemistry. 2005; 44:6371-82.

Kuhel D, Woollett L, Fichtenbaum C. HIV protease inhibitor-induced hyperlipidemia and lipodystrophy is mediated through regulation of sterol responsive element binding protein (SREBP) responsive genes. Circulation. 2000;102:360.

La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, Sorenson RC, Standiford TJ. On the physiological role(s) of the paraoxonases. Chem Biol Interact. 1999;119(120):379-88.

La Du BN. Structural and functional diversity of paraoxonases. Nat Med. 1996;2:1186-7.

La Du BN. Is Paraoxonase-3 another HDL-associated protein protective against atheroclerosis? Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001;21:467-8.

Lai CQ, Parnell LD, Ordovas JM. The APOA1/C3/A4/A5 gene cluster, lipid metabolism and cardiovascular disease risk. Curr Opin Lipidol. 2005;16(2):153-66.

Lalezari JP, DeJesus E, Northfelt DW, Richmond G, Wolfe P, Haubrich R, Henry D, Powderly W, Becker S, Thompson M, Valentine F, Wright D, Carlson M, Riddler S, Haas FF, DeMasi R, Sista PR, Salgo M, Delehanty J:. A controlled Phase II trial assessing three doses of enfuvirtide (T-20) in combination with abacavir, amprenavir, ritonavir and efavirenz in non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-naive HIV-infected adults. Antivir Ther. 2003;8(4):279-87.

Leeson CP, Whincup PH, Cook DG, Mullen MJ, Donald AE, Seymour CA, Deanfield JE. Cholesterol and arterial distensibility in the first decade of life: a population-based study. Circulation. 2000; 101(13):1533-38.

Leus FR, Zwart M, Kastelein JJ, Voorbij HA. PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial

hypercholesterolemia patients. Atherosclerosis. 2001;154(3):641-9.

Leviev I, James RW. promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. Atherioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20:516-21.

Li HL, Liu DP, Liang CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. J Mol Med. 2003;81(12):766-79.

Libman H and Witzburg RA. Infecção pelo HIV – Um manual clínico. MEDSI Editora Médica e Científica Ltda., Rio de Janeiro (RJ), 2ª edição 1995, p.3-6.

Liu Y, Mackness B, Mackness M. Comparison of the ability of paraoxonases 1 and 3 to attenuate the in vitro oxidation of low-density lipoprotein and reduce macrophage oxidative stress. Free Radic Biol Med. 2008;45:743-8.

Lind L, Anderson J, Ronn M, Gustavsson T, Holdfelt P, Hulthe J. Brachial artery intima-media thickness and echogenicity in relation to lipids and markers of oxidative stress un early subjects: the prospective investigation of the vasculature un Uppsala Seniors (PIVUS) Atudy. Lipids. 2008;43:133-41.

Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. Circulation. 2007;115:459-67.

Lusis AJ. Atherosclerosis. Nature. 2000;407:233-41.

Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease: potential for therapeutic intervention. Am J Cardiovasc Drugs. 2004;4(4):211-7.

Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. Circulation. 2003;107(22):2775-9.

Mackness B, Durrington P. Polymorphismis of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. Lancet. 1999;353(9151):468-9.

Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. Gen Pharmacol. 1998;31(3):329-36.

Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. Atherosclerosis. 1993;104(1-2):129-35.

Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. FEBS Lett. 1991b;286(1-2):152-4.

Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI. Paraoxonase status in coronary heart disease:

are activity and concentration more important than genotype? Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001;21(9):1451-7.

MacKness B, Mackness MI, Durrington PN, Arrol S, Evans AE, McMaster D et al. Paraoxonase activity in two healthy populations with differing rates of coronary heart disease. Eur J Clin Invest. 2000;30(1):4-10.

Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, Durrington PN. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. Atherosclerosis. 1991a;86:193-9.

