

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e
Ciências Cardiovasculares

Marcadores Genéticos Associados à Dislipidemia e
Redistribuição de Gordura Corporal em Indivíduos Infectados
pelo HIV em Terapia Antirretroviral

Tese de Doutorado
Rosmeri Kuhmmer Lazzaretti

Orientador: Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro (*In Memoriam*)
Prof^a. Dra. Carísi Anne Polanczyk

Porto Alegre

2012

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e
Ciências Cardiovasculares

Marcadores Genéticos Associados à Dislipidemia e
Redistribuição de Gordura Corporal em Indivíduos Infectados
pelo HIV em Terapia Antirretroviral

Tese de Doutorado
Rosmeri Kuhmmer Lazzaretti

Orientador: Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro (*In Memoriam*)
Prof^a. Dra. Carísi Anne Polanczyk

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Cardiovasculares.

Porto Alegre

2012

Aos meus grandes amores

Meu marido, Ronaldo, grande amor, companheiro e incentivador, por participar comigo ativamente nessa trajetória.

Meus filhos, Afonso e Felipe, meus amores, meu olhar no futuro.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, **Ronaldo**, pelo eterno amor e parceria constante em todos os momentos da nossa vida, pela paciência e incentivo nas dificuldades. Obrigada por sempre estar ao meu lado e por acreditar veementemente em meu sucesso profissional; por tornar a vida mais leve e fazer-me acreditar que os sonhos sempre serão possíveis e os obstáculos passageiros. Obrigada pela vida que compartilhamos.

Aos **meus filhos**, pelo maravilhoso fato de suas existências, pelos sorrisos encantadores, pelo sentido que dão a minha vida. Por me ensinarem, diariamente, a ter paciência, a sorrir, a brincar e a amar, incondicionalmente, em todos os nossos momentos.

Afonso, pelo imenso amor, carinho e cuidado que me dedica. Pela torcida constante, por compreender e reclamar minha ausência em períodos tão conturbados. Por partilhar os problemas, sempre tentando ajudar, e as conquistas, às vezes vibrando mais que eu mesma. Pelo auxílio na redação deste trabalho, revisando os textos em português, e, principalmente em inglês, onde tua contribuição foi fundamental.

Felipe, tão pequeno e inocente, que, no meio de minha trajetória, chegou para abrilhantar nossas vidas.

À minha irmã, **Regina**, coautora deste trabalho, pelo companheirismo, carinho, incentivo e apoio científico.

À minha mãe, **Maria Adiles**, pelo amor, carinho e apoio de sempre.

Ao meu sogro, **Raul**, que se estivesse entre nós, estaria vibrando nesta conclusão de doutorado.

A **Prof^a. Dra. Vanessa Suñé Mattevi**, sem palavras. Pela amizade, acolhimento, confiança, disponibilidade, orientação e pelo inestimável auxílio em todas as etapas deste trabalho, com paciência, competência e carinho que muito me marcaram. Agradeço pela hora semanal fixa durante todo este semestre. Nossa convivência contribui para meu crescimento pessoal e intelectual. Sua presença em todas as etapas foi imprescindível para a concretização desta tese. Muito obrigada pela dedicação ao longo dos anos que trabalhamos juntas e principalmente neste final da minha tese.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Sprinz**, pela confiança depositada na execução dos projetos, pela competência profissional e pronta disponibilidade, em todos os momentos, em auxiliar na execução deste estudo. Pelo auxílio no enriquecimento destes artigos.

À **Profª. Drª. Carisi Anne Polanczyk**, minha admiração e profunda gratidão. Pelo acolhimento, confiança, preocupação e estímulo constante. Pela revisão deste trabalho, mesmo não sendo sua área de especialização. Pelo exemplo de dedicação, competência e ética.

À **Aline Gasparotto** e **Marina Sassi**, pelas aulas no laboratório, pelas análises realizadas e dedicação incansável ao trabalho, que foram imprescindíveis para conclusão desta tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, **Prof. Dr. Luiz Eduardo Rohde** coordenador do programa no ingresso ao doutorado, pela oportunidade, pelo exemplo de caráter e ética profissional. À **Profª. Drª. Sandra Fuchs** pela sua dedicação ao **Programa de Pós-Graduação em Cardiologia e Ciências Cardiovasculares**.

À **Sirlei Reis**, pelo acolhimento, amizade e pelas palavras de incentivo constante.

Aos **residentes** e **acadêmicos** do **Ambulatório de HIV/AIDS**, pela contribuição dedicada durante a coleta dos dados.

Aos **professores** e **colegas** do **Programa de Pós-Graduação em Cardiologia e Ciências Cardiovasculares**, pela dedicação à pesquisa e ao desenvolvimento da ciência, pela contribuição, apoio e incentivo recebidos, fundamentais ao meu crescimento.

Aos **pacientes** do **Ambulatório de HIV/AIDS**, sem os quais este estudo não seria realizado, pela disponibilidade e confiança.

Ao **Programa Nacional de DST e AIDS/UNESCO**, **Ministério da Saúde** e ao **CNPq**, pelo auxílio financeiro desta pesquisa.

A **todas as pessoas** que direta ou indiretamente me apoiaram durante esta longa caminhada.

Em especial à equipe do IEP, muito mais que uma equipe, melhor dizendo então, aos **amigos do IEP** que me acolhem com tanto carinho, mesmo nos dias mais difíceis, como, confesso, foram alguns nos últimos tempos. **Dr. Luciano e Rúbia**, agradeço pelo total apoio e compreensão, pela flexibilidade nos horários, pelas folgas e férias que me foram dadas com o intuito de propiciar tempo para finalizar esta tese, por permitirem meu trabalho a distância, em alguns momentos. As colegas de coordenação, em especial a **Laura** e a **Silvia** pelo amparo, incentivo e conforto incondicional. Pela equipe da secretaria, em especial a **Fabiana** e a **Lisiane** pelo apoio em todos os momentos. Se tivesse que definir meus amigos do IEP em uma palavra, diria que foram impecáveis. Serei sempre grata pela ajuda e incentivo constantes.

E finalmente, ao **Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro**, por ter aceitado orientar-me nesta segunda etapa, pela confiança. Obrigada por ter possibilitado, desde o primeiro passo, o aprendizado necessário para conclusão desta tese. Por me acolher como aluna e guiar-me no crescimento acadêmico. Por encaminhar-me nos meus primeiros passos profissionais consolidados em minha profissão. Por estar sempre presente e servir de exemplo como cientista e ser humano. Indiscutivelmente foi um referencial para todos que, como eu, veem na vida acadêmica um caminho. Além disso, pelo exemplo de profissional que foi dedicado, competente e ético, brilhante mestre na ciência e na vida.

Agradeço pelos momentos de orientação científica, pelas palavras que sempre me passaram tranquilidade e sabedoria. Embora, tenha nos deixando fisicamente, o legado de seu trabalho estará sempre presente.

Gratidão e respeito eterno por tudo!

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	ii
Lista de Anexos e Apêndices.....	iii
Lista de Siglas.....	iv
Capítulo I	1
Introdução.....	2
Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.....	2
Síndrome da Lipodistrofia.....	4
Fisiopatologia da Dislipidemia Secundária à Terapia Antirretroviral.....	7
Farmacogenômica e Terapia Antirretroviral.....	9
Genes Candidatos.....	12
<i>Apolipoproteína A-V</i>	14
<i>Apolipoproteína B</i>	16
<i>Apolipoproteína C-III</i>	17
<i>Apolipoproteína E</i>	18
<i>Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade</i>	21
<i>SCAP: Proteína Ativadora da Clivagem de SREBP</i>	23
Estudos de Associação com Dislipidemia e Fenótipos Relacionados em Indivíduos Infectados pelo HIV	26
Referências Bibliográficas.....	31
Capítulo II.....	48
Justificativa	49
Objetivos.....	51
Capítulo III	52

Genetic Markers Associated to Dyslipidemia in HIV-Infected Individuals on HAART.....	53
Abstract	54
Introduction	55
Methods.....	56
<i>Subjects.....</i>	<i>56</i>
<i>Study Protocol.....</i>	<i>56</i>
<i>Laboratory analysis.....</i>	<i>57</i>
<i>Statistical analyses.....</i>	<i>58</i>
Results.....	59
<i>Study participants.....</i>	<i>59</i>
<i>Triglycerides.....</i>	<i>60</i>
<i>HDL-Cholesterol</i>	<i>60</i>
<i>Total cholesterol and LDL-cholesterol.....</i>	<i>61</i>
Aknowledgement.....	69
Discussion.....	62
References.....	70
 Capítulo IV.....	 82
 The S19W Polymorphism in APOA5 is Associated with Body Fat Composition in HIV-Infected Individuals Receiving HAART.....	 83
Abstract.....	84
Introduction.....	85
Materials and Method.....	86
<i>Subjects.....</i>	<i>86</i>
<i>Genetic Analyses.....</i>	<i>87</i>
<i>Anthropometric Assessment.....</i>	<i>87</i>
<i>Statistical Analyses.....</i>	<i>88</i>

Results.....	89
Discussion.....	91
Aknowledgement.....	102
References.....	96
Capítulo V.....	108
Conclusão Geral.....	109
Perspectivas Futuras.....	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Disfunção mitocondrial no tecido adiposo.....	06
Figura 2. Mecanismo proposto para as alterações metabólicas e TARV.....	08
Figura 3. Função das apoproteínas.....	12
Figura 4. Estrutura genômica e localização dos polimorfismos do gene <i>APOA5</i>	14
Figura 5. O gene <i>APOE</i> humano está mapeado no cromossomo 19 humano....	19
Figura 6. Ciclo celular do receptor de LDL.....	22
Figura 7. Regulação intracelular da expressão do gene <i>LDLR</i> e da HMG-CoA redutase pelo SREBP-2.....	25
The S19W Polymorphism in <i>APOA5</i> is Associated with Body Fat Composition in HIV-Infected Individuals Receiving HAART	
Figura 1. Comparison of anthropometric variables between S19W (56 C>G) genotype in both genders.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais estudos de associação entre polimorfismos em genes codificadores de lipoproteínas e fenótipos relacionados ao perfil lipídico em indivíduos infectados pelo HIV.....	29
 Genetic Markers Associated to Dyslipidemia in HIV-Infected Individuals on HAART	
Table 1. Genotypic and allelic frequencies of polymorphisms.....	77
Table 2. Characteristics of the study participants.....	78
Table 3. Mean metabolic variables according to polymorphisms analyzed.....	79
Table 4. Effect of <i>APOB</i> haplotype in Total Cholesterol and LDL-C.....	81
 The S19W Polymorphism in <i>APOA5</i> is Associated with Body Fat Composition in HIV-Infected Individuals Receiving HAART	
Table 1. Demographic, clinical and genotypic characteristics.....	103
Table 2. Anthropometric characteristics of participants according to gender.....	104
Table 3. Comparison of anthropometric variables between -1131 T>C and S19W (56 C>G) genotypes.....	105
Table 4. Poisson regression model and predictive variables for obesity development in HIV-positive patients on HAART.....	107

LISTA DE SIGLAS

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> (em Inglês) Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (em Português)
apo	apolipoproteína
APO	Gene de apolipoproteína
ARV	Antirretrovirais
ATP	Trifosfato de Adenosina
CRABP-1	<i>Cellular Retinoic Acid Binding Protein 1</i> (em Inglês) Proteína Ligadora do Ácido Retinóico Citoplasmático Tipo 1 (em Português)
DEXA	<i>Dual-energy X-ray Absorptiometry</i> (em Inglês) Absorciometria de Raios-x de Dupla Energia (em Português)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GWAS	<i>Genome-wide Association Studies</i> (em Inglês) Estudos de Varredura Genômica (em Português)
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> (em Inglês) Lipoproteína de Alta Densidade (em Português)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (em Inglês) Vírus da Imunodeficiência Humana (em Português)
HLA-B*4001	Antígeno Leucocitário Humano
HMGCoA	Hidroxi-metil-glutaril-Coenzima A
IMC	Índice de Massa Corporal
INSIG-1	<i>Insulin Induced Gene 1</i> (em Inglês) Gene Induzido pela Insulina 1 (em Português)
IPs	Inibidores da Protease
ITRN	Inibidor Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeo
ITRNN	Inibidor da Transcriptase Reversa Não-Análogo de Nucleosídeo
kb	Kilobases
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (em Inglês) Lipoproteína de Baixa Densidade (em Português)
LDLR	<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i> (em Inglês) Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade (em Português)
LPL	Lipase Lipoproteica
LRP	Proteína Relacionada ao Receptor da LDL
MAF	Frequência do Alelo Raro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PPAR γ	<i>Peroxisome Proliferator Activated-Receptor Gamma</i> (em Inglês) Receptor Ativado por Proliferadores do Peroxissoma γ (em Português)

RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RTV	Ritonavir
SCAP	<i>SREBP cleavage-activating protein</i> (em Inglês) Proteína Ativadora da Clivagem de SREBP (em Português)
SHCS	Swiss HIV Cohort Study (em Inglês)
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (em Inglês) Polimorfismos de um Único Nucleotídeo (em Português)
SREBP	<i>Sterol Regulatory Element Binding Proteins</i> (em Inglês) Proteínas de Ligação ao Elemento de Resposta a Esterol (em Português)
TARV	Terapia Antirretroviral
UNAIDS	Nações Unidas para Aids
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i> (em Inglês) Lipoproteína de Densidade Muito Baixa (em Português)

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

Introdução

A terapia antirretroviral (TARV) modificou favoravelmente o prognóstico dos indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).¹⁻³ No entanto, ao lado do sucesso clínico obtido para os indivíduos com boa adesão aos medicamentos, várias questões têm sido consideradas.³ Entre elas, as que dizem respeito às alterações do metabolismo dos lipídios e da redistribuição da gordura corporal, que são comumente encontradas naqueles com distúrbios metabólicos e que estão associadas com maior chance de eventos cardiovasculares e morte.⁴ Estas condições clínicas inter-relacionadas têm prevalência significativamente maior entre indivíduos em uso de TARV.^{4,5}

As relações entre TARV, dislipidemia e redistribuição da gordura corporal constituem um intricado universo fisiopatogênico, ainda com muitas lacunas. O manejo dessas alterações poderá vir a ser decisivo para a longevidade e qualidade de vida dos indivíduos HIV-positivo. Neste contexto, recentemente, com o auxílio do mapeamento do genoma humano, completado em 2003, bem como do Projeto *HapMap*, em andamento, a busca de perfis genéticos tem surgido como estratégia adicional para uma melhor caracterização de risco, associando polimorfismos genéticos com susceptibilidade a determinadas doenças, incluindo a dislipidemia, ou a padrões de resposta a determinadas medicações.⁶⁻⁸

Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

A síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) é uma doença pandêmica que tem como agente etiológico o HIV, um retrovírus. Vírus desta família contêm um genoma de composto por duas fitas de ácido ribonucleico (RNA), sendo este material convertido em ácido desoxirribonucleico (DNA) no interior da célula do hospedeiro através da enzima transcriptase reversa, o que leva à desorganização e consequente destruição do sistema imunológico do indivíduo.^{9,10}

As manifestações clínicas da infecção pelo HIV variam desde um estado de portador assintomático até o desenvolvimento de doenças oportunistas graves e potencialmente letais, com a Aids como o estágio mais avançado da doença, e podem variar de acordo com diversos fatores, como idade, sexo, genética do hospedeiro, histórico de tratamento, entre outros.^{11,12}

Transcorridos 30 anos desde os primeiros relatos nos Estados Unidos, a Aids continua sendo um dos grandes desafios para a saúde global. Segundo Relatório do Programa das Nações Unidas para Aids (UNAIDS) e da Organização Mundial de Saúde (OMS) somam-se 33,4 milhões de pessoas contaminadas no mundo.^{13,14} No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, de 1980 a junho de 2011, foram notificados 608.230 casos de Aids e estima-se que cerca de 630 mil pessoas vivem com HIV e Aids. Somente em 2010 foram notificados 34.218 novos casos, com taxa de incidência nacional de 17,9/100.000 habitantes e razão de sexo de 1,7 novos casos em homens para cada caso em mulheres.¹⁵

Desde 1996, o uso combinado de vários fármacos antirretrovirais (ARV) e a descoberta de novos alvos terapêuticos, marcam a contemporaneidade. A Aids passou a ser uma doença crônica e potencialmente controlável desde o surgimento da TARV. Atualmente, mais de 6,6 milhões de pessoas nos países em desenvolvimento recebem TARV e a meta é atingir 15 milhões de pessoas até 2015.¹⁶ As principais diretrizes estabelecem que o tratamento inicial deve incluir 2 inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN) e 1 inibidor da transcriptase reversa não nucleosídico (ITRNN), ou 2 ITRN e 1 inibidor da protease (IP) com a adição de ritonavir (RTV). Novas classes de antirretrovirais, como os inibidores de entrada, de fusão ou da integrase viral estão em uso, mas ainda em uma pequena proporção de pacientes.¹⁷⁻¹⁹

Embora a TARV tenha revertido os efeitos imunossupressores inerentes à história natural da infecção pelo HIV, ela tem sido acompanhada por uma incidência

elevada de efeitos adversos, que podem ocorrer no médio e longo prazo, resultantes da ação inflamatória do HIV e da toxicidade dos medicamentos, somadas aos fatores individuais e genéticos.¹ Entre os efeitos adversos, destacam-se à redistribuição anormal de gordura corporal e as alterações metabólicas, que associadas constituem a síndrome da lipodistrofia associada ao HIV, cuja importância clínica é demonstrada pelo aumento da prevalência de doenças cardiovasculares.

Síndrome da Lipodistrofia

Alterações metabólicas e mitocondriais constituem-se as principais responsáveis pela toxicidade da TARV.¹² O conjunto destas alterações foi chamado de “Síndrome da Lipodistrofia associada ao HIV”^{20,21} e envolve várias alterações como a dislipidemia, lipoatrofia, acúmulo de gordura centrípeta intra-abdominal e síndrome metabólica. Contudo, ainda não está claro se constituem alterações distintas ou se são componentes inter-relacionados de uma mesma síndrome. No entanto, evidências levam a crer que exista uma associação direta entre TARV e dislipidemia, um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular.^{5,22}

A prevalência da síndrome de lipodistrofia, descrita inicialmente em 1998,^{20,21} varia de 11 a 83% em estudos transversais.^{23,24} As modificações corporais estão associadas tanto com acúmulo (lipohipertrofia) quanto com perda (lipoatrofia) na gordura corporal, que podem ocorrer isoladas ou em conjunto (padrão misto). Na lipohipertrofia, pode haver aumento da circunferência abdominal (omental, mesentérico e retroperitoneal), aumento das mamas em mulheres e na região dorsocervical (giba de búfalo), pelo acúmulo de gordura. A lipoatrofia, que está mais relacionada aos ITRN (principalmente aos análogos timidínicos), inclui a perda de tecido adiposo subcutâneo na região glútea, braços e pernas, acompanhada de

proeminência vascular em membros superiores e inferiores, diminuição do coxim gorduroso temporal e periorbital, com afinamento da face e surgimento de dupla prega nasolabial.²⁵⁻²⁸

As modificações corpóreas geralmente se associam com alterações nos lipídeos plasmáticos e com a síndrome metabólica. Pode haver um aumento do colesterol total, da fração de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e dos triglicerídeos,^{29,30} que estão associados com um perfil que favorece a aterogênese.^{31,32} Na síndrome metabólica ocorre resistência periférica e hepática à insulina, com ou sem o desenvolvimento de hiperglicemia. Menos frequentemente, intolerância à glicose e diabetes melito tipo II podem ser diagnosticados.^{33,34} Além disso, alguns autores sugerem que a lipoatrofia ocorre mais precocemente do que a lipohipertrofia³⁵, e a lipoatrofia nem sempre está associada ao aumento de gordura visceral.^{36,37}

Carr e colaboradores (2003)³⁸ propuseram uma definição, validada pelo *Lipodistrophy Case Definition Study Group*, baseada em um estudo caso-controle, que identificou dez variáveis para compor um escore diagnóstico e de gravidade para lipodistrofia: gênero, idade, duração da infecção pelo HIV, estágio da infecção pelo HIV, relação da circunferência cintura/quadril, ânion *gap*, nível sérico de lipoproteína de alta densidade (HDL), gordura em membros inferiores, relação de gordura tronco/membros, relação de gordura intra-abdomina/abdominal superficial. Juntamente com exames de imagem, como absorciometria de raios-x de dupla energia (do inglês *dual-energy X-ray absorptiometry scan*, *DEXA*) ou tomografia computadorizada, obtiveram sensibilidade de 79% e especificidade de 80% para o diagnóstico de lipodistrofia.³⁸ Entretanto, os exames de imagem apresentam alto custo e difícil acesso para pacientes da rede pública, inviabilizando seu uso como método diagnóstico.

Entre os mecanismos fisiopatológicos propostos para explicar a síndrome

lipodistrófica do HIV estão os ITRN. Estes podem inibir seletivamente a replicação do DNA mitocondrial. No entanto, esta inibição, isoladamente, não contribui de todo para a toxicidade mitocondrial, o que sugere que outros mecanismos também estejam envolvidos.^{39,40} A disfunção mitocondrial pode prejudicar a função dos adipócitos, via aumento dos níveis das espécies reativas de oxigênio (ROS) e redução da produção de trifosfato de adenosina (ATP).⁴⁰ Estas alterações podem levar a distúrbios oxidativos no metabolismo dos lipídios, favorecendo o acúmulo e a lipotoxicidade.³⁹ As toxicidades mediadas pelos ITRNs provavelmente interagem com as alterações associadas aos IPs e ao próprio HIV, e contribuem para o aumento da apoptose e lipólise dos adipócitos, resultando numa diminuição do tamanho dos adipócitos e subsequentemente num fenótipo lipoatrófico (Figura 1).⁴⁰

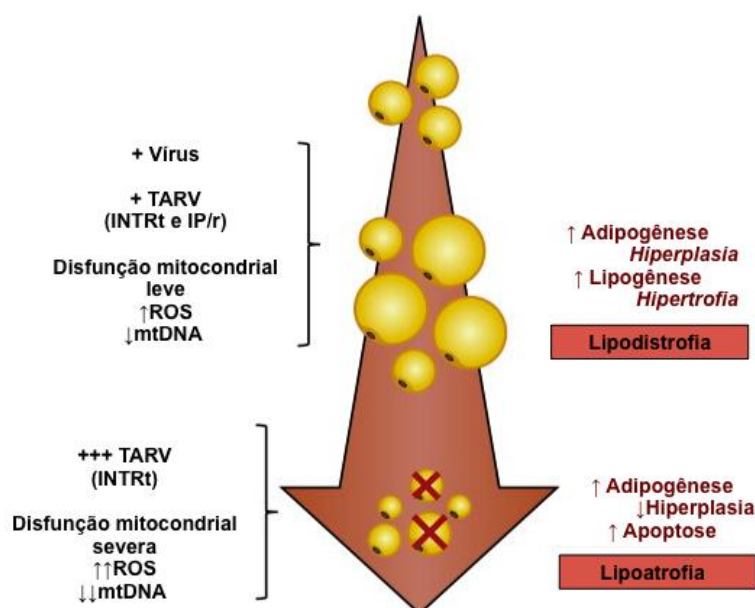


Figura 1. Disfunção mitocondrial no tecido adiposo (adaptado de Caron-Debarle e colaboradores, 2010).⁴⁰

TARV, terapia antirretroviral; ROS, espécies reativas de oxigênio; INTRt, inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos; IP/r, inibidor da protease/ritonavir; mtDNA, DNA mitocondrial.

