

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Janáina Kehl de Castilhos

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS
EM GENES DA VIA DE
SINALIZAÇÃO DA ADIPONECTINA
E SUA ASSOCIAÇÃO COM
EFEITOS ADVERSOS DA TERAPIA
ANTIRRETROVIRAL EM PESSOAS
VIVENDO COM HIV E AIDS.**

Porto Alegre

2013

Janáína Kehl de Castilhos

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS
EM GENES DA VIA DE
SINALIZAÇÃO DA ADIPONECTINA
E SUA ASSOCIAÇÃO COM
EFEITOS ADVERSOS DA TERAPIA
ANTIRRETROVIRAL EM PESSOAS
VIVENDO COM HIV E AIDS.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Prof^a.Dra.Vanessa Suñé Mattevi

Porto Alegre

2013

Catalogação na Publicação

C352a Castilhos, Janaína Kehl

Análise de polimorfismos em genes da via de sinalização da adiponectina e sua associação com efeitos adversos da terapia antirretroviral em pessoas vivendo com HIV e AIDS. – Porto Alegre, 2013.

78f.; graf.; tab.; il.

Dissertação (Mestrado). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2013.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Suñe Matteví.

1. Terapia antirretroviral. 2. TARV. 3. Síndrome de imunodeficiência adquirida. 4. HIV. 5. AIDS. 6. Toxicidade.
I. Título.

CDD 615.718

CDU 615.06

Agradecimentos

Esta dissertação é apenas um dos produtos de uma rede cooperativa de projetos que esta prestigiada Instituição mantém e fomenta. Portanto, nada mais justo que dar início aos meus agradecimentos homenageando não somente a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), como também a todos os funcionários e ao corpo docente, principalmente àqueles que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Patologia. Estes me receberam de braços abertos, sem subestimar meu currículo, ainda pouco voltado à pesquisa.

Preciso agradecer de forma especial às minhas orientadoras, Prof^ª. Dr. Vanessa Suñé Mattevi e Prof^ª. Dr. Marilda da Cruz Fernandes. À primeira, que foi minha orientadora durante a pesquisa e que, sem me conhecer pessoalmente, apostou em mim, sempre com paciência e dispo de uma palavra de incentivo, compreensão, mostrando-se disponível ao emprestar um pouco do seu tão vasto conhecimento. À Prof^ª. Marilda, minha orientadora da bolsa REUNI, não menos importante em meu desenvolvimento acadêmico, minha gratidão pela confiança, permitindo-me uma relação de cumplicidade e a oportunidade de uma experiência de docência que acabou servindo, a mim, de inestimável aprendizado. Palavras se fazem escassas diante de tudo que tenho a agradecer a ambas, limitando-me a desejar, por tudo o que me proporcionaram, a possibilidade de sempre retribuí-las com minha sincera amizade.

À Sandrine Comparsi Wagner, que além de ter me incentivado e orientado desde a graduação, esteve presente também neste processo, indicando-me, sem ressalvas, à Prof^ª. Vanessa. Meu muito obrigada!

Aos meus amigos, Rosana Cardoso Manique da Rosa e Rafael Fabiano Machado da Rosa, que, além de desafiarem a genética - passando a fazer parte da minha família -

sempre dispuseram de inesgotável incentivo e apoio, sem o que hoje eu não estaria aqui, feliz por tê-los ao meu lado.

Às amigas Grasiela Agnes e Aline Gasparotto pelo apoio incansável durante os experimentos.

À toda a minha família, especialmente meu pai, minha mãe e meus irmãos, por estarem sempre ao meu lado e que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse aqui, me ensinado que “o único lugar onde o trabalho vem antes do sucesso é no dicionário”. À minha cunhada que me ajudou com os textos em inglês e que compartilhou de perto as angústias, percalços e expectativas de um mestrado comigo. Jean Paul Sartre disse, certa vez, que “família é como a varíola: a gente tem quando criança e fica marcado para o resto da vida”. Pois compartilho desta assertiva, pois as marcas/ensinamentos da minha família caminharão sempre comigo em meu coração, inclusive daqueles que sei que estariam orgulhosos, mas que não estão aqui hoje, como meus avós.

Ao meu esposo, que esteve pacientemente ao meu lado nesta jornada. Amor, me perdoa por ter feito você perder o sono e muito obrigado por ter passado a noite em claro comigo. E saiba que mesmo que eu não diga sempre, sou muito grata por cada pequena coisa que você faz por mim.

Às agências de fomento, Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais do Ministério da Saúde, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), PRONEX-FAPERGS/CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por fornecerem o suporte financeiro tão necessário ao desenvolvimento desta pesquisa.

E a todas as pessoas que de alguma forma estiveram envolvidas nesta pesquisa ou que me apoiaram durante mais esta etapa: MUITO OBRIGADA!

Sumário

Lista de Abreviaturas	VI
Resumo	VIII
1. Introdução	1
1.1 Epidemiologia da infecção pelo HIV	1
1.2 Terapia antirretroviral	4
1.3 Adipocinas	8
2. Objetivos.....	24
3. Referências Bibliográficas.....	25
4. Artigo Científico.....	32
5. Considerações Finais	59
6. Anexos.....	62

Lista de Abreviaturas

ABCC2	Membro 2 da subfamília C das proteínas transmembranares ligantes de ATP
ADIPOR1	Receptor da adiponectina 1
ADIPOR2	Receptor da adiponectina 2
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMPK	AMP quinase
ANOVA	Análise de variâncias
APM1	Gene da adiponectina
APOB	Apolipoproteína B
APPL1	Adaptador protéico
BMI	Índice de massa corporal
CSF	Gordura subcutânea total
DNA	ácido desoxirribonucléico
GLUT-4	Transportador de glicose insulino-sensível
GPCR	Receptores ligantes de proteína G
HAART	Terapia antirretroviral de alto impacto
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Complexo de histocompatibilidade principal
IP	Inibidores da protease
ITRN	Inibidores da transcriptase reversa análogos a nucleosídeos
ITRNN	Inibidores da transcriptase reversa não análogos a nucleosídeos
LDL	Lipoproteína de baixa densidade

LKB1	Serina-treonina kinase hepática B1
LSF	Gordura subcutânea dos membros
MAF	Frequencia do alelo raro
MPR2	Proteína associada à resistência a múltiplas droga 2
P38 MAP	P38 proteína ativada por mitógeno
PPARα	Receptor ativado pela proliferação de peroxissomas alfa
PPAR γ	Receptor ativado pela proliferação de peroxissomas gama
PCR	Reação em cadeia da polimerase
P-gp	Glicoproteína P
SD	Desvio-padrão
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TARV	Terapia antirretroviral
TNFα	Fator de necrose tumoral α
TSF	Gordura subcutânea total
χ^2	Qui-quadrado

Resumo

Introdução: A adiponectina é uma proteína, secretada por adipócitos maduros, que participa da regulação do metabolismo da glicose e dos lipídeos. Ela é um potente antidiabético e antiinflamatório, sendo responsável por minimizar os riscos associados à obesidade. Em pacientes infectados pelo HIV que utilizam a terapia antirretroviral (TARV), os baixos níveis de adiponectina foram associados à presença de lipodistrofia em estudo previamente realizado por nosso grupo de pesquisa.

Objetivos: Avaliar a associação de cinco polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) presentes nos genes dos receptores de adiponectina (*ADIPOR1* - rs1342387 e rs10920533, *ADIPOR2* - rs11061925, rs929434 e rs767870) com a síndrome da lipodistrofia em pessoas vivendo com HIV e AIDS sob terapia antirretroviral.

Materiais e Métodos: Foram genotipados, por PCR em tempo real, 410 pacientes infectados pelo HIV em utilização da TARV. Foram avaliadas medidas antropométricas e bioquímicas destes pacientes. As médias destas medidas antropométricas e bioquímicas foram comparadas para os diferentes genótipos através da análise de variância.

Resultados: Foram analisados cinco SNPs localizados nos genes que codificam os receptores da adiponectina: dois no gene *ADIPOR1* (rs1342387 e rs10920533) e três no gene *ADIPOR2* (rs11061925, rs929434 e rs767870). Para o gene *ADIPOR2*, houve associação entre os níveis de triglicerídeos e os três SNPs analisados e entre o SNP rs11061925 e os níveis de colesterol total na amostra total. Igualmente para este gene, obtiveram-se associações entre os três SNPs analisados e variáveis bioquímicas (níveis de triglicerídeos, colesterol total, adiponectina e glicose), somente nos homens. Para as variantes do gene do *ADIPOR1* não foram encontradas associações significativas.

Conclusões: SNPs no gene *ADIPOR2* podem estar envolvidos nas alterações metabólicas em pacientes infectados pelo HIV em TARV. As associações mais significativas foram encontradas entre os genótipos e as variáveis bioquímicas quando a análise foi restrita ao sexo masculino, mostrando um efeito gênero-específico destas variantes.

1. Introdução

1.1 Epidemiologia da infecção pelo HIV

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um retrovírus, da família dos lentivírus, responsável pela patogênese da síndrome da imunodeficiência adquirida humana (AIDS). A infecção se dá pela penetração do HIV no organismo através das mucosas ou por contato direto com o sangue contaminado, portanto as formas mais comuns de contágio são o contato sexual, inoculação parenteral e transmissão vertical (da mãe contaminada para o feto ou o recém-nascido) [1, 2].

O HIV infecta as células T e os macrófagos diretamente ou é levado até esses pelas células de Langerhans. A replicação viral nos linfonodos regionais acarreta viremia e semeadura difusa dos tecidos linfóides. A viremia é controlada pela resposta imune do hospedeiro, e, então, o paciente entra em fase de latência clínica. Durante esta fase, a replicação viral nas células T e nos macrófagos continua sem qualquer diminuição, mas há alguma contenção imune do vírus. Há uma erosão gradual das células CD4+ pela infecção produtiva. Quando o número de células CD4+ que são destruídas não pode mais ser repostado, as contagens de células CD4+ declinam e o paciente desenvolve os sinais clínicos da AIDS. Os macrófagos também são parasitados pelo vírus desde cedo, no entanto não são lisados pelo HIV e transportam-no para os tecidos, particularmente para o cérebro [1].

É importante salientar que a infecção pelo HIV, por deprimir o sistema imunológico, deixa o indivíduo contaminado susceptível a infecções oportunistas, tais como toxoplasmose, candidíase, criptococose, neoplasias, etc., além de acarretar lesões neurológicas [1]. Como não há uma resposta imune

eficiente no indivíduo portador do HIV, pode ocorrer demora na percepção da infecção oportunista e esta pode tomar proporções indesejadas, muitas vezes levando o paciente ao óbito [2].

A infecção pelo HIV apresenta uma magnitude assustadora, tanto mundial quanto regional. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde do final de 2010, aproximadamente 34 milhões de pessoas no mundo vivem com HIV/AIDS, o que representa um aumento de 17% em relação ao ano de 2001. O aumento do número de casos é um reflexo do grande número de novas infecções pelo HIV e da expansão significativa da terapia antirretroviral, que ajudou a reduzir as mortes relacionadas à AIDS, principalmente nos anos mais recentes. O número de óbitos relacionados à AIDS atingiu seu pico em meados dos anos 2000, quando foram registrados 2,2 milhões de óbitos; já em 2010 foram registrados 1,8 milhões, uma redução significativa de aproximadamente 18%. Desde 1995, com a introdução da terapia antirretroviral, estima-se que 2,5 milhões de mortes tenham sido evitadas, sendo em torno de 700.000 delas somente no ano de 2010. Na América Latina, a epidemia parece ter se estabilizado, com cerca de 1,5 milhões de adultos e crianças vivendo com HIV/AIDS; em 2010, foram notificadas 100.000 infecções novas e 67.000 óbitos, estimando-se uma prevalência de 0,4% em adultos nesse mesmo ano [3].

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, de 1980 a junho de 2011 foram notificados 608.230 casos de AIDS. Em 2010, foram notificados 34.218 novos casos, com taxa de incidência nacional de 17,9/100.000 habitantes. Na última década observou-se uma estabilização da taxa de incidência no Brasil. De 1980 a 2010, no país, ocorreram 241.469 óbitos tendo como causa básica a AIDS. Em 2010 foram 11.965 óbitos, com coeficiente bruto de mortalidade de

6,3/100.000 habitantes. A taxa de prevalência da infecção pelo HIV, na população de 15 a 49 anos, é considerado estável em 0,6% desde 2004, permanecendo em torno de 0,4% entre as mulheres e 0,8% entre os homens [4].

A região Sul é a que apresenta maior número de casos notificados de AIDS no período de 1980 a junho de 2011, com total de 123.069 casos nesse período, sendo, no Rio Grande do Sul, 60.512 destas notificações, (49,2% do total de casos da região). No período de 1998 a 2010, observou-se um aumento na taxa de incidência no Estado, de 28,9/100.000 habitantes em 1998 para 37,6/100.000 habitantes em 2010, o que revela um acréscimo de 30% na taxa de incidência. No Rio Grande do Sul, em 2010, a taxa de incidência foi maior que a média nacional (17,9/100.000 habitantes), sendo de 37,6/100.000 habitantes. Dentre as capitais do país, Porto Alegre é a que apresenta maior incidência de casos notificados — 99,8/100.000 habitantes — seguida por Florianópolis, com 57,9/100.000 habitantes. Verifica-se, ainda, que dentre as 50 cidades brasileiras com maiores taxas de incidência, 17 estão localizadas em nosso Estado [4], o que configura um sério problema de saúde pública, onerando de forma agressiva o sistema de saúde pública em nossa região, já que estes pacientes desenvolvem várias comorbidades associadas ao HIV.

A resposta imunitária do organismo humano contra o vírus controla a viremia, mas não elimina o vírus, possivelmente devido à rápida replicação viral e pela grande facilidade com que ele sofre mutações [2]. Nesse contexto, a introdução da terapia antirretroviral foi de suma importância.

1.2 Terapia antirretroviral

A terapia antirretroviral (TARV) mudou o curso da doença ocasionada pela infecção pelo HIV, aumentando a sobrevivência e melhorando a qualidade de vida dos indivíduos portadores deste vírus, e transformando a AIDS de uma doença irreversivelmente fatal em uma doença crônica. A TARV é baseada em uma combinação de inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRNs), inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNNs), inibidores da protease (IPs), inibidores de fusão e inibidores da integrase. As três primeiras classes compõem a terapia de primeira escolha preconizada pelo Ministério da Saúde. Por serem esquemas eficazes, mais simples, menos tóxicos e de menor custo, este grupo de fármacos é amplamente utilizado para controlar a infecção pelo HIV e o desenvolvimento da AIDS. No entanto, é comum que os pacientes que aderem à terapia sofram com seus efeitos adversos, os quais incluem distúrbios metabólicos graves que, em longo prazo, podem contribuir para a incidência de doenças cardiovasculares. Estes efeitos adversos foram inicialmente atribuídos aos IPs, mas estudos clínicos recentes indicam que o uso de ITRNs representa também um fator de risco. Dentre os distúrbios metabólicos, o que mais comumente acomete os pacientes HIV positivos é a síndrome lipodistrófica, caracterizada por lipoatrofia periférica, redistribuição de gordura corporal (com acúmulo de tecido adiposo na região visceral e dorsocervical) e alterações metabólicas, como as dislipidemias (com elevação dos níveis séricos de triglicerídeos e de colesterol total) e a resistência insulínica [5-14].