Malavazi I, Abrao EP, Mikawa AY, Landgraf VO, da Costa PI. Abnormalities in apolipoprotein and lipid levels in an HIV-infected Brazilian population under different treatment profiles: the relevance of apolipoprotein-E genotypes and immunological status. Clin Chem Lab Med. 2004;42(5):525-2.

Mallon PW. Antiretroviral therapy and dyslipidaemia: unlocking the code. PLoS Med. 2006;3(3):e85.

Manfredi R, Chiodo F. Disorders of lipid metabolism in patients with HIV disease treated with antiretroviral agents: frequency, relationship with administered drugs, and role of hypolipidaemic therapy with bezafibrate. J infect. 2001;42(3):181-8.

Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles. J Biol Chem. 2003;278:393-47.

Marsillach J, Mackness B, Mackness M, Riu F, Beltrán R, Joven J, Camps J. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. Free Radic Biol Med. 2008;45:146-57.

Martin F, Navaratne L, Khan W, Sarner L, Mercey D, Anderson J, Noble H, Fakoya A, Hawkins DA, De Ruiter A, Taylor GP. Pregnant women with HIV infection can expect healthy survival: three-year follow-up. J Acquir Immune Defic Syndr. 2006;43(2):186-92.

Mary-Krause M, Cotte L, Simon A, Partisani M, Costagliola D. Increased risk of myocardial infarction with duration of protease inhibitor therapy in HIV-infected men. AIDS. 2003;17(17):2479-86.

Masiá M, Padilla S, Bernal E, Almenar MV, Molina J, Hernández I, Graells ML, Gutiérrez F. Influence of antiretroviral therapy on oxidative stress and cardiovascular risk: a prospective cross-sectional study in HIV-infected patients. Clin Ther. 2007;29:1448-55.

MATSUURA E, HUGHES GR, KHAMASHTA MA. OXIDATION OF LDL AND ITS CLINICAL IMPLICATION. AUTOIMMUN REV. 2008;7(7):558-66.

May M, Sterne JA, Sabin C, Costagliola D, Justice AC, Thiébaut R, Gill J, Phillips A, Reiss P, Hogg R, Ledergerber B, D'Arminio Monforte A, Schmeisser N, Staszewski S, Egger M. Prognosis of HIV-1-infected patients up to 5 years after initiation of HAART: collaborative analysis of prospective studies. AIDS. 2007;21(9):1185-97.

MEDEIROS AM, VON MÜHLEN CA, GIDLUND MA, BODANESE R, GOTTLIEB MG, BODANESE LC. ANTIBODIES AGAINST OXLDL AND ACUTE CORONARY SYNDROME. ARQ BRAS CARDIOL 2010;95(1):47-54.

Mertens A, Verhamme P, Bielicki JK, Phillips MC, Quarck R, Verreth W, Stengel D, Ninio E, Navab M, Mackness B, Mackness M, Holvoet P. Increased low-density lipoprotein oxidation and impaired high-density lipoprotein antioxidant defense are associated with increased macrophage homing and atherosclerosis in dyslipidemic obese mice: LCAT gene transfer decreases atherosclerosis. Circulation. 2003;107(12):1640-6.

Millan J, Pinto X, Munoz A, Zuniga M, Rubies-Prat J, Pallardo LF, Massana L, Mangas A, Hernandez Mijares A, Gonzalez-Santos P, Ascaso JF, Pedro-Botet J.. Lipoprotein TC/HDL ratios: Physiological significance and clinical

usefulness in cardiovascular prevention. Vasc Health Risk Manag. 2009;5:757-65.

Mildvan D, Machado SG, Wilets I, Grossberg SE. Endogenous interferon and triglyceride concentrations to assess response to zidovudine in AIDS and advanced AIDS-related complex. Lancet. 1992;339(8791):453-6.

Mills AM, Nelson M, Jayaweera D, Ruxrungtham K, Cassetti I, Girard PM. Once-daily darunavir/ritonavir vs. lopinavir/ritonavir in treatment-naive, HIV-1-infected patients: 96-week analysis. AIDS. 2009;23(13):1679-88.