Existem também alguns estudos preliminares sugerindo um componente genético para a disfunção mitocondrial que implica na lipoatrofia. Algumas evidências vêm do relato envolvendo 536 participantes no estudo de coorte

Multicenter AIDS, que associou o haplogrupo H no DNA mitocondrial com risco para a lipoatrofia.⁴¹ Além disso, Wangsomboonsiri e colaboradores (2010) demonstraram que o gene do antígeno leucocitário humano (HLA-B*4001) foi associado à lipoatrofia. No entanto, estes resultados aguardam a confirmação em outras populações e, por enquanto, nenhuma hipótese unificadora da predisposição genética para a lipoatrofia surgiu.⁴²

Fisiopatologia da Dislipidemia Secundária à Terapia Antirretroviral

A etiologia da síndrome de lipodistrofia ainda não está totalmente elucidada. Todavia, permanecem hipóteses que tentam explicar a sua gênese, através de mecanismos distintos para a ação dos IPs e dos ITRN. No entanto, contribuições individuais da infecção, agentes antirretrovirais específicos, fatores genéticos e mudanças associadas com a idade devem ser considerados.⁴³

Antes do uso dos medicamentos antirretrovirais de forma combinada, o aumento dos triglicerídeos, devido em parte à diminuição da depuração da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e à redução da HDL na circulação, já era descrito em indivíduos com HIV/Aids.⁴⁴ As alterações do metabolismo lipídico causadas pelo próprio vírus e os mecanismos responsáveis poderiam ser produzidos por fatores inflamatórios envolvidos na resposta imunológica à infecção.⁴⁴⁻⁴⁷

Várias teorias têm sido propostas para explicar o efeito dos IPs sobre a dislipidemia, embora, individualmente, nenhuma delas explique todos os aspectos destas alterações. Os IPs podem afetar várias vias metabólicas e são, etiologicamente, associados ao desenvolvimento de dislipidemia, resistência à insulina e lipohipertrofia. Carr e colaboradores (1998) propuseram uma teoria baseada no achado de homologia estrutural molecular entre o sítio catalítico da

protease do HIV e duas proteínas humanas envolvidas no metabolismo lipídico, a proteína ligadora do ácido retinóico citoplasmático tipo I (do inglês *Cellular Retinoic Acid Binding Protein 1*, CRABP-1) e proteína relacionada ao receptor da LDL (LRP). Assim, os IPs inibiriam etapas do metabolismo lipídico, dependendo provavelmente da expressão gênica dos receptores envolvidos.²⁰ A analogia encontrada na sequência de aminoácidos da protease do HIV foi de 63% com a região que incorpora o sítio de ligação do lipídio com a LRP e de 58% com a região terminal da CRABP-1.²⁰ Os IPs ligados ao CRABP-1 parecem diminuir a ativação do receptor do ácido 9-cis retinóico e a dimerização com o receptor ativado por proliferadores do peroxissoma γ (do inglês *Peroxisome Proliferator Activated-Receptor Gamma*, PPAR γ), que têm papel fundamental na diferenciação dos adipócitos e na apoptose dessas células, além de melhorar a sensibilidade periférica à insulina. Essas alterações levariam às hiperlipidemias e à liberação de lipídios na circulação (Figura 2).²⁰

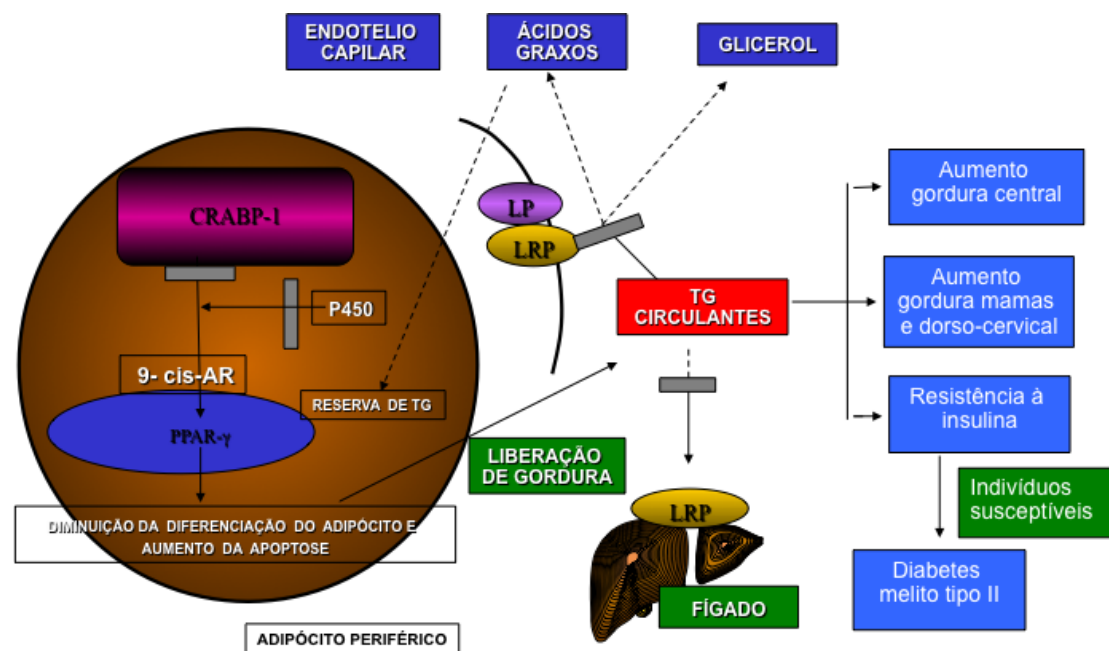


Figura 2. Mecanismo proposto para as alterações metabólicas e TARV (adaptado de Carr e colaboradores, 1998).²⁰

LP, lipase lipoproteica; LRP, proteína relacionada ao receptor da LDL; CRABP-1, proteína ligadora do ácido retinóico citoplasmático tipo I; 9-cis-AR, ácido 9-cis retinóico

Fatores que aumentam a atividade da proteína de ligação ao elemento regulador do estero1 1 (do inglês *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1*, SREBP-1) poderiam levar ao aumento da lipogênese e ao aumento na produção de VLDL. Experimentos em animais com RTV demonstram um aumento na produção de VLDL, o qual foi mais marcante na presença de dieta rica em gordura.⁴⁸ Além disso, o RTV não teve efeito sobre a depuração de lipoproteína na circulação e na expressão de enzimas responsáveis pela síntese de triglicerídeos.⁴⁸ Entretanto, foi observado um aumento significativo nos níveis hepáticos de apolipoproteína B (apo B).⁴⁸ Isto leva à hipótese de que o aumento nos triglicerídeos ocasionado pelo RTV seja devido ao aumento na produção hepática de lipoproteína, por inibição da degradação mediada pelo proteossoma da apo B e SREBP-1 no fígado.⁴⁹

Da mesma forma, a predisposição genética pode explicar, em parte, a variabilidade entre pacientes em relação aos efeitos dos IPs sobre o metabolismo dos lipídios. Alguns indivíduos quando expostos ao RTV podem ter elevações significativas nos níveis plasmáticos de triglicerídeos; enquanto que em outros este aumento não ocorre.⁵⁰⁻⁵²

Farmacogenômica e Terapia Antirretroviral

Nas últimas décadas, o conceito de que variações no genoma humano são determinantes importantes que influenciam a susceptibilidade a doenças infecciosas vem se consolidando, sendo responsáveis pela grande variação interindividual na resposta imune do hospedeiro após infecções, bem como na resposta terapêutica a diferentes fármacos.⁵³ A existência de grandes diferenças populacionais, bem como de pequenas variabilidades intrínsecas ao paciente, é consistente com a possibilidade de a herança genética ser um determinante na resposta aos fármacos.

Neste contexto, a farmacogenômica, que estuda a influência da estrutura e

da expressão genômica sobre a reação individual a fármacos e a farmacogenética é considerada a ciência que estuda as bases genéticas das variabilidades individuais, observadas nas respostas terapêuticas a tratamentos farmacológicos.⁵⁴ No entanto, para alguns pesquisadores, a convergência atual dos avanços em farmacogenética e do desenvolvimento rápido do genoma humano resultou na evolução da farmacogenética e sua transformação na farmacogenômica, especialidade mais abrangente, que se dedica, também, ao uso do genoma humano na descoberta de novos alvos terapêuticos. Esta evolução está levando a comunidade científica a um entusiasmo crescente para a aplicação da farmacogenômica na prática clínica. Assim sendo há controvérsia sobre a distinção a ser feita ou não entre farmacogenética e farmacogenômica. Nota-se que a distinção é arbitrária e que os dois termos são frequentemente usados de forma intercambiável.⁵⁵

Esta área da farmacologia clínica objetiva aperfeiçoar o tratamento através da personalização terapêutica conforme as diferenças nas características genéticas dos indivíduos.⁵⁴ Existem duas áreas amplas de pesquisa em farmacologia: a farmacocinética e a farmacodinâmica.⁵⁶ O termo farmacocinética refere-se ao curso de um fármaco e seus metabólitos em diferentes tecidos do organismo e inclui a sua absorção, distribuição, metabolização e eliminação. A farmacocinética de uma determinada substância é determinada pelas enzimas que a metabolizam bem como pelas proteínas que a transportam. Por sua vez, a farmacodinâmica descreve os efeitos farmacológicos de um medicamento no organismo, sejam eles desejados ou indesejados, e envolve as proteínas mediadoras do efeito deste medicamento, também chamadas de proteínas-alvo, que podem ser receptores ou proteínas transdutoras de sinais, por exemplo. Qualquer um destes tipos de proteínas pode contribuir para a variabilidade interindividual na eficácia ou toxicidade de um fármaco e, portanto, os genes que as codificam constituem possíveis candidatos para estudos farmacogenômicos.⁵⁶

Os avanços trazidos pela farmacogenômica ganham importância no tratamento clínico da infecção pelo HIV, devido à necessidade de um tratamento crônico e à elevada prevalência de efeitos adversos associados a este. Variações genéticas em certas proteínas envolvidas no transporte e no metabolismo dos antirretrovirais podem influenciar a sua eficácia e a ocorrência de efeitos adversos associados ao tratamento e à resposta virológica e imunológica.⁵⁷ A expectativa é que se possa selecionar o medicamento mais seguro e eficaz para cada tipo de paciente, de acordo com seu perfil genético. Acredita-se que o custo-efetividade da administração racional de medicamentos, através desse novo enfoque, trará grandes mudanças de paradigmas na Medicina.⁵⁸

Devido ao aumento mundial da mortalidade por doenças cardiovasculares, tem crescido a busca pelas variantes genéticas associadas à determinação dos níveis dos lipídeos plasmáticos e dos demais fatores de risco associados a essas patologias, como o excesso de massa corporal, a hipertensão arterial sistêmica e o diabetes melito.^{6,58,59} Tanto as abordagens genéticas mais tradicionais, como o estudo de genes candidatos, como aquelas surgidas na era pós-genômica, como os estudos de varredura genômica (do inglês *genome-wide association studies*, GWAS), têm indicado que os genes que codificam as proteínas envolvidas no transporte e metabolismo dos lipídeos na circulação sanguínea desempenham um papel importante na determinação destes fenótipos.^{6,7,58-61}

As lipoproteínas constituem um meio de transporte dos lipídeos na circulação sanguínea entre os diferentes órgãos e tecidos. Estas partículas variam a forma, tamanho e densidade no plasma, de acordo com sua composição em triglicerídeos e colesterol, sendo classificadas em quilomícrons e VLDL; estas primeiras mais ricas em triglicerídeos, e LDL e HDL, estas últimas mais ricas em moléculas de colesterol.⁶²

Os componentes proteicos das partículas de lipoproteínas são denominados de apoproteínas ou apolipoproteínas. Cada tipo de lipoproteína contém um conjunto característico de apolipoproteínas, conforme pode ser visto na Figura 3.

Apoproteínas			
Apoproteína	Função estrutural	Receptor	Efeito na atividade enzimática
AI	HDL	Receptor B1 vigilante (SRB1)	Ativador LCAP
AII	HDL	Receptor HDL?	Cofator LCAT
(a)	Lp(a)	Receptor plasminogênio?	Provavelmente interfere com a fibrinólise
B48	Quilomícrons	LRP	HTGL?
B100	VLDL, IDL, LDL	Receptor LDL	-
CI, CII	-	-	Ativação de LPL
CIII	-	-	Inibição de LPL
E	Partículas remanescentes	Receptor LDL	-

Figura 3. Função das apoproteínas. Tanto a apoE quanto a apoB ligam-se ao receptor de LDL, que algumas vezes é referido como receptor apoB/E. LCAT, lecitina: colesterol aciltransferase; LRP, proteína relacionada ao receptor da LDL, LDL, proteína de baixa densidade; HTGL, triglicerídeos lipase hepática; LPL, lipase lipoproteica.

Fonte: Baynes e Dominiczak, 2000.

Genes Candidatos

A estrutura do genoma humano é praticamente idêntica em todos, sendo a variabilidade individual determinada por apenas 0,1% da estrutura do DNA.⁸ Em geral, dois tipos de alterações genéticas são descritas: polimorfismos e mutações. Mutações são geralmente definidas como alterações no DNA que estão associadas ao dano celular, ocorrendo em uma frequência baixa na população (geralmente menos de 1%). Polimorfismos, por outro lado, são variantes genéticas mais frequentes, geralmente mais de 1% da população estudada. A maioria dos polimorfismos ocorre em nucleotídeos individuais, sendo chamados de

polimorfismos de um único nucleotídeo (do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs). Outros polimorfismos ocorrem como repetições de dinucleotídeos ou como grandes inserções ou deleções.

Estes polimorfismos podem ocorrer na região codificante dos genes, podendo ou não alterar o aminoácido codificado, ou nas regiões não codificantes, podendo modular a expressão de genes individuais.⁶³ Por outro lado, devido a sua proximidade, não é incomum que alguns SNPs sejam co-herdados com um gene relacionado a uma doença específica. Nestes casos, diz-se que o SNP está em desequilíbrio de ligação com um determinado gene participante da patogênese de uma dada doença, e sua detecção pode ser utilizada como marcador de diagnóstico ou prognóstico para dela.^{55,63}

As alterações descritas com os polimorfismos, apesar de fenotipicamente discretas ou mesmo imperceptíveis, podem determinar susceptibilidades variadas a doenças ou padrão de resposta alterado com o uso de certas medicações.^{8,64,65}

Estudos genéticos de fenótipos complexos podem ser baseados no conhecimento *a priori* do envolvimento potencial de um gene na patogênese do fenótipo em questão. Esta abordagem, amplamente empregada em estudos farmacogenômicos, é conhecida como do “gene candidato”.⁶¹

Dentre os genes que codificam as apolipoproteínas e demais proteínas relacionadas ao transporte e metabolismo dos lipídeos na circulação, selecionamos os candidatos mais prováveis para associação com os fenótipos dislipidemia e obesidade em pacientes infectados pelo HIV sob TARV, baseados nos relatos prévios da literatura em relação a populações saudáveis, tanto pela abordagem dos genes candidatos como pelos *GWAS*. Também foram utilizados como critérios de seleção estudos de associação positivos para as variantes selecionadas em populações brasileiras e os poucos relatos encontrados para associações em pacientes infectados pelo HIV.

Apolipoproteína A-V

O gene da apolipoproteína A-V (*APOA5*; Figura 4) foi recentemente identificado próximo ao grupo dos genes *APOA1/C3/A4*, como quarto membro do agrupamento de genes (*cluster*) no cromossomo 11, a uma distância de aproximadamente 27 kilobases (kb) do gene *APOA4* e 37 kb do *APOC3*. O *APOA5* é constituído por quatro éxons, codificando uma proteína de 369 aminoácidos. Parece ser expresso exclusivamente no fígado e secretado no plasma, onde a proteína está presente principalmente na lipoproteína HDL.⁶⁶⁻⁶⁹ Contudo, tem sido detectada, também, nas partículas de VLDL, quilomícrons, com igual distribuição em VLDL e HDL em jejum⁷⁰, mas não foi encontrada nas LDL.^{71,72}

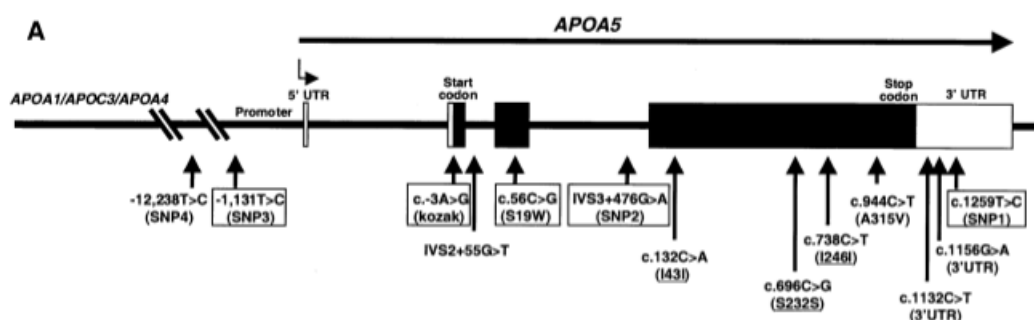


Figura 4. Estrutura genômica e localização dos polimorfismos do gene *APOA5*. O gene é transcrito da esquerda para a direita como indicado pela seta horizontal. Os éxons são mostrados por caixas, sendo que as regiões codificadoras de proteínas estão pintadas de preto. As posições e identidades dos SNPs identificados no gene *APOA5* são mostrados abaixo do esquema (adaptado de Pennacchio e colaboradores, 2002).⁶⁷

Segundo Pennacchio e colaboradores (2002), as concentrações plasmáticas de triglicerídeos estão fortemente relacionadas com variações no gene da *APOA5*.⁶⁷ Os camundongos em que o gene da *APOA5* humana foi superexpresso tinham os níveis plasmáticos de triglicerídeos cerca de um terço inferior em relação aos seus controles, enquanto que camundongos sem a expressão do gene (nocauteados por indução) apresentaram concentrações plasmáticas de triglicérides quatro vezes maiores do que os controles selvagens.^{66,73,74} Além disso, níveis de colesterol foram diminuídos em todas as

frações de lipoproteínas com a grande redução de massa da fração de HDL, o que sugere que *APOA5* pode ter um papel não apenas na regulação dos níveis de triglicérides, mas também nos do colesterol.⁷⁵

A exata função do gene da *APOA5* ainda não está clara. Desde a sua descoberta, tem sido considerado como um potente fator regulador do metabolismo dos triglicérides e dois mecanismos têm sido propostos para a sua ação. Um deles é que a apolipoproteína A-V (apoA-V) poderia modular a síntese hepática intracelular e/ou a secreção de VLDL^{71,72,76}, ou seria um ativador intravascular da hidrólise dos triglicérides pela lipase lipoproteica (LPL).⁷⁷⁻⁷⁹ A apoA-V, através da ligação aos quilomícrons ou à VLDL, em um sítio aos proteoglicanos endoteliais e à LPL pelo outro, estabiliza o sistema lipolítico endotelial e assim aumenta a hidrólise de TG mediada pela LPL. Além disso, pode também estabilizar a LPL dimérica ou, menos provavelmente, modular a forma das lipoproteínas ricas em TG, tornando-as um melhor substrato para a LPL.⁷⁷⁻⁸⁰ A apoA-V, mesmo em baixas concentrações plasmáticas, pode ser reutilizada e transferida para outras partículas de lipoproteínas após a hidrólise.⁸⁰

Entre os SNPs mais estudados no gene *APOA5* encontram-se o C56G (S19W; rs3135506) e o -1131T/C (rs662799). O polimorfismo C56G é responsável pela troca de uma serina por um triptofano na posição 19 da proteína, enquanto que no -1131T/C não há troca de aminoácidos, já que está localizado na região promotora do gene.⁶⁷ Estes polimorfismos podem alterar a síntese ou a estrutura secundária da proteína, modificando sua função no controle da secreção de lipídeos.⁸¹ De acordo com alguns estudos, os alelos raros de ambos SNPs conferem aos seus portadores risco maior de possuir concentrações de triglicérides aumentadas.

Apolipoproteína B

A apolipoproteína B (apoB) é uma glicoproteína constituída por 4536 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 540 kDa. É uma proteína anfipática, que pode ser encontrada em duas formas principais de acordo com seu peso molecular: apoB48 e apoB100. A primeira é sintetizada pelo intestino enquanto a segunda, pelo fígado.⁸² A sua natureza anfipática faz com que as regiões hidrofóbicas estejam imersas no núcleo da LDL e, as hidrofílicas, expostas na superfície da molécula.⁸³ Possui cinco domínios estruturais, sendo o quarto domínio (aminoácidos 3070-4100), o responsável pela interação da apoB com os receptores para LDL e pela manutenção da integridade desta partícula. Esses processos modulam a remoção de LDL e regulam a biossíntese do colesterol.^{84,85} Ainda, está envolvida na montagem e secreção dos quilomícrons no intestino delgado e da VLDL do fígado.^{86,87}

A apoB é o principal componente estrutural de muitas lipoproteínas: quilomícrons (responsáveis pelo transporte dos lipídeos absorvidos pelo intestino), VLDL, IDL, LDL.⁸⁸ A apoB100 é uma ligante para o receptor de LDL e também está presente na lipoproteína(a), onde se liga a um polipeptídeo homólogo ao plasminogênio.^{89,90}

A apoB100 é o único constituinte proteico da LDL.⁹¹ Já a apoB48 é codificada pelo mesmo gene que codifica a apoB100, resultado de um mecanismo de edição do RNA mensageiro no qual ocorre a troca de uma base citosina por uma uracila, transformando o códon CAA codificante do aminoácido glutamina (posição 2153) para um códon de terminação UAA.⁹² O gene *APOB* se localiza no braço curto do cromossomo 2 (2p24) e contém 29 éxons e 28 íntrons. A clonagem e o sequenciamento do gene da *APOB* tornaram possível o estudo de suas variações no DNA humano. Vários polimorfismos no gene *APOB* já foram estudados. Dentre os sítios polimórficos já descritos, destacam-se *XbaI* (éxon 26), *EcoRI* (éxon 29),

Ins/Del (éxon 1- peptídeo sinalizador), *MspI* (éxon 26) e região hipervariável na extremidade 3'.^{84,91,93,94} Todos têm sido estudados quanto ao seu potencial de associação com variações nos níveis do perfil lipídico em humanos.

Dentre os polimorfismos citados, o polimorfismo *XbaI* (7673 C>T; rs693) do gene da apoB refere-se a uma troca de um nucleotídeo no éxon 26, a qual resulta em uma mutação silenciosa, que não afeta a sequência de aminoácidos da apoB. Ocorre a troca de um nucleotídeo citosina por uma timina na terceira posição do códon 2488 (ACC→ACT), que codifica o mesmo aminoácido treonina. A presença de timina resulta em um alelo sensível (X+) e outro insensível (X-) à enzima *XbaI*, dos quais o alelo X- parece corresponder ao alelo selvagem. Essa variação determina três genótipos X+X+, X+X- e X-X-.^{93,95,96} O fragmento de 710 pares de bases, gerado pelo método mais amplamente utilizado, que amplifica parte do éxon 26, contendo o sítio de mutação, é clivado pela enzima *XbaI* durante a restrição enzimática em dois fragmentos de 433 e 277 pares de base no alelo X+, e não é clivado no alelo X-.⁹⁷

O polimorfismo I/D é resultante da inserção (I)/deleção (D) no éxon 1, de 3 códons (9 pares de base), gerando um peptídeo sinal de 27/24 aminoácidos. Ele possui um potencial impacto fisiológico porque altera a estrutura (3 aminoácidos, Leu-Ala-Leu) do peptídeo sinal.⁹⁸ Isso pode afetar a síntese e expressão do gene da *APOB*, que possui papel central no metabolismo lipídico.⁹⁹ A deleção (D) caracteriza o polimorfismo.

Apolipoproteína C-III

A apolipoproteína C-III (apoC-III) é componente dos quilomícrons e da VLDL e está presente em pequena quantidade na HDL, LDL e IDL, sendo o fígado o principal local de síntese e, em menor grau, o intestino. No plasma normal, a apoC-

III apresenta três isoformas (apo CIII-0, apo CIII-1 e apo CIII-2),¹⁰⁰ que diferem entre si pelo número de ligações dos ácidos siálicos. A apoC-III, *in vitro*, é capaz de inibir as lipases lipoproteica e hepática.¹⁰¹

Alguns polimorfismos têm sido detectados em torno do gene da apoC-III (*APOC3*), que está localizado no cromossomo 11, região q23.1-q23.2. O mais amplamente estudado é o polimorfismo *Sst*I, devido a uma substituição de uma C por uma G, na posição do nucleotídeo 3238 (rs5128), na região 3' não traduzida do gene. Esta substituição gera dois alelos: C e G. O genótipo normal é CC, sendo considerados alterados o CG e GG.¹⁰¹

Apolipoproteína E

A apolipoproteína E (apoE), integrante de lipoproteínas plasmáticas, tem sido extensivamente estudada, principalmente por sua função no metabolismo de lipídeos e envolvimento no transporte de colesterol em vários tecidos.¹⁰²⁻¹⁰⁴

O gene para a apoE (*APOE*) foi mapeado no cromossomo 19 (19q13.2). Existem três principais isoformas da apoE que são codificadas por diferentes alelos, denotados como E2, E3 e E4, distintas entre si pela composição de aminoácidos nas posições dos códons 112 e 158 do éxon 4, o que confere diferenças metabólicas entre cada isoforma,^{105,106} que possibilita a formação de seis genótipos (E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4 e E4/E4); Figura 5. O alelo E2 (cisteína/cisteína) possui o aminoácido cisteína nas duas posições da proteína (aminoácidos 112 e 158) é a menos frequente na população em geral. O alelo E3 (cisteína/arginina) codifica a forma ancestral da proteína; possui o códon 5'-TGC- 3' na posição 112, que corresponde ao aminoácido cisteína, e o códon 5'-CGC-3' na posição 158 correspondendo ao aminoácido arginina (sendo este o alelo mais comum). Uma troca de C por T na posição 158 da proteína faz a E2 diferir de E3 por

codificar uma cisteína. O alelo E4 (arginina/arginina) possui argininas nestas duas posições e uma troca de T por C é responsável pela diferença entre as formas E4 e E3, por acrescentar arginina na posição 112.¹⁰⁷⁻¹¹¹ As outras variantes da apoE são chamadas de E1, E5 e E7, mas elas são extremamente raras. Os polimorfismos cadastrados no dbSNP correspondentes à essas alterações são respectivamente, rs429358 (C471T), e rs7412 (T609C).