Os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRNs) são uma classe de antiretrovirais com estrutura química constituída por uma

versão modificada dos nucleosídeos naturais. Estes compostos, depois da fosforilação intracelular, formam metabólitos ativos, suprimindo a replicação do HIV e interferindo na atividade da enzima transcriptase reversa. Muitos estudos farmacogenéticos que envolvem esta classe de drogas estão focados em reações de hipersensibilidade e no complexo de histocompatibilidade principal (HLA). Alguns genes envolvidos no transporte destas drogas, como o gene *ABCC2* (membro 2 da subfamília C das proteínas transmembranares ligantes de ATP) que codifica a proteína associada à resistência a múltiplas drogas 2 (MPR2), também são estudados e relacionados à toxicidade dos ITRNs. Além disso, existem estudos que relacionam polimorfismos no genoma mitocondrial e no fator de necrose tumoral α (TNF α) com a toxicidade da classe de drogas [6, 7, 15, 16].

Os inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNNs) são uma classe de antirretrovirais que age inibindo não competitivamente a transcriptase reversa do HIV-1. Muitos estudos farmacogenéticos de disposição, eficácia e toxicidade dos ITRNNs envolvem genes implicados no seu metabolismo, como polimorfismos do citocromo P450, no transporte do fármaco, como polimorfismos na glicoproteína P (P-gp), e nas reações de hipersensibilidade, como polimorfismos do sistema HLA [7, 15, 16].

Por sua vez, os inibidores da protease (IPs) são uma classe de antirretrovirais que inibe a replicação do vírus por inibir a atividade da protease do HIV-1. Polimorfismos nos genes das apolipoproteínas têm sido associados com anormalidades metabólicas, como hiperlipidemia, e com eventos cardiovasculares relacionadas a esta classe de drogas [6, 7, 11, 15, 16].

A resposta à TARV é um fenômeno complexo e é limitada pela ocorrência de efeitos tóxicos agudos ou crônicos ou pela emergência da resistência às drogas. O metabolismo das drogas e sua toxicidade varia muito entre indivíduos, afetando a eficácia da terapia. Acredita-se que variações genéticas podem ter relevante participação nesta variabilidade [7, 15].

1.2.1 Efeitos Adversos

Os efeitos adversos da TARV têm papel fundamental na adesão ao tratamento por parte dos pacientes [17]. As complicações da TARV são multifatoriais, complexas e seus mecanismos ainda não estão completamente elucidados [5]. No entanto, sabe-se que o impacto dos IPs e dos ITRNs na secreção de adiponectina pelos adipócitos resulta de uma superestimulação das citocinas pró-inflamatórias. Estes fármacos desregulam a expressão e secreção de várias adipocinas, além de inibir a diferenciação dos adipócitos e induzir à resistência insulínica, em parte por diminuir a taxa de transcrição nos adipócitos, colaborando, assim, para a disfunção do tecido adiposo e para a lipodistrofia. A fisiopatologia destas alterações é complexa e poucas opções terapêuticas estão disponíveis [6, 16, 18].

A associação da terapia antirretroviral com alterações metabólicas foi descrita na última década. Estas alterações ocorrem após aproximadamente três meses do início do tratamento e envolvem, inicialmente, alterações somáticas como a lipodistrofia com lipoatrofia e características metabólicas como a resistência insulínica, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, incluindo hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, e anormalidades de coagulação [11, 16].

É consenso que pacientes portadores de HIV apresentam risco aumentado de desenvolver doenças cardiovasculares. Este aumento do risco é multifatorial, causado tanto pelo vírus em si como pela terapia antirretroviral e subsequente reconstituição imune. No entanto, a terapia antirretroviral como fator associado independente aumenta o risco de infarto do miocárdio em 26% por ano de exposição durante os seis primeiros anos de uso. A incidência do primeiro evento cardiovascular é de 5,7 por 1000 pessoas/ano e aumenta conforme o tempo de exposição à terapia (o risco relativo é de 1,26 por ano de exposição). O risco é mais alto em pacientes que fazem uso de inibidores da protease do que naqueles que estão expostos aos inibidores da transcriptase reversa não análogos a nucleosídeos. Os inibidores da protease têm papel importante na síndrome metabólica e no risco de desenvolvimento de complicações cardiovasculares por interferirem no metabolismo das lipoproteínas e dos adipócitos, aumentando os níveis de glicose, colesterol total e triglicerídeos e diminuindo os níveis de colesterol HDL [11, 12, 19].

Há mais de 10 anos, com a introdução da terapia antirretroviral, foi identificada uma síndrome de lipoatrofia em pacientes infectados pelo HIV. Estudos comprovam que a lipoatrofia está relacionada à depressão e à redução da qualidade de vida destes indivíduos [10].

1.2.2 Lipodistrofia

Lipodistrofia é um termo usado para descrever um grupo de diversas alterações caracterizadas por mudanças na composição corporal e alterações metabólicas. As mudanças na composição corporal incluem a lipoatrofia, que é a perda completa ou parcial de tecido adiposo, e a lipohipertrofia, que é o acúmulo

patológico de tecido adiposo em diversos compartimentos do corpo [20, 21]. A prevalência da lipodistrofia associada ao HIV, descrita pela primeira vez em 1998 após a introdução da terapia antirretroviral, chega a 80% naqueles pacientes que recebem terapia antirretroviral, segundo estudo anteriores [19].

A lipoatrofia é caracterizada pela diminuição da gordura subcutânea nas extremidades com veias proeminentes, perda de gordura subcutânea das nádegas e atrofia facial. A perda de peso e de gordura subcutânea da lipoatrofia deve ser diferenciada de outras condições inerentes à infecção por HIV, como má nutrição, caquexia, insuficiência da adrenal e infecções crônicas severas. Já a lipohipertrofia pode ser diferenciada pelo acúmulo de gordura em torno da região dorso-cervical, do pescoço, do abdômen, tronco e depósitos de gordura subcutâneos. Os pacientes com lipodistrofia podem apresentar lipoatrofia, lipohipertrofia ou ambas [19, 20].

1.3 Adipocinas

O tecido adiposo foi, por muitos anos, considerado um “órgão” de reserva energética. No entanto, em 1994, com a descoberta da leptina, o tecido adiposo recebeu o status de tecido endócrino [22]. Diversas moléculas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), a leptina, a resistina e a adiponectina, são secretados pelo tecido adiposo e exercem efeitos metabólicos significativos em outros tecidos. Estas moléculas, chamadas adipocinas, estão associadas às alterações na distribuição de tecido adiposo e nas anormalidades metabólicas em pacientes com infecção pelo HIV. Por exemplo, o TNF α é um mediador importante de resistência à insulina; o aumento dos níveis do receptor do TNF α tem sido associado com a perda de gordura subcutânea e com a resistência

insulínica em pacientes infectados pelo HIV. A leptina, que sinaliza uma complexa rede de respostas metabólicas tanto em nível central como periféricamente, também está fortemente relacionada com o acúmulo de tecido adiposo na lipodistrofia do HIV, embora a forma como se dá esta relação ainda não seja completamente conhecida [23].

As adipocinas secretadas pelo tecido adiposo podem ter ação sinérgica ou antagonica nas vias de controle de diversos processos metabólicos e imunológicos. Elas exercem sua ação através de efeitos endócrinos, parácrinos e autócrinos em uma série de processos fisiológicos e patológicos. Em particular, estão envolvidas na regulação do consumo alimentar e metabolismo energético, tanto em situações normais quanto em patológicas, e na regulação da resposta inflamatória [24].

A desregulação das adipocinas causada pelo excesso de acúmulo de gordura está envolvida na patogênese da síndrome metabólica e doenças cardiovasculares [25]. A maioria das adipocinas secretadas pelo tecido adiposo, como o fator de necrose tumoral α (TNF α), a leptina, a lipocaína 2 e a resistina, exercem efeitos deletérios no sistema cardiovascular. Nos casos de obesidade, a expansão do tecido adiposo leva a um aumento da expressão dessas adipocinas pró-inflamatórias, que contribuem para a patogênese das doenças cardiovasculares. Por outro lado, a adiponectina, adipocina secretada em maior quantidade pelo tecido adiposo e que apresenta atividades anti-inflamatórias e na sensibilização pela insulina, está com sua expressão diminuída na obesidade, o que também é relacionado às patologias do sistema cardiovascular [26, 27].

1.3.1 Adiponectina

A adiponectina, também conhecida como AdipoQ, Acrp30 ou ApM1, é um peptídeo pertencente à família 1q do sistema complemento, expresso e secretado pelo tecido adiposo sob estímulo de receptores nucleares, e está relacionada com a regulação do metabolismo da glicose e dos lipídeos, e com o processo inflamatório [28-31]. Esta proteína é secretada pelos adipócitos maduros em resposta à exposição ao fator de transcrição do receptor ativado pela proliferação de peroxissomas gama (PPAR γ) a seus agonistas [23, 30, 32]. Seus níveis plasmáticos estão negativamente correlacionados aos níveis de glicose, insulina, triglicerídeos, TNF α e proteína C reativa e positivamente correlacionados com os níveis de colesterol HDL e com a estimulação insulínica pela glicose [19, 28, 33-35].

A adiponectina é uma das adipocinas mais abundantes secretadas pelos adipócitos, circulando em níveis que variam de 3 a 30 $\mu\text{g/ml}$ em humanos, representando mais de 0,05% do total de proteínas plasmáticas, sendo menor o seu nível plasmático em homens do que em mulheres. Esta proteína é secretada pelos adipócitos na circulação sanguínea na forma de três complexos oligoméricos, incluindo um trímero, um hexâmero e um multímero de alto peso molecular. A adiponectina trimérica é a base para a construção dos hexâmeros e multímeros de alto peso molecular; ela é formada via interação hidrofóbica de moléculas globulares e sua estabilização ocorre através de ligações não-covalentes de domínios colágenos na haste da tripla hélice (Figura 1) [13, 24, 25, 34-37].

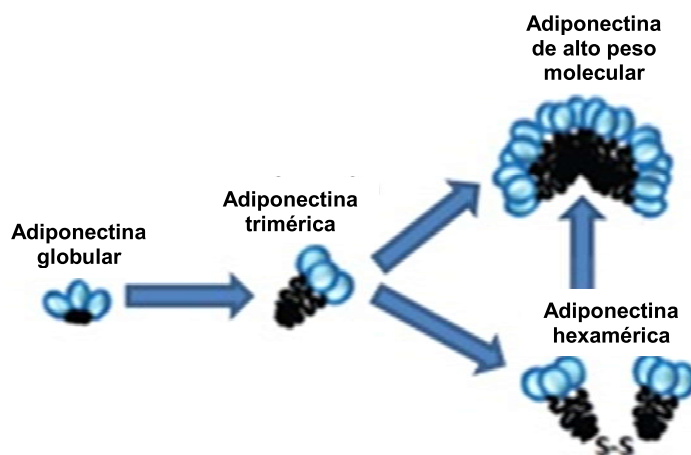


Figura 1. A adiponectina trimérica é a base para a construção dos hexâmeros e múltiplos de alto peso molecular; ela é formada via interação hidrofóbica de moléculas globulares e sua estabilização ocorre através de ligações não-covalentes de domínios colágenos na haste da tripla hélice. **Adaptado de Hui, Lamb *et al.* [26].**

A adiponectina aumenta a combustão dos ácidos graxos e o consumo energético, em parte via ativação do receptor ativado pela proliferação de peroxissomas alfa (PPAR α), que leva à diminuição dos triglicerídeos contidos no fígado e no músculo esquelético, e assim coordenando o aumento da sensibilidade insulínica [34]. A adiponectina inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas das células endoteliais, inibindo assim sua capacidade de responder a vários estímulos inflamatórios. Ela também suprime a transformação de macrófagos em células espumosas. A adiponectina promove a sensibilidade insulínica por afetar o metabolismo da glicose e dos lipídeos no músculo esquelético e no fígado [25, 38].

O nível de adiponectina é alto em humanos ao nascimento, no entanto decai durante a primeira década de vida, em paralelo com a lipidificação dos adipócitos [37]. O declínio dos níveis circulantes de adiponectina associado a fatores genéticos e ambientais, causa obesidade, o que contribui para o desenvolvimento de resistência insulínica, diabetes tipo 2, síndrome metabólica e aterosclerose [39]. A expressão do RNAm do gene da adiponectina e a

concentração circulante desta proteína estão reduzidas em várias desordens metabólicas, como obesidade, dislipidemia, resistência insulínica, diabetes tipo 2, lipodistrofia congênita e doenças cardiovasculares [5, 29]. Esta proteína exerce efeitos cardioprotetivos, antiateroscleróticos na vasculatura, efeitos antidiabéticos no músculo esquelético e antifibróticos no fígado. Entre os efeitos cardioprotetivos figuram sua atividade antioxidante, metabólica, antifibrótica, anti-apoptótica, anti-inflamatória e vasodilatadora [36].

No metabolismo dos lipídeos, a adiponectina é responsável por diminuir o nível de triglicerídeos no fígado, estimular a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético e diminuir a lipogênese no fígado. Já com relação ao metabolismo dos carboidratos, a proteína está envolvida no aumento da sensibilidade insulínica no fígado, diminuição dos níveis plasmáticos de glicose, diminuição da produção da glicose pelo fígado e aumento da expressão da GLUT-4 (transportador de glicose insulino-sensível) no músculo; esta última enzima atua na sensibilização insulínica [24].

A hipoadiponectinemia parece ser um dos marcadores da síndrome metabólica associada à terapia antirretroviral, especialmente nos casos em que ocorre acúmulo central de gordura corporal, nos quais os níveis de adiponectina apresentam-se diminuídos. Este fato vem corroborar a relação da adiponectina com os efeitos adversos da TARV [6, 8, 40]. Uma marcante associação entre a hipoadiponectinemia e as doenças cardiovasculares tem sido documentada em diversos estudos. Por outro lado, altos níveis de adiponectina são associados com a diminuição do risco de doenças cardiovasculares, independentemente de outros fatores de risco [26, 34].