Monier PL, Wilcox R. Metabolic complications associated with the use of highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected adults. Am J Med Sci. 2004;328(1):48-56.

Mujawar Z, Rose H, Morrow MP, Pushkarsky T, Dubrovsky L, Mukhamedova N, Fu Y, Dart A, Orenstein JM, Bobryshev YV, Bukrinsky M, Sviridov D. Human immunodeficiency virus impairs reverse cholesterol transport from macrophages. PloS Biol. 2006;4(11):365.

Murphy RL, Sanne I, Cahn P, Phanuphak P, Percival L, Kelleher T, Giordano M. Dose-ranging, randomized, clinical trial of atazanavir with lamivudine and stavudine in antiretroviral-naive subjects: 48-week results. AIDS. 2003;17(18):2603-14.

Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Redox imbalance and its control in HIV infection. Antioxid Redox Signal. 2002;4(3):455-64.

Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, Vahabzadeh K, Hama SY, Hough GP, Kamranpour N, Berliner JA, Lusis AJ, Fogelman AM. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. J Lipid Res. 2004;45:993-07.

Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ, Fonarow GC, Cardinez CJ, Castellani LW et al. oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. J Clin Invest. 1997;99:2005-19.

Negredo E, Ribalta J, Ferré R, Salazar J, Rey-Joly C, Sirera G, Masana L, Clotet B. Efavirenz induces a striking and generalized increase of HDL-cholesterol in HIV-infected patients. AIDS. 2004;18:819-21.

Ng DS, Chu T, Esposito B, Hui P, Connelly PW, Gross PL. Paraoxonase-1 deficiency in mice predisposes to vascular inflammation, oxidative stress, and thrombogenicity in the absence of hyperlipidemia. Cardiovasc Pathol. 2008;17:226-32.

Ngondi JL, Oben L, Musoro FD, Etame SLH, Mbanya D. The effect of different combination therapies on oxidative stress markers in HIV infected patients in cameroon. AIDS Res Ther. 2006,3:19.

Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. JAMA. 2003;290(17):2292-300.

Noor MA, Parker RA, O'Mara E, Grasela DM, Currie A, Hodder SL, Fiedorek FT, Haas DW. The effects of HIV protease inhibitors atazanavir and lopinavir/ritonavir on insulin sensitivity in HIV-seronegative healthy adults. AIDS. 2004;18(16):2137-44.

Noto H, Hashimoto Y, Satoh H, Hara M, Iso-o N, Togo M, Kimura S, Tsukamoto K. Exclusive association of paraoxonase 1 with high-density lipoprotein particles in apolipoprotein A-I deficiency. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2001;289:395-401.

Oliveira SA, Mansur AP, Ribeiro CC, Ramires JAF, Annichino-Bizzacchi JM. PON 1 M/L55 mutation protects high-risk patients against coronary artery disease. Int J Cardiol. 2004;94:73-7.

Pakker NG, Notermans DW, de Boer RJ, Roos MT, de Wolf F, Hill A, Leonard JM, Danner SA, Miedema F, Schellekens PT. Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. Nat Med. 1998;4(2):208-14.

Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med. 1998;338(13):853-60.

Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas J, Chrysohoou C, Toutouza M, Stefanadis CI, Toutouzas PK. Importance of LDL/HDL cholesterol ratio as a predictor for coronary heart disease events in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia: a 15-year follow-up (1987-2002). Curr Med Res Opin. 2003;19(2):89-94.

Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. 2009;1-161.