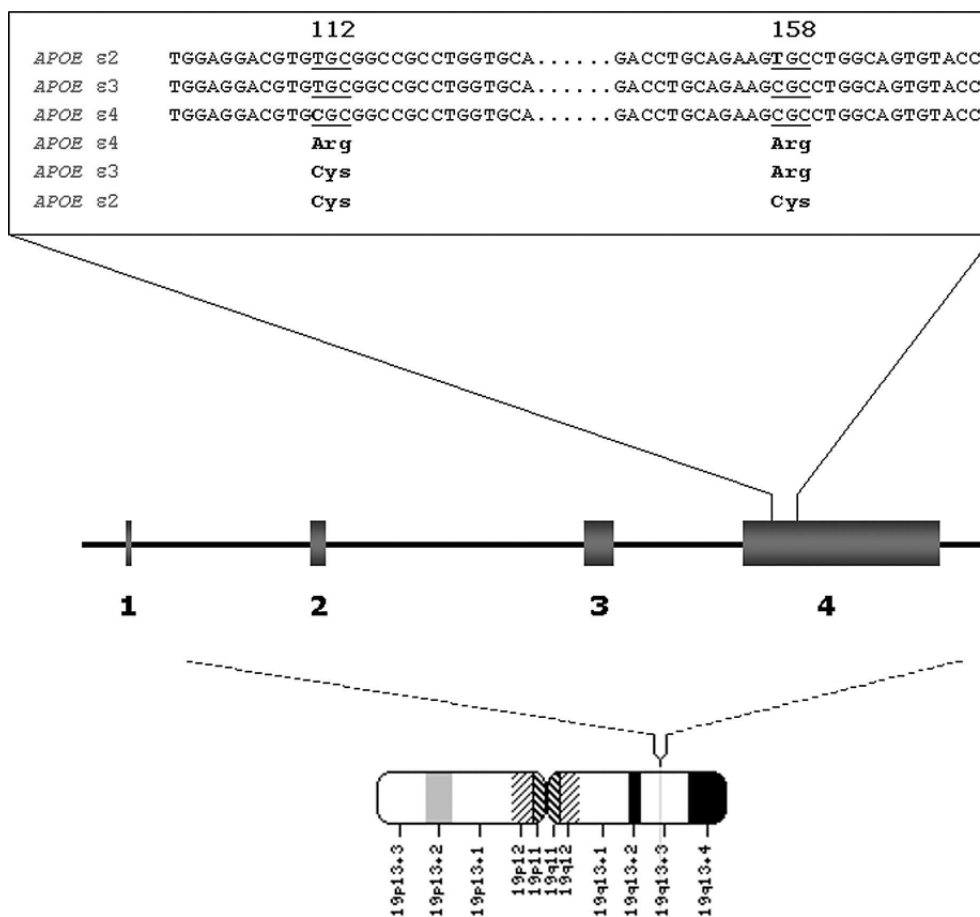


Figura 5. O gene *APOE* humano está mapeado no cromossomo 19 humano (19q13,2). Em humanos existem três alelos principais do gene *APOE* (E2, E3 e E4). As isoformas proteicas produzidas por esses alelos diferem na composição de aminoácidos nas posições 112 e 158: E2 (Cys 112, Cys 158), E3 (Cys 112, Arg 158; forma mais comum), e E4 (Arg 112, Arg 158). (adaptada de Ojopi e colaboradores, 2004).¹¹²

Vários mecanismos foram descritos sobre a influência das diferentes isoformas da apoE influenciam nas concentrações plasmáticas de colesterol:

influenciando a absorção de colesterol, a síntese endógena de colesterol, eliminação do colesterol através dos ácidos biliares, a remoção dos quilomícrons remanescentes, a conversão do IDL em LDL, a cinética do LDL, a depuração hepática das gorduras da dieta, através de propriedades imunorregulatórias, pela afinidade aos receptores de lipoproteínas e participando no transporte reverso do colesterol.¹¹³⁻¹¹⁵ A apoE desempenha seu papel no transporte do colesterol fundamentalmente através de dois receptores de lipoproteínas, servindo como ligante ao receptor de LDL e receptor hepático de apoE/proteína relacionada ao receptor de LDL.^{115,116} A afinidade pelo receptor depende do polimorfismo do éxon 4 no gene da *APOE* e é isoforma-específica. *In vitro*, E3 e E4 demonstraram afinidade similar pelo receptor de LDL, enquanto que E2 apresentava 2% ou menos de capacidade de ligação.¹¹⁷ Além disso, o catabolismo da partícula contendo E2 também é mais lento, resultando em uma taxa menor de formação de LDL.¹¹⁸ Como a hidrólise da LDL é mais lenta, ocorre um acúmulo de VLDL e remanescentes contendo E2, no meio extracelular. Dessa forma, o nível extracelular de colesterol diminui, levando a um estímulo na síntese de receptores, conseqüentemente aumenta a absorção de LDL, diminuindo sua concentração plasmática.

Por outro lado, a depuração dos remanescentes de quilomícrons ocorre de forma mais rápida nas isoformas E4 do que nas E3. Este fato, associado à absorção elevada de colesterol nos indivíduos E4, aumenta o aporte intra-hepático de colesterol, diminuindo a síntese hepática de colesterol e a atividade do receptor de LDL, conseqüentemente elevando os níveis plasmáticos de LDL. A baixa afinidade de E2 pelo receptor de LDL leva ao aumento da atividade deste e aumento na depuração de LDL.¹¹³

Da mesma forma, há evidência de que a distribuição das isoformas de *APOE* entre as partículas de lipoproteínas é isoforma-específica, com E4 com maior associação com lipoproteínas ricas em triglicérides que E3 e E2.^{113,116}

Concentrações altas de triglicerídeos foram observadas em portadores de E2 e E4 quanto comparados a homozigotos E3.¹¹⁹ Entretanto, este resultado aparenta ser relativamente contraditório em relação ao alelo E4 que, em outros estudos, foi associado com baixos níveis de triglicerídeos,¹²⁰ enquanto outros ainda não mostraram nenhuma associação consistente.¹²¹ Também houve pesquisadores que encontraram discordância sobre a prevalência aumentada de hipertrigliceridemia em indivíduos E4.¹¹⁶

Os indivíduos portadores do alelo E4 apresentam níveis mais elevados de colesterol total, LDL, enquanto que os portadores do alelo E3 apresentam níveis intermediários e os portadores do alelo E2 níveis menores. O alelo E2 foi relacionado também com aumento nos níveis séricos de triglicerídeos.^{115,116,122,123}

Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade

O receptor de lipoproteína de baixa densidade (receptor de LDL) é uma glicoproteína majoritariamente expressa no fígado, embora também seja em células dos tecidos periféricos. Esses receptores reconhecem a apoB100, presente na LDL, e a apoE, presente nas IDL e HDL, removendo essas lipoproteínas da circulação por meio de um processo de alta afinidade de ligação e internalização^{124,125} regulando assim, o nível de colesterol plasmático.¹²⁶

No metabolismo celular da partícula de LDL, a apo B100 da superfície liga-se ao receptor de LDL, que está localizado em regiões denominadas de fossetas revestidas, que contêm clatrina. Na sequência, o complexo do receptor de LDL é internalizado por endocitose formando endossomos. O endossomo possui pH ácido, o que permite que a LDL se dissocie do receptor.¹²⁷ Este é reciclado, podendo retornar à superfície da célula e iniciar outro ciclo de endocitose. A LDL, por sua vez, é entregue ao lisossomo quando as membranas do endossomo e do lisossomo se

fundem. Os componentes proteicos da LDL são hidrolisados a aminoácidos, por hidrólise da apoB100, e os ésteres de colesterol à colesterol livre o qual é transferido para um compartimento celular onde pode associar-se às membranas celulares.¹²⁸ Cada ciclo de atividade do receptor de LDL tem a duração aproximada de 10 minutos, ocorrendo internalização e reciclagem mesmo na ausência de ligante.¹²⁹ O colesterol liberado da LDL exerce ações regulatórias como aumento da atividade da esterificação do colesterol; diminuição da biossíntese de colesterol endógeno; e diminuição da síntese de receptores para LDL, aumentando assim a sua concentração plasmática (Figura 6).^{102,130}

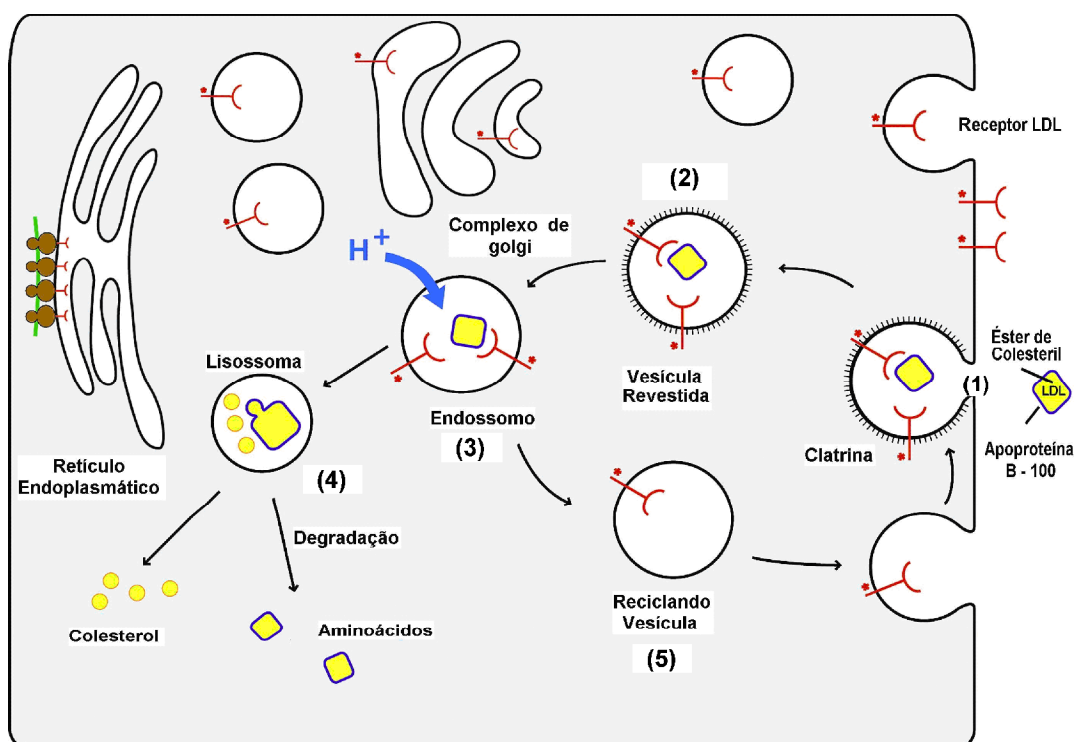


Figura 6 – Ciclo celular do receptor de LDL. (1) ligação da LDL ao receptor (vesícula revestida de clatrina) → (2) internalização da LDL (vesícula revestida) → (3) formação dos endossomos → (4) hidrólise dos componentes (degradação com formação de colesterol e aminoácidos) → (5) reciclagem do receptor (adaptado de Jeon & Blacklow, 2005)¹³⁰

O papel do receptor de LDL no metabolismo e na regulação intra e extracelular do colesterol, foi demonstrado nos estudos com pacientes com hipercolesterolemia familiar, doença hereditária autossômica dominante, caracterizada por mutação no gene receptor do LDL (*LDLR*), que predispõe às

doenças cardiovasculares em pessoas ainda jovens.^{102,130}

O gene *LDLR*, está localizado no cromossomo 19 (19p13.2 – 19p13.3), possui 18 éxons, 17 íntrons e codifica 5 domínios proteicos, cobrindo uma região de aproximadamente 45 kb.^{127,129,130} O domínio amino-terminal com função de ligação com as LDL apresenta 292 aminoácidos e, ainda, uma sequência rica em cisteína que possui sete repetições imperfeitas de aproximadamente 40 aminoácidos, com algumas variações (repetições de I a VII). Por análise mutacional, verificou-se que nem todas as repetições são essenciais para a correta ligação do *LDLR*, havendo uma contribuição individual de cada repetição para a capacidade de ligação.^{127,129} O RNA mensageiro transcrito a partir deste gene tem 5,3 kb, dos quais aproximadamente metade correspondem a uma extensa região 3' não traduzida (UTR) do éxon 18.¹³⁰ Da tradução do RNA mensageiro do *LDLR* resulta um polipeptídeo com 860 aminoácidos. A região a montante do gene *LDLR* contém as sequências reguladoras em *cis* que atuam no controle da expressão do gene. Na região que contém os 200 pares de bases que antecedem o códon de iniciação da tradução encontram-se três repetições diretas imperfeitas, em que duas das repetições interatuam com o fator de transcrição e outra contém um local de regulação condicional positiva por esteróis (do inglês *sterol regulatory element*, *SRE*).^{130,131}

SCAP: Proteína Ativadora da Clivagem de SREBP

Os mecanismos reguladores envolvidos na homeostase do colesterol ainda são parcialmente compreendidos, sabe-se que a biossíntese do colesterol é controlada diretamente pelos seus níveis no retículo endoplasmático e posterior transdução dessa informação através da expressão de vários genes.¹³² O elemento chave envolvido neste processo de regulação da biossíntese do colesterol é uma família de fatores de transcrição de membranas, as proteínas de ligação ao

elemento de resposta a esterol (do inglês *sterol regulatory element binding proteins*, SREBP).

A SREBP está localizada na membrana do retículo endoplasmático. Quando aumenta o colesterol celular, a ligação deste e de seus derivados oxigenados (óxidos de colesterol) à proteína ativadora de clivagem da SREBP (SCAP; *SREBP cleavage-activating protein*) e à proteína do gene induzido pela insulina 1 (do inglês *insulin induced gene 1*, INSIG-1) promove a associação dessas proteínas com a SREBP. Sendo assim, o complexo proteico INSIG/SCAP/SREBP permanece na membrana do retículo. Por outro lado, a redução do conteúdo intracelular de colesterol favorece a dissociação do complexo INSIG/SCAP, permitindo que a SCAP direcione a SREBP ao complexo secretório celular (complexo de Golgi). Neste compartimento, a SREBP sofre duas clivagens proteolíticas subsequentes, de modo que a porção ativa do fator de transcrição seja liberada e migre ao núcleo, onde induz a transcrição do gene do *LDLR* (capta o LDL circulante na corrente sanguínea), HMG-CoA (Hidroxi-metil-glutaril-Coenzima A) redutase (leva a uma produção endógena aumentada de colesterol) e da proteína que degrada o receptor de LDL (Figura 7).¹³²⁻¹³⁷ Este mecanismo de regulação do colesterol celular protege as células do efeito deletério causado quando há concentração excessiva de colesterol.^{138,139}

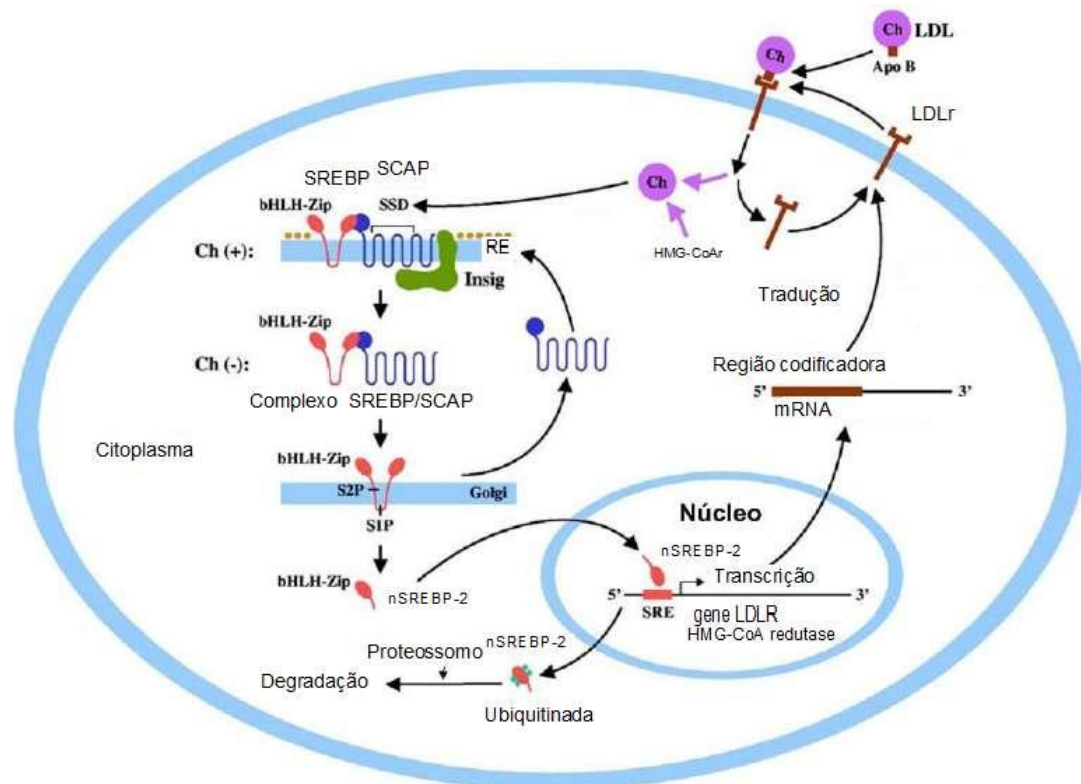


Figura 7. Regulação intracelular da expressão do gene *LDLR* e da HMG-CoA redutase pelo SREBP-2. A via das SREBPs desempenha um importante papel na regulação de transcrição, enquanto a região 3'UTR do mRNA do *LDLR* é um fator chave na regulação pós-transcrição. bHLH-Zip, zíper de leucina hélice-alça-hélice básico; Ch, colesterol; RE, retículo endoplasmático; HMG-CoA redutase, 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase; Insig, gene insulina induzido; SREBP, proteína ligadora do elemento regulado por esteróis; nSREBP-2, SREBP-2 maduro; S1P, protease site-1; S2P, protease site-2; SCAP, proteína de ativação da clivagem do SREBP; SRE, elemento regulador de esteróis (adaptado de Kong & Jiang, 2008).¹³³

O gene SCAP está localizado no cromossomo 3p21.3.11, possui 23 éxons e codifica uma proteína de 1276 aminoácidos. A porção amino-terminal da proteína contém oito sequências hidrofóbicas separadas por pequenas alças hidrofílicas. Esse domínio está também presente na HMG-CoA redutase e compreende uma área de sensor de colesterol, enquanto a porção carboxi-terminal contém a função biológica restante.¹⁴⁰

Estudos de Associação com Dislipidemia e Fenótipos Relacionados em Indivíduos Infectados pelo HIV

A dislipidemia e a anormalidade na distribuição da gordura corporal são alterações frequentes em indivíduos expostos à TARV. O uso de regimes contendo RTV é um dos indicadores mais significativos de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, enquanto que o uso de estavudina, zidovudina, didanosina e IP está, principalmente, associado à redistribuição da gordura corporal. No entanto, alterações metabólicas não ocorrem em todos os pacientes, apesar de comparáveis demograficamente e apresentarem resposta imunológica e virológica semelhantes quando expostos aos mesmos medicamentos.⁵⁷

Polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo de lipoproteínas e dos adipócitos poderiam explicar, pelo menos em parte, estas divergências. Os principais estudos em relação aos genes candidatos descritos no capítulo anterior em pacientes infectados pelo HIV estão resumidos na Tabela 1 e são discutidos a seguir.

Recentemente, SNPs consistentemente associados com níveis de lipídeos séricos na população em geral foram validados em 745 pacientes infectados pelo HIV em uso de TARV. Um escore genético favorável (com base no número de SNPs associados à dislipidemia no paciente) foi associado a níveis elevados de LDL em 32% dos pacientes; em pacientes com um escore genético desfavorável, este número subiu para 53%. Da mesma forma, os níveis baixos de HDL-C, naqueles em uso de inibidor da protease, foram observados em 17% dos pacientes com um escore genético favorável, versus 42% com um escore desfavorável.⁷

Estudos de genes candidatos em pacientes infectados pelo HIV centraram-se na variação genética na *APOE* e os genes do agrupamento *APOA1/C3/A4/A5* devido à correlação entre os polimorfismos neste grupo com hiperlipidemia na

população em geral. As variantes alélicas do gene da *APOC3* e da *APOE* parecem também contribuir significativamente para elevações nos níveis de triglicerídeos, a um grau comparável a fatores de risco como a idade e uso de RTV como componente do esquema ARV.¹⁴⁻¹⁴³ Adicionalmente, relato de casos indica que dislipidemia severa pode ter sido provocada pelo início da TARV em portadores dos alelos E2 e E4 da *APOE*. O polimorfismo 3238 C>G do gene *APOC3* têm sido associado a um maior risco de desenvolvimento de dislipidemia.^{141,142} Fauvel e colaboradores (2001) avaliaram 60 homens em uso de IP (dos quais 31 pacientes estavam recebendo indinavir), demonstraram uma associação do alelo raro da *APOC3* (G) com altos níveis de triglicerídeos e baixos níveis de HDL-C.¹⁴² Esta associação do SNP da *APOC3* com dislipidemia foi confirmada em um estudo longitudinal com 329 participantes do Estudo *Swiss HIV Cohort* (SHCS).¹⁴¹ Na população deste estudo, 5,8% dos pacientes com genótipos desfavoráveis em *APOC3* (3238G) e portadores das variantes da *APOE* (E2 e E4), apresentaram maior risco de desenvolver hipertrigliceridemia quando expostos ao RTV.¹⁴² Em contraposição, Foulkes e colaboradores (2006) não encontraram associação entre o SNP 3238 C>G da *APOC3* e níveis de triglicerídeos, HDL ou LDL, em indivíduos caucasianos e africanos.¹⁴³

Embora os mecanismos pelos quais as variações no gene da *APOA5* influenciam os níveis de triglicerídeos ainda não sejam bem conhecidos, resultados sugerem que eles sejam um dos mais importantes determinantes genéticos das concentrações de triglicerídeos no plasma.¹⁴⁴ Segundo Guardiola e colaboradores (2006), pacientes HIV positivo em uso de IP, portadores do alelo raro -1131C da *APOA5* apresentam níveis plasmáticos de triglicerídeos acentuadamente aumentados. Um efeito semelhante, mas de menor magnitude, foi demonstrado em relação a alterações nos níveis de colesterol total.¹⁴⁵

Arnedo e colaboradores (2007), com modelo de escore genético, verificaram a contribuição de 20 SNPs em 13 genes envolvidos no transporte dos lipídeos, em 438 pacientes em uso de TARV. Variantes de cinco genes, entre eles *APOA5* (64 G>C e -1131 T>C), *APOC3* (-482 C>T, -455T>C e 3238C>G) e *APOE*, contribuíram para hipertrigliceridemia e as variantes de dois genes (*APOA5* (64 G>C e -1131 T>C) e *CETP*) contribuíram para baixos níveis de HDL.⁶

Em conjunto, estes resultados indicam que muitos fatores genéticos comuns para a população em geral estão associado à dislipidemia em HIV e, em particular, durante a terapia com IP. Estudos mais amplos são necessários para investigar associações entre estas variantes genéticas, TARV e outros eventos vasculares e metabólicos em indivíduos infectados pelo HIV.