Os níveis de adiponectina costumam ser inversamente relacionados com o acúmulo de tecido adiposo, no entanto, na síndrome lipodistrófica associada ao HIV, níveis baixos de adiponectina são relacionados com diminuição do acúmulo de tecido adiposo, o que sugere que nestes casos a adiponectina não mantém a relação inversa com a redistribuição de gordura corporal [23, 27, 41]. Estes níveis da proteína podem ser alterados por diversos fatores; por exemplo, ingestão de proteína de soja, óleos de peixe e ácido linoléico aumentam os níveis plasmáticos da proteína, tendo efeito antidiabético e cardiovascular protetivo, enquanto que o estresse oxidativo inibe a expressão da proteína, contribuindo para obesidade e síndrome metabólica. Os níveis de adiponectina podem ser influenciados, ainda, por sexo, idade e estilo de vida [34].

Alguns estudos apontam que o impacto da infecção pelo HIV nos adipócitos humanos pode ocorrer através da regulação da adiponectina, na ausência de infecção produtiva nestas células. Na presença do vírus, os adipócitos humanos secretam altos níveis de adiponectina. Embora ainda não seja clara a forma como o HIV influencia a produção e secreção da adiponectina, acredita-se que isto ocorra através da ligação do vírus com receptores responsáveis pela sinalização da produção de adiponectina na membrana nos adipócitos [42].

Baixas concentrações plasmáticas de adiponectina, inferiores a 4,0 $\mu\text{g/ml}$, são consideradas um fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças arteriais coronarianas em homens japoneses. A adiponectina regula negativamente a resposta inflamatória das células endoteliais, contribuindo para a prevenção do desenvolvimento da aterosclerose [25].

Em estudo anterior, realizado com o mesmo grupo de pacientes infectados pelo HIV que será analisado nesta pesquisa, foi encontrada relação positiva entre dois polimorfismos do gene da adiponectina e os níveis desta proteína [41].

1.3.2 Receptores da Adiponectina

Nos humanos, são conhecidos os receptores para adiponectina 1 e 2, codificados, respectivamente, pelos genes *ADIPOR1* e *ADIPOR2*. Estes estão expressos no músculo esquelético, fígado e células β pancreáticas, locais críticos para o metabolismo da glicose e dos lipídeos. No músculo estão mais expressos os receptores *ADIPOR1*, enquanto que no fígado é mais marcante a expressão dos receptores *ADIPOR2*. Eles têm a função biológica de estimular a oxidação de ácidos graxos e inibir a saída de glicose do fígado, esta última, através da inibição da gliconeogênese [30, 33, 36, 43, 44].

Os dois receptores, *ADIPOR1* e *ADIPOR2*, apresentam sete domínios transmembranares e uma topologia de membrana inversa a todos os outros receptores ligantes de proteínas G (GPCRs), com uma terminação amino (NH_2) citoplasmática e uma pequena terminação carboxila (COOH) extracelular com aproximadamente 25 aminoácidos. O alinhamento das sequências protéicas dos dois receptores revela 69 aminoácidos na porção N-terminal de *ADIPOR1*, e 79 aminoácidos na mesma região de *ADIPOR2*. Estas regiões são específicas de cada receptor, no entanto, o restante da cadeia protéica é altamente homóloga, apresentando cerca de 80% de identificação. Estes receptores medeiam a ativação de AMP quinase (AMPK), PPAR α e P38 MAP quinase (P38 proteína quinase ativada por mitógeno) no fígado, músculo esquelético e células

endoteliais, pela adiponectina. Os eventos intracelulares subsequentes à ativação dos dois receptores ainda não são bem compreendidos, no entanto, sabe-se que um adaptador protéico que contém um domínio homólogo, o APPL1, liga-se tanto com *ADIPOR1*, quanto com *ADIPOR2*. Quando a adiponectina estimula seus receptores, o domínio citoplasmático destes se liga ao APPL1, que promove a passagem da proteína quinase LKB1 (serina-treonina kinase hepática B1) do núcleo para o citoplasma celular, promovendo a ativação da AMPK [26, 34, 45].

ADIPOR1 é expresso em todos os tecidos, mas é mais concentrado no músculo esquelético. Este receptor apresenta alta afinidade pela adiponectina globular e baixa afinidade pelas isoformas maiores. Sua ação primária ocorre ao nível da musculatura esquelética. Enquanto isso, o receptor *ADIPOR2*, predominantemente expresso no fígado, apresenta afinidade intermediária com todas as isoformas da adiponectina. Um terceiro receptor de adiponectina também foi descrito, a T-caderina. A expressão deste receptor ocorre exclusivamente nas células endoteliais e células musculares lisas [46].

As propriedades anti-inflamatórias da adiponectina são mediadas pela ativação dos receptores *ADIPOR1* e *ADIPOR2* em monócitos, macrófagos e células endoteliais, atenuando o acúmulo de células inflamatórias em locais de lesão vascular. O efeito ateroprotetivo desta proteína também é dependente da ativação de seus receptores que potencializam a ação do óxido nítrico através da estimulação de AMPK, o que favorece a vasodilatação e inibe a agregação plaquetária, adesão de monócitos e proliferação de células musculares lisas [25]. O gene do *ADIPOR1* é composto por 17kb (quilobases), está localizado no cromossomo 1(q32.1), apresenta oito éxons e codifica 375 aminoácidos, enquanto que o gene do *ADIPOR2* é composto por 97kb, localiza-se no

cromossomo 12(13.33) e codifica 387 aminoácidos [43]. Atualmente, são vários os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) identificados nestes dois genes relacionados à baixa sensibilidade insulínica, obesidade central, aumento do risco de doenças cardiovasculares e aumento dos níveis de triglicerídeos [29, 44].

Sabe-se que a exposição ao HIV estimula os adipócitos a secretarem adiponectina e que os níveis desta proteína são menores nos pacientes HIV positivos que apresentam lipohipertrofia. Também é manifesto que a supressão viral pela terapia antirretroviral remove o estímulo sobre a adiponectina [30, 42].

Experimentos *in vitro*, em que a cultura de miócitos foi tratada com adiponectina, mostraram que a supressão da expressão dos genes de receptores de adiponectina reduziu consideravelmente a oxidação dos ácidos graxos e a captação da glicose, enquanto que a estimulação da expressão de *ADIPOR1* teve exatamente o efeito contrário, aumentando a oxidação dos ácidos graxos e captação de glicose, além de aumentar os efeitos da adiponectina [47]. Polimorfismos em *ADIPOR1* podem afetar o risco de doenças cardiovasculares através de mecanismos independentes da sensibilidade insulínica. A diminuição na expressão de *ADIPOR1* associada com SNPs no 3º bloco haplotípico pode prejudicar diretamente o efeito antiaterogênico da adiponectina [48].

Vários estudos sugerem que variações no gene da adiponectina estão associadas com os níveis circulantes desta proteína, contudo os resultados relacionados ao papel genético dos receptores *ADIPOR1* e *ADIPOR2* permanecem controversos [49].

1.3.2.1 Polimorfismos nos Receptores da Adiponectina

Polimorfismos de única base (SNPs) são trocas de uma única base na sequência de nucleotídeos do DNA. Essas variações ocorrem no genoma humano com uma frequência acima de 1% na população e podem ser responsáveis pelas diferenças individuais nas respostas aos medicamentos. Representam 90% da variação genética no genoma humano, ocorrem geralmente a cada 1000pb e apresentam baixas taxas de mutações (10^{-7}). As transições mais comuns ocorrem entre as bases púricas (G/A) e entre as bases pirimídicas (C/T). A grande maioria é neutra, mas quando causam alterações na sequência de aminoácidos de uma proteína podem ocasionar mudanças em sua estrutura e função [50].

Todos os polimorfismos incluídos neste estudo estão localizados em regiões intrônicas dos genes dos receptores da adiponectina, conforme demonstra a Figura 2.

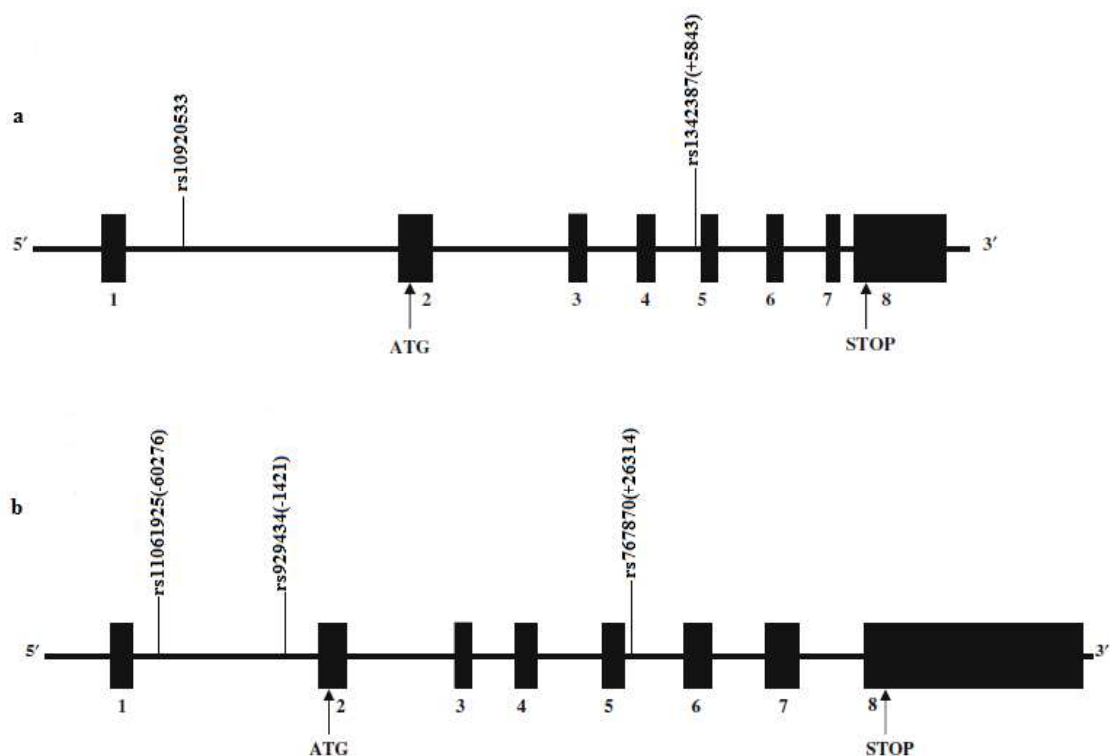


Fig2. Estrutura genômica e localização dos SNPs nos genes *ADIPOR1* (a) e *ADIPOR2* (b). Os éxons são representados pelas caixas e os introns pelas linhas que as conectam. Os números entre parênteses indicam a localização dos SNPs em relação à base A do códon de iniciação ATG, para aqueles SNPs que apresentavam este dado disponível na literatura.

Adaptado de Richardson *et al.*[51].

Os polimorfismos que foram incluídos neste estudo foram selecionados a partir de estudos prévios, nos quais apresentaram alguma associação significativa com parâmetros antropométricos ou bioquímicos relacionados às dislipidemias ou à síndrome metabólica em amostras da população em geral, uma vez que os mesmos genes não haviam sido previamente investigados em pacientes infectados pelo HIV. Também foi utilizada como critério de seleção a localização em diferentes blocos haplotípicos dos genes em questão, através da ferramenta *Haploview*. Por este motivo, sumarizamos nas Tabelas 1 e 2 os relatos encontrados durante o levantamento bibliográfico sobre estes polimorfismos.

Tabela 1. Dados sobre rs1342387 e rs10920533 localizados no gene do *ADIPORI*

rs1342387	População	Posição no gene	Alelo freqüente/alelo raro	MAF (freqüência do alelo raro)	Achado	Alelo de risco	Referência Bibliográfica
502	Europeus com níveis de tolerância à glicose normais ou diminuídos.	5843 – região intrônica 4	A/G	0,44	Associação com glicose de jejum (p 0,05) e HbA _{1c} (p 0,04)	Indivíduos com genótipo GG têm níveis aumentados de HbA _{1c} .	Stefan, Machicao <i>et al.</i> 2005. [28]
439	Mexicanos americanos (323 controles sem diabetes e 116 pacientes com diabetes)	+5843 (ATG) – região intrônica	A/G	0,36 em diabéticos, 0,42 em não diabéticos	Nenhuma associação	GG diminui níveis de triglicérides.	Richardson, Schneider <i>et al.</i> 2006. [51]

522	Finlandeses com níveis de tolerância à glicose diminuídos.	+5842 – região intrônica 4	G/A	0,47	Associação com medidas corporais, como circunferência da cintura e quadril, peso, altura, IMC. (obesidade central)	Genótipo GG associado com indicadores de obesidade central, aumento das medidas corporais.	Siitonen, Pulkkinen <i>et al.</i> 2006. [29]
1498	Caucasianos franceses.	5843 – região intrônica 4	G/A	0,43	Sem associação com diabetes tipo 2		Vaxillaire, Dechaume <i>et al.</i> 2006. [33]
3977	129 pacientes com resistência insulínica severa, 2127 pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 e 1721 controles saudáveis.		A/G	0,44	Sem associação com diabetes tipo 2		Collins, Luan <i>et al.</i> 2007. [49]
1834	Mulheres americanas, 714 com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 e 1120 controles saudáveis.	+5843 – região intrônica 4	G/A	0,31	Associação significativa com risco de diabetes tipo 2, perda da	Alelo A associado aos casos de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2, aumenta o	Qi, Doria <i>et al.</i> 2007. [38]

					associação após ajustes múltiplos.	risco em 28 ^o %. [52]
290	Chineses com diabetes tipo 2 (196 com risco de doença cardiovasculares e 94 sem risco para doenças cardiovasculares)	região intrínica	G/A	Efeito cardioprotetivo	Genótipo AA está associado com diminuição do risco de doenças cardiovasculares.	Gu, Ma <i>et al.</i> 2009.
rs10920533						
451	Indivíduos com síndrome metabólica	região intrínica 1	G/A	0,29	Interação com resistência insulínica somente em indivíduos com síndrome metabólica.	GG aumenta o risco de resistência insulínica. [53] Phillips <i>et al.</i> 2010.

