

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Carmela Farias da Silva Tagliari

**INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES EM
GENES ENVOLVIDOS NO
METABOLISMO DO TECIDO ADIPOSEO
COM O DESENVOLVIMENTO DE
LIPODISTROFIA E AVALIAÇÃO DA
TÉCNICA DBS NO MONITORAMENTO
TERAPÊUTICO DE FÁRMACOS EM
PESSOAS VIVENDO COM HIV EM
TERAPIA ANTIRRETROVIRAL**

Porto Alegre

2019

Carmela Farias da Silva Tagliari

Investigação de variantes em genes envolvidos no metabolismo do tecido adiposo com o desenvolvimento de lipodistrofia e avaliação da técnica DBS no monitoramento terapêutico de fármacos em pessoas vivendo com HIV em terapia antirretroviral

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Prof^a. Dra. Vanessa Suñé Mattevi
Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Linden

Porto Alegre

2019

Catálogo na Publicação

Tagliari, Carmela Farias da Silva

Investigação de variantes em genes envolvidos no metabolismo do tecido adiposo com o desenvolvimento de lipodistrofia e avaliação da técnica DBS no monitoramento terapêutico de fármacos em pessoas vivendo com HIV em terapia antirretroviral / Carmela Farias da Silva Tagliari. -- 2019.

243 p. : tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2019.

Orientador(a): Vanessa Suñé Mattevi ; coorientador(a): Rafael Linden.

1. Terapia antirretroviral. 2. Monitoramento terapêutico de fármacos. 3. Genética. 4. Lipodistrofia. 5. HIV. I. Título.

INSTITUIÇÃO (ÕES) E FONTE (S) FINANCIADORA (S)

Instituições:

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Laboratório de Biologia Molecular

Universidade Feevale

Laboratório de Toxicologia Analítica

Hospital de Clínica de Porto Alegre (HCPA)

Serviço de Medicina Interna e Doenças Infecciosas

Fontes Financiadoras:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES):
concessão bolsa de Doutorado.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) –
edital PPSUS 2013.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - edital
Universal 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos portadores do vírus HIV.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me orientar no caminho do bem, fazer o bem e querer o bem.

À minha família, por me mostrar que educação se aprende em casa e que o conhecimento deve ser construído e maturado sob os pilares da humildade.

Ao meu marido, Maurício Tagliari, pelas alegações positivas diante dos desafios de um doutorado.

À Vanessa Suñé Mattevi por ter me aceitado de volta e, principalmente, pelo seu papel fundamental como “mãe científica”, auxiliando-me a costurar meus retalhos de conhecimento em uma colcha sólida e fundamentada.

Às “caçadoras” do meu coração: Alice, Vivian, Patrícia, Greice, Cáren e Érica. Meus braços e minhas pernas. Fundamentais para este trabalho e para minha vida.

As amigas Grasi, Lila, Marília, Tati e Magda por proporcionar um relacionamento efetivo, não uma mera conexão supérflua. Igualmente, minha gratidão pelo aconchego durante os desabafos científicos.

Ao Dr. Eduardo Sprinz, Dr. Diego e os residentes do Serviço de Infectologia do HCPA, pela paciência diante das minhas dúvidas intermináveis.

À secretária Amélia, do Serviço de Infectologia do HCPA, muito solícita ao recrutamento dos pacientes.

Ao Dr. Rafael Linden e a Natália, principalmente, do laboratório de Toxicologia da Feevale, que superando a fronteira da distância e as quase 14h de fuso horário, me auxiliou na escrita de um dos *papers*.

À Júlia Poeta, pela primeira orientação nos corredores do HCPA.

À Dra. Rosmeri Kuhmmer Lazzaretti e Dra. Aline Kirjner Poziomyck pelo acolhimento, solicitude e amabilidade.

Aos participantes desta pesquisa, que me fizeram enxergar a vida além de um tubo *vacutainer* EDTA.

Ao meu anjo da guarda por me proteger aonde quer que eu vá.

E as demais pessoas que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

Obrigada.