Tabela 1: Principais estudos de associação entre polimorfismos em genes codificadores de lipoproteínas e fenótipos relacionados ao perfil lipídico em indivíduos infectados pelo HIV

Gene	SNP	Posição no gene	N	Alelo frequente/ raro	MAF*	Achado	Referência
<i>APOC3</i>	rs5128 3238 C>G	região 3'UTR	60	C/G	0,066	<u>Alelo raro</u> Maior IMC TG: 60% mais alto; HDL: 30% mais baixos.	Fauvel, 2001. ¹⁴²
<i>APOC3</i>	rs5128 3238 C>G	região 3'UTR	329	C/G	0,092	<u>Alelo raro e alelos E2 e E4</u>	Tarr, 2005. ¹⁴¹
<i>APOE</i>	rs429358; 2060 T>C e rs7412; 2198 C>T	Éxon 4, posição 112 e 158 da proteína	329	E2, E3, E4	2060T>C: 0,093 2198C>T: 0,055	Hipertrigliceridemia	
<i>APOC3</i>	rs5128 3238 C>G	região 3'UTR	626	C/G	-	NS	Foulkes, 2006. ¹⁴³
<i>APOA5</i>	rs3135506 S19W (56 C>G)	Posição 19 da proteína	742	C/G	0,07	Baixo HDL Hipertrigliceridemia	Rotger, 2009. ⁷
<i>APOA5</i>	rs662799 -1131 T>C	Região promotora	742	T/C	0,08	Baixo HDL Hipertrigliceridemia	Rotger, 2009. ⁷
<i>APOE</i>	rs429358 2060 T>C	Éxon 4, posição 112 da proteína	742	T/C	0,11	Hipertrigliceridemia Aumento Não HDL	Rotger, 2009. ⁷
<i>APOE</i>	rs7412 2198 C>T	Éxon 4, posição 158 da proteína	742	C/T	0,07	Hipertrigliceridemia Aumento Não HDL	Rotger, 2009. ⁷
<i>APOB</i>	rs693 7673 C>T	Éxon	742	C/T	0,44	Aumento Não HDL	Rotger, 2009. ⁷
<i>APOA5</i>	Haplótipo rs3135506; 64 C>G e rs662799; -1131 T>C	Posição 19 da proteína e região promotora	438	Haplótipo	64 C>G: 0,07 -1131 T>C: 0,09 Haplótipo: 0,26	<u>Haplótipo</u> Baixo HDL Hipertrigliceridemia	Arnedo, 2007. ⁶
<i>APOE</i>	rs429358; 2060 T>C e rs7412; 2198 C>T	Éxon 4, posição 112 e 158 da proteína	438	E2, E3, E4	-	<u>Alelo E2 e E3</u> Hipertrigliceridemia	Arnedo, 2007. ⁶
<i>APOC3</i>	Haplótipo rs2854117; -482 C>T, rs2854116; -455T>C e rs5128; 3238C>G	Éxon 4, região 3'	438	Haplótipo	-482 C>T: 0,31 -455 T>C: 0,41 3238 C>G: 0,10 Haplótipo: 0,65	<u>Haplótipo</u> Hipertrigliceridemia	Arnedo, 2007. ⁶

<i>APOA5</i>	rs662799 -1131 T>C	Região promotora	229	T/C	0,08	<u>Alelo raro</u> Hipertrigliceridemia Hipercolesterolemia Baixo HDL	Guardiola, 2006. ¹⁴⁵
<i>APOE</i>	rs429358; 2060 T>C e rs7412; 2198 C>T	Éxon 4, posição 112 e 158 da proteína	174	E2, E3, E4	-	<u>Alelos E2 e E4</u> Hipertrigliceridemia	Marzocchetti, 2011. ¹⁴⁶

SNP, polimorfismo de um único nucleotídeo; IMC, índice de massa corporal; HDL, lipoproteína de alta densidade.

*MAF: frequência do alelo raro

Referências Bibliográficas

1. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998;338:853-60.
2. Marins JR, Jamal LF, Chen SY, et al. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. *AIDS* 2003;17:1675-82.
3. Tuboi SH, Brinkhof MWG, Egger M, et al. Discordant responses to potent antiretroviral treatment in previously naive HIV-1-infected adults initiating treatment in resource-constrained countries: the antiretroviral therapy in low-income countries (ART-LINC) collaboration. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;45:52-9.
4. Dubé MP, Stein JH, Aberg JA, et al. Guidelines for the evaluation and management of dyslipidemia in human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults receiving antiretroviral therapy: Recommendations of the HIV Medicine Association of the Infectious Disease Society of America and the Adult AIDS Clinical Trials Group. *Clin Infect Dis* 2003;37:613-27.
5. Friis-Møller N, Sabin CA, Weber R, et al. Cardiovascular disease risk factors in HIV patients-association with antiretroviral therapy. Results from the DAD study. *AIDS* 2003;17:1179-93.
6. , Sahli R, et al. Contribution of 20 single nucleotide polymorphisms of 13 genes to dyslipidemia associated with antiretroviral therapy. *Pharmacogenet Genom* 2007;17(9):755–564.
7. , et al. Contribution of genome-wide significant single-nucleotide polymorphisms and anti- retroviral therapy to dyslipidemia in HIV-infected individuals: A longitudinal study. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2(6):621–628.

8. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007;449:851-61.
9. Sepkowitz KA. Aids – The first 20 years. *N Eng J Med* 2001;344(23):1764-1772.
10. Schwartz SA, Nair MPN. Current concepts in Human Immunodeficiency Virus infection and AIDS. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6(3):295-305.
11. Cao Y, Qin L, Zhang L, et al. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England Journal of Medicine*, 332: 201-208, 1995.
12. Paranjape RS. Immunopathogenesis of HIV infection. *The Indian Journal of Medical Research* 2005;121:240-255.
13. World Health Organization. Joint United Nations Programme of HIV/AIDS. Report on the Global AIDS Epidemic. 2008. www.who.int/hiv.
14. Joint United Nations Program on HIV/AIDS and World Health Organization. AIDS Epidemic Update. Geneva, Switzerland; 2009. Disponível em <http://www.unaids.org>.
15. MS - Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Boletim Epidemiológico Aids e DST 2011. Acesso em http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2011/50652/boletim_aids_2011_final_m_pdf_26659.pdf.
16. UNAIDS 2012 Global Report. Acesso em <http://www.unaids.org/en/aboutunaids/unaidstrategygoalsby2015/>.
17. MS/SVS – Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Recomendações de terapia antirretroviral para adultos vivendo com HIV/aids no Brasil – 2008. Brasília: Coordenação

- Nacional de DST e AIDS. Acesso em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/2008/consenso-adulto-2008>.
18. MS/SVS – Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Recomendações de terapia antirretroviral para adultos vivendo com HIV/aids no Brasil – 2012. Brasília: Coordenação Nacional de DST e AIDS. Acesso em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/2012/consenso-adulto-2012>.
 19. Schneider E, Whitmore S, Glynn KM, Dominguez K, Mitsch A, McKenna MT; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Revised surveillance case definitions for HIV infection among adults, adolescents, and children aged <18 months and for HIV infection and AIDS among children aged 18 months to <13 years—United States, 2008. *MMWR Recomm Rep* 2008;57(RR-10):1–12.
 20. Carr A, Sâmaras K, Burton S, et al. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS* 1998;12:51-8.
 21. Carr A, Cooper DA. Lipodystrophy associated with an HIV-protease inhibitor. *N Engl J Med* 1998;339:1296.
 22. The DAD Study Group. Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2007;356:1723-35.
 23. Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, et al. Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet* 1999;353:2093-9.
 24. Gervasoni C, Ridolfo AL, Trifiro G, et al. Redistribution of body fat in HIV-infected women undergoing combined antiretroviral therapy. *AIDS* 1999;13:465-71.

25. Miller KD, Jones E, Yanowski JA, et al. Visceral abdominal-fat accumulation associated with use indinavir. *Lancet* 1998;351:871-5.
26. Safrin S, Grunfeld C. Fat Distribution and metabolic changes in patients with HIV infection. *AIDS* 1999;13:2493-505.
27. Wanke CA, Falutz JM, Shevitz A, et al. Clinical Evaluation and Management of Metabolic and Morphologic Abnormalities Associated with Human Immunodeficiency Virus. *Clin Infect Dis* 2002;34:248-59.
28. Grunfeld C, Tien P. Difficulties in understanding the metabolic complications of acquired immune deficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 2003;37:S43-46.
29. Stein, J.H. Dyslipidemia in the era of HIV protease inhibitors. *Prog Cardiovasc Dis* 2003;45:293-304.
30. Asztalos BF, Schaefer EJ, Horvath KV, et al. Protease inhibitor-based HAART, HDL, and CHD-risk in HIV-infected patients. *Atherosclerosis* 2006;184:72-7.
31. Périard D, Telenti A, Sudre P, et al. Atherogenic dyslipidemia in HIV-infected individuals treated with protease inhibitors. The Swiss HIV Cohort Study. *Circulation* 1999;100:700-5.
32. Stein JH, Klein MA, Bellehumeur JL, et al. Use of human immunodeficiency virus-1 protease inhibitors is associated with atherogenic lipoprotein changes and endothelial dysfunction. *Circulation* 2001;104:257-62.
33. Grinspoon S. Mechanisms and strategies for insulin resistance in acquired immune deficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 2003;37:S85-90.
34. Gelato MC. Insulin and carbohydrate dysregulation. *Clin Infect Dis* 2003;36:S91-5.
35. Grunfeld C, Saag M, Cofrancesco J, Jr., et al. Regional adipose tissue

- measured by MRI over 5 years in HIV- infected and control participants indicates persistence of HIV-associated lipoatrophy. *AIDS* 2010;24(11):1717-1726.
36. Bacchetti P, Gripshover B, Grunfeld C, et al. Fat distribution in men with HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;40(2):121-131.
 37. From the Study of Fat Redistribution and Metabolic Change in HIV Infection (FRAM). Fat Distribution in Men With HIV Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:121–131.
 38. Carr A, Emery S, Law M, et al. An objective case definition of lipodystrophy in HIV-infected adults: a case-control study. *Lancet*. 2003;361(9359):726-735.
 39. Villaroya F, Domingo P, Giralt M. Drug-induced lipotoxicity: lipodystrophy associated with HIV-1 infection and antiretroviral therapy. *Biochim Biophys Acta*, 2010;1801:392-9.
 40. Caron-Debarle M, Lagathu C, Boccara F, et al. HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging. *Trends in Molecular Medicine* 2012;16(5):218-229.
 41. Hendrickson SL, Kingsley LA, Ruiz-Pesini E, et al. Mitochondrial DNA haplogroups influence lipoatrophy after highly active anti- retroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009;51:111-6.
 42. Wangsomboonsiri W, Mahasirimongkol S, Chantarangsu S, et al. Association between HLA-B*4001 and lipodystrophy among HIV-infected patients from Thailand who received a stavudine- containing antiretroviral regimen. *Clin Infect Dis* 2010;50:597-604.
 43. Grinspoon S, Carr A. Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. *N Engl J Med* 2005;352:48-62.

44. Grunfeld C, Pang M, Doerrler W, et al. Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:1045-52.
45. Zangerle R, Sarcletti M, Gallati H, et al. Decreased plasma concentrations of HDL cholesterol in HIV-infected individuals are associated with immune activation. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994;7:1149-56.
46. Periard D, Telenti A, Sudre P, et al. Atherogenic dyslipidemia in HIV-infected individuals treated with protease inhibitors. The Swiss HIV Cohort Study. *Circulation* 1999;100:700-5.
47. Salas-Salvadó L, García-Lorda P. The metabolic puzzle during the evolution of HIV infection. *Clin Nutr* 2001;20:379-91.
48. Riddle TM, Kuhel DG, Woollett LA, et al. HIV protease inhibitor induces fatty acid and sterol biosynthesis in liver and adipose tissues due to the accumulation of activated sterol regulatory element-binding proteins in the nucleus. *J Biol Chem* 2001;276:37514-9.
49. Liang JS, Distler O, Cooper DA, et al. HIV protease inhibitors protect apolipoprotein B from degradation by the proteasome: a potential mechanism for protease inhibitor-induced hyperlipidemia. *Nat Med* 2001;7:1327-31.
50. Grunfeld C, Doerrler W, Pang M, et al. Abnormalities of apolipoprotein E in the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3734-40.
51. Lister RK, Youle M, Nair DR, et al. Latent dysbetalipoproteinaemia precipitated by HIV-protease inhibitors. *Lancet* 1999;353:1678.

52. Shahmanesh M, Jaleel H, DeSilva Y, et al. Protease inhibitor related type III hyperlipoproteinaemia is common and not associated with apolipoprotein-E E2/E2 phenotype. *Sex Transm Infect* 2001;77:283-6.
53. Haas DW, Smeaton LM, Shafer RW, et al. Pharmacogenetics of long-term responses to antiretroviral regimens containing Efavirenz and/or Nelfinavir: an Adult Aids Clinical Trials Group Study. *J Infect Dis* 2005;192(11):1931-42.
54. Shin J, Kayser SR, Langaee TY, et al. Pharmacogenetics: from discovery to patient care. *American Journal of Health-System Pharmacy* 2009;66: 625-37.
55. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics - drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 2003;348:538-549.
56. Johnson JA. Pharmacogenetics: potential for individualized drug therapy through genetics. *Trends Genet* 2003;19:660-666.
57. Rodriguez-Novoa S, Barreiro P, Jimenez-Nacher I, et al. Overview of the pharmacogenetics of HIV therapy. *Pharmacogenomics J* 2006;6:234-245.
58. Tukiainen T, Kettunen J, Kangas AJ, al. Detailed metabolic and genetic characterization reveals new associations for 30 known lipid loci. *Human Molecular Genetics* 2012;21(6):1444–1455.
59. Sanna S, Li B, Mulas A, et al. Fine Mapping of Five Loci Associated with Low-Density Lipoprotein Cholesterol Detects Variants That Double the Explained Heritability. *PLoS Genet* 2011;7(7):e1002198.
60. WTCCC. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447(7):661-683.
61. Marian AJ. Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Translational Research* 2012;159:64–79.
62. Baynes J & Dominiczak MH. *Bioquimica Medica*. Manole:São Paulo, 2000.

63. Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med* 2003;348(6):529-37.
64. Katsanis N, Worley KC, Lupski JR. An evaluation of the draft human genome sequence. *Nat Genet* 2001;29:88-91.
65. A haplotype map of the human genome. The International HapMap Consortium. *Nature* 2005;437:1299-320.
66. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 2001;294:169-173.
67. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, et al. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum Mol Genet.* 2002;11:3031-3038.
68. Van Der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC., et al. Apolipoprotein A-V. A novel apolipoprotein associated with early phase of liver regeneration. *J Biol Chem* 2001;276(48):44512-44520.
69. Olivier M, Wang X, Cole R, et al. Haplotype analysis of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 11. *Genomics* 2004;83:912-923.
70. O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, et al. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chem* 2005;51(2):351-359.
71. Weinberg RB, Cook VR, Beckstead JA, et al. Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. *J. Biol. Chem* 2003. 278:34438–34444.

72. Beckstead JA, Oda MN, Martin DDO, et al. Structure-function studies of human apolipoprotein A-V: a regulator of plasma lipid homeostasis. *Biochemistry* 2003;42:9416-9423.
73. Talmud PJ, Hawe E, Martin S, et al. Relative contribution of variation within the *APOC3/A4/A5* gene cluster in determining plasma triglycerides. *Human Molecular Genetics* 2002;24:3039-3046.
74. Hubacek JA, Kovár J, Skodová Z, et al. Genetic analysis of APOAV polymorphisms (T-1131C, Ser19Trp and Val53Met): no effect on plasma remnant particles concentrations. *Clinica Chimica Acta* 2004;348:171-175.
75. Lee KWJ, Ayyobi AF, Frohlich JJ, et al. APOA5 gene polymorphism modulates levels of the triglyceride, HDL cholesterol and FERHDL but is not a risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2004;176:165-172.
76. Olofsson SO. ApoA-V: the regulation of a regulator of plasma triglycerides. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2005;25:1097–1099.
77. Fruchart-Najib J, Baugé E, Niculescu LS, et al. 2004. Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:397–404.
78. Merkel M, Loeffler B, Kluger M, et al. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem* 2005;280:21553–21560.
79. Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, et al. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J. Biol. Chem* 2004;279:27941–27947.
80. Merkel M, Heeren J. Give me A5 for lipoprotein hydrolysis! *J Clin Invest* 2005;115:2694–2696

81. Ward KJ, Shields B, Knight B, et al. Genetic variants in apolipoprotein AV alter triglyceride concentrations in pregnancy. *Lipids Health Dis* 2003;2:9-16, 2003.
82. Lusis AJ, Wesr R, Mehrabian M, et al. Cloning and expression of apolipoprotein B, the major protein of low and very low-density lipoproteins. *Proc Nat Acad Sci USA* 1985;82:4597-4601.
83. Segrest JP, Jones MK, De Loff H, et al. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J. Lipid. Res.*, v. 42, n. 9, p. 1346–1367, 2001.
84. Sakuma T, Hirata RDC, Hirata MH. Five polymorphisms in gene candidates for cardiovascular disease in Afro-Brazilian individuals. *J Clin Lab Anal* 2004; 18:309-316.
85. Tahri-Daizadeh N, Tregouet DA, Nicaud V, et al. Exploration of multilocus effects in a highly polymorphism gene the apolipoprotein (APOB) gene, in relation to plasma apoB levels. *Ann Hum Genet* 2004;68:405-418.
86. Genest JJ, Ordovas JM, McNamara JR, et al. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene in patients with premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1990;82:7–17.
87. Benes P, Muzík J, Benedík J, et al. Single effects of apolipoprotein B, (a), and E polymorphisms and interaction between plasminogen activator inhibitor-1 and apolipoprotein(a) genotypes and the risk of coronary artery disease in Czech male Caucasians. *Mol Genet Metab* 2000;69(2):137–143.
88. Chiodini BD, Barlera S, Franzosi MG, et al. APO B gene polymorphisms and coronary artery disease: a meta- analysis. *Atherosclerosis* 2003;167(2):355-366.
89. Olofsson SO. ApoA-V: the regulation of a regulator of plasma triglycerides. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 2005;25(6):1097-1099.

90. Faergemax O. Introduction: Apolipoprotein and guidelines for prevention of cardiovascular disease. *J Int Med* 2006;259:434-436.
91. Talmud PJ, Barni N, Kessling, et al. Apolipoprotein B gene variants are involved in the determination of serum cholesterol levels: a study in normo- and hypercholesterolemic individuals. *Atherosclerosis* 1987;67(1):81-9.
92. Chen Sh, Abib E, Yang CY, et al. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* 1987;238:363-366.
93. Law A, Powell LM, Brut H, et al. Common DNA polymorphism within coding sequence of apolipoprotein B gene associated with altered lipid levels. *Lancet* 1986;8493(327):1301-1303.
94. Berg K. DNA polymorphism at the apolipoprotein B locus is associated with lipoprotein level. *Clin Genet* 1986;30(6):515-520.
95. Priestley L, Knott T, Wallis S, et al. RFLP for the human apolipoprotein B gene: I, BamHI; II, EcoRI; III, EcoRV; IV, MspI; V, XbaI. *Nucleic Acids Res* 1985;13(18):6789-6793.
96. Blackhart BD, Ludwig EM, Pierotti VR, et al. Structure of the human apolipoprotein B gene. *J Biol Chem* 1986;261(33):15364-15367.
97. Renges HH, Peacock R, Dunning AM, et al. Genetic relationship between the 3'-VNTR and diallelic apolipoprotein B gene polymorphisms: Haplotype analysis in individuals of European and South Asian origin. *Ann Hum Genet* 1992;56:11-33.
98. Boerwinkle E, Browa SA, Rohrbach K, et al. Role of apolipoprotein E and B gene variation in determining response of lipid, lipoprotein, and apolipoprotein levels to increased dietary cholesterol. *Am J Hum Genet* 1991;49(6):1145-1154.

99. Kallel A, Feki M, Elasmı M, et al. Apolipoprotein B Signal Peptide Polymorphism: distribution and influence on lipid parameters in Tunisian Population. *Physiol Res* 2007;56(4):411- 417.
100. Harake B, Caines PS, Thibert RJ, et al. A simple micromethod for rapid assessment of the distribution of apolipoprotein C isoforms in very-low-density lipoprotein. *Clin Biochem* 1991;24:255-260.
101. McConathy WJ, Gesquiere JC, Bass H, et al. Inhibition of lipoprotein lipase activity by synthetic peptides of apolipoprotein C-III. *J Lipid Res* 1992;33:995-1003.
102. Brown MS & Goldstein JL. A Receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-47.
103. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988;240:622-630.
104. Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, et al. Low density lipoprotein receptor-related proteins mediates uptake of cholesteryl esters derived from apolipoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5810-5814.
105. Zannis VI, Just PW, Breslow JL. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Genet* 1981;33:11-24.
106. Utermann G, Steinmetz A, Weber W. Genetic control of human apolipoprotein E polymorphism: comparison of One-and two-dimensional techniques of isoprotein analysis. *Hum. Genet* 1972;60:344-351.
107. Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem* 1982;257:2518-21.

108. Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem* 1981;256:9077-83.
109. Rall SC Jr, Weisgraber KH, Innerarity TL, et al. Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:4696-700.
110. Rall SC Jr, Weisgraber KH, Mahley RW, et al. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1982;257:4171-8.
111. Goldstein FC, Ashley AV, Gearing M, et al. Apolipoprotein E and age at onset of Alzheimer's disease in African American patients. *Neurology* 2001;(57)1923-5.
112. Ojopi EPB, Bertoncini AB, Dias Neto E. Apolipoproteína E e a doença de alzheimer. *Rev Psiquiatr Clín* 2004;(31):26-33.
113. Dreon DM, Fernstrom HA, Miller B, et al. Apolipoprotein E Isoform Phenotype and LDL Subclass Response to a Reduced-Fat Diet. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1995;15(1):105-111.
114. Lehtimäki T, Moilanen T, Porkka K, et al. Association between serum lipids and apolipoprotein E phenotype is influenced by diet in a population-based sample of free-living children and young adults: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Journal of Lipid Research* 1995;36:653-661.
115. Martinez TLR, Janovich H, Lopes IL, et al. Apolipoproteína E, dislipidemia e aterosclerose. *Dislipidemia Today* 2001;(2):3-7.
116. Mahley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annual Rev Genomics Hum Genet.* 2000;1:507-537.

117. Demant T, Bedford D, Packard CJ, et al. Influence of apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein B-100 metabolism in normolipemic subjects. *J Clin Invest* 1991;88(5):1490–1501.
118. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988;8:1-21.
119. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *J Lipid Res* 1992;33(4):447-454.
120. Sing CF, Davignon J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *Am J Hum Genet* 1985;37(2):268–285.
121. Davignon J, Genest J. Genetic of lipoprotein disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998;27(3):521-550.
122. Hagberg JM, Wilund KR, Ferrell RE. Apo E gene and gene-environment effects on plasma lipoprotein-lipid levels. *Physiology of Genomics* 2000;4:101-108. 76.
123. Peña R, Lahoz C, Mostaza JM, et al. Effect of apo E genotype on the hypolipidaemic response to pravastatin in an outpatient setting. *Journal of Internal Medicine* 2002;251:518-525.
124. Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science* 1996;272:685-688.
125. Jeon H, Blacklow SC. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem* 2005;74:535-562.
126. Ishibashi S, Brown MS, Golstein JL, et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 1993;92:883-893.

127. Davis CG, Goldstein JL, Südhof TC, et al. Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* 1987;326:760-765.
128. Gillian-Daniel DL, Bates PW, Tebon A, Attie AD. Endoplasmatic reticulum localization of the low density lipoprotein receptor mediates presecretory degradation of apolipoprotein B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4337-42.
129. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997;89:331-40.
130. Jeon H, Blacklow SC. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem* 2005;74:535-562.
131. Sato R, Takano T. Regulation of intracellular cholesterol metabolism. *Cell Struct Funct* 1995;20:421-7.
132. Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 2006;124(1):35-46.
133. Kong WJ, Liu J, Jiang JD. Human low-density lipoprotein receptor gene and its regulation. *J Mol Med* 2006;84:29–36.
134. Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans* 2002;30:1091-1095.
135. Espenshade PJ. SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *J. Cell Sci* 2006;119:973-976.
136. Rawson RB. The SREBP pathway--insights from Insigs and insects. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(8):631-40.

137. Radhakrishnan A, Goldstein JL, McDonald JG, Brown MS. Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metab* 2008;8(6):512-21.
138. Soccio RE, Breslow JL. Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1150-60.
139. Brown MS, Goldstein JL. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lipid Res* 2009;50:S15-27.
140. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Maintaining cholesterol homeostasis: Sterol regulatory element-binding proteins. *World J Gastroenterol* 2004;10(21):3081-3087.
141. Tarr PE, Taffe P, Bleiber G, et al. Modeling the influence of APOC3, APOE, and TNF polymorphisms on the risk of antiretroviral therapy-associated lipid disorders. *J Infect Dis* 2005;191:1419–1426.
142. Fauvel J, Bonnet E, Ruidavets JB, et al. An interaction between apo C-III variants and protease inhibitors contributes to high triglyceride/low HDL levels in treated HIV patients. *AIDS* 2001;15:2397–2406.
143. Foulkes AS, Wohl DA, Frank I, et al. Associations among Race/Ethnicity, ApoC-III Genotypes, and Lipids in HIV-1-Infected Individuals on Antiretroviral Therapy. *PLoS Med* 2006; 3(3): e52.
144. Hubacek J, Skodová Z, Adamkova V, et al. The influence of APOA5 polymorphisms (T -1133>C and S19>W) on plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction. *Clinical Genetics* 2004;65:126-130.
145. Guardiola M, Ferre R, Salazar J, et al. Protease Inhibitor-Associated Dyslipidemia in HIV-Infected Patients Is Strongly Influenced by the APOA5–1131T-C Gene Variation. *Clinical Chemistry* 2006; 52(10):1914-1919.