Parra S, Alonso-Villaverde C, Coll B, Ferre N, Marsillach J, Aragones G, Mackness M, Mackness B, Masana L, Joven J, Camps J. Serum paraoxonase-1 activity and concentration are influenced by human immunodeficiency virus infection. Atherosclerosis. 2006;194(1):175-81

Parra S, Marsillach J, Aragonés G, Beltrán R, Montero M, Coll B, Mackness B, Mackness M, Alonso-Villaverde C, Joven J, Camps J. Paraoxonase-1 gene haplotypes are associated with metabolic disturbances, atherosclerosis,

and immunologic outcome in HIV-infected patients. J Infect Dis. 2010;201(4):627-34.

PARRA S, MARSILLECH J, ARAGONÉS G, BELTRÁN R, MONTERO M, COLL B, ET AL. PARAOXONASE-1 GENE HAPLOTYPES ARE ASSOCIATED WITH METABOLIC DISTURBANCE, ATHEROSCLEROSIS, AND IMMUNOLOGIC OUTCOME IN HIV-INFECTED PATIENTS. J INFECT DIS. 2010A;201(4):627-34.

Parra S, Coll B, Aragonés G, Marsillach J, Beltrán R, Rull A, Joven J, Alonso-Villaverde C, Camps J. Non concordance between subclinical atherosclerosis and the calculated Framingham risk score in HIV-infected patients: relationships with serum markers of oxidation and inflammation. HIV Med. 2010b;11(4):225-31.

Parra S, Alonso-Villaverde C, Coll B, Ferré N, Marsillach J, Aragonès G, Mackness M, Mackness B, Masana L, Joven J, Camps J. Serum paraoxonase-1 activity and concentration are influenced by human immunodeficiency virus infection. Atheroscleros. 2007;194(1):175-81.

Pereira SA, Batuca JR, Caixas U, Branco T, Delgado-Alves J, Germano I, Lampreia F, Monteiro EC. Effect of efavirenz on high-density lipoprotein antioxidant properties in HIV-infected patients. Br J Clin Pharmacol. 2009;68(6):891-7.

Pereira SA, Branco T, Côrte-Real RM, Germano I, Lampreia F, Caixas U, Monteiro EC. Long-term and concentration-dependent beneficial effect of efavirenz on HDL-cholesterol in HIV-infected patients. Br J Clin Pharmacol. 2006;61(5):601-4.

Perla-Kajan J, Jakubowski H. Paraoxonase 1 protects against protein Nhomocysteinylation in humans. FASEB J. 2010;24:931-6.

Petit JM, Duong M, Florentin E, Duvillard L, Chavanet P, Brun JM, Portier H, Gambert P, Verges B. Increased VLDL-apoB and IDL-apoB production rates in nonlipodystrophic HIV-infected patients on a protease inhibitor-containing regimen: a stable isotope kinetic study. J Lipid Res. 2003;44(9):1692-7.

Phuntuwate W, Suthisisang C, Koanantakul B, Mackness MI, Mackness B. Paraoxonase 1 status in the Thai population. J Hum Genet. 2005;50(6):293-300.

PODZAMCZER D, ANDRADE-VILLANUEVA J, CLOTET B, TAYLOR S, ROCKSTROH JK, REISS P, DOMINGO P, GELLERMANN HJ, DE ROSSI L, CAIRNS V, SORIANO V. LIPID PROFILES FOR NEVIRAPINE VS. ATAZANAVIR/RITONAVIR, BOTH COMBINED WITH TENOFOVIR DISOPROXIL FUMARATE AND EMTRICITABINE OVER 48 WEEKS, IN TREATMENT-NAÏVE HIV-1-INFECTED PATIENTS (THE ARTEN STUDY). HIV MED. 2011;12(6):374-82.

Précourt LP, Amre D, Denisa MC, Lavoie JC, Delvine E, Seidman E, Levy E The three-gene paraoxonase family: Physiologic roles, actions and regulation. Atherosclerosis. 2011;214:20-36.

Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylestearase gene (PON-1) is one member of a multigene family. Genomics. 1996;33:498-07.

Rainwater DL, Rutherford S, Dyer TD, Rainwater ED, Cole SA, Vandeberg JL. Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. Heredity. 2009;102:147-54.