Tabela 2. Dados sobre rs111061925, rs929434 e rs767870 localizados no gene do *ADIPOR2*

n	População	Posição no gene	Alelo frequente/alelo raro	MAF (frequência do alelo raro)	Achado	Alelo de risco	Referência Bibliográfica
rs11061925							
1834	Mulheres americanas, 714 com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 e 1120 controles saudáveis.	-60276 – região intrônica 1	C/T	0,29	Nenhuma associação com diabetes tipo 2		Qi, Doria <i>et al.</i> 2007. [38]
rs929434							
439	Mexicanos americanos (323 controles sem diabetes e 116 pacientes com diabetes)	-1419 (ATG) - região intrônica 1	A/G	0,46 em diabéticos, 0,45 em não diabéticos	↓ significativa de TG (p 0,00016)	Genótipo GG associado a diminuição dos níveis de triglicérides.	Richardson, Schneider <i>et al.</i> 2006. [51]
rs767870							
1834	Mulheres americanas, 714 com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 e 1120 controles saudáveis.	-1421 (ATG)- região intrônica 1	G/A	0,30	Nenhuma associação com diabetes tipo 2		Qi, Doria <i>et al.</i> 2007. [38]
439	Mexicanos americanos (323	+26314	G/A	0,06 em	↓ significativa de	Genótipo AA	Richardson,

	controles sem diabetes e 116 pacientes com diabetes).	(ATG) - região intrônica	A/G	0,16	diabéticos, 0,08 em não diabéticos	TG (p 0,013)	associado com diminuição dos níveis de triglicérides.	Schneider <i>et al.</i> 2006. [51]
1498	Caucasianos franceses.	26314 - região intrônica 6	A/G	0,13	diabéticos	Associação com diabetes tipo 2 (p 0,034)		Vaxillaire, Dechaume <i>et al.</i> 2006. [33]
3977	129 pacientes com resistência insulínica severa, 2127 pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 e 1721 controles saudáveis.		A/G	0,15	diabéticos	Sem associação com diabetes tipo 2		Collins, Luan <i>et al.</i> 2007. [49]
68	Gregos com risco cardiovascular (40 com estenose na angiografia e 28 sem estenose na angiografia).	região intrônica 5	A/G	0,19	diabéticos	Associação com doença cardiovascular	Portadores do alelo A são mais propensos a aterosclerose.	Halvatsiotis, Tsiotra <i>et al.</i> 2010. [44]

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) presentes nos genes dos receptores de adiponectina com a síndrome da lipodistrofia em pessoas vivendo com HIV e AIDS sob terapia antirretroviral.

2.1.1 Objetivos específicos

- comparar as frequências dos polimorfismos estudados entre pacientes HIV positivos com e sem lipodistrofia;
- relacionar a variação dos níveis de adiponectina com a presença de diferentes polimorfismos nos genes dos receptores deste peptídeo;
- analisar a associação entre os polimorfismos estudados e as alterações metabólicas nestes pacientes.

3. Referências Bibliográficas

1. Contran RS, Kumar V, Collins T. Robbins, Patologia Estrutural e Funcional. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
2. Brasileiro Filho G. Bogliolo, Patologia Geral. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.
3. UNAIDS. Global summary of the AIDS epidemic 2011. World Health Organization; 2011 [updated 2011 12/2011; cited]; Available from: http://www.who.int/hiv/data/2012_epi_core_en.png.
4. Boletim Epidemiológico - AIDS - DST [database on the Internet]. Ministério da Saúde. 2011 [cited 28/11/2011]. Available from: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/publicacao/2010/boletim2010_preliminar_pdf_34434.pdf.
5. Xu A, Yin S, Wong L, Chan KW, Lam KS. Adiponectin ameliorates dyslipidemia induced by the human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir in mice. *Endocrinology*. 2004 Feb;145(2):487-94.
6. Tsiodras S, Perelas A, Wanke C, Mantzoros CS. The HIV-1/HAART associated metabolic syndrome - novel adipokines, molecular associations and therapeutic implications. *J Infect*. 2010 Jul;61(2):101-13.
7. Bezante GP, Briatore L, Rollando D, Maggi D, Setti M, Ghio M, *et al*. Hypoadiponectinemia in lipodystrophic HIV individuals: a metabolic marker of subclinical cardiac damage. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009 May;19(4):277-82.
8. Minami R, Yamamoto M, Takahama S, Ando H, Miyamura T, Suematsu E. High molecular weight form of adiponectin in antiretroviral drug-induced dyslipidemia in HIV-infected Japanese individuals based on in vivo and in vitro analyses. *Intern Med*. 2009;48(20):1799-875.

9. Deloumeaux J, Maachi M, Sow-Goerger MT, Lamaury I, Velayoudom FL, Cheret A, *et al.* Adiponectin and leptin in Afro-Caribbean men and women with HIV infection: Association with insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2010 Nov 30.
10. Hammond E, McKinnon E, Nolan D. Human immunodeficiency virus treatment-induced adipose tissue pathology and lipoatrophy: prevalence and metabolic consequences. *Clin Infect Dis.* 2010 Sep 1;51(5):591-9.
11. Mavroudis CA, Majumder B, Loizides S, Christophides T, Johnson M, Rakhit RD. Coronary artery disease and HIV; getting to the HAART of the matter. *Int J Cardiol.* 2012 Oct 2.
12. Wu PY, Hung CC, Liu WC, Hsieh CY, Sun HY, Lu CL, *et al.* Metabolic syndrome among HIV-infected Taiwanese patients in the era of highly active antiretroviral therapy: prevalence and associated factors. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Apr;67(4):1001-9.
13. Veloso S, Escote X, Ceperuelo-Mallafre V, Lopez-Dupla M, Peraire J, Vilades C, *et al.* Leptin and adiponectin, but not IL18, are related with insulin resistance in treated HIV-1-infected patients with lipodystrophy. *Cytokine.* 2012 May;58(2):253-60.
14. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Adultos Vivendo com HIV/AIDS [database on the Internet]. Ministério da Saúde. 2013 [cited 05/03/2013]. Available from: <http://www.aids.gov.br/publicacao/2013/consenso-adulto>.
15. Tozzi V. Pharmacogenetics of antiretrovirals. *Antiviral Res.* 2010 Jan;85(1):190-200.
16. Lagathu C, Kim M, Maachi M, Vigouroux C, Cervera P, Capeau J, *et al.* HIV antiretroviral treatment alters adipokine expression and insulin sensitivity of adipose tissue in vitro and in vivo. *Biochimie.* 2005 Jan;87(1):65-71.

17. Hawkins T. Understanding and managing the adverse effects of antiretroviral therapy. *Antiviral Res.* 2010 Jan;85(1):201-9.
18. Resino S, Micheloud D, Lorente R, Bellon JM, Navarro ML, Munoz-Fernandez MA. Adipokine profiles and lipodystrophy in HIV-infected children during the first 4 years on highly active antiretroviral therapy. *HIV Med.* 2011 Jan;12(1):54-60.
19. Palios J, Kadoglou NP, Lampropoulos S. The pathophysiology of HIV-/HAART-related metabolic syndrome leading to cardiovascular disorders: the emerging role of adipokines. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:103063.
20. Singhania R, Kotler DP. Lipodystrophy in HIV patients: its challenges and management approaches. *HIV AIDS (Auckl).* 2011;3:135-43.
21. Trujillo ME, Scherer PE. Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med.* 2005 Feb;257(2):167-75.
22. Bastard JP, Feve B. The secretory face of the adipose cell: A tribute to two queens, leptin and adiponectin. *Biochimie.* 2012 Oct;94(10):2063-4.
23. Tong Q, Sankale JL, Hadigan CM, Tan G, Rosenberg ES, Kanki PJ, *et al.* Regulation of adiponectin in human immunodeficiency virus-infected patients: relationship to body composition and metabolic indices. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Apr;88(4):1559-64.
24. Carbone F, La Rocca C, Matarese G. Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie.* 2012 Oct;94(10):2082-8.
25. Villarreal-Molina MT, Antuna-Puente B. Adiponectin: Anti-inflammatory and cardioprotective effects. *Biochimie.* 2012 Oct;94(10):2143-9.
26. Hui X, Lam KS, Vanhoutte PM, Xu A. Adiponectin and cardiovascular health: an update. *Br J Pharmacol.* 2012 Feb;165(3):574-90.

27. de Luis DA, Bachiller P, Palacios T, Conde R, Izaola O, de la Fuente B, *et al.* Relationship of fat distribution with adipokines in patients with acquired immunodeficiency virus infection. *J Clin Lab Anal.* 2012 Sep;26(5):336-41.
28. Stefan N, Machicao F, Staiger H, Machann J, Schick F, Tschritter O, *et al.* Polymorphisms in the gene encoding adiponectin receptor 1 are associated with insulin resistance and high liver fat. *Diabetologia.* 2005 Nov;48(11):2282-91.
29. Siitonen N, Pulkkinen L, Mager U, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, *et al.* Association of sequence variations in the gene encoding adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) with body size and insulin levels. The Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetologia.* 2006 Aug;49(8):1795-805.
30. Munoz-Sanz A, Rodriguez-Vidigal FF, Domingo P. Pathogenesis of lipodystrophy and metabolic syndromes associated with HIV infection. *Med Clin (Barc).* 2006 Sep 30;127(12):465-74.
31. Broedl UC, Lehrke M, Fleischer-Briellmaier E, Tietz AB, Nagel JM, Goke B, *et al.* Genetic variants of adiponectin receptor 2 are associated with increased adiponectin levels and decreased triglyceride/VLDL levels in patients with metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol.* 2006;5:11.
32. Liu M, Liu F. Up- and down-regulation of adiponectin expression and multimerization: Mechanisms and therapeutic implication. *Biochimie.* 2012 Oct;94(10):2126-30.
33. Vaxillaire M, Dechaume A, Vasseur-Delannoy V, Lahmidi S, Vatin V, Lepretre F, *et al.* Genetic analysis of ADIPOR1 and ADIPOR2 candidate polymorphisms for type 2 diabetes in the Caucasian population. *Diabetes.* 2006 Mar;55(3):856-61.

34. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1784-92.
35. Breitfeld J, Stumvoll M, Kovacs P. Genetics of adiponectin. *Biochimie*. 2012 Oct;94(10):2157-63.
36. Dadson K, Liu Y, Sweeney G. Adiponectin action: a combination of endocrine and autocrine/paracrine effects. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011;2:62.
37. Groeneveld MP, Huang-Doran I, Semple RK. Adiponectin and leptin in human severe insulin resistance - Diagnostic utility and biological insights. *Biochimie*. 2012 Oct;94(10):2172-9.
38. Qi L, Doria A, Giorgi E, Hu FB. Variations in adiponectin receptor genes and susceptibility to type 2 diabetes in women: a tagging-single nucleotide polymorphism haplotype analysis. *Diabetes*. 2007 Jun;56(6):1586-91.
39. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N. The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. *FEBS Lett*. 2008 Jan 9;582(1):74-80.
40. Kinlaw WB, Marsh B. Adiponectin and HIV-lipodystrophy: taking HAART. *Endocrinology*. 2004 Feb;145(2):484-6.
41. Trinca JR, Sprinz E, Lazzaretti RK, Hutz MH, Kuhmmer R, de Almeida S, *et al.* SNPs in the APM1 gene promoter are associated with adiponectin levels in HIV-infected individuals receiving HAART. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010 Nov 1;55(3):299-305.
42. Sankale JL, Tong Q, Hadigan CM, Tan G, Grinspoon SK, Kanki PJ, *et al.* Regulation of adiponectin in adipocytes upon exposure to HIV-1. *HIV Med*. 2006 May;7(4):268-74.

43. Crimmins NA, Martin LJ. Polymorphisms in adiponectin receptor genes ADIPOR1 and ADIPOR2 and insulin resistance. *Obes Rev.* 2007 Sep;8(5):419-23.
44. Halvatsiotis I, Tsiotra PC, Ikonomidis I, Kollias A, Mitrou P, Maratou E, *et al.* Genetic variation in the adiponectin receptor 2 (ADIPOR2) gene is associated with coronary artery disease and increased ADIPOR2 expression in peripheral monocytes. *Cardiovasc Diabetol.* 2010;9:10.
45. Buechler C, Wanninger J, Neumeier M. Adiponectin receptor binding proteins--recent advances in elucidating adiponectin signalling pathways. *FEBS Lett.* 2010 Oct 22;584(20):4280-6.
46. Tishinsky JM, Robinson LE, Dyck DJ. Insulin-sensitizing properties of adiponectin. *Biochimie.* 2012 Oct;94(10):2131-6.
47. Loos RJ, Ruchat S, Rankinen T, Tremblay A, Perusse L, Bouchard C. Adiponectin and adiponectin receptor gene variants in relation to resting metabolic rate, respiratory quotient, and adiposity-related phenotypes in the Quebec Family Study. *Am J Clin Nutr.* 2007 Jan;85(1):26-34.
48. Soccio T, Zhang YY, Bacci S, Mlynarski W, Placha G, Raggio G, *et al.* Common haplotypes at the adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) locus are associated with increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2006 Oct;55(10):2763-70.
49. Collins SC, Luan J, Thompson AJ, Daly A, Semple RK, O'Rahilly S, *et al.* Adiponectin receptor genes: mutation screening in syndromes of insulin resistance and association studies for type 2 diabetes and metabolic traits in UK populations. *Diabetologia.* 2007 Mar;50(3):555-62.
50. Feolo ML, Sherry ST. NCBI dbSNP Database: Content and Searching. Maryland: Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US).

51. Richardson DK, Schneider J, Fourcaudot MJ, Rodriguez LM, Arya R, Dyer TD, *et al.* Association between variants in the genes for adiponectin and its receptors with insulin resistance syndrome (IRS)-related phenotypes in Mexican Americans. *Diabetologia*. 2006 Oct;49(10):2317-28.
52. Gu N, Ma X, Lin Y, Guo X. Genetic variation in adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) is associated with the risk of coronary artery disease in type 2 diabetes in Chinese population. *Diabetes*. 2009;58.
53. Ferguson JF, Phillips CM, Tierney AC, Perez-Martinez P, Defoort C, Helal O, *et al.* Gene-nutrient interactions in the metabolic syndrome: single nucleotide polymorphisms in ADIPOQ and ADIPOR1 interact with plasma saturated fatty acids to modulate insulin resistance. *Am J Clin Nutr*. 2010 Mar;91(3):794-801.

4. Artigo Científico

Polymorphisms in adiponectin receptor genes are associated with lipodystrophy-related phenotypes in HIV- infected patients using antiretroviral therapy.

Manuscrito em preparação para submissão ao periódico *Pharmacogenetics and Genomics*, fator de impacto: 3,485

Polymorphisms in adiponectin receptor genes are associated with lipodystrophy-related phenotypes in HIV- infected patients using antiretroviral therapy.

Janaína K. Castilhos¹, Eduardo Sprinz², Rosmeri K. Lazzaretti², Regina Kuhmmer²,
Vanessa S. Mattevi¹.

¹Programa de Pós-graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil,

²Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

Correspondence:

Prof. Vanessa Suñé Mattevi, PhD

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Sarmento Leite, 245, sala 309

CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55-51-33038763, Fax: +55-51-33038718

E-mail: vmattevi@ufcspa.edu.br

Abstract

Objectives: Adiponectin is a circulating peptide, secreted by mature adipocytes, which possibly acts as a manager of glucose and lipids metabolism. In HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy (HAART), adiponectin levels have been found to be altered in lipodystrophy in a previous research by our group, being decreased in lipoatrophy when compared to lipohypertrophy. In order to better understand the adiponectin regulation mechanisms and its effects in HIV-lipodystrophy, we studied five single nucleotide polymorphisms (SNPs) in adiponectin receptor genes *ADIPOR1* (rs1342387 and rs10920533) and *ADIPOR2* (rs11061925, rs929434 and rs767870) and their association with adiponectin plasma levels, as well as lipodystrophy subtypes and other parameters linked to glucose and lipids metabolism involved in the lipodystrophic syndrome.