146. Marzocchetti A, Schwarz J, Di Giambenedetto S, et al. The Effect of Polymorphisms in Candidate Genes on the Long-Term Risk of Lipodystrophy and Dyslipidemia in HIV-Infected White Patients Starting Antiretroviral Therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011;27(12):1299-309.

CAPÍTULO II

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Justificativa

Os recentes progressos da TARV proporcionaram um importante avanço na evolução do prognóstico da Aids, resultando no controle efetivo da infecção, no restabelecimento da imunidade e na conseqüente redução da morbimortalidade, transformando-a em uma doença crônica. No entanto, com o passar do tempo, tem-se observado eventos adversos previamente não descritos, que emergiram em paralelo à crescente utilização dos medicamentos ARV. Dentre esses eventos, destacam-se a dislipidemia e a redistribuição da gordura corporal.

As alterações na distribuição da gordura corporal e nas concentrações dos lipídeos plasmáticos em direção a um perfil mais aterogênico podem significar maior risco de complicações cardiovasculares. A fisiopatologia das alterações metabólicas, bem como seus agentes causais, ainda não foi totalmente esclarecida, assim como consensos específicos para o tratamento das alterações metabólicas do HIV não estão disponíveis. Diferentes estratégias têm sido empregadas no tratamento dos efeitos adversos dos ARVs, tais como dieta, atividade física, fármacos hipolipemiantes e a substituição entre os medicamentos ARVs, porém os resultados têm sido muito variados. No entanto, essas alterações metabólicas e anormalidades na distribuição da gordura corporal não ocorrem em todos os pacientes expostos a TARV, indicando a possibilidade de envolvimento de fatores genéticos na sua ocorrência. Neste contexto, evidências recentes provenientes de estudos de varredura genômica reforçam a importância da investigação de variantes genéticas na etiologia de dislipidemias e da obesidade.

Embora seja uma área de pesquisa extremamente promissora e com um enorme potencial para a identificação de conjuntos de marcadores genéticos que se tornem uma ferramenta de avaliação de rotina utilizada pelos clínicos na seleção de fármacos e dosagens específicos para cada paciente, os estudos farmacogenômicos da TARV ainda são pouco numerosos. A farmacogenômica pode

não somente aumentar a eficácia das terapias existentes, mas também colaborar para o desenvolvimento de novas terapias, possibilitando o esclarecimento das causas genéticas e fisiológicas da variação nas respostas aos fármacos e das reações adversas. Desta forma, polimorfismos nos genes que codificam as apolipoproteínas e demais proteínas relacionadas ao transporte e metabolismo dos lipídeos na circulação, tornam-se os candidatos mais prováveis para associação com os fenótipos dislipidemia e redistribuição da gordura corporal em pacientes infectados pelo HIV expostos à TARV.

Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar a associação dos polimorfismos dos genes da *APOA5* -1131 T>C (rs662799) e S19W (56 C>G; rs3135506), *APOB* SP *Ins/Del* (rs17240441) e *Xba*I, 7673 C>T (rs693), *APOC3* 3238 C>G (rs5128), *APOE* 334 T>C (E4; rs429358) e 472 C>T (E2; rs7412), *SCAP* 2386 A>G (rs12487736) e *LDLR* intron 19 G>T (rs6511720) com dislipidemia e redistribuição da gordura corporal em indivíduos infectados pelo HIV em uso de terapia antirretroviral.

São objetivos específicos deste trabalho:

- Determinar a prevalência de lipodistrofia, lipoatrofia, lipohipertrofia e alterações do perfil lipídico.
- Determinar as frequências alélicas e genóticas dos nove polimorfismos localizados nos seis genes candidatos em estudo neste grupo específico.
- Avaliar a associação destes polimorfismos com subfenótipos bioquímicos e antropométricos relacionados aos desfechos dislipidemia e redistribuição da gordura corporal.

CAPÍTULO III

**Genetic Markers Associated to Dyslipidemia in HIV-Infected
Individuals on HAART**

Manuscrito em preparação para submissão à revista AIDS

Genetic Markers Associated to Dyslipidemia in HIV-Infected

Individuals on HAART

Rosmeri K. Lazzaretti, MSc,* Aline S. Gasparotto, MSc,† Marina G.de M. Sassi, BS,† Regina Kuhmmer, MSc,* Jussara M. Silveira, PhD,§ Rossana P. Basso, MSc,§ Cezar A. T. Pinheiro, MSc,λ Mariângela F. Silveira, PhD,λ Carísi A. Polanczyk, PhD,*‡ Eduardo Sprinz, PhD,ψ¶ Vanessa S. Mattevi, PhD,†¶ and Jorge P. Ribeiro, PhD,*‡ (*In Memoriam*)

Running title: Genetic Markers and Dyslipidemia in HIV-infection
 Word count, manuscript: 4103
 Word count, abstract: 221

Address for correspondence:

Vanessa S. Mattevi, PhD
 Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
 Rua Sarmiento Leite, 245, sala 309
 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil
 Phone: +55 51 3303 8763
 Fax: +55 51 3303 8718
 E-mail: vmattevi@ufcspa.edu.br

This study was supported by Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais, Ministério da Saúde, Brazil; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS); and PRONEX-FAPERGS/CNPq.

*Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

†Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre–UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

§Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Correa Jr.

λServiço de Assistência Especializada em HIV/AIDS. Universidade Federal de Pelotas-UFPEL, Pelotas, RS, Brazil.

ψInternal Medicine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; and the

‡Department of Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

¶These authors were joint senior authors on this work.

Abstract

Objective: To evaluate the impact of 9 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 6 candidate genes (*APOB*, *APOA5*, *APOE*, *APOC3*, *SCAP* and *LDLR*) and dyslipidemia in HIV-infected patients on stable highly active antiretroviral therapy (HAART) with undetectable viral loads.

Design: Cross-sectional study.

Methods: Blood samples were collected from 614 patients at reference services in the cities of Porto Alegre, Pelotas and Rio Grande in Brazil. The SNPs were genotyped by conventional polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR.

Results: The prevalence of dyslipidemia was particularly high among the PI-treated patients (79%). *APOE* (rs429358 and rs7412) genotypes and *APOA5* -1131 T>C (rs662799) were associated with plasma TG and LDL-C levels. The *APOA5* -1131 T>C (rs662799) and *SCAP* 2386A>G (rs12487736) polymorphisms were significantly associated with HDL-C levels. The mean values of the TC and LDL-C levels were associated with both the *APOB* SP *Ins/Del* (rs17240441) and *APOB* *XbaI*, 7673 C>T (rs693) polymorphisms. However, no evidence of interactions among these genetic variants with the use of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor or protease inhibitor-containing regimens was identified.

Conclusion: Our data support the importance of genetic factors in the determination of lipid levels in HIV-infected individuals. Due to the relatively high number of carriers of these risk variants, genetic testing before HAART initiation may be advisable to guide the selection of an appropriate antiretroviral therapy regimen.

Keywords: dyslipidemia, HIV, HAART, pharmacogenetics, polymorphisms

Introduction

The use of highly active antiretroviral therapy (HAART) as a standard of care has changed the prognosis of human immunodeficiency virus (HIV) infection by decreasing mortality and improving quality of life [1,2]. Despite the clinical benefits, long-term HAART is associated with a complex spectrum of unwanted metabolic effects, including dyslipidemia that eventually might lead to increased risk of cardiovascular diseases [3].

Nevertheless, these side effects are not universal to all individuals on antiretroviral therapy (ART) and even vary in individuals with comparable ART, demographic, immunologic and virological characteristics. This variability suggests that host genetic factors and inherited predispositions may have a significant influence on the appearance of metabolic alterations [4].

The exact mechanism of dyslipidemia is not fully understood but is most likely multifactorial. In the general population, genetic variation accounts for approximately 43 - 83% of the variability in lipid plasma levels [5]. Recent candidate gene studies [6-11] as well as genome-wide-based association studies have identified certain single nucleotide polymorphisms (SNPs) that could account for a significant portion of the variation in blood lipid levels [12-14].

In HIV infection, genetic predisposition may help to explain the variability among patients with respect to the effects of protease inhibitors (PIs) on lipid metabolism [10,11]. We have hypothesized that this variation is attributable to the joint effect of HIV infection and ART together with the underlying genetic predisposition present in these individuals. The aim of this study was to investigate the frequencies of 9 SNPs in 6 candidate genes and to identify associations between these SNPs and the plasma lipid levels of patients on stable ART with undetectable viral loads.

Methods

Subjects

We conducted a cross-sectional study with 614 patients who were diagnosed with HIV-1 infection according to the criteria of the Centers for Disease Control and Prevention [15]. All subjects were more than 17 years old, had regularly used ART for at least 12 months, had a viral load below the detection limit of the test (50 copies/mL; Versant® HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA), Siemens, Germany) and were recruited from three referral centers in southern Brazil (HIV/AIDS Ambulatory Unit of Hospital de Clínicas from Porto Alegre/RS, HIV ambulatory care of Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Correa Jr. from Rio Grande/RS, and HIV/AIDS Specialized Assistance Service from Pelotas/RS) from March 2006 to November 2008. Pregnant women and those with neurological disease that prevented understanding and proper consent were not included in the study. The study protocol was approved by the Research Ethics Committees of the three centers and of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, and all participants signed an informed consent statement before they were included in the study (protocol numbers: 05/295, 718/08, 154/07 and 141/06, respectively).

Study Protocol

The routine evaluation consisted of visits every 4 months in each center for an evaluation by the patients' attending physicians as well as laboratory evaluations that included measurements of CD4 cell counts, viral load and lipid levels. The patients were invited to participate in the study and had their information and a blood sample for DNA extraction collected during one of these visits.

An interview was performed at enrollment to obtain demographic and lifestyle information. Details of HIV infection (time from diagnosis as well as current

and prior antiretroviral medications), lipid-lowering intervention and relevant clinical variables were obtained from medical records. The interviewer phenotypically defined the patients' ethnicities because there might be a strong cultural tendency to claim European ancestry in Brazil [16]. Patients were classified as Euro or Afro-descendants because the Amerindian contribution is very low in the Brazilian South Region [17].

Laboratory analysis

Blood samples were collected and sent to the Molecular Biology Laboratory for DNA extraction. Lipid profiles included determinations of total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL-C), triglycerides (TG) and, when possible, low-density lipoprotein (LDL-C) after fasting for 12 hours. LDL-C was calculated using the Friedewald formula, $LDL-C = TC - HDL-C - TG/5$, if triglyceride levels were below 400 mg/dL.

Dyslipidemia was defined by fasting triglycerides plasma levels ≥ 150 mg/dL and/or fasting total cholesterol ≥ 200 mg/dL and/or LDL-C ≥ 130 mg/dL and/or HDL-C < 40 mg/dL. Participants were instructed not to perform any vigorous physical activity or ingest alcohol in the 24 hours prior to the blood collection [18].

Genomic DNA was obtained from peripheral leukocytes by a standard salting-out technique [19]. The genotypes of apolipoprotein B gene (*APOB*) polymorphisms were determined using polymerase chain reaction (PCR)-based procedures in 410 individuals from the outpatient clinic of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The polymorphism of insertion/deletion of signal peptide SP *Ins/Del* (rs17240441) was amplified by PCR using primers as previously described [20] and directly analyzed by electrophoresis in 8% polyacrylamide gels. The *Xba*I, 7673 C>T (rs693) polymorphism was amplified by PCR using the primers described by Pan *et*

al. [21], and genotypes were determined by digestion with *Xba*I restriction endonuclease and electrophoresis in 2% agarose gels.

The SNPs of apolipoprotein A-V (*APOA5*) -1131 T>C (rs662799) and S19W (56 C>G; rs3135506), apolipoprotein E (*APOE*) 334 T>C (E4; rs429358) and 472 C>T (E2; rs7412), apolipoprotein C-III (*APOC3*) 3238 C>G (rs5128), sterol regulatory element-binding factor cleavage-activating protein (*SCAP*) 2386 A>G (rs12487736) and low-density lipoprotein receptor (*LDLR*) intron 19 G>T (rs6511720) were genotyped by real-time PCR using the TaqMan methodology (Table 1). Candidate SNPs were selected via review of PubMed reports of SNP associations with dyslipidemia in the general population or among HIV-infected individuals [6-11].

Statistical Analyses

The results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) for continuous variables and as proportions for categorical variables. Variables that did not have a normal distribution (triglycerides) were transformed into natural logarithms before the statistical tests were applied. Allele frequencies were estimated by gene counting. χ^2 analysis was used to test for deviations in genotype frequencies from the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE).

For the *APOC3* 3238 C>G (rs5128), *APOA5* -1131 T>C (rs662799) and S19W (56 C>G) (rs3135506), *SCAP* 2386 A>G (rs12487736) and *LDLR* intron 19 G>T (rs6511720) polymorphisms, the association analyses were performed according to the dominant model due to the low number of individuals who were homozygous for the minor allele and were pooled with subjects with the heterozygous genotype. As for *APOE* SNPs 334 T>C (rs429358) and 472 C>T (rs7412), which together define the *APOE* E2, E3, and E4 alleles, the subjects were analyzed in 3 genotype categories: E2/E3, homozygotes for the E3 allele and E3/E4.

Subjects with the rare genotypes E2/E2 (n= 5), E2/E4 (n= 9) and E4/E4 (n= 16) were excluded from the statistical analyses.

The Testing Haplotype Effects in Association Studies Program (version 3.1, THESIAS, Paris, France) was used for the analysis of linkage disequilibrium between polymorphisms within the same gene [22].

General linear model analyses were used to test for the interaction between SNPs and variables and to adjust the lipid profile for covariables. The following variables were included in the models and underwent stepwise removal: ethnic group, gender, age, physical activity, cigarette smoking, use of lipid-lowering agents, PI use, body mass index (BMI) and the presence of polymorphism. Only those variables that were significant predictors were included in the final model. Correction for multiple testing was performed using the Bonferroni method. The data were analyzed with the Statistical Package for Social Sciences (version 20.0, SPSS, Chicago, Illinois). The value indicating statistical significance was $P < 0.05$.

Results

Study participants

The main demographic, clinical and metabolic characteristics of the individuals enrolled in the study are shown in Table 2. Of the 614 patients, 55.5% were male, 57% were characterized as Euro-descendants and the mean patient age was 43 ± 10 years. The mean duration of ART was 68 ± 41 months. Regarding metabolic parameters, 245 (41%) patients had hypercholesterolemia, 293 (49%) had hypertriglyceridemia and 185 (31%) had low HDL-C levels.

The total patient population was stratified according to current PI use or non-use. The prevalence of dyslipidemia was particularly high among the PI-treated patients (79%; $P=0.006$). Although the mean levels of TC and LDL-C did not differ

significantly between the PI-treated and non-PI-treated subjects, the latter had higher plasma HDL-C levels (51 ± 17 mg/dL versus 46 ± 14 mg/dL; $P < 0.001$) and lower triglycerides levels (170 ± 131 mg/dL versus 223 ± 202 mg/dL, $P < 0.001$) than the PI-treated subjects. Therefore, PI use was tested as a covariate in all statistical analyses and was included when significant.

For all studied polymorphisms, there was no departure from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$), except for *APOC3* 3238 C>G (rs5128). The genotype and allele frequencies of the analyzed SNPs are shown in Table 1. Table 3 summarizes the association analysis of the SNPs with serum lipid concentrations.

Triglycerides

Two SNPs contributed significantly to the modification of TG levels. The *APOE* genotype was associated with higher plasma TG levels ($P = 0.033$), and the E2 allele was associated with increased TG levels (Tukey test, E2/E3 vs. E3/E3, $P = 0.003$; E2/E3 vs. E3/E4, $P = 0.029$). However, this result was no longer significant after correction for multiple testing ($P = 0.132$).

The effect of the *APOA5* -1131 T>C (rs662799) polymorphism on plasma lipids was observed in C-allele carriers who presented higher triglyceride levels than those with the TT genotype (243 ± 230 mg/dL and 187 ± 157 mg/dL, respectively; $P = 0.003$). This nominal *P*-value remained statistically significant after Bonferroni correction for multiple comparisons ($P = 0.024$).

HDL-Cholesterol

The *APOA5* -1131 T>C (rs662799) polymorphism was also significantly associated with HDL-C levels. The TT homozygotes presented higher HDL-C concentrations than C-carriers ($P = 0.047$) after the same statistical approach and

adjustment for covariates. Furthermore, a statistically significant association of the *SCAP* 2386 A>G (rs12487736) variant was observed with HDL-C levels (P=0.032). As shown in Table 3, the 2386GG homozygotes had lower HDL-C levels, while the 2386AA homozygotes showed an increase of 5 ± 2 mg/dL when compared to GG homozygotes (Tukey test, AA vs. GG, P=0.014). However, both associations were no longer significant after the Bonferroni correction for multiple comparisons.

Total cholesterol and LDL-cholesterol

Initially, the average TC level was associated with both the *APOB* SP *Ins/Del* (rs17240441) (Table 3, P=0.036) and *APOB* *Xbal*, 7673 C> T (rs693) (P=0.007) polymorphisms. A *post hoc* test showed that there were differences between the homozygotes for both polymorphisms (Tukey test, *Ins/Ins* vs. *Del/Del*, P= 0.027 and C/C vs. T/T, P=0.007, respectively). Neither result was significant after Bonferroni correction was applied (P=0.320 and P=0.056, respectively).

The mean LDL-C levels were also different between the genotypes (P=0.007 and P=0.002, respectively) for both polymorphisms and were statistically significant after Bonferroni correction was applied (P=0.048 and P=0.016, respectively). The Tukey test showed that in the polymorphism of the signal peptide, differences were found between the homozygotes (*Ins/Ins* vs. *Del/Del*, P=0.006) and in the polymorphism in exon 26 of the gene. The homozygous group with regard to the C allele differed from the other groups (C/C vs. C/T, P = 0.006; C/C vs. T/T, P = 0.008).

A significant linkage disequilibrium ($D' = 0.72$, $P < 0.001$) was detected between polymorphisms associating alleles *Del* and T, as well as *Ins* and C. Based on these results, we analyzed the effect of the haplotype combining alleles *Del* and T on the levels of these lipid parameters. The haplotype analysis showed that

homozygotes for the risk haplotype showed significantly higher mean levels of TC and LDL-C (Table 4). The *post hoc* test showed that the differences were found between non-carriers and homozygotes for the *De/T* haplotype (Tukey test, $P=0.036$ and $P=0.038$, respectively).

The *APOE* genotype was associated with elevated plasma LDL-C levels ($P=0.002$; $P=0.008$ after Bonferroni correction; Table 3). In contrast to what was observed regarding the TG levels, the E2 allele was associated with a decrease in the LDL-C levels, while the E4 allele was associated with an increase, as the differences were found between the E2 and E4 allele carriers (Tukey test, E2/E3 vs. E3/E3, $P=0.011$; E2/E3 vs. E3/E4, $P=0.005$).

Regarding *APOA5* S19W (56 C>G) (rs3135506), there was a marginal association with LDL-C levels. Carriers of the G allele and C/C genotype showed a mean and an SD of 112 ± 35 mg/dL and 106 ± 37 mg/dL, respectively ($P=0.047$), that was adjusted for gender, age, BMI and use of lipid-lowering agents. However, this correlation did not remain significant after Bonferroni correction.

No significant contribution to plasma TC, TG, HDL-C or LDL-C was identified in the present dataset with regard to *APOC3* 3238 C>G (rs5128) and *LDLR* intron 19 G>T (rs6511720).

Analyses were also performed separately for users and nonusers of IPs (data not shown), and similar effects were observed in both groups, although in some cases these effects were not significant.

Discussion

Metabolic and morphological alterations in HIV-infected individuals on ART emerged as a major long-term, treatment-associated toxicity. In this study, for the first time, we broadly evaluated the relationship between certain gene candidates

and SNPs with dyslipidemia in a population of HIV-infected individuals on ART in Brazil. Indeed, we found an association between genetic polymorphism and lipid alterations in the population studied.

The contributions of several polymorphisms to dyslipidemia in 614 HIV-1-infected patients on HAART were addressed in the present multicenter study. Nine polymorphisms in 6 candidate genes were analyzed for their association with dyslipidemia. As expected according to the literature, this adverse effect was more prevalent in patients receiving PIs ([23] and references therein). However, we found no statistically significant difference in TC and LDL-C levels between PI-treated and non-PI-treated patients, probably associated with the more prevalent use of lipid-lowering agents by the PI group (21 vs. 14%, $P=0.021$).

The allelic frequencies of the *APOB*, *APOA5*, *APOE*, *SCAP* and *LDLR* genotypes were similar to those previously described in populations from the same geographical region or ethnicity [8-11]. The *APOC3* 3238 C>G (rs5128) genotypic frequencies were not distributed according to what was expected under Hardy-Weinberg equilibrium ($P=0.032$; Table 1). This small deviation was most likely due to the lower number of homozygotes (2 patients, 0.3%) for the rare allele observed in our study; 7 were expected according to Hardy-Weinberg's proportions. Nevertheless, the allele frequencies ($G=0.11$) were very close to those found in previous studies of individuals not infected with HIV who live in Southern Brazil ($G=0.10$), as shown by Fiegenbaum *et al.* [8], and to participants in the Swiss HIV Cohort Study (SHCS), which were $G=0.10$ and $G=0.09$, as shown by Rotger *et al.* [11] and Tarr *et al.* [24], respectively.

Our study demonstrated a strong association between the E3/E4 genotype and elevated plasma LDL-C, which is in agreement with the results of previous studies [25,26]. The E4 variant is typically associated with increased levels of LDL-C and low plasma TG levels, whereas the E2 variant is associated with lower LDL-C

levels in the general population [25,26]. In a large meta-analysis, the E4 variant was associated with a 42% increase in cardiovascular disease risk [27]. Although E2 isoforms bind to LDL receptors much more weakly than E3 or E4 isoforms, the catabolism of the particle containing isoform E2 is slower; this may result in a lower rate of LDL-C formation. Moreover, according to the conclusion of the meta-analysis of Bennet *et al.* [28], there is an approximately linear relationship between the *APOE* genotypes and both LDL-C levels and to the risk of cardiovascular disease.

Carriers of non-E3/E3 genotypes of *APOE* appear to be at risk of ritonavir-associated hypertriglyceridemia, and this risk appears to be enhanced by the association with *APOC3* variants [29]. According to the SHCS, the interaction between *APOE* and *APOC3* is associated with an extreme risk of developing hypertriglyceridemia in individuals treated with ritonavir [24]. Our data did not allow us to perform the same analyses, as the vast majority of our PI-users were on ritonavir. Nevertheless, our findings are in agreement with these data reinforcing the association of E2 allele and increased TG levels. With respect to the E3/E3 genotype, according to our data as well as to those of [30], HIV-positive patients have a lower risk of developing high triglyceride levels after starting HAART than non-E3/E3 genotypes.

APOA5 also plays an important role in the modulation of blood lipid metabolism; it is predominantly synthesized in the liver and is secreted into the plasma, where it plays a central role in regulating TG metabolism [31,32]. Two polymorphisms in the *APOA5* gene, -1131 T>C and S19W (56 C>G), have been shown to be associated with elevated triglyceride levels in different populations [31,33]. In our study, for *APOA5* -1131 T>C, individuals with at least one C allele had higher TG levels and lower levels of HDL-C. However, only the association with TG levels remained significant after the Bonferroni correction was applied. These results are consistent with previous study in HIV-infected patients, indicated that -1131C

carriers experienced marked increases in triglyceride levels during a 3-year follow-up, while no change was recorded in patients carrying the -1131T normal allele [34]. A similar effect, but of lesser magnitude, was demonstrated regarding changes in cholesterol [34]. In accordance with our results in the general population, Lai *et al.* [33] found significant associations between the minor allele in this SNP and increased plasma TG concentrations in three ethnic groups (Chinese, Malay and Asian-Indian). Conversely, there were inverse associations between the minor allele and HDL cholesterol concentrations that reached statistical significance in the Chinese and Malay populations but not in the Asian-Indian population. In the Czech population, the C allele was associated with elevated levels of plasma TG and a higher risk of the development of myocardial infarction [35,36]. Furthermore, it is noteworthy that our findings are consistent with the conclusion of Zhao & Zhao's [37] meta-analysis, which included all articles published before November 2009 on the *APOA5* -1131 T>C polymorphism.