Reddy ST, Devarajan A, Bourquard N, Shih DM, Fogelman A M. Is it just paraoxonase 1 or are other members of the paraoxonase gene family implicated in atherosclerosis? Curr Opin Lipidol. 2008;19:405-8.

Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. Circ Cardiovasc Genet. 2008;1:147-52.

Richter A, Pladevall M, Manjunath R, Lafata JE, Xi H, Simpkins J et al. Patient characteristics and costs associated with dyslipidaemia and related conditions in HIV-infected patients: a retrospective cohort study. HIV Med. 2005;6:79-90.

Riddler SA, Smit E, Cole SR, Li R, Chmiel JS, Dobs A, Palella F, Visscher B, Evans R, Kingsley LA.. Impact of HIV infection and HAART on serum lipids in men. JAMA. 2003;289(22):2978-82.

Riddler SA, Li X, Chu H, Kingsley LA, Dobs A, Evans R. Longitudinal changes in serum lipids among HIV-infected men on highly active antiretroviral therapy. HIV Medicine. 2007;8(5):280-87.

Riddler SA, Li X, Otvos J, Post W, Palella F, Kingsley L, Visscher B, Jacobson LP, Sharrett AR. Antiretroviral therapy is associated with an atherogenic lipoprotein phenotype among HIV-1-infected men in the Multicenter AIDS Cohort Study. J Acquir Immune Defic Syndr. 2008;48(3):281-8.

RODRÍGUEZ-MORÁN M, GUERRERO-ROMERO F, ARADILLAS-GARCÍA C, BERMUDEZ-PEÑA C, SIMENTAL-MENDIA LE, VARGAS MORALES JM, TORRES RODRÍGUEZ ML, DE LA CRUZ MENDOZA E. ATHEROGENIC INDICES AND PREHYPERTENSION IN OBESE AND NON-OBESE CHILDREN. DIAB VASC DIS RES. 2012. [EPUB AHEAD OF PRINT].

Ronchini KR, Duarte AJ, Casseb JS, Gidlund M. Cardiovascular complications and increased levels of circulating modified low density lipoprotein in HIV patients and patients with lipodystrophy. Braz J Med Biol Res. 2004;37(1):119-22.

Rose H, Hoy J, Woolley I, Tchoua U, Bukrinsky M, Dart A, Sviridov D. HIV infection and high density lipoprotein metabolism. Atherosclerosis. 2008;199:79-86.

Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, Phillips MN, Wilkes BM, Eldridge RL, Robbins GK, D'Aquila RT, Goulder PJ, Walker BD. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. Nature. 2000; 407(6803):523-6.

Rosenblat M, Oren R, Aviram M. Lysophosphatidylcholine (LPC) attenuates macrophage-mediated oxidation of LDL. Biochem Biophys Res Commun. 2006a;344(4):1271-7.

Rosenblat M, Gaidukov L, Khersonsky O, Vaya J, Oren R, Tawfik DS, Aviram M. The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux. J Biol Chem. 2006b;281:7657-65.

Rosenblat M, Vaya J, Shih DM. Paraoxonase (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA 1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcoline. Atherosclerosis. 2005;179:69-77.

Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999; 340(2):115-26.

Rozenberg O, Rosenblat M, Coleman R, Shih DM, Aviram M. Paraoxonase (PON1) deficiency is associated increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. Free Rad Biol Med. 2003;34:774-84.

Saint Martin L, Vandhuick O, Guillo P, Bellein V, Bressollette L, Roudaut N, Amaral A, Pasquier E. Premature atherosclerosis in HIV positive patients and cumulated time of exposure to antiretroviral therapy (SHIVA study). Atherosclerosis. 2006;185:361-7.