Materials and Methods: Genotypes of 407 HIV-patients on HAART were investigated through real-time polymerase chain reaction. Mean biochemical and anthropometrical parameters were compared between the different genotypes using analysis of variance.

Results: The three *ADIPOR2* gene SNPs investigated (rs11061925, rs929434 and rs767870) were associated with fasting plasma triglyceride concentrations and one of them (rs11061925) with total cholesterol in the whole sample. For this gene, associations were also found between these SNPs and biochemical parameters (triglycerides, total cholesterol, adiponectin and glucose levels) in men. For *ADIPOR1* gene variants we have not found any significant association.

Conclusions: SNPs in *ADIPOR2* gene seem to be involved in the metabolic alterations in HIV-infected patients receiving HAART. The most significant associations found between SNPs of *ADIPOR2* gene and biochemical parameters were restricted to men.

Key Words: adiponectin, adiponectin receptors, *ADIPOR1*, *ADIPOR2*, HAART, HIV, lipodystrophy, metabolic syndrome.

Introduction

Since the 1990s, with the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART), the morbidity and mortality of HIV/AIDS is decreasing. With the survival rate of infected patients increasing, a substantial number of chronic diseases has emerged. Among these disorders, the most common are the metabolic defects related to glucose and lipid metabolism, which can be accompanied by fat redistribution or lipodystrophy. These metabolic abnormalities might be a mechanism sustaining the development of cardiovascular disease. An increase of about 26% in the risk of myocardial infarction has been reported in patients on HAART [1-5].

Lipodystrophy is characterized by a series of body morphological changes that include lipoatrophy, lipohypertrophy or both (mixed lipodystrophy). Lipoatrophy is described as a subcutaneous fat decrease on the extremities, buttocks and face, besides prominent veins due to the loss of subcutaneous fat in the limbs. The lipohypertrophy is characterized by fat accumulation, that is usually observed in the abdomen, trunk, around the neck, in dorsocervical region (“buffalo hump”) or as subcutaneous fat deposits [2, 5, 6].

The pathophysiological mechanisms of the HIV/HAART-associated lipodystrophic syndrome are poorly understood. However, it is known that adipose tissue is implicated in these alterations. Several studies have recognized the adipose tissue as an endocrine organ that produces adipokines. These molecules have been involved in the pathogenesis of the metabolic syndrome and cardiovascular disease [6, 7].

Adiponectin is the adipokine secreted in more abundance by the adipose tissue. Its blood levels are inversely related to fat tissue mass. Therefore, adiponectin decrease is associated with metabolic syndrome, lipodystrophy and, thereby, with the increase of

cardiovascular risk [4, 7]. Adiponectin acts through binding with two 7-transmembrane proteins, its receptors, *ADIPOR1* and *ADIPOR2*. The adiponectin receptor genes are structurally similar, both presenting 8 exons. *ADIPOR1* gene resides on chromosome 1p36.13-q41, while *ADIPOR2* gene is located on chromosome 12p13.31 [8].

Several studies suggest that variations in the adiponectin gene are associated with circulating levels of this protein. However, the results related to the genetic role of the receptors *ADIPOR1* and *ADIPOR2* remain controversial [9]. In a previous study, we found a positive association between two polymorphisms of the adiponectin gene (*APMI*) and blood levels of this protein in HIV-infected patients on HAART [10]. We also observed that adiponectin levels were altered in HIV-associated lipodystrophy, being decreased in lipoatrophy when compared to lipohypertrophy. In the present study, we aimed to investigate the association between genetic variability in the adiponectin receptor genes, *ADIPOR1* and *ADIPOR2*, and lipodystrophy and its related anthropometric and metabolic phenotypes in HIV-infected patients on HAART.

Methods

Patients

Four hundred and seven consecutive patients with HIV infection who gave informed consent to the study and fulfilled inclusion and exclusion criteria were recruited from the outpatient clinic at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil. Inclusion criteria were: HIV infection, HAART treatment for at least 1 year, age greater than 18 years old, viral load below detection level (<50 copies per milliliter). Exclusion criterion: pregnancy. This study has been approved by the Research Ethics Committees of the Institutions involved.

Biochemical and anthropometric parameters

All subjects, after a 12h overnight fasting, provided blood samples and underwent a complete physical examination by trained researchers. Fasting serum glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol are part of patient's routine care. These and others relevant clinical variables, as infection HIV data, HAART type and hypolipemic drug use were obtained from medical records. To get hold of demographics and lifestyle information interviews were performed. In this interview, the patient's ethnicities were phenotypically defined by the interviewer as Afro or Euro-descendants, as discussed in previous works [10, 11]. Waist and hip circumferences, weight, height and skin folds (biceps, triceps, subscapular, axillary, suprailiac, abdominal, calf) were measured by two nutritionists. Body mass index (BMI) was calculated as weight (in kilograms) divided by height (in meters) squared. To determine limb subcutaneous fat (LSF) biceps, triceps and calf folds were grouped. To measure central subcutaneous fat (CSF), subscapular, axillary, suprailiac and abdominal folds were grouped. The sum of LSF and CSF was named total subcutaneous fat (TSF) [12]. A physician performed the fat redistribution diagnosis. Lipoatrophy was recognized as the subcutaneous fat decrease on the extremities, buttock and face, beyond prominent veins due to a loss of subcutaneous limb fat. The lipohypertrophy is characterized by fat accumulation, which is usually observed in the abdomen, trunk, around the neck, in dorsocervical region ("buffalo hump") or as subcutaneous fat deposits. In patients who had both types of fat redistribution, the term mixed lipodystrophy was used to qualify it as such [5]. The Friedewald equation was utilized to estimate low-density lipoprotein (LDL) cholesterol in subjects who had triglycerides under 400 mg/dL. The Human Adiponectin Elisa Kit (Linco Research, St. Charles, MO) was used to obtain serum adiponectin levels.

Genetic analysis

DNA samples were obtained from peripheral leukocytes through a standard salting out technique [13]. The SNPs were genotyped by real-time PCR, using the commercial available kits (Applied Biosystems™) for each SNP, based on TaqMan methodology. Linkage disequilibrium statistics were analyzed with the Haploview software, using HapMap data (HapMap Public Release #28) of Caucasian population, for selection of single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in different haplotype blocks of both *ADIPOR1* and *ADIPOR2* genes. SNPs previously associated with anthropometric measurements or lipid levels were forcedly included in the SNP selection tool. Two polymorphisms in *ADIPOR1* (rs1342387 and rs10920533) and three in *ADIPOR2* (rs11061925, rs929434 and rs767870) were selected.

Statistical analysis

A χ^2 test was used to assess whether the genotypes frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium and to compare the genotype and allele frequencies between patients with and without lipodystrophy. Biochemical (glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol and adiponectin levels) and anthropometric (BMI, waist circumference, LSF, CSF and TSF) parameters were compared among the different genotypes as a result of the *T* test for independent samples and analysis of variance (ANOVA). These biochemical and anthropometric variables were adjusted for covariables that showed significant correlation with them in previous univariate analyses (age, gender, BMI, smoking, regular practice of physical activity, hypolipemic drug use, protease inhibitors use) through multiple regressions. Homogeneity of variances was tested using Levene's test. Kruskal-Wallis test was used instead of

ANOVA when homogeneity of variances was not met. The triglycerides variable that did not show normal distribution was transformed into natural logarithm before statistical tests. Statistical analyses were performed in SPSS version 20.0 for Windows software. Pairwise linkage disequilibrium coefficients (D' and r^2) were estimated and plotted using the Haploview software.

Results

The demographic and clinical characteristics of the patients included in this study are shown in Table 1. About half of these patients were women (45.5%), 58.7% were phenotypically characterized as Euro-descendants and their mean age was 43 years old. Data about other relevant covariables as smoking, regular practice of physical activity, hypolipemic drug and use of protease inhibitors are shown in the same Table. A more detailed characterization of this sample can be found in Trinca *et al.*[10].

Table 2 shows the anthropometric and metabolic features stratified by gender. As we have previously demonstrated [11], the prevalence of lipodystrophy overall was not different between genders. However, when only patients who had lipodystrophy were compared, it can be noticed that lipodystrophy subtypes frequencies showed heterogeneity between genders (Pearson Chi-square, $P=0.001$): the lipodystrophy was more prevalent in lipodystrophic men (50.4%) and the lipohypertrophy was more prevalent in lipodystrophic women (35.5%). It can also be seen in Table 2 that the quantitative anthropometric variables on this study — body mass index, total subcutaneous fat, central subcutaneous fat, and limbs subcutaneous fat — were higher in women. Furthermore, the metabolic parameters evaluated — glucose, lipid, and adiponectin levels — were also significantly different among genders. Men presented higher glucose and triglycerides, while women had higher total cholesterol, HDL and

adiponectin levels. Therefore, the population was also stratified by gender to perform the statistical analyses.

Five SNPs were genotyped, two in *ADIPOR1* (rs1342387 and rs10920533) and three in *ADIPOR2* (rs11061925, rs929434 and rs767870). Genotype and allele frequencies of the SNPs analyzed are shown in Table 3. Genotype frequencies for all SNPs were in agreement with those expected under Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown). Genotype frequencies were compared between ethnicities for all SNPs. The frequencies of SNPs located in the *ADIPOR2* gene were significantly different between Euro and Afro-descendants (data not shown) and were also in Hardy-Weinberg equilibrium in those groups when analyzed separately. For this reason, the ethnicity was included as a covariate in all analyses.

Of the five SNPs examined located in *ADIPOR1* and *ADIPOR2* genes, the three located in *ADIPOR2* exhibited associations with different lipodystrophy-related phenotypes. For the two SNPs genotyped in the *ADIPOR1* gene, no significant associations were observed.

Table 4 presents the association analyses for *ADIPOR2* with lipid profile, glucose and adiponectin levels. When we analyzed the total sample, the three SNPs (rs11061925, rs929434 and rs767870) were significantly associated with triglyceride levels, and one of them was also marginally associated with total cholesterol levels (rs11061925). T/T homozygotes for rs11061925 presented higher triglycerides and cholesterol levels. A/A homozygotes for rs929434 also presented higher triglycerides, the same happening with A/A homozygotes for rs767870. No differences were observed regarding anthropometric phenotypes (BMI, waist circumference, TSF, CSF and LSF) among genotypes (data not shown).

Due to the significant differences regarding metabolic parameters in men and women, the total sample was further stratified by gender for association analyses of *ADIPOR2* gene. When this was accomplished, the associations verified in the whole sample remained statistically significant in men, only, as can be seen in Table 5. T/T homozygotes for rs1106925 still presented higher triglyceride and cholesterol levels, but with lower *P*-values. rs929434 A/A homozygotes presented also higher triglycerides and cholesterol levels, this last association not being found in the whole sample. Homozygotes for both variants presented also lower adiponectin levels, which was not previously seen in the whole sample.

The SNP rs767870 was not associated with triglycerides and cholesterol levels in men but G-allele carriers presented higher glucose levels than homozygotes for the AA genotype (Table 5).

Pearson correlation coefficients were calculated to check whether triglycerides or total cholesterol levels presented correlations with adiponectin levels in the total sample. In this analysis, only triglycerides presented a moderate inverse correlation with adiponectin levels ($r = -0.284$, $P < 0.001$). The same inverse correlation was found when the sample was stratified by sex ($r = -0.314$, $P < 0.001$ in women, and $r = -0.307$, $P < 0.001$ in men).

Poisson regression analyses were used to determine whether any of the SNPs analyzed was a significant predictor of the categorical phenotypes investigated (e.g. lipodistrophy, lipoatrophy and lipohypertrophy). However, neither SNP was shown to be a significant predictor of these phenotypes.

The linkage disequilibrium was calculated for SNPs located in *ADIPOR1* and in *ADIPOR2*. The *D'* and *r*-squared values are presented in Figure 1. The variants

rs11061925 and rs929434 presented the highest r^2 value (0.77), while the other pairs of SNPs presented r^2 values lower than 0.31.

Discussion

Several studies had associated the use of HAART in HIV-infected patients with metabolic disturbances such as lipodystrophy and metabolic syndrome. These alterations are characterized by body fat redistribution, dyslipidemia and insulin resistance. Adiponectin is an important protein involved in the regulation of lipid and glucose metabolism [1, 4, 5]. In a previous study by our group, Trinca *et al.* [10] found a positive association between polymorphisms of the adiponectin gene and blood levels of this protein in HIV-infected patients. Furthermore, they found that patients with lipohypertrophy presented higher adiponectin levels than patients with lipoatrophy or mixed pattern, which is the inverse to what should be expected, given the known inverse relationship between fat mass and adiponectin levels found in non-HIV-infected individuals. The genetic role of adiponectin receptors (*ADIPOR1* and *ADIPOR2*) remains controversial [9] and has been previously evaluated in HIV-lipodystrophy in only one study with one SNP [4]. Hence, we investigated the association between genetic variability in adiponectin receptor genes and lipodystrophy and its related anthropometric and metabolic phenotypes in HIV-infected patients on HAART.

Allele frequencies for the five SNPs observed in this population were similar to those observed in previous studies [14, 15]. For rs1342387, located in intronic region 4 of *ADIPOR1*, literature data are controversial. Where as some authors report associations between this SNP and triglycerides, glucose and central obesity [14, 16, 17], other authors do not show any associations between this SNP and these parameters [9, 18]. In a study regarding rs10920533, located in intronic region 1 of *ADIPOR1*,

Ferguson *et al.* [15] found an association between insulin resistance and the G/G genotype of this polymorphism in individuals with metabolic syndrome. However, in our analysis we have not found any significant associations with anthropometrical and biochemical measurements for these two SNPs.

For the *ADIPOR2* gene, we found significant associations between the three SNPs investigated and biochemical parameters in the analysis of the total sample and when stratified by gender, only in men. To our knowledge, the SNP rs11061925, located in intron 1 of the *ADIPOR2* gene, has not been associated with any biochemical parameter in previous studies. The T/T genotype was associated significantly with higher triglycerides and total cholesterol in total sample. When our sample was stratified by gender, besides these biochemical parameters, a significant association with lower adiponectin levels was verified, only in men. These data are in accordance with the inverse correlation observed among adiponectin levels with triglycerides and total cholesterol levels, as has been shown by other studies [19].

Richardson *et al.* [14] reported an association between the A/A genotype for rs929434, located also in intronic region 1 of *ADIPOR2* gene, and higher triglyceride levels in Mexican Americans from the San Antonio Family Diabetes Study. This association was reproduced in this study for the total sample and males only, and we found also significant associations of this SNP with total cholesterol and adiponectin levels in men. The individuals that presented the AA genotype for this polymorphism showed low levels of adiponectin and higher levels of total cholesterol.