According to some studies, the rare allele of the S19W (56 C>G) SNP in *APOA5* confers a greater risk of elevated concentrations of triglycerides [38,39]. Nevertheless, our data do not support this hypothesis in HIV-infected individuals. We found only a marginal association with the LDL-C, no longer significant after multiple comparison correction. Previous reports have demonstrated that these two SNPs (-1131 T>C and S19W) are not in linkage disequilibrium and are considered to be two tag SNPs that represent three *APOA5* haplotypes [33,38,39]. Although both SNPs have been associated with elevated plasma triglyceride concentrations in several populations [33,38,40], they appear to differ in their associations with other cardiovascular risk factors [39,41]. The divergent results could suggest that the phenotypes associated with these 2 SNPs are driven by different mechanisms and also may be explained, at least partially, by heterogeneity and the different ethnic backgrounds in the studied populations [42].

To our knowledge, this is the first study conducted in an HIV-positive setting to assess the association of *SCAP* 2386 A>G rs12487736 with dyslipidemia. The *SCAP* pathway controls cellular cholesterol homeostasis. *SCAP* is key for the activation of SREBFs and fulfills two functions: it acts as a sterol sensor and escorts sterol regulatory element-binding factors (SREBFs) from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus, where a two-step proteolytic process releases the transcriptionally active domain from membranes to enter the nucleus and activates the transcription of more than 30 genes that encode proteins that mediate the uptake and synthesis of cholesterol, unsaturated fatty acids and triglycerides ([7] and references therein). Initially, in our analysis, we found that AA homozygous patients showed higher HDL-C levels; however, this result was no longer significant after Bonferroni correction was applied. Carriers of the 2386G allele from non-HIV-infected Brazilians treated with simvastatin exhibit reduced TC and TG levels, as shown by Fiegenbaum *et al.* [7], but no association was found with HDL-C levels.

The mean TC and LDL-C levels showed statistically significant differences for genotypes of both polymorphisms in the *APOB* gene: SP *Ins/Del* (rs17240441) and *XbaI*, 7673 C> T (rs693). The homozygotes for the alleles T and *Del* had higher levels of these lipids than individuals heterozygous for both alleles, who had intermediate levels; this result is compatible with a co-dominant effect of these polymorphisms. These results are in agreement with published data showing that the *Del* and T alleles are associated with increased levels of TC and/or LDL-C in different populations with distinct diseases [9,43-45]. However, Xu *et al.* and Ye *et al.* found no association of the polymorphism in the signal peptide of the gene with TC and LDL-C levels in the Finnish and Chinese populations, respectively [46,47].

The significant linkage disequilibrium observed between polymorphisms, as reported in other studies [20,47], led to an analysis of risk haplotype (patients with a combination of alleles *Del* and T). The results continued to show the effect patterns

of these alleles persist independently. The patients who were homozygous for the risk haplotype showed higher total cholesterol and LDL-C, while an intermediate effect was observed in patients with the heterozygous haplotype. Rios *et al.* [9] also observed the association of the haplotype with LDL-C levels in a Brazilian population in a comparison of patients with and without coronary artery disease.

There are two possible causes for these changes in lipid metabolism related to both polymorphisms in the *APOB* gene. The first cause is that three amino acids, leu-ala-leu, that are included in the allele *Ins* and deleted in the allele *Del* could alter the hydrophobicity of the signal peptide of the protein and, thereby, alter the rate of translocation of new *APOB* peptides synthesized in the cytoplasm to the endoplasmic reticulum [46]. The second hypothesis is based on the fact that there is no amino acid change in the functional protein in both polymorphisms. These could then be in linkage disequilibrium with an unknown change in the DNA that may cause lipid abnormalities [20].

Two SNPs that were proposed in the literature (*APOC3* 3238 C>G (rs5128) and *LDLR* intron 19 G>T (rs6511720) did not contribute to the plasma lipid levels in the present dataset, which may reflect a limited effect of these SNPs. The relationship between variations at the *APOC3* locus and plasma lipid levels has been studied mainly during the last decade. The most studied *APOC3* polymorphism, 3238 C>G (rs5128), has repeatedly been found to be associated with hypertriglyceridemia in population-based studies [48,49] and with selected dyslipidemias, such as familial combined hyperlipidemia [50,51]. In two studies of HIV patients, significant TG elevation was observed in carriers of two *APOC3* SNPs, among them 3238 C>G [24,29]. Nevertheless, our findings are in contrast with the results of previous studies on the effects of *APOC3* 3238 C>G (rs5128) SNPs on dyslipidemia in HIV-1 positive individuals who have used HAART and in the general population. This disagreement could reflect temporal differences from the population studied by these authors and

the present, as there was a gap between the times of enrollment in these studies. With HIV patients, over several years, the specific antiretroviral drugs prescribed and the general disease severity may change.

All analyses were also performed by stratifying the patients according to PI use (data not shown); however, similar effects were observed in both groups. Furthermore, the variables were not statistically significant in some analyses, and this was most likely attributable to the reduction in the number of individuals when they are analyzed separately. This finding suggests that in our sample, the lipid-gene interaction is independent of the type of HAART used and that the variation observed is similar to that found in the general population.

We acknowledge some limitations of the present study. The cross-sectional design and the inclusion of patients receiving several different antiretroviral regimens, which is a difficulty inherent to any study involving current HAART, as by definition it should include at least three different drugs. This fact might hinder the accomplishment of any pharmacogenomics study regarding this therapy. Furthermore, we found a deviation from the HWE observed in the current population for the *APOC3* 3238 C>G (rs5128) SNP, although this deviation may indicate genotyping error. Laboratory procedures that were in place to detect error included blinded, no-template controls and DNA sample replicates. Previous studies, which have evaluated HWE, have not reported deviation for this SNP; however, HWE analysis has not been reported in all studies. Another limitation that we might acknowledge is the restricted number of SNPs analyzed. We cannot rule out the possibility that other SNPs in the genes investigated here are associated with the phenotypes studied.

In conclusion, our data support the importance of genetic factors on of lipid levels in HIV-infected individuals from a previously uninvestigated region of the world. Unfortunately, we found no evidence of interaction of these genetic variants

with the use of non-nucleoside transcriptase reverse inhibitors or protease inhibitors. Due to the relatively high number of carriers of these risk variants (for example, *APOA5* –1131T>C = 15%, *APOB* risk haplotype = 47%, *APOE* = 20.1%), genetic testing before ART initiation may be advisable to guide ART regimen selection. This question merits evaluation in an appropriately designed trial.

Acknowledgement

In memoriam of Prof. Jorge Pinto Ribeiro, an example of scientist and educator. He will be sadly missed, but his enduring and substantial legacy will be intensely alive.

References

1. Taiwo BO, Li X, Palella F, Jacobson LP, Margolick JB, Detels R, et al. Higher risk of AIDS or death in patients with lower CD4 cell counts after virally suppressive HAART. *HIV Med* 2009; **10**:657-717.
2. Marins JR, Jamal LF, Chen SY, Barros MB, Hudes ES, Barbosa AA, et al. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. *AIDS* 2003; **17**:1675-82.
3. Dubé MP, Stein JH, Aberg JA, Fichtenbaum CJ, Gerber JG, Tashima KT, et al. Guidelines for the evaluation and management of dyslipidemia in human immunodeficiency virus (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.
4. Fox J, Boffito M, Winston A. The clinical implications of antiretroviral pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 2006; **7**:587–596.
5. Chang M, Yesupriya A, Ned RM, Mueller PW, Dowling NF. Genetic variants associated with fasting blood lipids in the U.S. population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *MC Medical Genetics* 2010; **11**:62.
6. De Andrade FM, Maluf SW, Schuch JB, Voigt F, Barros AC, Lucatelli JF, Hutz MH. The influence of the S19W SNP of the APOA5 gene on triglyceride levels in southern Brazil: Interactions with the APOE gene, sex and menopause status. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2011; **21**:584-590.
7. Fiegenbaum M, Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC, Hutz MH. Determinants of variable response to simvastatin treatment: the role of common variants of SCAP, SREBF-1a and SREBF-2 genes. *Pharmacogenomics J* 2005; **5**:359-64.

8. Fiegenbaum M, De Andrade FM, Hutz MH. Association between plasma lipid parameters and APOC3 genotypes in Brazilian subjects: Effect of gender, smoking and APOE genotypes. *Clinica Chimica Acta* 2007; **380**:175–181.
9. Rios DLS, Vargas AF, Torres MR, Zago AJ, Callegari-Jacques SM, Hutz MH. Interaction between SREBP-1a and APOB polymorphisms influences total and low-density lipoprotein cholesterol levels in patients with coronary artery disease. *Clin Genet* 2003; **63**:380–385.
10. , Sahli R, Furrerc H, Hirscheld B, Elzie L, *et al.* Contribution of 20 single nucleotide polymorphisms of 13 genes to dyslipidemia associated with antiretroviral therapy. *Pharmacogenet Genom* 2007; **17(9)**:755–564.
11. , Martinez R, Cavassini M, Bernasconi E, *et al.* Contribution of genome-wide significant single-nucleotide polymorphisms and anti- retroviral therapy to dyslipidemia in HIV-infected individuals: A longitudinal study. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; **2(6)**:621–628.
12. Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, Demissie S, Musunuru K, Schadt EE, *et al.* Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet* 2009; **41(1)**:56-65.
13. Sandhu MS, Waterworth DM, Debenham SL, Wheeler E, Papadakis K, Zhao JH, *at al.* LDL-cholesterol concentrations: a genome-wide association study. *Lancet* 2008; **371(9611)**:483-491.
14. Wallace C, Newhouse SJ, Braund P, Zhang F, Tobin M, Falchi M, *et al.* Genome-wide association study identifies genes for biomarkers of cardiovascular disease: serum urate and dyslipidemia. *Am J Hum Genet* 2008; **82(1)**:139-149.
15. Schneider E, Whitmore S, Glynn KM, Dominguez K, Mitsch A, McKenna MT; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Revised surveillance case definitions for HIV infection among adults, adolescents, and children

- aged <18 months and for HIV infection and AIDS among children aged 18 months to <13 years—United States, 2008. *MMWR Recomm Rep* 2008;57(RR-10):1–12.
16. Zembrzuski VM, Callegari-Jacques SM, Hutz MH. Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. *Ann Hum Genet* 2006; **70**:822–828.
 17. Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmao L, Amorim A, *et al.* Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat* 2010; **31**:184–190.
 18. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; **285**:2486–97.
 19. Lahiri DK, Nurnberger Jr JI. A rapid nonenzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**:5444.
 20. Pajukanta PE, Valsta LM, Aro A, Pietinen P, Helio T, Tikkanen MJ. The effects of the apolipoprotein B signal peptide (ins/del) and XbaI polymorphisms on plasma lipid responses to dietary change. *Atherosclerosis* 1996; **122(1)**:1-10.
 21. Pan JP, Chiang AN, Tai JJ, Wang SP, Chang MS. Restriction fragment length polymorphisms of apolipoprotein B gene in Chinese population with coronary heart disease. *Clin Chem* 1995; **41(3)**:424-9.
 22. Tregouet DA, Garelle V. A new JAVA interface implementation of THESIAS: testing haplotype effects in association studies. *Bioinformatics* 2007; **23 (8)**: 1038-1039.
 23. Feeney ER and Mallon PWV. HIV and HAART-Associated Dyslipidemia. The

- Open Cardiovascular Medicine Journal 2011; **5**: 49-63.
24. Tarr PE, Taffe P, Bleiber G, Furrer H, Rotger M, Martinez R, *et al.* Modeling the influence of APOC3, APOE, and TNF polymorphisms on the risk of antiretroviral therapy-associated lipid disorders. *J Infect Dis* 2005; **191**:1419–1426.
 25. Ordovas JM, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, Rodriguez C, Park JS, Cole T, Schaefer EJ. Effect of apolipoprotein E and A-IV phenotypes on the low density lipoprotein response to HMG CoA reductase inhibitor therapy. *Atherosclerosis* 1995; **113(2)**: 157–166.
 26. Pedro-Botet J, Schaefer EJ, Bakker-Arkema RG, Black DM, Stein EM, Corella D, Ordovas JM. Apolipoprotein E genotype affects plasma lipid response to atorvastatin in a gender specific manner. *Atherosclerosis* 2001; **158(1)**: 183–193.
 27. Mahley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000; **1**:507–537.
 28. Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A, Ahlbom A, *et al.* Association of Apolipoprotein E Genotypes With Lipid Levels and Coronary Risk. *JAMA*. 2007; **298(11)**:1300-1311.
 29. Fauvel J, Bonnet E, Ruidavets JB, Ferrieres J, Toffoletti A, Massip P, *et al.* An interaction between apo C-III variants and protease inhibitors contributes to high triglyceride/low HDL levels in treated HIV patients. *AIDS* 2001; **15**:2397–2406.
 30. Marzocchetti A, Schwarz J, Di Giambenedetto S, Colafigli M, Bracciale L, Fabbiani M, *et al.* The Effect of Polymorphisms in Candidate Genes on the Long-Term Risk of Lipodystrophy and Dyslipidemia in HIV-Infected White Patients Starting Antiretroviral Therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011; **27(12)**:1299-309.
 31. Seda O, Sedova L. New Apolipoprotein A-V: comparative genomics meets

- metabolism. *Physiol Res* 2003; **52**:141-146.
32. Tai ES, Ordovas JM. Clinical significance of apolipoprotein A5. *Curr Opin Lipidol* 2008; **4**:349-354.
33. Lai CQ, Tai ES, Tan CE, Cutter J, Chew SK, Zhu YP, Adiconis X, Ordovas JM. The APOA5 locus is a strong determinant of plasma triglyceride concentrations across ethnic groups in Singapore. *J Lipid Res* 2003; **44**:2365–2373.
34. Guardiola M, Ferre R, Salazar J, Alonso-Villaverde C, Coll B, Parra S, *et al.* Protease Inhibitor-Associated Dyslipidemia in HIV-Infected Patients Is Strongly Influenced by the APOA5–1131T-C Gene Variation. *Clinical Chemistry* 2006; **52(10)**:1914-1919.
35. Ek JA, Škodová Z, Lánská V, Adámková V. APOA5 variant (T-1131>C) affect plasma levels of non-HDL cholesterol in Caucasians. *Exp Clin Cardiol* 2008; **13**:129-132.
36. Ínek A, Lánská V, *et al.* Apolipoprotein AV gene polymorphisms (T-1131/C and Ser19/Trp) influence plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction. *Exp Clin Cardiol* 2003; **8(3)**:151–154.
37. Zhao T and Zhao J. Association of the apolipoprotein A5 gene -1131 T>C polymorphism with fasting blood lipids: a meta-analysis in 37859 subjects. *BMC Medical Genetics* 2010; **11**:120.
38. , Krauss RM, Rubin EM, Cohen JC. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Human Molecular Genetics* 2002; **11**:3031-8.
39. Lai CQ, Demissie S, Cupples LA, Zhu Y, Adiconis X, Parnell LD, *et al.* Influence of the APOA5 locus on plasma triglyceride lipoprotein subclasses, and CVD risk in the Framingham Heart Study. *Journal of Lipid Research*

- 2004; **45**:2096-105.
40. Hodoglugil U, Tanyolac S, Williamson DW, Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein A–V: a potential modulator of plasma triglyceride levels in Turks. *J Lipid Res* 2006; **47**:144–153.
 41. Lee KW, Ayyobi AF, Frohlich JJ, Hill JS. APOA5 gene polymorphism modulates levels of triglyceride, HDL cholesterol and FERHDL but is not a risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2004; **176**:165–172.
 42. Corella D, Lai CQ, Demissie S, Cupples LA, Manning AK, Tucker KL, Ordovas JM. APOA5 gene variation modulates the effects of dietary fat intake on body mass index and obesity risk in the Framingham Heart Study. *J Mol Med* 2007; **85**:119–128.
 43. Kay A, März W, Hoffmann MM, Zhang Q, Masana L, Cavanna J, *et al.* Coronary artery disease and dyslipidemia within Europe: genetic variants in lipid transport gene loci in German subjects with premature coronary artery disease. *Atheroscler Suppl* 2002; **3(1)**: 27-33.
 44. Turner PR, Talmid PJ, Visvikis S, Ehnholm C, Tiret L. DNA polymorphisms of the apoprotein B gene are associated with altered plasma lipoprotein concentrations but not with perceived risk of cardiovascular disease: European Atherosclerosis Research Study. *Atherosclerosis* 1995; **116(2)**: 221-34.
 45. Benn M, Nordestgaard BG, Jensen JS, Grande P, Sillesen H, Tybjaerg-Hansen A. Polymorphism in APOB associated with increased low-density lipoprotein levels in both genders in the general population. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90(10)**: 5797-803.
 46. Xu CF, Tikkanen MJ, Huttunen JK, Pietinen P, Büttler R, Humphries S, Talmud P. Apolipoprotein B signal peptide insertion/deletion polymorphism is associated with Ag epitopes and involved in the determination of serum triglyceride levels. *J Lipid Res* 1990; **31(7)**: 1255-61.

47. Ye P, Chen B, Wang S. Association of polymorphisms of the apolipoprotein B gene with coronary heart disease in Han Chinese. *Atherosclerosis* 1995; **117(1)**: 43-50.
48. Porkka KKV, Taimela S, Kontula K, Lehtimäki T, Aalto-Setälä K, Akerblom HK, Viikari JS. Variability gene effects of DNA polymorphisms at the apo B, apo AI/C-III and apo E loci on serum lipids: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Clin Genet* 1994; **45**:113-121.
49. Peacock RE, Temple A, Gudnason V, Rosseneu M, Humphries SE. Variation at the lipoprotein lipase and apolipoprotein AI-C-III gene loci are associated with fasting lipids and lipoprotein traits in a population sample from Iceland: interaction between genotype, gender and smoking status. *Genet Epidemiol* 1997; **14**:265-282.
50. Ribalta J, La Ville AE, Vallve JJC, Humphries S, Turner PR, Masana L. A variation in the apolipoprotein C-III gene is associated with an increased number of circulating VLDL and IDL particles in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 1997; **38**:1061-1069.
51. Dammerman M, Sanfuijl LA, Halaas JL, Chung W, Breslow JL. An apolipoprotein C-III haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3' untranslated region polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**:4562-4566.

Table 1. Genotypic and allelic frequencies of polymorphisms analyzed

Polymorphisms	Genotypic frequency	Allelic frequency		
<i>APOA5</i> -1131 T>C (rs662799) ^a		A	G	
T/T	515 (84.7)	0.92	0.08	
T/C	90 (14.8)			
C/C	3 (0.5)			
Total	608			
<i>APOA5</i> S19W (56 C>G; rs3135506) ^b		C	G	
C/C	500 (82)	0.90	0.10	
C/G	103 (16.9)			
G/G	7 (1.1)			
Total	610			
<i>APOB</i> SP <i>Ins/Del</i> (rs17240441) ^c		Ins	Del	
Ins/ins	193 (47.3)	0.70	0.30	
Ins/del	176 (43.1)			
Del/del	39 (9.6)			
Total	408			
<i>APOB</i> <i>Xba</i> I, 7673 C>T (rs693) ^d		C	T	
C/C	122 (30)	0.55	0.45	
C/T	203 (49.9)			
T/T	82 (20.1)			
Total	407			
<i>APOC3</i> 3238 C>G (rs5128) ^e		C	G	
C/C	478 (78.8)	0.89	0.11	
C/G	127 (20.9)			
G/G	2 (0.3)			
Total	607			
<i>APOE</i> ^f		E2	E3	E4
E2/E2	5 (8)	0.07	0.79	0.14
E2/E3	67 (11.2)			
E2/E4	9 (1.5)			
E3/E3	379 (63.6)			
E3/E4	120 (20.1)			
E4/E4	16 (2.7)			
Total	596			
<i>LDLR</i> intron19 G>T (rs6511720) ^g		G	T	
G/G	487 (80.2)	0.90	0.10	
G/T	113 (18.6)			
T/T	7 (1.2)			
Total	607			
<i>SCAP</i> 2386 A>G (rs12487736) ^h		C	T	
A/A	168 (27.7)	0.52	0.48	
A/G	296 (48.9)			
G/G	142 (23.4)			
Total	606			

The difference in the number of individuals among single nucleotide polymorphisms (SNPs) is due to failure in genotyping some SNPs in the whole sample.

Genotypic frequency presented as number of patients (%).

^a $\chi^2 = 0.194$; $P = 0.659$; $gI = 1$

^b $\chi^2 = 0.421$; $P = 0.516$; $gI = 1$

^c $\chi^2 = 0.003$; $P = 0.955$; $gI = 1$

^d $\chi^2 = 0.021$; $P = 0.883$; $gI = 1$

^e $\chi^2 = 4.567$; $P = 0.032$; $gI = 1$

^f $\chi^2 = 2.143$; $P = 0.829$; $gI = 5$

^g $\chi^2 = 0.024$; $P = 0.877$; $gI = 1$

^h $\chi^2 = 0.275$; $P = 0.600$; $gI = 1$

Table 2. Characteristics of the study participants

	All study participants n=614	PI-sparing ART n=311	PI-based ART n=303	P-value
Demographic				
Age, yrs	43.0 ± 10	42 ± 10	43 ± 9	0.114 [§]
Male sex, n (%)	341 (55.5)	179 (58)	162 (54)	0.348*
Ethnicity, n (%)				
Euro-Brazilians	349 (57)	166 (48)	183 (60)	0.094*
Afro-Brazilians	265 (43)	145 (47)	120 (40)	
Physical activity, n (%)	156 (25)	74 (24)	82 (27)	0.389*
Cigarette smoking, n (%)	186 (30)	103 (33)	83 (28)	0.153*
Clinical				
CD4, cells/uL	533 ± 266	516 ± 255	552 ± 277	0.095 [§]
Therapy time (months)	68 ± 41	57 ± 38	76 ± 41	< 0.001 ^{§¶}
Lipid-lowering use (%)	105 (17)	42 (14)	63 (21)	0.021*
Metabolic				
Triglycerides, mg/dL	196 ± 171	170 ± 131	223 ± 202	< 0.001 ^{¶¶}
Total cholesterol, mg/dL	192 ± 48	189 ± 44	196 ± 52	0.056 [§]
HDL-C, mg/dL	48 ± 16	51 ± 17	46 ± 14	< 0.001 [§]
LDL-C, mg/dL	107 ± 37	105 ± 34	109 ± 40	0.175 [§]
Dyslipidemia, n (%)	455 (74)	215 (69)	240 (79)	0.006*
Hypertriglyceridemia	293 (49)	122 (40)	171 (59)	<0.001*
Hypercholesterolemia	245 (41)	118 (39)	127 (44)	0.267*
Low HDL-C	185 (31)	74 (24)	111 (38)	<0.001*

Data presented as mean ± SD or number of patients (%).

PI, protease inhibitors; ART, antiretroviral therapy; HDL-C, high density lipoprotein; LDL-C, low density lipoprotein.

[¶]P value expressed with tests performed with ln-transformed variable

[§] Student t-test for independent samples.

* χ^2 -Test with Yates correction.