Sankatsing RR, Wit FW, Vogel M, de Groot E, Brinkman K, Rockstroh JK, Kastelein JJ, Stroes ES, Reiss P.. Increased carotid intima-media thickness in HIV patients treated with protease inhibitors as compared to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Atherosclerosis. 2009;202(2):589-95.

Santos RD. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Guideline of Atherosclerosis Prevention from Atherosclerosis Department of Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq Bras Cardiol. 2001;77:1-48.

Scacchi R, Corbo RM, Rickards O, De Stefano GF. New data on the world distribution of paraoxonase (PON1 Gln 192→Arg) gene frequencies. Hum Biol. 2003;75:365-73.

Sentí M, Tomás M, Fitó M, Weinbrenner T, Covas MI, Sala J, Masiá R, Marrugat J. Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(11):5422-6.

Serdar Z, Aslan K, Dirican M, Sarandöl E, Yeşilbursa D, Serdar A. Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease. Clin Biochem. 2006;39(8):794-03.

SHARMA N, BALIARSINGH S. HIGH FASTING SERUM GLUCOSE IN NON-DIABETIC SUBJECTS ≥45 YEARS IS AN INDICATOR OF FUTURE CARDIOVASCULAR EVENTS AS IT IS POSITIVELY ASSOCIATED WITH ATHEROGENIC INDEX OF PLASMA. ARCH PHYSIOL BIOCHEM. 2012;118(2):43-6.

Shafran SD, Mashinter LD, Roberts SE. The effect of low-dose ritonavir monotherapy on fasting serum lipid concentrations. HIV Med. 2005;6(6):421-5.

Shor-Posner G, Basit A, Lu Y, Cabrejos C, Chang J, Fletcher M, Mantero-Atienza E, Baum MK. Hypocholesterolemia is associated with immune dysfunction in early human immunodeficiency virus-1 infection. Am J Med.1993;94(5):515-9.

Simons K, Ikonem E. How cells handle cholesterol. Science. 2000;290(1): 1721-26.

Sinan S, Kockar F, Arslan O. Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics. Biochimie. 2006;88(5):565-74.

Smith KA, Boyle BA. New strategies to combat HIV: augmenting antiviral

immunity. AIDS Read. 2003;13(8):365-9.

Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O, La Du BN. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(16):7187-91.

Stein JH Dyslipidemia in the era of HIV protease inhibitors. Prog Cardiovasc Dis. 2003;45:293-304.

Stein JH, Komarow L, Cotter BR, Currier JS, Dubé MP, Fichtenbaum CJ, Gerschenson M, Mitchell CK, Murphy RL, Squires K, Parker RA, Torriani FJ;. Lipoprotein changes in HIV-infected antiretroviral-naïve individuals after starting antiretroviral therapy: ACTG Study A5152s. J Clin Lipidol. 2008;2(6):464-71.

Stocker R, Keaney Jr JF. Role of oxidative modifications in artherosclerosis. Physiol Rev. 2004;84:1381-478.

Suzuki K, Ito Y, Wakai K, Kawado M, Hashimoto S, Toyoshima H. Japan Collaborative Cohort Study Group. Serum oxidized low-density lipoprotein levels and risk of colorectal cancer: a case-control study nested in the Japan Collaborative Cohort Study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004;13:1781-7.

Tarr PE, Rotger M & Telenti A. Dyslipidemia in HIV-infected individuals: from pharmacogenetics to pharmacogenomics. Pharmacogenomics. 2010;11(4): 587-94.

Tashima KT, Bausserman L, Alt EN, Aznar E, Flanigan TP. Lipid changes in patients initiating efavirenz- and indinavir-based antiretroviral regimens. HIV Clin Trials. 2003;4(1):29-36.

Thompson AM, Aberg JA, Cahn P, Montaner JSG, Rizzardini G, Telenti A, Gatell JM, Günthard HF, Hammer SM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Reiss P, Richman DD, Volberding PA, Yeni P, Schooley RT. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel; International AIDS Society-USA. JAMA. 2010;304(3):321-33.