The SNP rs767870, located in intronic region 5 of *ADIPOR2* gene, was significantly associated with triglycerides levels in the total sample. The A/A genotype was associated with triglycerides increase in total sample, contradicting a previous study that showed the inverse association [14]. The association between this

polymorphism and glucose levels in men was in accordance with Vaxillaire *et al.* [18], that showed association between rs767870 and diabetes *mellitus* type 2. The only work, to our knowledge, already performed regarding this variant in HIV-lipodystrophy patients did not find any significant association between this SNP and lipodystrophy or dyslipidemia [4].

Our linkage disequilibrium analysis shows that the SNPs rs11061925 and rs929434, both located in intron 1 of the *ADIPOR2* gene, are more strongly linked to each other ($r^2 = 0.77$) than to rs767870 ($r^2 = 0.08$ to rs11061925 and $r^2 = 0.13$ to rs929434). These data suggest either that one of the two first variants is the true functional mutation responsible for the observed association or that both are in linkage disequilibrium with a nearby causal mutation. The rs767870 variant association seems to be independent from the other two, due to the low linkage disequilibrium with them.

Adiponectin is a hormone produced by mature adipocytes and regulates lipid and glucose metabolism, as well as inflammation [14]. Thus, polymorphisms in the genes that encode adiponectin receptors (*ADIPOR1* and *ADIPOR2*) may play an important role in metabolic disturbances [14, 15]. Both receptors are expressed in most tissues, however *ADIPOR1* is most abundantly expressed in skeletal muscle, while *ADIPOR2* is predominantly expressed in the liver [20, 21]. Adiponectin acts through PPAR- α and γ activation to stimulate fatty acids oxidation and decrease tissue triglyceride content in the liver [19, 22]. It has been shown that low adiponectin levels are correlated with the development of atherosclerosis and cardiovascular diseases in obese patients. In this context, low adiponectin levels have been linked to small dense LDL, as well as to high APOB (apolipoprotein B) and triglyceride levels. In addition, adiponectin protects against cardiovascular diseases acting also on the vascular endothelium by suppressing lipid accumulation in macrophages. Therefore, the associations presented here in may

have an impact on the increase of the risk of cardiovascular diseases in HIV-patients on HAART, and men carriers of the risk genotypes should be the target of follow-up studies to verify this hypothesis.

We and other authors [11, 23] have previously reported the sexual dimorphism regarding the prevalence of lipodystrophy and its metabolic complications. According to a review by Carbonne *et al.* [19], female have significant higher levels of adiponectin in plasma than males, and this sexual dimorphism is due mainly to serum androgens, since it becomes more evident during puberty. The *ADIPOR2* gene effect restricted to men reported here in adds more data of sex-specific gene effects to reinforce the evidence of the importance of the genetic role in this sexual dimorphism.

This study presents some limitations. First, the cross-sectional nature of the study design, which provides associations and not causality. Second, the heterogeneity in antiretroviral regimens, due to the complexity of HAART, because all drugs do not have the same effect on lipid, glucose and adiponectin metabolism, and on lipodystrophy and metabolic syndrome. Lastly, a limited number of SNPs was analyzed.

In conclusion, polymorphisms in the adiponectin receptor gene *ADIPOR2* have been found to be associated with biochemical parameters, such as triglycerides, adiponectin and total cholesterol levels in HIV-infected men on HAART. However, this study has an exploratory design, therefore, more studies are needed to explore the role of the adiponectin-signaling pathway in the etiology of lipodystrophy and metabolic syndrome, this way expanding the applications of pharmacogenomics in the investigation of HAART adverse effects.

The authors do not report conflicts of interest in this work.

Acknowledgements:

R.K.L., E.S., and R.K were responsible for recruitment and clinical evaluation of patients. J. K. C. carried out the experiments and statistical analyses and wrote the article. V.S.M. conceived, designed the experiments and wrote the article. The authors thank Grasiela Agnes and Aline Gasparotto for helping with experiments, and Lidiana Moraes dos Santos for helping with English correction.

This work 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), PRONEX-FAPERGS/CNPq and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

References

1. Bezante GP, Briatore L, Rollando D, Maggi D, Setti M, Ghio M, *et al.* Hypoadiponectinemia in lipodystrophic HIV individuals: a metabolic marker of subclinical cardiac damage. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009 May;19(4):277-82.
2. Barbaro G, Barbarini G. Human immunodeficiency virus & cardiovascular risk. *Indian J Med Res.* 2011 Dec;134(6):898-903.
3. Gutierrez AD, Balasubramanyam A. Dysregulation of glucose metabolism in HIV patients: epidemiology, mechanisms, and management. *Endocrine.* 2012 Feb;41(1):1-10.
4. Veloso S, Escote X, Ceperuelo-Mallafre V, Lopez-Dupla M, Peraire J, Vilades C, *et al.* Leptin and adiponectin, but not IL18, are related with insulin resistance in treated HIV-1-infected patients with lipodystrophy. *Cytokine.* 2012 May;58(2):253-60.
5. Palios J, Kadoglou NP, Lampropoulos S. The pathophysiology of HIV-/HAART-related metabolic syndrome leading to cardiovascular disorders: the emerging role of adipokines. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:103063.
6. Tsiodras S, Perelas A, Wanke C, Mantzoros CS. The HIV-1/HAART associated metabolic syndrome - novel adipokines, molecular associations and therapeutic implications. *J Infect.* 2010 Jul;61(2):101-13.
7. de Luis DA, Bachiller P, Palacios T, Conde R, Izaola O, de la Fuente B, *et al.* Relationship of fat distribution with adipokines in patients with acquired immunodeficiency virus infection. *J Clin Lab Anal.* 2012 Sep;26(5):336-41.
8. Potapov VA, Chistiakov DA, Dubinina A, Shamkhalova MS, Shestakova MV, Nosikov VV. Adiponectin and adiponectin receptor gene variants in relation to type 2 diabetes and insulin resistance-related phenotypes. *Rev Diabet Stud.* 2008 Spring;5(1):28-37.

9. Collins SC, Luan J, Thompson AJ, Daly A, Semple RK, O'Rahilly S, *et al.* Adiponectin receptor genes: mutation screening in syndromes of insulin resistance and association studies for type 2 diabetes and metabolic traits in UK populations. *Diabetologia*. 2007 Mar;50(3):555-62.
10. Trinca JR, Sprinz E, Lazzaretti RK, Hutz MH, Kuhmmer R, de Almeida S, *et al.* SNPs in the APM1 gene promoter are associated with adiponectin levels in HIV-infected individuals receiving HAART. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010 Nov 1;55(3):299-305.
11. Gasparotto AS, Sprinz E, Lazzaretti RK, Kuhmmer R, Silveira JM, Basso RP, *et al.* Genetic polymorphisms in estrogen receptors and sexual dimorphism in fat redistribution in HIV-infected patients on HAART. *AIDS*. 2012 Jan 2;26(1):19-26.
12. Florindo AA, Latorre Mdo R, Santos EC, Borelli A, Rocha Mde S, Segurado AA. Validation of methods for estimating HIV/AIDS patients' body fat. *Rev Saude Publica*. 2004 Oct;38(5):643-9.
13. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991 Oct 11;19(19):5444.
14. Richardson DK, Schneider J, Fourcaudot MJ, Rodriguez LM, Arya R, Dyer TD, *et al.* Association between variants in the genes for adiponectin and its receptors with insulin resistance syndrome (IRS)-related phenotypes in Mexican Americans. *Diabetologia*. 2006 Oct;49(10):2317-28.
15. Ferguson JF, Phillips CM, Tierney AC, Perez-Martinez P, Defoort C, Helal O, *et al.* Gene-nutrient interactions in the metabolic syndrome: single nucleotide polymorphisms in ADIPOQ and ADIPOR1 interact with plasma saturated fatty acids to modulate insulin resistance. *Am J Clin Nutr*. 2010 Mar;91(3):794-801.

16. Stefan N, Machicao F, Staiger H, Machann J, Schick F, Tschritter O, *et al.* Polymorphisms in the gene encoding adiponectin receptor 1 are associated with insulin resistance and high liver fat. *Diabetologia*. 2005 Nov;48(11):2282-91.
17. Siitonen N, Pulkkinen L, Mager U, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, *et al.* Association of sequence variations in the gene encoding adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) with body size and insulin levels. The Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetologia*. 2006 Aug;49(8):1795-805.
18. Vaxillaire M, Dechaume A, Vasseur-Delannoy V, Lahmidi S, Vatin V, Lepretre F, *et al.* Genetic analysis of ADIPOR1 and ADIPOR2 candidate polymorphisms for type 2 diabetes in the Caucasian population. *Diabetes*. 2006 Mar;55(3):856-61.
19. Carbone F, La Rocca C, Matarese G. Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie*. 2012 Oct;94(10):2082-8.
20. Buechler C, Wanninger J, Neumeier M. Adiponectin receptor binding proteins--recent advances in elucidating adiponectin signalling pathways. *FEBS Lett*. 2010 Oct 22;584(20):4280-6.
21. Dadson K, Liu Y, Sweeney G. Adiponectin action: a combination of endocrine and autocrine/paracrine effects. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011;2:62.
22. Villarreal-Molina MT, Antuna-Puente B. Adiponectin: Anti-inflammatory and cardioprotective effects. *Biochimie*. 2012 Oct;94(10):2143-9.
23. Galli M, Veglia F, Angarano G, Santambrogio S, Meneghini E, Gritti F, *et al.* Gender differences in antiretroviral drug-related adipose tissue alterations. Women are at higher risk than men and develop particular lipodystrophy patterns. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003 Sep 1;34(1):58-61.

Table 1 Demographic and clinical characteristics of the study subjects

Characteristics	Mean (SD) or Percentage
Age (years)	43 (9.4)
Women	45.5
Ethnicity	
Euro-descendants	58.7
Afro-descendants	41.3
Physical activity	24.6
Smoking	27.3
HAART duration (months)	69 (42)
Hypolipemic drug use	17.0
Protease inhibitors use	49.4

HAART, highly-active antiretroviral therapy.

Table 2 Anthropometric and metabolic characteristics of the study population according to gender

Clinical Features	Men (222)	Women (185)	<i>P</i>
Lipodystrophy (%)	50.9 (113)	56.2 (104)	0.285 ^a
Lipoatrophy	50.4 (57) ^b	26.0 (27) ^c	
Lipohypertrophy	18.6 (21) ^d	35.5 (37) ^e	0.001 ^f
Mixed lipodystrophy	31.0 (35)	38.5 (40)	
Glucose (mg/dL)	97.1 (20.8)	91.1 (12.3)	<0.001 ^g
Triglycerides (mg/dL)	227.1 (213.4)	153.8 (94.6)	<0.001 ^h
Total Cholesterol(mg/dL)	188.1 (50.1)	197.8 (45.41)	0.043 ^g
HDL Cholesterol(mg/dL)	46.2 (12.7)	56.9 (16.2)	<0.001 ^g
Adiponectin level (µg/mL)	7.5 (5.3)	11.4 (8.8)	<0.001 ^g
BMI (kg/m ²)	24.5 (3.5)	25.6 (5.3)	0.013 ^g
Waist circumference (cm)	88.0 (9.8)	89.5 (12.6)	0.217 ^g
CSF (mm)	64.1 (29.4)	92.6 (35.8)	<0.001 ^g
LSF (mm)	20.1 (8.8)	39.7 (21.6)	<0.001 ^g
TSF (mm)	84.1 (35.6)	132.4 (51.1)	<0.001 ^g

Data presented as mean (SD) or percentage (n). BMI, body mass index, CSF, central subcutaneous fat, LSF, limbs subcutaneous fat, TSF, total subcutaneous fat.

^aPearson chi square.

^bAdjusted residual=+3.70, $p<0.001$.

^cAdjusted residual=-3.70, $p<0.001$.

^dAdjusted residual=-0.283, $p=0.005$.

^eAdjusted residual=+0.283, $p=0.005$.

^fPearson chi square between individuals with lipodystrophy only.

^gStudent's t-test for independent samples.

^hStudent's t-test for independent samples with ln-transformed variable.

Table 3 Genotype and allele frequencies of the *ADIPOR1* and *ADIPOR2* SNPs examined

Polymorphisms	Genotype frequency	Allele frequency	
<i>ADIPOR1</i>			
rs1342387			
GG	104 (25.7%)	G	A
AG	200 (49.4%)	0.50	0.50
AA	101 (24.9%)		
rs10920533			
GG	232 (57.1%)	G	A
AG	142 (34.9%)	0.75	0.25
AA	32 (7.9%)		
<i>ADIPOR2</i>			
rs11061925			
CC	190 (46.7%)	C	T
CT	182 (44.7%)	0.69	0.31
TT	35 (8.6%)		
rs929434			
GG	170 (42.1%)	G	A
AG	195 (48.3%)	0.66	0.34
AA	39 (9.7%)		
rs767870			
AA	228 (56%)	A	G
AG	152 (37.3%)	0.75	0.25
AA	27 (6.6%)		

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

Table 4 Associations between SNPs of *ADIPOR2* and biochemical parameters in HIV-infected individuals

	Triglycerides (mg/dL) ¹			Total Cholesterol (mg/dL) ²			Glucose (mg/dL) ²			Adiponectin (µg/mL) ³						
	N	Mean	SD	P	N	Mean	SD	P	n	Mean	SD	P				
rs11061925																
C/C	190	190.2 ^a	106.6	0.027 [§]	189	189.2	40.6	0.049 [#]	188	96.5	19.4	0.056 [*]	190	9.0	5.9	0.735 [*]
C/T	182	187.5 ^a	156.5		181	191.4	44.6		178	92.5	12.8		181	9.6	7.7	
T/T	35	265.7	337.7		35	215.6	69.2		34	93.2	11.9		35	9.2	6.9	
rs929434																
G/G	170	191.6 ^b	110.2	0.010 [§]	170	189.5	43.1	0.060 [#]	168	96.0	20.0	0.199 [*]	170	9.1	6.2	0.611 [*]
A/G	195	184.6 ^b	148.9		194	191.2	42.5		192	93.0	12.9		194	9.6	7.4	
A/A	39	272.8	325.2		38	213.6	67.2		37	94.1	12.0		39	8.4	7.0	
rs767870																
A/A	228	210.6	199.8	0.043 ⁱ	228	195.6	48.7	0.119 ^α	224	93.1	12.2	0.056 ^α	228	9.3	6.3	0.947 ^α
G-carriers	179	175.4	105.7		177	188.4	41.8		176	96.2	20.2		178	9.2	7.5	

¹Adjusted by age, ethnic group, body mass index (BMI), hypolipemic drug use, protease inhibitors use.²Adjusted by gender, age, ethnic group, BMI, hypolipemic drug use, protease inhibitors use.³Adjusted by gender, ethnic group, BMI, hypolipemic drug use, regular practice of physical activity.[§]One-way analysis of variance performed with ln-transformed variable.[#]Independent samples Kruskal-Wallis test.^{*}One-way analysis of variance.ⁱStudent's t-test for independent samples with ln-transformed variable.^αStudent's t-test for independent samples.^αTukey test, C/C vs. C/T, $p=0.887$; C/C vs. T/T, $p=0.042$ and C/T vs. T/T, $p=0.021$.^αTukey test, A/A vs. A/G, $p=0.007$; A/A vs. G/G, $p=0.032$ and A/G vs. G/G, $p=0.697$.