[¶] Student t-test for independent samples with ln-transformed variable

Table 3. Mean metabolic variables according to polymorphisms analyzed

Polymorphisms	Total Cholesterol (mg/dL)		LDL-C (mg/dL)		HDL-C (mg/dL)		Triglycerides (mg/dL)	
	N	M ± SD	N	M ± SD	N	M ± SD	N	M ± SD
APOA5 -1131 T>C (rs662799)								
T/T	499	191 ± 80	458	106 ± 72	498	48 ± 88	499	187 ± 157
T/C + C/C	92	196 ± 78	83	107 ± 12	92	45 ± 16	92	243 ± 230
<i>P</i> -value		0.549		0.953		0.047§		0.003*£
<i>P</i> -value corrected**		1.000		1.000		0.376		0.024
APOA5 S19W (56 C>G; rs3135506)								
C/C	486	192 ± 49	443	106 ± 37	485	48 ± 15	486	199 ± 177
C/G + G/G	106	197 ± 43	99	112 ± 35	107	50 ± 17	107	183 ± 144
<i>P</i> -value		0.330		0.047§		0.130		0.398*
<i>P</i> -value corrected**		1.000		0.376		1.000		1.000
APOB SP Ins/Del (rs17240441)								
Ins/ins	192	189 ± 42 ^a	176	99 ± 31 ^c	192	52 ± 15	193	195 ± 167
Ins/del	175	193 ± 51 ^{ab}	158	106 ± 36 ^{cd}	175	50 ± 14	176	195 ± 193
Del/del	39	210 ± 45 ^b	37	120 ± 41 ^d	39	54 ± 13	39	187 ± 103
<i>P</i> -value		0.036§		0.006§		0.245		0.996*
<i>P</i> -value corrected**		0.288		0.048		1.000		1.000
APOB XbaI, 7673 C> T (rs693)								
C/C	122	183 ± 42 ^e	112	95 ± 35 ^g	122	52 ± 15	122	187 ± 126
C/T	202	194 ± 42 ^{ef}	185	107 ± 31 ^h	201	50 ± 14	203	193 ± 163
T/T	81	203 ± 59 ^f	73	110 ± 41 ^{ih}	82	51 ± 12	82	212 ± 248
<i>P</i> -value		0.007§		0.002§		0.705		0.791*
<i>P</i> -value corrected**		0.056		0.016		1.000		1.000
APOC3 3238 C>G (rs5128)								
C/C	464	193 ± 48	424	107 ± 37	465	49 ± 16	440	191 ± 162
C/G + G/G	125	192 ± 49	115	108 ± 39	124	47 ± 15	124	210 ± 214
<i>P</i> -value		0.718		0.833		0.295		0.905*
<i>P</i> -value corrected**		1.000		1.000		1.000		1.000
APOE genotype								

E2/E3	64	188 ± 60	56	93 ± 34 ⁱ	63	46 ± 14	64	263 ± 350 ^l
E3/E3	365	193 ± 47	333	109 ± 37 ^k	366	49 ± 16	366	186 ± 128 ^m
E3/E4	119	198 ± 47	112	112 ± 38 ^k	119	48 ± 17	119	195 ± 153 ^m
<i>P</i> -value		0.209		0.002 [¶]		0.371		0.033* [§]
<i>P</i> -value corrected**		0.836		0.008		1.000		0.132
<i>LDLR</i> intron19 G>T (rs6511720)								
G/G	475	193 ± 48	430	107 ± 36	476	48 ± 16	473	198 ± 184
G/T + T/T	114	191 ± 51	107	105 ± 41	113	50 ± 16	114	183 ± 109
<i>P</i> -value		0.612		0.427		0.120		0.971*
<i>P</i> -value corrected**		1.000		1.000		1.000		1.000
<i>SCAP</i> 2386 A>G (rs12487736)								
A/A	164	195 ± 49	146	107 ± 39	164	50 ± 17 ⁿ	164	201 ± 162
A/G	287	194 ± 48	263	107 ± 35	287	49 ± 15 ^{no}	287	197 ± 197
G/G	137	188 ± 47	129	107 ± 41	137	45 ± 14 ^o	138	188 ± 124
<i>P</i> -value		0.443		0.970		0.032 [¥]		0.971*
<i>P</i> -value corrected**		1.000		1.000		0.128		1.000

HDL-C, high density lipoprotein; LDL-C, low density lipoprotein

**P*-value expressed with tests performed with log_n-transformed variable

***P*-value after Bonferroni correction for multiple testing

§Adjusted for gender, age and lipid-lowering agents use

¶Adjusted for age and lipid-lowering agents use

\$Adjusted for gender, cigarette smoking and PI use

£Adjusted for gender, age, lipid-lowering agents use and PI

♪Adjusted for gender, age, ethnic group, BMI and lipid-lowering agents use

¥Adjusted for gender, cigarette smoking, ethnic group and lipid-lowering agents use

^{ab}Tukey test, *Ins/Ins* vs. *Ins/Del*, *P*=0.619; *Ins/Ins* vs. *Del/Del*, *P*=0.027; *Ins/Del* vs. *Del/Del*, *P*=0.145

^{cd}Tukey test, *Ins/Ins* vs. *Ins/Del*, *P*=0.231; *Ins/Ins* vs. *Del/Del*, *P*=0.006; *Ins/Del* vs. *Del/Del*, *P*=0.071

^{ef}Tukey test, *C/C* vs. *C/T*, *P*=0.053; *C/C* vs. *T/T*, *P*=0.007; *C/T* vs. *T/T*, *P*=0.598

^{ghi}Tukey test, *C/C* vs. *C/T*, *P*=0.006; *C/C* vs. *T/T*, *P*=0.008; *C/T* vs. *T/T*, *P*=0.830

^{jk}Tukey test, *E2/E3* vs. *E3/E3*, *P*=0.011; *E2/E3* vs. *E3/E4*, *P*=0.005; *E3/E3* vs. *E3/E4*, *P*=0.628

^{lm}Tukey test, *E2/E3* vs. *E3/E3*, *P*=0.003; *E2/E3* vs. *E3/E4*, *P*=0.029; *E3/E3* vs. *E3/E4*, *P*=0.875

^{no}Tukey test, *A/A* vs. *A/G*, *P*=0.594; *A/A* vs. *G/G*, *P*=0.014; *A/G* vs. *G/G*, *P*=0.071

Table 4. Effect of *APOB* haplotype in Total Cholesterol and LDL-C.

Risk haplotype	TC (mg/dL)			LDL-C (mg/dL)		
	N	Mean \pm SD	<i>P</i> -value	N	Mean \pm SD	<i>P</i> -value
Noncarriers	213	188 \pm 42 ^a	0.036	196	100 \pm 32 ^b	0.011
Heterozygous <i>Del</i> /T	163	195 \pm 51		147	108 \pm 36	
Homozygotes <i>Del</i> /T	27	212 \pm 48 ^a		25	118 \pm 43 ^b	

TC, Total Cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein.

Results from analysis of variance.

^aTukey Test noncarriers vs. homozygous for *Del*/T, *P*=0.036.

^bTukey Test noncarriers vs. homozygous for *Del*/T, *P*=0.038.

CAPÍTULO IV

**The S19W Polymorphism in *APOA5* is Associated with Body Fat
Composition in HIV-Infected Individuals Receiving HAART**

Manuscrito em preparação para submissão à revista JAIDS

**The S19W Polymorphism in *APOA5* is Associated with Body Fat
Composition in HIV-Infected Individuals Receiving HAART**

Rosmeri K. Lazzaretti, MSc,* Marina G.de M. Sassi, BS,† Regina Kuhmmer, MSc,*
Jussara M. Silveira, PhD,§ Rossana P. Basso, MSc,§ Cezar A. T. Pinheiro, MSc,λ
Mariângela F. Silveira, PhD,λ Carísi A. Polanczyk, PhD,*‡ Vanessa S. Mattevi,
PhD,†¶ Eduardo Sprinz, PhD,ψ¶ and Jorge P. Ribeiro, PhD,*‡ (*In Memoriam*)

Running title: *APOA5* is Associated with Body Fat Composition
Word count, manuscript: 2813
Word count, abstract: 211

Address for correspondence:

Vanessa S. Mattevi, PhD
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Rua Sarmiento Leite, 245, sala 309
90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil
Phone: +55 51 3303 8763
Fax: +55 51 3303 8718
E-mail: vmattevi@ufcspa.edu.br

This study was supported by Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais, Ministério da Saúde, Brazil; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS); and PRONEX-FAPERGS/CNPq.

*Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

†Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre–UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

§Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Correa Jr.

λServiço de Assistência Especializada em HIV/AIDS. Universidade Federal de Pelotas-UFPEL, Pelotas, RS, Brazil.

ψInternal Medicine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; and the

‡Department of Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

¶These authors were joint senior authors on this work.

Abstract

Background: Apolipoprotein A-V (*APOA5*) has been implicated as one of the key regulators of triglyceride metabolism. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in this gene have been consistently associated with plasma lipids and risk of cardiovascular disease, yet their associations with body mass index and obesity remain controversial.

Objective: This study aimed to investigate the associations between 2 SNPs in *APOA5*, 1131 T>C (rs662799) and S19W (56 C>G; rs3135506), and anthropometric measurements in HIV-infected individuals on highly active antiretroviral therapy (HAART).

Design: Cross-sectional study.

Materials and Methods: The genotypes of 610 HIV-infected patients on HAART were investigated. Anthropometric parameters included weight, height, waist circumference and skinfold thickness. The SNPs were genotyped by real-time PCR.

Results: Lipoatrophy was more prevalent in men (53%), whereas lipohypertrophy and obesity were more commonly observed in women (36% and 17%, respectively). The S19W CC homozygotes presented higher total subcutaneous fat ($P=0.002$), central subcutaneous fat ($P=0.004$) and limb subcutaneous fat ($P=0.003$) than G-allele carriers. In addition, the multivariate analysis showed that the presence of the G-allele conferred protection against obesity in the study population (prevalence ratio = 0.412, 95% confidence interval = 0.183–0.928, $P=0.032$).

Conclusions: These results suggest the possibility of using the *APOA5* S19W polymorphism as a marker of predisposition to obesity in antiretroviral therapy users.

Key Words: *APOA5*, HAART, HIV, body fat composition, lipodystrophy, pharmacogenomics

Introduction

HIV-associated lipodystrophy syndrome has been increasingly reported in people treated with highly active antiretroviral therapy (HAART). The main clinical features of this syndrome include dyslipidemia, insulin resistance and body abnormalities, which are associated both with accumulation (lipohypertrophy) and/or loss of body fat (lipoatrophy).^{1,2} These findings are associated with a greater risk of cardiovascular disease.³ In addition, such adverse effects may interfere with patient adherence to treatment and eventually lead to failure of antiretroviral therapy (ART).^{4,5}

The prevalence of lipodystrophy syndrome ranges from 11 to 83%, depending on the study.^{6,7} This variation most likely arises from the use of different diagnostic criteria and the lack of a universally accepted definition of lipodystrophy or fat redistribution syndrome. Increasing evidence suggests that these disorders, commonly clustering in a syndromal pattern, are mediated by distinct pathologic pathways and can occur independently.⁸⁻¹² However, the mechanisms responsible for abnormalities in body fat redistribution in distinct populations or under different treatment regimens are not clear. Gender, ethnicity, older age, body weight before therapy, duration of HIV illness, effectiveness of viral suppression, adipocyte differentiation, mitochondrial toxicity, genetic predisposition and, most importantly, type and duration of antiretroviral therapy have all been postulated as risk factors for fat redistribution. Nevertheless, not all people exposed to a particular antiretroviral develop similar adverse effects, and human genetic variations might be responsible for the different rates and expression of these adverse events.

With the improved prognosis of HIV-infected patients, nutritional complications are now playing a primary role in the management of these patients.¹³ Although wasting was common early in the HIV epidemic, it has become less prevalent with the advent of HAART.¹⁴ With the exception of peripheral lipoatrophy,

which is linked to certain types of antiretroviral medications, HIV-infected patients are presenting less wasting and more obesity as they live longer and gain weight, similar to the general population.¹⁵ A recent study, in fact, found that being overweight or obese is now more common among HIV patients than wasting.¹⁶

Apolipoprotein A-V (*APOA5*) has been implicated as one of the key regulators of triglyceride metabolism. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *APOA5* gene have been consistently associated with plasma lipids and cardiovascular disease risk in multiple populations.^{2,17-19} However, their associations with body mass index and obesity remain controversial.²⁰⁻²² To date, our understanding of the contribution of genetic variation to lipodystrophy in HIV-infected patients is very limited. Therefore, the aim of the present study was to investigate the 2 most relevant SNPs in the *APOA5* gene discovered to date, -1131 T>C (rs662799) and S19W C>G (rs3135506), and their associations with anthropometric measurements in HIV-infected individuals exposed to HAART.

Materials and Methods

Subjects

The study population was described previously.²³ Briefly, this cross-sectional study was carried with 614 HIV-1-infected patients (diagnosed according to the revised criteria of the Centers for Disease Control) recruited consecutively from three referral centers in southern Brazil.¹⁵ Patients were eligible for inclusion when they were more than 17 years old, had been on HAART for at least 12 months and presented a viral load below the detection limit (50 copies/mL; Versant® HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA), Siemens, Germany). Pregnant women and those with neurological diseases that precluded their understanding the study protocol were not included. The Ethics Research Committees of the 3 centers reviewed and approved

the study protocol. All patients provided informed consent.

Anthropometric and clinical parameters, as well as other lifestyle variables, were recorded at enrollment. A blood sample was collected from each participant for DNA extraction. Patients were classified as European or African-derived ethnicity according to their phenotypic characteristics. Issues related to the skin color-based classification criteria adopted in Brazil are well-documented.^{24,25}

Genetic analyses

Genomic DNA was extracted from whole blood samples by the “salting out” method.²⁶ Genotyping for the -1131 T>C (rs662799) and S19W (56 C>G; rs3135506) polymorphisms in *APOA5* were performed by real-time PCR using TaqMan® methodology (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Anthropometric Assessment

The fat redistribution diagnoses were performed by the same physician at each center. Lipoatrophy was identified by the loss of fat in the face and/or limbs (arms, legs or buttocks); lipohypertrophy was identified by the accumulation of lipomas or fat in any site in the abdomen, dorsocervical region or breasts. Patients who had both types of fat tissue redistribution were classified as having a mixed pattern.²⁷

Anthropometric measurements were performed by trained researchers for all patients upon their inclusion in the study. To analyze subcutaneous fat, body measurements of 7 skinfold thicknesses (in millimeters; mm) were performed in triplicate with Lange calipers® (Cambridge Instrument, Cambridge, MA, USA); the average value was used for analysis. Total body subcutaneous fat (TSF) was determined by summing the thicknesses of biceps, triceps, subscapular, midaxillary,

suprailiac, abdominal and medial calf. Subcutaneous fat in the central region (CSF) was calculated by summing the thicknesses of the subscapular, midaxillary, suprailiac and abdominal regions, and the subcutaneous fat of the limbs (LSF) was determined by adding the thicknesses of the biceps, triceps and medial calf.²⁸

Waist circumference was measured at the midpoint between the last rib and the iliac crest and the hip at the point of greatest protrusion of the buttocks using an inextensible anthropometric tape (Sanny®, São Paulo, Brazil). Waist and hip circumferences were combined into a waist-to-hip ratio, which is a commonly used surrogate for body fat distribution. Height and body weight were measured with an anthropometric mechanical scale (Filizola®, São Paulo, Brazil). The body mass index (BMI) was calculated as the weight divided by the square of the height (BMI = weight (kg) / [height (cm)]²). BMI was categorized according to World Health Organization (WHO) criteria.²⁹

Statistical analyses

Continuous variables were presented as the mean \pm standard deviation (SD), and categorical variables as proportions. Student's t-test for independent samples was used to analyze the difference between genders, and the categorical variables were compared with the χ^2 test or Fisher's exact test. Variables with asymmetric distributions (duration of therapy and LSF) were transformed into natural logarithms before statistical tests. Allele frequencies were determined by gene counting. χ^2 analysis was used to test for deviations of genotype frequencies from Hardy–Weinberg equilibrium. The association analyses were performed according to the dominant model due to the low number of individuals homozygous for the minor allele for both variants; they were pooled with heterozygous subjects.

General linear models were used to test for associations between the

APOA5 -1131 T>C and S19W SNPs and anthropometric variables. The covariables gender, age, ethnic group, physical activity, cigarette smoking, use of lipid-lowering agents and protease inhibitors use were included in the models and removed stepwise. Only those variables that were significant predictors in the univariate analysis were retained in the final models. Correction for multiple testing was performed using the Bonferroni method.

Haplotypes were inferred, and linkage disequilibrium estimated by D' and r^2 using Haploview.³⁰

Poisson regression models with robust variance were used to assess the obesity predictor variables. P -values lower than 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (version 20.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

The demographic and clinical characteristics of 614 HIV patients genotyped for the -1131 T>C (rs662799) and S19W (56 C>G; rs3135506) *APOA5* polymorphisms are shown in Table 1. Patients included in the study were predominantly male (55.5%) and of European descent (57%), with a mean age of 43 ± 10 years. The mean duration of HAART was 68 ± 41 months, and 49% were using protease inhibitors.

Table 2 shows the participants' anthropometric characteristics according to gender. Significant differences between men and women were found for all anthropometric parameters except waist circumference.

The overall prevalence of lipodystrophy was not different between genders (Table 2). However, when considering only those patients with lipodystrophy the atrophic pattern was more prevalent in lipodystrophic men (53%), the hypertrophic

pattern was more prevalent in lipodystrophic women (36%) and 33% of the patients showed a mixed pattern. Women had higher average BMI, TSF and CSF than men ($26 \pm 5 \text{ kg/m}^2$, $136 \pm 52 \text{ mm}$ and $92 \pm 35 \text{ mm}$ vs. $25 \pm 4 \text{ kg/m}^2$, $87 \pm 39 \text{ mm}$ and $65 \pm 30 \text{ mm}$, respectively), which also characterize the hypertrophic pattern. Applying the WHO²⁹ criteria, the prevalence of overweight and obesity was 46%; 204 individuals were overweight (34% of men and 33% of women), and 71 were obese (7% of men and 17% of women).

Genotype frequencies for the two SNPs analyzed were distributed as expected by Hardy-Weinberg equilibrium (Table 1). There were no differences in genotype frequencies among ethnic groups (data not shown), so the sample was analyzed intact.

Table 3 presents the association analyses between the *APOA5* -1131 T>C (rs662799) and S19W (rs3135506) genotypes and the anthropometric parameters. Both polymorphisms were nominally associated with measures of total and central body fat: S19W was associated with BMI, and both polymorphisms were associated with waist circumference, though these results were no longer significant after applying the Bonferroni correction for multiple testing. The S19W variant was consistently associated with subcutaneous fat measurements. The S19W CC homozygotes presented higher TSF ($P=0.002$), CSF ($P=0.004$) and LSF ($P=0.003$) than the G-allele carriers (Table 3). These P -values remained statistically significant after applying the Bonferroni correction for multiple comparisons ($P=0.010$, $P=0.020$, $P=0.015$, respectively).

The mean values of the anthropometric variables were compared among genotypes in each gender separately for the S19W variant. The anthropometric variables behaved similarly among genotypes, following the same direction in both genders (Figure 1).

Linkage disequilibrium between the two SNPs was estimated by the values

of $D' = 1.0$ (95% CI = 0.35-1.0) and $r^2 = 0.0090$. Despite the high value of D' (attributed to the presence of only 3 haplotypes among the 2 SNPs; C/T=0.825, G/T=0.096, and C/C=0.079), the r^2 value suggests that the disequilibrium between them is fairly low, so we decided to not perform further association analyses with these haplotypes.

Poisson regression analyses were used to determine whether the *APOA5* S19W C>G (rs3135506) SNP was a significant predictor of any of the categorical phenotypes. Table 4 presents the best Poisson regression model for obesity. Male gender (PR=0.461; P=0.001), performance of physical activity (PR=0.480; P=0.032) and the presence of the *APOA5* S19W C>G (rs3135506) polymorphism (PR=0.412; P=0.032) all conferred protection against obesity in the study population.

Discussion

Body fat disorders are a common and relevant problem in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. Among the more apparent effects are changes in fat distribution (lipodystrophy), which encompass fat loss (lipoatrophy) and/or an increase in fat accumulation (lipohypertrophy). These symptoms may occur separately or concurrently within an individual. Lipoatrophy, in particular, has a strongly negative impact on self-performance, quality of life, self-esteem and adherence to therapy. However, the definition, pathogenesis, measurement, and management of these lipodystrophies remain controversial.

In our study, the overall prevalence of lipodystrophy was 51%, which is similar to the results of previous studies.^{31,32} The lipohypertrophy pattern was more common in women, whereas the lipoatrophy pattern was more common in men. This sex-specific difference in the prevalence of lipodystrophy subtypes was also reported in other studies on HIV-positive individuals in Brazil.^{31,33} The prevalence of alterations in body fat distribution was 65% in the report from Santos *et al.* (2005)³³ and 55% in

the study performed by Diehl *et al.* (2008).³¹ Lichtenstein *et al.* (2004)¹¹ reviewed 15 published surveys of >100 patients with descriptions suggestive of lipodystrophy. The authors determined that the prevalence estimates for lipodystrophy vary widely, from 9%³⁴ to 48% (mean 32%),³² depending on the criteria used for assessment.¹¹ The differences between these prevalence rates may have also been confounded by sex, age, type and duration of HAART, and the lack of a validated definition.^{2,11}

Overweight and obesity are a growing problem in HIV-infected populations, potentially leading to the disease risk factors of dyslipidemia and lipohypertrophy. Moreover, obesity has become an unexpected health problem in HIV-infected women.^{16,35} Other studies reporting high frequencies of overweight and obese HIV patients have noted a positive association between these problems and being female.^{36,37} In a study conducted in our research center, overweight was observed in 34.2% of the patients, obesity in 8.4%, and malnutrition in 5.2%. Women were more likely to be obese than men.³⁸ This pattern was also observed in other studies conducted in Brazil.³⁹⁻⁴¹ We also observed higher mean BMI and skinfold values in women. Surprisingly, waist circumference was not different between genders. This may be explained by the higher prevalence of atrophy in men on HAART, who usually present higher waist circumferences in the general population.⁴² Our findings are consistent with previous studies conducted in Latin America, including Brazil, where researchers found higher mean BMI values and higher frequencies of obesity and metabolic syndrome in positive HIV women.⁴³

Our data and other studies confirm that overweight and obesity are growing health problems in the HIV-positive population.^{35-37,39-41} This may be explained by higher survival and fewer opportunistic infections following the introduction of ART. For this population, lifestyle changes and, when necessary, antilipemic drug therapy are needed to reduce the prevalence of overweight, obesity, and metabolic complications that contribute to morbidity.¹³

Patterns of body fat distribution vary among genders in non-HIV-infected populations. Women have a higher percentage of body fat than men, with the fat tending to accumulate around the hips, buttocks and thighs, men may have a larger intra-abdominal fat mass.⁴⁴ This trend seems unaltered in our HIV-infected cohort on HAART: men were more prone to develop lipoatrophy, while women tended to show lipohypertrophy or the mixed pattern. According to Rosenbaum *et al.* (2001),⁴⁵ these gender discrepancies are not accounted for by differences in adipose tissue distribution and appear to reflect, at least in part, effects of circulating gonadal steroids and/or primary genetic differences.⁴⁶⁻⁴⁸

We have demonstrated, that the S19W (56 C>G) polymorphism of *APOA5* is significantly associated with body fat redistribution, skinfold thickness and BMI in HIV-infected patients on HAART. Our data revealed that C/C (S/S) homozygotes presented higher means of total, subcutaneous and central fat accumulation. In contrast to our findings, Smith *et al.* (2010)²⁰ did not detect any associations between the *APOA5* SNPs and anthropometric measures in Hispanics of Caribbean origin, but they did find an interaction between these SNPs and lipoprotein lipase, gene such that the presence of the minor alleles for both SNPs was associated with significantly greater measures of obesity, including extreme obesity. Likewise, Corella *et al.* (2007)²¹ did not observe any interactions between the S19W polymorphism and anthropometric measures or obesity in subjects participating in the Framingham Offspring Study. Both of these studies, however, were performed in non-HIV-infected subjects.

Although the exact mechanism by which the S19W (56 C>G) *APOA5* polymorphism influences body fat redistribution, skinfold thickness, BMI and obesity is unknown, the present results support the idea that this factor may be one important genetic determinant in the redistribution of body fat in HIV-infected individuals. The S19W polymorphism causes a serine to be exchanged for a tryptophan at the 19th

position of the protein.¹⁸ This polymorphism can alter the synthesis or secondary protein structure by modifying lipid secretion parameters. According to some studies, the rare allele, which was associated with lower adiposity measures, confers a greater risk of having increased concentrations of triglycerides.⁴⁹ It is possible that the SNP reduces the ability of APOA5 to induce LPL activity, thereby reducing intravascular TG hydrolysis, with less fatty acid uptake by muscle and adipose tissue, thus leading to lower adiposity.⁵⁰⁻⁵² This speculation is further supported by a recent study showing that APOA5 overexpression lowered plasma TG but increased body weight and inguinal fat pad size in mice.^{52,53}

With respect to the linkage disequilibrium between the -1131 T>C and S19W (56 C>G) SNPs, we noted that in spite of the high value of D' , the r^2 value suggests that the disequilibrium between them is fairly low, so we decided to not perform further association analyses with these haplotypes. Furthermore, previous reports have demonstrated that these two (-1131 T>C and S19W) SNPs are not in linkage disequilibrium but are instead considered two marker SNPs representing three APOA5 haplotypes. Therefore, the effects of the 2 polymorphisms are independent.^{18,54-56}

We acknowledge some limitations of the present study, including the cross-sectional design and the inclusion of patients receiving several different antiretroviral regimens. The latter is an inherent difficulty for any study involving current HAART strategies, that should include different drugs. This fact might hinder the accomplishment of pharmacogenomics analyses of this therapy.

In conclusion, although these results must be confirmed in future studies, they suggest the possibility of using the *APOA5* gene as a marker of predisposition to obesity as a consequence of ART. It will likely be possible in the near future to genetically identify individuals at risk of developing body fat alterations in response to HAART, which should minimize possible adverse effects. Along with changes in

lifestyle (such as cessation of smoking, lower alcohol consumption, less sedentary time and more exercise), genetic identification of individuals at greater risk might help to decrease the risk of cardiovascular disease in HIV-infected patients.