Tomas M, Latorre G, Senti M, Marrugat J. The antioxidant function of high density lipoproteins: a new paradigm in atherosclerosis. Rev Esp Cardiol. 2004;57:557-69.

Torriani FJ, Komarow L, Parker RA, Cotter BR, Currier JS, Dubé MP, Fichtenbaum CJ, Gerschenson M, Mitchell CK, Murphy RL, Squires K, Stein JH; ACTG 5152s Study Team. Endothelial function in human immunodeficiency virus-infected antiretroviral-naive subjects before and after starting potent antiretroviral therapy: The ACTG (AIDS Clinical Trials Group) Study 5152s. J Am Coll Cardiol. 2008;52(7):569-76.

Treitinger A, Spada C, Verdi JC, Miranda AF, Oliveira OV, Silveira MV, Moriel P, Abdalla DS. Decreased antioxidant defence in individuals infected by the human immunodeficiency virus. Eur J Clin Invest. 2000;30(5):454-9.

Tsimikas S. In vivo markers of oxidase stress and therapeutic intervention. Am J Cardiol. 2008;101:34-42D.

Tsiodras S, Mantzoros C, Hammer S, Samore M. Effects of protease inhibitors on hyperglycemia, hyperlipidemia, and lipodystrophy: a 5-year cohort study. Archives of Internal Medicine. 2000;160:2050-6.

van der Gaag MS, van Tol A, Scheek LM, James RW, Urgert R, Schaafsma G, Hendriks HF. Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity: a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men. Atherosclerosis. 1999;147:405-10.

van der Valk M, Kastelein JJ, Murphy RL, van Leth F, Katlama C, Horban A, Glesby M, Behrens G, Clotet B, Stellato RK, Molhuizen HO, Reiss P; Atlantic Study Team. Nevirapine-containing antiretroviral therapy in HIV-1 infected patients results in an anti-atherogenic lipid profile. AIDS. 2001;15(18):2407-14.

van Leth F, Phanuphak P, Stroes E, Gazzard B, Cahn P, Raffi F, Wood R, Bloch M, Katlama C, Kastelein JJ, Schechter M, Murphy RL, Horban A, Hall DB, Lange JM, Reiss P.. Nevirapine and efavirenz elicit different changes in lipid profiles in antiretroviral-therapy-naive patients infected with HIV-1. PLoS Med. 2004;1:64-73.

Voestsch B, Benke KS, Panhuysen CI, Damasceno BP, Loscalzo J. The combined effect of paraoxonase promoter and coding region polymorphisms on the risk of arterial ischemic stroke among young adults. Arch Neurol. 2004;61:351-6.

Voestsch B, Benke KS, Damasceno BP, Siqueira LH, Loscalzo J. Paraoxonase 192Gln>Arg polymorphism:independent risk factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults. Stroke. 2002;33:1459-64.

Wang X, Chai H, Yao Q, Chen C. Molecular mechanisms of HIV protease inhibitor-induced endothelial dysfunction. J Acquir Immune Defic Syndr. 2007;44(5):493-9.

Wohl D, Scherzer R, Heymsfield S, Simberkoff M, Sidney S, Bacchetti P, Grunfeld C. The associations of regional adipose tissue with lipid and lipoprotein levels in HIV-infected men. J Acquir Immune Defic Syndr. 2008;48(1):44-52.

Yildiz G, Hür E, Ozçiçek A, Candan F, Kayatas M. The Mean Platelet Volume and Atherogenic Index of Plasma in Nondipper Normotensive Individuals Compared to Dippers. Clin Exp Hypertens. 2012. [Epub ahead of print].

Zhang Y, Zheng F, Du H, Krepinsky JC, Segbo JA, Zhou X. Detecting the polymorphisms of paraoxonase (PON) cluster in Chinese Han population based on a rapid method. Clin Chim Acta. 2006;365(1-2):98-103.