Table 5 Associations between SNPs of *ADIPOR2* and biochemical parameters in HIV-infected individuals stratified by gender

Men																
	Triglycerides (mg/dL) ¹			Total Cholesterol (mg/dL) ¹			Glucose (mg/dL) ¹			Adiponectin (µg/mL) ²						
	N	Mean	SD	P	N	Mean	SD	P	n	Mean	SD	P				
rs11061925																
C/C	107	215.7 ^a	119.6	0.007 [§]	106	185.7 ^b	42.2	<0.001 [*]	106	99.0	23.5	0.185 [*]	107	7.3 ^{c,d}	5.0	0.047 [*]
C/T	96	214.5 ^a	197.6		96	183.0 ^b	46.1		94	94.0	14.3		95	8.1 ^c	5.2	
T/T	19	361.7	447.5		19	229.6	75.7		19	98.5	12.9		19	5.0 ^d	3.0	
rs929434																
G/G	91	223.7 ^{e,f}	131.7	0.019 [§]	91	186.1 ^g	45.8	0.002 [*]	90	99.2	24.9	0.184 [*]	91	7.3	5.3	0.008 [#]
A/G	110	210.1 ^e	182.4		109	183.8 ^g	42.9		108	94.3	14.1		109	8.0	5.1	
A/A	20	347.2 ^f	440.2		20	225.4	75.7		20	98.9	12.8		20	4.6	2.2	
rs767870																
A/A	136	244.4	240.4	0.157 [†]	136	191.5	52.5	0.222 ^α	135	94.2	12.8	0.028 ^α	136	7.4	5.2	0.987 ^α
G carriers	86	201.2	123.8		85	183.2	42.6		84	101.0	26.2		85	7.4	4.9	
Women																
	Triglycerides (mg/dL) ¹			Total Cholesterol (mg/dL) ¹			Glucose (mg/dL) ¹			Adiponectin (µg/mL) ⁴						
	N	Mean	SD	P	N	Mean	SD	P	n	Mean	SD	P				

Cont. Table5

rs11061925																
C/C	83	158.7	88.1	0.932 [§]	83	193.6	38.7	0.496 [*]	82	93.4	12.2	0.066 [*]	83	11.0	6.8	0.370 [*]
C/T	86	154.6	93.3		85	201.2	42.7		84	90.6	11.1		86	11.4	9.9	
T/T	16	149.7	73.5		16	199.1	55.1		15	86.6	8.9		16	14.3	9.0	
rs929434																
G/G	79	151.6	78.8	0.321 [§]	79	193.8	40.1	0.582 [*]	78	92.2	12.0	0.477 [*]	79	11.3	7.1	0.818 [*]
A/G	85	154.3	92.3		85	200.2	42.0		84	91.4	11.5		85	11.3	9.7	
A/A	19	188.6	112.8		18	201.2	52.8		17	88.5	10.1		19	12.6	9.5	
rs767870																
A/A	92	160.6	98.2	0.583 ⁱ	92	200.5	42.7	0.352 ^α	89	91.9	11.4	0.712 ^α	92	11.5	7.7	0.990 ^α
G carriers	93	151.5	79.2		92	194.7	41.4		92	91.2	11.9		93	11.5	9.4	

¹Adjusted by age, ethnic group, body mass index (BMI), hypolipemic drug use, protease inhibitors use.

²Adjusted by ethnic group, BMI, hypolipemic drug use, regular practice of physical activity.

[§]One-way analysis of variance performed with ln-transformed variable.

^{*}One-way analysis of variance.

[#]Independent samples Kruskal-Wallis test.

ⁱStudent's t-test for independent samples with ln-transformed variable.

^αStudent's t-test for independent samples.

^aTukey test, C/C vs. C/T, $p=0.748$; C/C vs. T/T, $p=0.016$ and C/T vs. T/T, $p=0.005$.

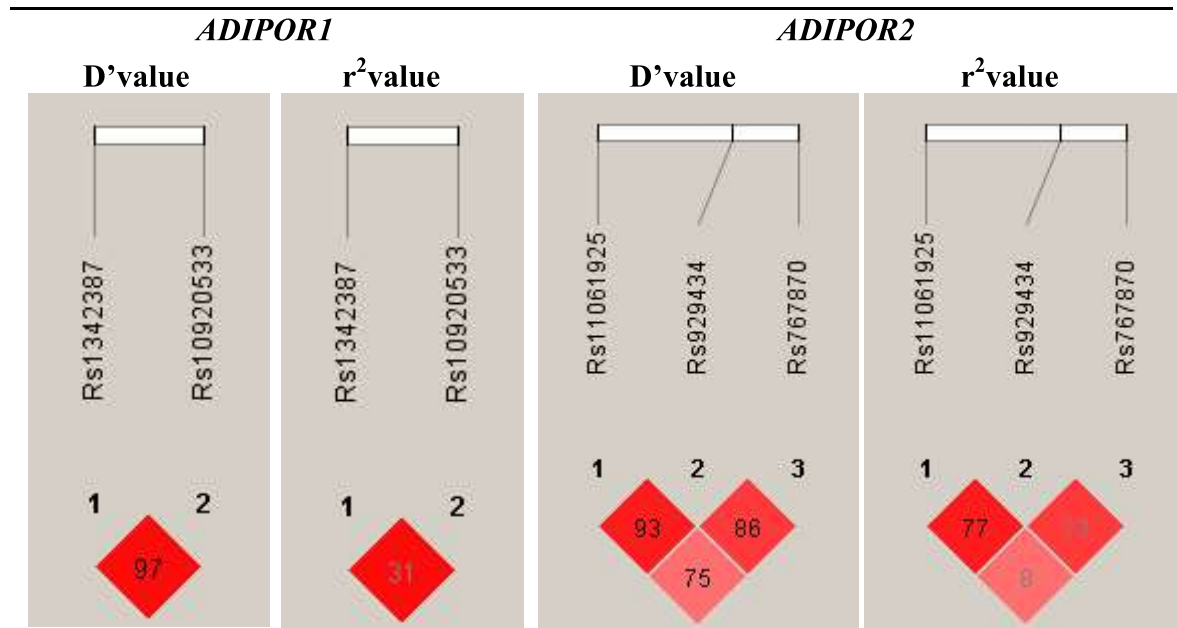
^bTukey test, C/C vs. C/T, $p=0.916$; C/C vs. T/T, $p=0.001$ and C/T vs. T/T, $p<0.001$.

^{c,d}Tukey test, C/C vs. C/T, $p=0.547$; C/C vs. T/T, $p=0.142$ and C/T vs. T/T, $p=0.038$.

^{e,f}Tukey test, A/A vs. A/G, $p=0.015$; A/A vs. G/G, $p=0.098$ and A/G vs. G/G, $p=0.459$.

[§]Tukey test, A/A vs. A/G, $p=0.001$; A/A vs. G/G, $p=0.003$ and A/G vs. G/G, $p=0.936$.

Figure 1. Linkage disequilibrium values between SNPs located in *ADIPOR1* and *ADIPOR2*.



5. Considerações Finais

Vários estudos vêm associando o uso da terapia antirretroviral em pacientes infectados pelo HIV com distúrbios metabólicos, principalmente com a lipodistrofia e a síndrome metabólica. A adiponectina é uma proteína, secretada por adipócitos maduros, responsável pela regulação do metabolismo dos lipídeos e carboidratos. Em um estudo anterior, nosso grupo de pesquisa encontrou uma associação positiva entre polimorfismos do gene da adiponectina com os níveis plasmáticos desta proteína em pacientes infectados pelo HIV. Além disso, verificamos uma relação inversa à esperada, demonstrada na literatura para indivíduos não infectados pelo HIV, entre os padrões de lipodistrofia e os níveis plasmáticos de adiponectina destes pacientes. Estes pacientes apresentaram níveis de adiponectina mais altos quando apresentavam também lipohipertrofia do que aqueles que apresentavam lipoatrofia ou padrão misto de redistribuição de gordura corporal. A fim de compreender melhor estes achados buscamos estudar o papel dos receptores da adiponectina (*ADIPOR1* e *ADIPOR2*), investigando a variabilidade genética nos genes destes receptores e sua relação com a lipodistrofia, síndrome metabólica e seus fenótipos relacionados, tais como parâmetros antropométricos e bioquímicos, no mesmo grupo de pacientes infectados pelo HIV em uso de TARV dos achados citados acima.

Com relação aos polimorfismos estudados localizados no gene do *ADIPOR1*, rs1342387 e rs10920533, não encontramos nenhuma associação significativa entre estas variáveis genéticas e as variáveis antropométricas e bioquímicas envolvidas nos distúrbios metabólicos.

Enquanto isso, com relação aos polimorfismos estudados do gene *ADIPOR2*, rs11061925, rs929434 e rs767870, encontramos uma associação positiva destes SNPs

com variáveis bioquímicas, quando analisamos a amostra total, e somente nos homens quando estratificamos a amostra por gênero. Estas associações apontam que os indivíduos portadores dos genótipos A/A do SNP rs929434 e os portadores do genótipo T/T do SNP rs11061925 apresentam níveis de colesterol e triglicerídeos mais elevados e níveis plasmáticos de adiponectina mais baixos, o que poderia ser um indicativo de que portadores destes genótipos poderiam ter maior risco de desenvolver dislipidemias e, conseqüentemente, doenças cardiovasculares. É demonstrado que pacientes infectados pelo HIV em terapia antirretroviral apresentam risco aumentado em 26% de desenvolverem doenças cardiovasculares. Além disso, os homens portadores do genótipo AA do rs767870 apresentaram níveis mais elevados de triglicerídeos e de glicose, o que indica uma associação deste genótipo com as dislipidemias e com o diabetes *mellitus* tipo 2. Por este motivo, a identificação e acompanhamento dos indivíduos portadores dos genótipos acima descritos poderia culminar na diminuição do desenvolvimento de comorbidades associadas à terapia antirretroviral, como as doenças cardiovasculares e o diabetes *mellitus* tipo 2, e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Por fim, os polimorfismos em genes dos receptores da adiponectina, *ADIPOR2*, foram associados com os parâmetros bioquímicos, como triglicerídeos, adiponectina e os níveis de colesterol total em pacientes infectados pelo HIV em uso de TARV. No entanto, este estudo tem um desenho transversal, o que impede que seja feita uma relação de causalidade.

Além de continuar a investigação em torno dos genes da adiponectina e dos seus receptores (*ADIPOR1* e *ADIPOR2*), vislumbramos estudos voltados para as proteínas adaptadores APPL1 e APPL2, as quais estão envolvidas no processo de sinalização da via da adiponectina e que já foram associados, por Deepa *et al.* e por Jiang *et al.*[61,

62], com diabetes *mellitus* tipo 2, obesidade, resistência insulínica, doenças cardiovasculares e hipertensão. Por conseguinte, são necessários mais estudos para investigar o papel da via de sinalização de adiponectina na etiologia da lipodistrofia, da síndrome metabólica, das doenças cardiovasculares e do diabetes *mellitus* tipo 2, expandindo assim as aplicações da farmacogenômica no estudo dos efeitos adversos da TARV.

6. Anexos

6.1 Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da UFCSPA



COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
UFCSPA

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA, registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o nº 075/05 em 23/07/04, analisou o Projeto:

Projeto: 11-787

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

VANESSA BUÑE MATTEVI

ROSMERI KUHMMER LAZZARETTI

REGINA KUHMMER

EDUARDO SPRINZ

JANAINA KEHL DE CASTILHOS

Título: ANÁLISE DE POLIMORFISMO EM GENES DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA ADIPONECTINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM EFEITOS ADVERSOS DA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL EM PESSOAS VIVENDO COM HIV E AIDS.

Esse projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos conforme as Resoluções 196/09 e demais Resoluções complementares. Toda e qualquer alteração do projeto, assim como eventos adversos graves, deverão ser comunicados a este CEP. Os TCLE, quando necessários, somente poderão ser utilizados após prévia e explícita aprovação (carimbo) de sua redação por este CEP.

Porto Alegre, 24 de maio de 2011

[Assinatura]
José Geraldo Varnel Taborda
Coordenador do CEP/UFCSPA

6.2 Anexo 2 – Normas da Revista Científica

Pharmacogenetics and Genomics

Online Submission and Review System

Author Resources

[Copyright Transfer \(PDF\)](#)

[Patient Consent Form \(PDF\)](#)

[Reprint Ordering](#)

[Permissions Requests](#)

Guidance for Authors on the Preparation and Submission of Manuscripts to Pharmacogenetics and Genomics

Note: These instructions comply with those formulated by the International Committee of Medical Journal Editors. For further details, authors should consult the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" at www.icmje.org.

The Journal is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) which aims to define best practice in the ethics of scientific publishing (www.publicationethics.org).

Editorial policy

The recipient editor will read each manuscript to determine whether it is appropriate for external peer review. Those deemed suitable will undergo external review; others will be rapidly returned to the corresponding author. Authors need not suggest referees, but the editors will respect the wishes of the corresponding author that the manuscript not be sent to a particular competing laboratory for review. Manuscripts will be judged solely on the basis of their content of original data and on the conclusions drawn from them. Manuscripts that report screening of mutant/variant allelic frequencies in an isolated population will no longer be considered for publication in Pharmacogenetics and Genomics, unless the mutant/variant is analysed with respect to an association with a particular disease or, in the special case, where comparisons of different populations add new insight into important clinical issues. In case-control studies, it is imperative that the allele(s) being analysed is (are) associated with a functional difference in expression of the gene product and that the gene product can be mechanistically linked to the disease being investigated. For example, is the disease mediated by chemicals or drugs that are metabolised by the gene product?

Points to consider before submission

Please think carefully about the following points and make the appropriate declarations.

Redundant or duplicate publication

We ask you to confirm that your paper has not been published in its current form or a substantially similar form (in print or electronically, including on a web site), that it has not been accepted for publication elsewhere, and that it is not under consideration by another publication. The International Committee of Medical Journal Editors has provided details of what is and what is not duplicate or redundant publication (www.icmje.org). If you are in doubt (particularly in the case of material that you have posted on a web site), we ask you to proceed with your submission but to include a copy of the relevant previously published work or work under consideration by other journals. In your covering letter to the editors, draw attention to any published work that concerns the same patients or subjects as the present paper.