References

1. Carr A, Sâmaras K, Burton S, et al. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS*. 1998;12:51-58.
2. Carr A. HIV lipodystrophy: risk factors, pathogenesis, diagnosis and management. *AIDS*. 2003;17(1):S141–S148.
3. Friis-Møller N, Sabin CA, Weber R, et al. Cardiovascular disease risk factors in HIV patients-association with antiretroviral therapy. Results from the DAD study. *AIDS*. 2003;17:1179-1193.
4. Mills EJ, Nachega BJ, Bangsberg DR, et al. Adherence to HAART: A Systematic Review of Developed and Developing Nation Patient-Reported Barriers and Facilitators. *PLoS Med*. 2006;3(11):e438.
5. Taiwo BO, Li X, Palella F, et al. Higher risk of AIDS or death in patients with lower CD4 cell counts after virally suppressive HAART. *HIV Med*. 2009;10:657-717.
6. Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, et al. Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet*. 1999; 353:2093–2099.
7. Gervasoni C, Ridolfo AL, Trifiro G, et al. Redistribution of body fat in HIV-infected women undergoing combined antiretroviral therapy. *AIDS*. 1999;13:465-471.
8. Thiebaut R, Daucourt V, Mercie P, et al. Lipodystrophy, metabolic disorders, and human immunodeficiency virus infection: Aquitaine Cohort, France, 1999. *Clin Infect Dis*. 2000;31:1482–1487.
9. Saves M, Raffi F, Capeau J, et al. Factors related to lipodystrophy and

- metabolic alterations in patients with human immunodeficiency virus infection receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2002;34:1396-1405.
10. Tien PC, Grunfeld C. What is HIV-associated lipodystrophy? Defining fat distribution changes in HIV infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2004;17:27-32.
 11. Lichtenstein K, Wanke C, Henry K, et al. Estimated Prevalence of HIV-associated adipose redistribution syndrome (HARS): abnormal abdominal fat accumulation—in HIV-infected patients. *Antiviral Therapy*. 2004;9:L33.
 12. Grinspoon S, Carr A. Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. *N Engl J Med*. 2005;352:48-62.
 13. Lazzaretti RK, Kuhmmer R, Sprinz E, et al. Dietary Intervention Prevents Dyslipidemia Associated With Highly Active Antiretroviral Therapy in Human Immunodeficiency Virus Type 1–Infected Individuals. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:979–88.
 14. Smit E, Skolasky RL, Dobs AS, et al. Changes in the incidence and predictors of wasting syndrome related to human immunodeficiency virus infection, 1987-1999. *Am J Epidemiol*. 2002;156:211–218.
 15. Schneider E, Whitmore S, Glynn KM, et al. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Revised surveillance case definitions for HIV infection among adults, adolescents, and children aged < 18 months and for HIV infection and AIDS among children aged 18 months to <13 years—United States, 2008. *MMWR Recomm Rep*. 2008;57(RR-10):1–12.
 16. Amorosa V, Synnestvedt M, Gross R, et al. A table of 2 epidemics: the intersection between obesity and HIV infection in Philadelphia. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;39(5):557-61.
 17. Lai CQ, Parnell LD, Ordovas JM. The APOA1/C3/A4/A5 gene cluster, lipid

- metabolism and cardiovascular disease risk. *Curr Opin Lipidol*. 2005;16:153-166.
18. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, et al. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum Mol Genet*. 2002;11:3031-3038.
 19. Guardiola M, Ferre R, Salazar J, et al. Protease Inhibitor-Associated Dyslipidemia in HIV-Infected Patients Is Strongly Influenced by the APOA5-1131T-C Gene Variation. *Clinical Chemistry*. 2006;52(10):1914-1919.
 20. Smith CE, Tucker KL, Lai CQ, et al. Apolipoprotein A5 and lipoprotein lipase interact to modulate anthropometric measures in Hispanics of Caribbean origin. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(2): 327.
 21. Corella D, Lai CQ, Demissie S, et al. APOA5 gene variation modulates the effects of dietary fat intake on body mass index and obesity risk in the Framingham Heart Study. *J Mol Med*. 2007; 85:119-128.
 22. Sánchez-Moreno C, Ordovaás JM, Smith CE, et al. APOA5 Gene Variation Interacts with Dietary Fat Intake to Modulate Obesity and Circulating Triglycerides in a Mediterranean Population. *J. Nutr*. 2011;141(3):380-385.
 23. Gasparotto AS, Sprinz E, Lazzaretti RK, et al. Genetic polymorphisms in estrogen receptors and sexual dimorphism in fat redistribution in HIV-infected patients on HAART. *AIDS*. 2012; 26:19-26.
 24. Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, et al. Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39:321-325.
 25. Veit TD, Cordero EA, Mucenic T, et al. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009;18:424-430.
 26. Lahiri DK, Nurnberger Jr JI. A rapid nonenzymatic method for the preparation

- of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:5444.
27. Saint-Marc T, Partisani M, Poizot-Martin I, et al. Fat distribution evaluated by computed tomography and metabolic abnormalities in patients undergoing antiretroviral therapy: preliminary results of the LIPOCO study. *AIDS.* 2000;14:37–49.
28. Florindo AA, Latorre MRDO, Santos ECM, et al. Validation of methods for estimating HIV/AIDS patients' body fat [in Portuguese]. *Rev Saude Publica.* 2004;38:643–649.
29. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000;894:1-253.
30. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest.* 2008;118:1590–1605.
31. Diehl LA, Dias JR, Paes AC, et al. Prevalence of HIV-associated lipodystrophy in Brazilian outpatients: relation with metabolic syndrome and cardiovascular risk factors. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52:658–667.
32. Rozenbaum W, Gharakhanian S, Salhi Y, et al. Clinical and laboratory characteristics of lipodystrophy in a French cohort of HIV-infected patients treated with protease inhibitors. *Antivir Ther.* 1999;4(Suppl 2):L34.
33. Santos CP, Felipe YX, Braga PE, et al. Self-perception of body changes in persons living with HIV/AIDS: prevalence and associated factors. *AIDS.* 2005;19(4):S14-21.
34. Pappas VA, Kyriakis KP, Polydorou-Pfandl D, et al. Epidemiologic characteristics of Koebner's phenomenon in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000;25:283-284.
35. Lakey WC, Yang LY, Yancy W, et al. From wasting to obesity: initial

- antiretroviral therapy and weight gain in HIV-infected persons. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;(16). [Epub ahead of print]
36. Shuter J, Chang CJ, Klein RS. Prevalence and predictive value of overweight in an urban HIV care clinic. *Acquir Immune Defic Syndr*. 2001;26(3):291-7.
37. Kruzich LA, Marquis GS, Wilson CM, Stephensen CB. HIV-infected US youth are at high risk of obesity and poor diet quality: a challenge for improving short-and long-term health outcomes. *J Am Diet Assoc*. 2004;104(10):1554-60.
38. Kroll AF, Sprinz E, Leal SC, et al. Prevalence of obesity and cardiovascular risk in patients with HIV/AIDS in Porto Alegre, Brazil. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2012;56(2):137-141.
39. Jaime PC, Florindo AA, Latorre MRDO, et al. Prevalência de sobrepeso e obesidade abdominal em indivíduos portadores de HIV/AIDS, em uso de terapia anti-retroviral de alta potência. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7(1):65-72.
40. Leite LHM, Sampaio ABMM. Metabolics abnormalities and overweight in HIV/AIDS persons-treated with antiretroviral therapy. *Rev Nutr*. 2008;21(3):277-283.
41. Mariz CA, Albuquerque MFPM, Ximenes RAA, et al . Body mass index in individuals with HIV infection and factors associated with thinness and overweight/obesity. *Cad. Saúde Pública*. 2011;27(10):1997-2008.
42. Lean ME, Han TS, Morrison CE. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *Bmj*. 1995;311(6998):158-161.
43. Cahn P, Leite O, Rosales A, et al. Metabolic profile and cardiovascular risk factors among Latin American HIV-infected patients receiving HAART. *Braz J Infect Dis*. 2010;14:158–166.
44. Mattsson C, Olsson T. Estrogens and glucocorticoid hormones in adipose

- tissue metabolism. *Curr Med Chem*. 2007;14(27):2918-2924.
45. Rosenbaum M, Pietrobelli A, Vasselli JR, et al. Sexual dimorphism in circulating leptin concentrations is not accounted for by differences in adipose tissue distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001;25(9):1365-1371.
 46. Marques-Vidal P, Bongard V, Ruidavets JB, et al. Obesity and alcohol modulate the effect of apolipoprotein E polymorphism on lipids and insulin. *Obes Res*. 2003;11:1200–1206
 47. Elosua R, Demissie S, Cupples LA, et al. Obesity modulates the association among APOE genotype, insulin, and glucose in men. *Obes Res*. 2003;11:1502–1508
 48. Corella D, Ordovas JM. The metabolic syndrome: a crossroad for genotype–phenotype associations in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2004;6:186–196.
 49. Ward KJ, Shields B, Knight B, et al. Genetic variants in apolipoprotein AV alter triglyceride concentrations in pregnancy. *Lipids Health Dis*. 2003;2:9-16, 2003.
 50. Merkel M, Loeffler B, Kluger M, et al. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem*. 2005;280:21553–21560.
 51. Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, et al. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem*. 2004;279:27941–27947.
 52. Wu CK, Chang YC, Hua SC, et al. A triglyceride-Raising APOA5 Genetic Variant Is Negatively Associated With Obesity and BMI in the Chinese Population. *Obesity*. 2010(18):1964–1968.
 53. Pamir N, McMillen TS, Li YI, et al. Overexpression of apolipoprotein A5 in

mice is not protective against body weight gain and aberrant glucose homeostasis. *Metab Clin Exp*. 2009;58:560–567.

54. Lai CQ, Tai ES, Tan CE, et al. The apolipoprotein A5 locus is a strong determinant of plasma triglyceride concentrations across ethnic groups in Singapore. *J Lipid Res*. 2003, 44:2365-2373.
55. Lai CQ, Demissie S, Cupples LA, et al. Influence of the APOA5 locus on plasma triglyceride, lipoprotein subclasses, and CVD risk in the Framingham Heart Study. *J Lipid Res*. 2004;45:2096–2105.
56. Ínek A, Lánská V, et al. Apolipoprotein AV gene polymorphisms (T-1131/C and Ser19/Trp) influence plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction. *Exp Clin Cardiol*. 2003;8(3):151–154.

Acknowledgement

In memoriam of Prof. Jorge Pinto Ribeiro, an example of scientist and educator. He will be sadly missed, but his enduring and substantial legacy will be intensely alive.

Table 1. Demographic, clinical and genotypic characteristics of the patients studied

Characteristics	Total (n=614)
Age, yrs	43 ± 10
Ethnicity (%)	
Euro-descendants	349 (57)
Afro-descendants	265 (43)
Clinical	
Therapy time (months)	68 ± 41
Use of protease inhibitor (%)	303 (49)
Physical activity, n (%)	156 (25)
Cigarette smoking, n (%)	186 (30)
APOA5 -1131 T>C (rs662799) ^a	
TT	515 (84.7)
TC	90 (14.8)
CC	3 (0.5)
APOA5 S19W (56 C>G) (rs3135506) ^b	
CC	500 (82)
CG	103 (16.9)
GG	7 (1.1)

Data presented as mean ± SD or number (%).

^a $\chi^2 = 0.421$; P= 0.516; gl= 1

^b $\chi^2 = 0.194$; P= 0.659; gl= 1

Table 2. Anthropometric characteristics of participants according to gender

Characteristics	Total (n=614)	Men (n=341)	Women (n=273)	P value
Body mass index (kg/m ²)	25 ± 5	25 ± 4	26 ± 5	0.003 [§]
< 25 (kg/m ²), n (%)	333 (54)	197 (59)	136 (50)	0.001 [¥]
25 – 29.9 (kg/m ²), n (%)	207 (34)	116 (34)	91 (33)	
≥ 30 (kg/m ²), n (%)	71 (12)	25 (7)	46 (17)	
Waist circumference (cm)	89 ± 11	89 ± 11	89 ± 12	0.547 [§]
Hip circumference (cm)	96 ± 12	95 ± 7	99 ± 16	<0.001 [§]
Waist-to-hip ratio	0.93 ± 0.08	0.94 ± 0.08	0.91 ± 0.09	0.001 [§]
Total subcutaneous fat (mm)	108 ± 51	87 ± 39	136 ± 52	<0.001 [§]
Central subcutaneous fat (mm)	77 ± 35	65 ± 30	92 ± 35	<0.001 [§]
Limbs subcutaneous fat (mm)	31 ± 21	22 ± 14	43 ± 23	<0.001 [¶]
Lipodystrophy, n (%)	314 (51)	165 (49)	149 (55)	0.145 [*]
Atrophy	127 (41)	87 (53)	40 (27)	<0.001 ^{**}
Hypertrophy	83 (26)	30 (18)	53 (36)	
Mixed pattern	104 (33)	48 (29)	56 (37)	

Data presented as mean ± SD or number of patients (%).

[¶] Student t-test for independent samples with log_n-transformed variable

[§] Student t-test for independent samples.

[¥] Value obtained by the Fisher's exact test.

^{*}χ²-Test with Yates correction.

^{**}χ²-Test with Yates correction between individuals with lipodystrophy only.

Table 3. Comparison of anthropometric variables between -1131 T>C and S19W (56 C>G) genotypes

APOA5 genotypes	-1131 T>C			S19W (56 C>G)				
	TT	C carriers	<i>P</i> -value	<i>Adjusted P</i> -value**	CC	G carriers	<i>P</i> -value	<i>P</i> -value**
BMI, kg/m ²	25 ± 4 (511)	26 ± 5 (93)	0.083 [‡]	0.664	25 ± 5 (496)	24 ± 4 (110)	0.016 [‡]	0.080
WC, cm	88 ± 11 (490)	89 ± 11 (91)	0.034 [£]	0.276	89 ± 12 (480)	87 ± 11 (103)	0.029 [£]	0.145
TSF, mm	108 ± 52 (481)	113 ± 49 (86)	0.182 [§]	1.000	111 ± 52 (467)	98 ± 48 (102)	0.002 [§]	0.010
CSF, mm	76 ± 36 (481)	81 ± 33 (86)	0.148 [¶]	1.000	79 ± 36 (467)	70 ± 32 (102)	0.004 [¶]	0.020
LSF, mm	32 ± 22 (486)	32 ± 21 (88)	0.569 ^{*§}	1.000	32 ± 22 (473)	28 ± 19 (102)	0.003 ^{*§}	0.015

TSF, total subcutaneous fat; CSF, central subcutaneous fat; LSF, limbs subcutaneous fat; BMI, body mass index; WC, waist circumference.

Data presented as mean ± SD (n).

**P*-value expressed with tests performed with log_n-transformed variable

***P*-value after Bonferroni correction for multiple testing

§Adjusted for age, gender and cigarette smoking

¶Adjusted for gender and cigarette smoking

§Adjusted for gender and age

‡Adjusted for gender, cigarette smoking and lipid-lowering agents use

£Adjusted for cigarette smoking, lipid-lowering agents use and physical activity

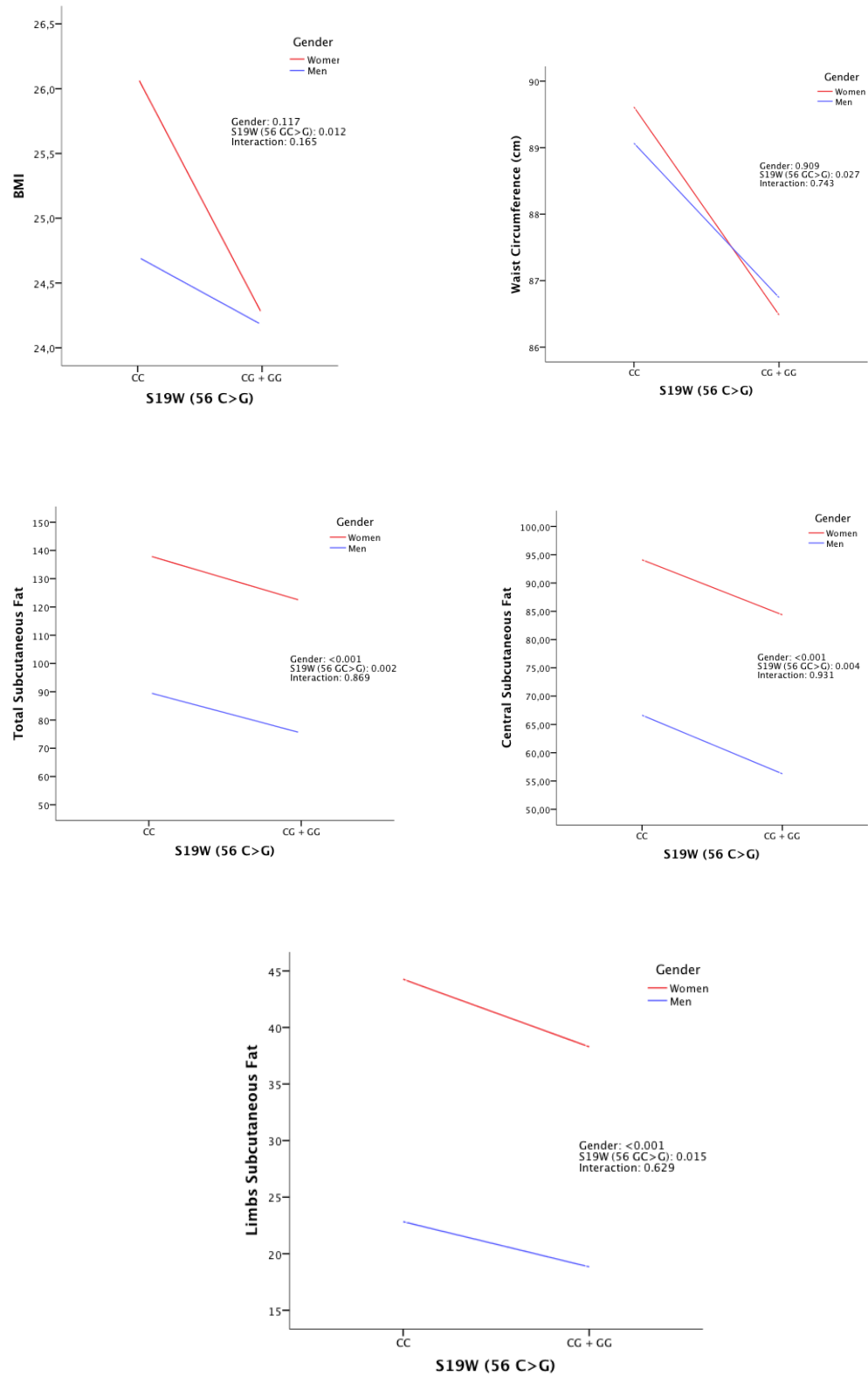


Figure 1. Comparison of anthropometric variables between S19W (56 C>G) genotype in both genders.

Table 4. Poisson regression model and predictive variables for obesity development in HIV-positive patients on HAART

Outcome	Variable	PR	IC 95%	P-value
Obesity BMI ≥ 30	Male sex	0.461	0.292 – 0.728	0.001
	Physical activity	0.480	0.245 – 0.939	0.032
	G carriers	0.412	0.183 – 0.928	0.032

95% CI, 95% confidence interval; BMI, body mass index; PR, prevalence ratio.

CAPÍTULO V

CONCLUSÃO GERAL

PERSPECTIVAS FUTURAS

Conclusão Geral

Após estudarmos nove polimorfismos em seis genes envolvidos no metabolismo dos lipídios em indivíduos infectados pelo HIV provenientes de três centros de referência no tratamento da Aids do Estado do Rio Grande do Sul, podemos chegar às seguintes conclusões:

Em relação à prevalência dos efeitos adversos em questão, embora 21% dos pacientes avaliados, em uso do TARV, estivessem em uso de fármacos hipolipemiantes, a amostra analisada apresentou uma alta prevalência de dislipidemia. A prevalência de lipodistrofia foi de 51% na amostra total e não diferiu entre os gêneros, no entanto, a lipoatrofia foi mais prevalente no gênero masculino, enquanto que a lipohipertrofia, no gênero feminino.

As frequências alélicas obtidas para os polimorfismos em estudo na amostra da população de três centros de referência em atendimento à pacientes infectados pelo HIV foram semelhantes às frequências encontradas em populações locais ou em outras populações de pacientes euro-descendentes infectados pelo HIV.

Dois SNPs contribuíram significativamente para a modificação dos níveis de triglicerídeos: tanto o alelo E2 do gene da *APOE* quanto o alelo C do polimorfismo - 1131 T>C (rs662799) da *APOA5* foram associados com maiores níveis. No entanto, apenas o alelo C da *APOA5* manteve significância estatística após aplicação do teste de Bonferroni.

Este é o primeiro estudo que avaliou a associação do gene *SCAP* com o perfil lipídico de pacientes infectados pelo HIV. Contudo, a associação encontrada com os níveis de HDL-C não foi mantida após aplicação do teste de correção de Bonferroni, da mesma forma que a associação com o genótipo homocigoto T/T do polimorfismo - 1131 T>C do gene da *APOA5*, que apresentou maiores concentrações de HDL-C que

os portadores do alelo C.

Inicialmente, os níveis médios de colesterol total e LDL-C foram associados com ambos polimorfismos da *APOB* (Ins/Del; rs17240441 e *Xba*I 7673 C> T; rs693). No entanto, somente a associação com os níveis de LDL-C permaneceu significativa após a correção por Bonferroni.

Encontramos uma forte e consistente associação do alelo E2 do gene da *APOE* com a redução dos níveis de LDL-C no plasma, enquanto que o alelo E4 foi associado com aumento do LDL-C.

O nosso estudo foi o primeiro a associar o polimorfismo S19W (56 C>G; rs3135506) do gene da *APOA5* com parâmetros antropométricos em indivíduos infectados pelo HIV. Indivíduos homocigotos para o alelo C tiveram maiores medidas de gordura subcutânea total, dos membros e central em comparação aos portadores do alelo G. Neste contexto, praticar atividade física, ser do gênero masculino e possuir o polimorfismo S19W 56 C>G conferiram proteção para obesidade no modelo de regressão de Poisson.

Perspectivas Futuras

A dislipidemia é uma doença complexa, poligênica que provavelmente resulta da interação de múltiplas variantes genéticas com fatores ambientais tais como obesidade, dieta e vida sedentária, além de depender das características genéticas de cada população estudada. Em se tratando do código genético, com aproximadamente dois milhões de polimorfismos já identificados, avaliar o efeito isolado de um determinado alelo é um desafio, pois a dislipidemia é muito susceptível a interações gene-gene, gene-nutriente e gene-ambiente. A expressão de variações específicas em um sistema biológico complexo é sujeita a modificações de outros genes envolvidos no mesmo processo fisiológico, o que prejudica, por exemplo, a identificação real do papel de um determinado polimorfismo na homeostase do sistema. Em contrapartida, um traço herdado pode ser modificado ou manifestado por influências do meio ambiente quando uma única mutação responde por uma síndrome genética ou diversos polimorfismos, aparentemente de pouca influência em condições basais, gerando um fenótipo alternativo após sofrerem influências ambientais.

Recentemente, grande atenção tem sido dada às lipoproteínas e aos polimorfismos associados ao metabolismo lipídico assim como ao risco de doenças cardiovasculares. Estes polimorfismos representam um índice de exposição presente ao longo da vida de níveis alterados de lipoproteínas, medidas séricas feitas em momentos isolados que sofrem influência de fatores como dieta, exercício, jejum, entre outros. Desta forma a tendência atual é considerar que o valor preditivo dos polimorfismos é mais consistente do que medidas séricas isoladas de lipídeos.

Este estudo possibilitou a análise de marcadores genéticos que estão relacionados com o processo de aterogênese numa população específica, associada a uma incidência aumentada de eventos cardiovasculares. Desta forma, é possível identificar novos parâmetros de risco, permitindo que um novo paradigma possa ser implementado: a individualização terapêutica conforme as características susceptíveis

de um indivíduo, aprimorando a aplicabilidade da genética na abordagem clínica. O tratamento individualizado proposto pela farmacogenética representa um avanço na terapêutica. A prática dessa especialidade implicará na redução de efeitos adversos e no aumento da eficácia e segurança do uso de medicamentos. No entanto, ainda existem obstáculos a serem superados, como a compreensão da dinâmica complexidade do genoma humano e da etiologia de doenças com origem multifatorial, assim como muitas barreiras relacionadas a questões éticas precisam ser transpostas.

A farmacogenética, contudo, é um campo de pesquisa ainda em desenvolvimento, apesar dos inúmeros benefícios que esta pode trazer. É fundamental notar que muitos genes podem influenciar as respostas aos medicamentos, o que torna complexa a tarefa de identificar quais variações genéticas são mais relevantes. Validar clinicamente os marcadores genéticos de maior relevância clínica e avaliar a relação custo-efetividade do seu uso na prática talvez sejam os fatores limitantes mais importantes do uso da informação genética ao serem tomadas decisões terapêuticas. A multiplicidade dos genes envolvidos e as complexas interações entre eles nos levam a pensar na necessidade de acumular mais informações antes de afirmar que o tempo chegou para implementá-los na prática clínica diária.