Conflicts of interest

Authors must state all possible conflicts of interest in the manuscript, including financial, consultant, institutional and other relationships that might lead to bias or a conflict of interest. If there is no conflict of interest, this should also be explicitly stated as none declared. All sources of funding should be acknowledged in the manuscript. All relevant conflicts of interest and sources of funding should be included on the title page of the manuscript with the heading "Conflicts of Interest and Source of Funding:". For example:

Conflicts of Interest and Source of Funding: A has received honoraria from Company Z. B is currently receiving a grant (#12345) from Organization Y, and is on the speaker's bureau for Organization X – the CME organizers for Company A. For the remaining authors none were declared.

In addition, each author must complete and submit the journal's copyright transfer agreement, which includes a section on the disclosure of potential conflicts of interest based on the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors, "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (www.icmje.org/update.html). The form is readily available on the manuscript submission page www.editorialmanager.com/pgen and can be completed and submitted electronically. Please note that authors may sign the copyright transfer agreement form electronically. For additional information about electronically signing this form, go to <http://links.lww.com/ZUAT/A106>.

Permissions to reproduce previously published material

We ask you to send us copies of permission to reproduce material (such as illustrations) from the copyright holder. We cannot send your paper to press without these permissions.

Patient consent forms

The protection of a patient's right to privacy is essential. We ask you to send copies of patient consent forms on which patients or other subjects of your experiments clearly grant permission for the publication of photographs or other material that might identify them. If the consent form for your research did not specifically include this, please obtain it or remove the identifying material. A sample patient consent form is available from the Journal's website if required.

Ethics committee approval

You must state clearly in your submission in the Methods section that you conducted studies on human participants must with the approval of an appropriate named ethics committee. Please also look at the latest version of the Declaration of Helsinki. Similarly, you must confirm that experiments involving animals adhered to ethical standards and must state the care of animal and licensing guidelines under which the study was performed.

Authorship

We ask that all authors sign the submission letter. First, we have (rarely) had problems when someone named as an author was not aware of the submission of a paper and, on occasion, did not support the findings published. All authors must acknowledge that they have read and approved the paper, they have met the criteria for authorship as established by the International Committee of Medical Journal Editors, that they believe that the paper represents honest work, and that they are able to verify the validity of the results reported. We also ask that one person is named and agreed upon as the corresponding author who will act as the sole contact between the editors and publishers. Changes to submitted papers will only be accepted through the corresponding author, unless he/she submits in writing the authorization of an alternative contact. In addition to those from the ICJME the International Society for Medical Publication Professionals, ISMPP (www.ismpp.org) have produced some useful guidelines on authorship of studies sponsored by companies: Good Publication Practice (GPP2) (www.ismpp.org).

Compliance with NIH and Other Research Funding Agency Accessibility Requirements

A number of research funding agencies now require or request authors to submit the post-print (the article after peer review and acceptance but not the final published article) to a repository that is accessible online by all without charge. As a service to our authors, LWW will identify to the National Library of Medicine (NLM) articles that require deposit and will transmit the post-print of an article based on research funded in whole or in part by the National Institutes of

Health, Wellcome Trust, Howard Hughes Medical Institute, or other funding agencies to PubMed Central. The Copyright Transfer Agreement provides the mechanism.

Copyright assignment

Papers are accepted for publication on the understanding that exclusive copyright in the paper is assigned to the Publisher. Authors are asked to submit a signed copyright assignment with their paper. They may use material from their paper in other works published by them after seeking formal permission.

Submissions

Original articles, review and mini-review articles of 5000 words or less, editorials, invited commentaries on previously published material, opinion pieces, together with rapid and short communications and scientific correspondence will all be included in Pharmacogenetics and Genomics.

A mini-review should provide a critical but balanced view of the field. It should direct the reader to not more than 40 key papers in the field. Personal communications and submitted manuscripts should not be cited. Mini-reviews are generally by invitation but proposals for mini-reviews may also be submitted to either Editor. Material submitted or considered by the editors for rapid communication will be particularly time sensitive information and on acceptance will be accelerated through the publication process.

Succinct Opinion pieces on any current topic will be considered. These may range from specific recommendations regarding individual drugs or genes, or general topics such as study design, implementation of pharmacogenomic testing, or public policy issues. Submitted manuscripts should have no more than 1,200 words of text and 10 references (no abstract).

Authors are strongly encouraged to submit their manuscripts through the web-based tracking system at <http://pgen.editorialmanager.com>. The site contains instructions and advice on how to use the system. Authors should NOT in addition then post a hard copy submission to the editorial office, unless you are supplying artwork, letters or files that cannot be submitted electronically, or have been instructed to do so by the editorial office. For those authors who have no option but to submit by mail please send one copy of the article, plus an electronic version on disk or CD-ROM to one of the following editors: (a) Mark J. Ratain, M.D., The University of Chicago, 5841 S. Maryland Ave., MC 2115, Chicago, IL 60637, USA. Tel: +1 773 702 4400; Fax: +1 773 702 2689; Email: mratain@medicine.bsd.uchicago.edu (b) Matthias Schwab, Prof. Dr. med., Dr Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie, Auerbachstr. 112, 70376 Stuttgart, Germany. Tel: +49 711 8101 3700; fax: +49 711 859 295; e-mail: matthias.schwab@ikp-stuttgart.de.

Double spacing should be used throughout the manuscript, which should include the following sections, each starting on a separate page: Title Page, abstract and keywords, text, acknowledgements, references, individual tables and captions. Margins should be not less than 3 cm. Pages should be numbered consecutively, beginning with the Title Page, and the page number should be placed in the top right hand corner of each page. Abbreviations should be defined on their first appearance in the text; those not accepted by international bodies should be avoided. Submit the required number of paper copies and keep copies of everything submitted.

Presentation of Papers

Title Page

The Title Page should carry the full title of the paper and a short title, of no more than 45 characters and spaces, to be used as a 'running head' (and which should be so identified). The first name, middle initial and last name of each author should appear. If the work is to be

attributed to a department or institution, its full name should be included. Any disclaimers should appear on the Title Page, as should the name and address of the author responsible for correspondence concerning the manuscript and the name and address of the author to whom requests for reprints should be made. Finally, the Title Page should include a statement of conflicts of interest and source of funding, and when none state "none declared".

Abstracts

The second page should carry a structured abstract of no more than 250 words. The abstract should state the Objective(s) of the study or investigation, basic Methods (selection of study subjects or laboratory animals; observational and analytical methods), main Results (giving specific data and their statistical significance, if possible), and the principal Conclusions. It should emphasise new and important aspects of the study or observations. Short communications should include an unstructured summary of no more than 150 words. Opinion pieces do not have an abstract.

Key Words

The abstract should be followed by a list of 3 - 10 keywords or short phrases which will assist the cross-indexing of the article and which may be published. When possible, the terms used should be from the Medical Subject Headings list of the National Library of Medicine (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

Text

Full papers of an experimental or observational nature may be divided into sections headed Introduction, Methods (including ethical and statistical information), Results and Discussion (including a conclusion), although invited commentaries and reviews may require a different format. Opinion pieces should have no more than 1,200 words of text and 10 references (no abstract). Rapid Communications should comprise up to 1500 words, up to 15 references, and up to 2 inserts (2 figures, or 2 tables, or 1 figure and table). Short Communications should comprise a single item of text of no more than 1500 words, up to 2 inserts (2 figures, or 2 tables or 1 figure and table), and contain up to 10 references. Correspondence should be no more than 800 words, one insert (table or figure), and 10 references.

Acknowledgements

Acknowledgements should be made only to those who have made a substantial contribution to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from people acknowledged by name in case readers infer their endorsement of data and conclusions.

References

References should be numbered consecutively in the order in which they first appear in the text. They should be assigned Arabic numerals, which should be given in brackets, e.g. [17]. References should include the names of all authors when six or fewer; when seven or more, list only the first six names and add et al. References should also include full title and source information. Journal names should be abbreviated as in MEDLINE (NLM Catalog, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>).

Articles in journals

Romerius P, Giwercman A, Moëll C, Relander T, Cavallin-Ståhl E, Wiebe T, *et al.* Estrogen receptor α single nucleotide polymorphism modifies the risk of azoospermia in childhood cancer survivors. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;**21**:263-269.

Books

DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (2005). *Cancer, principles & practice of oncology*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Personal communications and unpublished work should not feature in the reference list but should appear in parentheses in the text. Unpublished work accepted for publication but not

yet released should be included in the reference list with the words 'in press' in parentheses beside the name of the journal concerned. References must be verified by the author(s) against the original documents.

Tables

Each table should be typed on a separate page in double spacing. Tables should not be submitted as photographs. Each table should be assigned an Arabic numeral, e.g. (Table 3) and a brief title. Vertical rules should not be used. Place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Explain in footnotes all non-standard abbreviations that are used in each table. Identify statistical measures of variations, such as standard deviation and standard error of the mean.

Be sure that each table is cited in the text. If you use data from another published or unpublished source, obtain permission and acknowledge the source fully.

Illustrations

A) Creating Digital Artwork

1. Learn about the publication requirements for Digital Artwork: <http://links.lww.com/ES/A42>
2. Create, Scan and Save your artwork and compare your final figure to the Digital Artwork Guideline Checklist (below).
3. Upload each figure to Editorial Manager in conjunction with your manuscript text and tables.

B) Digital Artwork Guideline Checklist

Here are the basics to have in place before submitting your digital artwork:

- Artwork should be saved as TIFF, EPS, or MS Office (DOC, PPT, XLS) files. High resolution PDF files are also acceptable.
- Crop out any white or black space surrounding the image.
- Diagrams, drawings, graphs, and other line art must be vector or saved at a resolution of at least 1200 dpi. If created in an MS Office program, send the native (DOC, PPT, XLS) file.
- Photographs, radiographs and other halftone images must be saved at a resolution of at least 300 dpi.
- Photographs and radiographs with text must be saved as postscript or at a resolution of at least 600 dpi.
- Each figure must be saved and submitted as a separate file. Figures should not be embedded in the manuscript text file.

Remember:

- References to figures and tables should be made in order of appearance in the text and should be in Arabic numerals in parentheses, e.g. (Fig. 2).
- Number figures in the figure legend in the order in which they are discussed.
- Upload figures consecutively to the Editorial Manager web site and enter figure numbers consecutively in the Description field when uploading the files.
- If hard copies are submitted they should have a label pasted to the back bearing the figure number, the title of the paper, the author's name and a mark indicating the top of the figure.
- Illustrations should be presented to a width of 82 mm or, when the illustration demands it, to a width of 166 mm.
- Photomicrographs must have internal scale markers.
- If photographs of people are used, their identities must be obscured or the picture must be accompanied by written consent to use the photograph.
- If a figure has been published before, the original source must be acknowledged and written permission from the copyright holder for both print and electronic formats should be

submitted with the material. Permission is required regardless of authorship or publisher, except for documents in the public domain.

- Figures may be reduced, cropped or deleted at the discretion of the editor.
- Colour illustrations are acceptable but authors will be expected to cover the extra reproduction costs (for current charges, contact the publisher).

Legends for illustrations

Captions should be typed in double spacing, beginning on a separate page. Each one should have an Arabic numeral corresponding to the illustration to which it refers. Internal scales should be explained and staining methods for photomicrographs should be identified.

Units of measurement

Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units (metre, kilogram, or litre) or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius. Blood pressures should be given in millimetres of mercury.

All haematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Editors may request that alternative or non-SI units be added by the authors before publication.

Abbreviations and symbols

Use only standard abbreviations. Avoid abbreviations in the title and abstract. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.

Nomenclature

Authors are asked to confirm in their covering letter of submission, that their manuscript complies with the nomenclature guidelines developed by the HUGO nomenclature committee for human genes. The guidelines can be found at the following sites:

Human genes

Use genetic notation and symbols approved by the HUGO Nomenclature Committee. Before submission, approved gene symbols should be obtained from the HUGO Nomenclature Committee (www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature). Useful reference articles and forms: White et al. (1997), 'Guidelines for Human Gene Nomenclature', *Genomics*, 45, 468-471]; to submit new gene names, the Gene Name Proposal form may be completed on the nomenclature web page: (www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature).

Human genetic variation

Designation of single nucleotide polymorphisms (SNPs), deletions, insertions and other gene mutations should follow the guidelines given in *Hum Genet* 2001; 109:121-124. The nomenclatures for allelic variations of human P450s should adhere to the recommendations given at <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/> those of N-acetyl transferases at <http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html> and those of UDP glycosyltransferases in *Pharmacogenetics* 1997; 7:255-269.

Human cytogenetics

Use ISCN nomenclature for cytogenetics notation [Mitelman, F. (ed.) ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, S. Karger, Basel]. Human gene names and loci should be written in uppercase italics and Arabic numerals. Protein products are not italicised.

Mouse strain and genetic nomenclature

International Committee on Standardised Genetic Nomenclature for Mice (<http://www.informatics.jax.org/>) new symbols and names for genes should be obtained before submission (<http://www.informatics.jax.org/>).

Offprints

Offprints may be purchased using the appropriate form that will be made available with proofs. Orders should be sent when the proofs are returned; orders received after this time cannot be fulfilled.

Supplemental Digital Content

Supplemental Digital Content (SDC): Authors may submit SDC via Editorial Manager to LWW journals that enhance their article's text to be considered for online posting. SDC may include standard media such as text documents, graphs, audio, video, etc. On the Attach Files page of the submission process, please select Supplemental Audio, Video, or Data for your uploaded file as the Submission Item. If an article with SDC is accepted, our production staff will create a URL with the SDC file. The URL will be placed in the call out within the article. SDC files are not copy-edited by LWW staff, they will be presented digitally as submitted. For a list of all available file types and detailed instructions, please visit <http://links.lww.com/A142>.

SDC Call-outs

Supplemental Digital Content must be cited consecutively in the text of the submitted manuscript. Citations should include the type of material submitted (Audio, Figure, Table, etc.), be clearly labeled as "Supplemental Digital Content," include the sequential list number, and provide a description of the supplemental content. All descriptive text should be included in the call-out as it will not appear elsewhere in the article.

Example:

We performed many tests on the degrees of flexibility in the elbow (see Video, Supplemental Digital Content 1, which demonstrates elbow flexibility) and found our results inconclusive.

List of Supplemental Digital Content

A listing of Supplemental Digital Content must be submitted at the end of the manuscript file. Include the SDC number and file type of the Supplemental Digital Content. This text will be removed by our production staff and not be published.

Example:

Supplemental Digital Content 1. wmv

SDC File Requirements

All acceptable file types are permissible up to 10 MBs. For audio or video files greater than 10 MBs, authors should first query the journal office for approval. For a list of all available file types and detailed instructions, please visit <http://links.lww.com/A142>.