*... “o DNA não tem um significado
fixo ou deliberado. Por esta razão,
é preciso interpretá-lo com cautela,
menos como prosa, mais como
murmúrios solenes e complicados
de um oráculo.”*

(Sam Kean, *O Polegar do Violonista*)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	9
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	14
RESUMO	16
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	17
1.1. A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) e o vírus HIV	17
2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	21
3 O VÍRUS HIV-1	25
3.1. A partícula viral	25
3.2. Organização genômica do HIV-1	25
3.3. O ciclo de vida do HIV-1	27
3.4. Curso clínico da infecção pelo HIV-1	29
3.5. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV-1	31
4 TERAPIA ANTIRRETROVIRAL (TARV)	34
4.1. Efeitos adversos da TARV	38
5 GENES CANDIDATOS	50
5.1. Fator de Necrose Tumoral (<i>TNF</i>)	51
5.2. Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR)	53
5.3. Proteína de ligação ao elemento regulatório de esteróis (SREBP)	54
5.4. Gene associado a obesidade e massa gorda (<i>FTO</i>)	56
5.5. Sirtuína 1 (<i>SIRT1</i>)	59
6 MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DE FÁRMACOS (MTF)	66
6.1. Mancha de sangue seco em papel (DBS)	68
7 JUSTIFICATIVA	72
8 OBJETIVOS	73
8.1. Objetivo geral	73
8.2. Objetivos específicos	73
9 ARTIGO 1	
<i>“Pharmacogenetic considerations in the treatment of HIV”</i>	75
10 ARTIGO 2	
<i>“Association between FTO and SREBF1 gene variants and lipodystrophy in HIV-infected patients on HAART”</i>	90
11 ARTIGO 3	
<i>“Investigation of SIRT1 gene variants in HIV-associated lipodystrophy and metabolic syndrome”</i>	115
12 ARTIGO 4	
<i>“DBS sampling to clinical quantification of efavirenz and atazanavir in HIV-infected Brazilians on HAART: why we gave up?”</i>	142
13 CONCLUSÃO	170
14 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	171
15 ANEXOS	194
ANEXO A Parecer Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)	194
ANEXO B Ficha coleta de dados	199
ANEXO C Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – etapa 1	201

	ANEXO D	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – etapa 2	203
16	CURRÍCULO LATTES		205

LISTA DE ABREVIATURAS

2-OG	2-oxoglutarato
Aids	Síndrome da Imunodeficiência Humana (do inglês, <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (do inglês, <i>AMP-activated protein kinase</i>)
APOBEC3G	Enzimas APOBEC (do inglês, <i>APOlipoprotein B mRNA Editing enzyme, Catalytic polypeptide-like 3G or AG3</i>)
AR	Ácido retinoico
ARVs	Fármacos antirretrovirais
C/EBP- α	Proteína alfa estimuladora de ligação a CCAAT (do inglês, <i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>)
C/EBP- β	Proteína beta estimuladora de ligação a CCAAT (do inglês, <i>CCAAT/enhancer-binding protein beta</i>)
CA	Capsídeo viral (p24)
CCR5	C-C receptor de quimiocina 5
CIDEC	Indutor de morte celular pelo fator de fragmentação de DNA α -efetor c (do inglês, inglês <i>cell death-inducing DFFA - DNA fragmentation factor-α-like effector c</i>)
CXCR4	C-X-C receptor de quimiocinas 4
cis-9-AR	Ácido cis-9-retinoico
cDNA	DNA complementar
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças Americano (do inglês, <i>Center for Disease Control and Prevention</i>)
CRABP-1	Proteína de ligação ao ácido retinóico citoplasmático do tipo 1 (do inglês, <i>cytoplasmic retinoic-acid binding protein type 1</i>)
CRF	Formas Recombinantes Circulantes (<i>Circulating Recombinant Forms</i>)
CV-HIV	Carga viral HIV
CYP3A	Citocromo P450 3A4 (do inglês, <i>cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2

ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial (do inglês, <i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
env	Gene do envelope (glicoproteína de superfície gp120 e transmembrana gp41)
fbpp	Fração do analito ligado às proteínas plasmáticas (do inglês, <i>fraction of analyte bound to plasma proteins</i>)
FLD	Doença hepática gordurosa (do inglês, <i>fatty liver disease</i>)
FTO	Gene associado a obesidade e massa gorda (do inglês, <i>fat mass-and obesity-associated gene</i>)
GWAs	Estudos de ampla associação genômica (do inglês, <i>Genomic Wide Association studies</i>)
HAART	Terapia antirretroviral altamente ativa (Highly Active Antiretroviral Therapy)
Hct	Hematócrito
HCV	Vírus da hepatite C (do inglês, <i>hepatitis C virus</i>)
HDAC	Desacetilases de histonas (do inglês, <i>histone deacetylase</i>)
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade (do inglês, <i>High Density Lipoprotein cholesterol</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HSM	Homens que fazem sexo com outros homens
HTLV	<i>Human T-Lymphotropic Virus</i>
IDF	Federação Internacional de Diabetes (do inglês <i>International Diabetes Federation</i>)
IE	Inibidor de entrada
IF	Inibidores de fusão
IFN- γ	Interferon gama
IL-6	Interleucina 6
IN	Integrase (p32)
INI	Inibidores da integrase
INSIG	Gene induzido pela insulina (do inglês, <i>insulin induced gene</i>)
IP	Inibidores da protease
IST	Infecções Sexualmente Transmissíveis
ITRN	Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos

ITRNN	Inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos
ITRnt	Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos
LAV	<i>Lymphadenopathy-Associated Virus</i>
LPL	Lipoproteína lipase (do inglês, <i>lipoprotein lipase</i>)
LRP	proteína relacionada com o receptor da lipoproteína de baixa densidade (do inglês, <i>low density lipoprotein-receptor-related protein</i>)
LT-CD4	Linfócitos T CD4
LTR	Sequências de terminação longa (do inglês, <i>long terminal repeats</i>)
MA	Matriz proteica (p17)
MCE	Expansão clonal mitótica (do inglês, <i>mitotic clonal expansion</i>)
mtDNA	DNA mitocondrial
MTF	Monitoramento terapêutico de fármacos
NAT	Teste de ácido nucleico (do inglês, <i>Nuclei acid test</i>)
NC	Proteínas nucleares virais (p7)
NCEP	Programa Nacional de Educação sobre Colesterol dos Estados Unidos (do inglês <i>National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III</i>)
<i>nef</i>	Gene do fator negativo
NF-Kb	Fator nuclear <i>kappa</i> B
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORFs	Sítio de origem da replicação (do inglês, <i>open reading frames</i>)
PDI	Pessoas que usam drogas injetáveis
PGC1- α	Co-ativador-1 α do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (do inglês, <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>)
PIC	Complexo pré-integração (do inglês, <i>pre-integration complex</i>)
<i>pol</i>	Gene da polimerase precursor das proteínas virais (protease, transcriptase reversa, RNase H e integrase)
PPARG	receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (do inglês, <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>)
PPRE	elementos responsivos aos proliferados de peroxissoma (do inglês, <i>peroxisome proliferator response elements</i>)
PR	Protease (p10)

PrEP	Profilaxia Pré-Exposição
RC	Restrição calórica
RE	Retículo endoplasmático
<i>rev</i>	Gene regulador de <i>splicing</i>
RI	Resistência à insulina
RNA	Ácido ribonucleico
RS	Rio Grande do Sul
<i>RUNX1T1</i>	Fator de transcrição <i>RUNX1 partner transcriptional co-repressor 1</i>)
RVS	Resveratrol
SCAP	Proteína ativadora de clivagem (do inglês, <i>SREBP cleavage activating protein</i>)
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
Sir2	Regulador de silenciamento da informação 2 (do inglês, <i>Silent Information Regulator 2</i>)
SIRTs	Sirtuínas (do inglês, <i>sirtuins</i>)
<i>SIRT1</i>	Sirtuína 1 (do inglês, sirtuin 1)
SM	Síndrome metabólica
SRA	Síndrome Retroviral Aguda
<i>SREBF1</i>	Fator de transcrição de ligação ao elemento regulatório de esterol 1 (do inglês, <i>sterol regulatory element binding transcription factor 1</i>)
SREBP	Proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol (do inglês <i>sterol regulatory element binding proteins</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
TG	Triglicerídeos
TAR	Elemento de resposta transativadora
<i>tat</i>	Gene do transativadora transcricional
TARV	Terapia antirretroviral
<i>TNF</i>	Fator de necrose tumoral (do inglês, <i>tumor necrosis factor</i>)
TR	Transcriptase reversa (p51)
UCP2	Proteína desacopladora mitocondrial 2 (do inglês <i>uncoupling protein 2</i>)
URF	Formas recombinantes únicas (do inglês, <i>unique recombinant form</i>)

- vif* Gene do fator de infectividade viral
- vpu* Gene da proteína viral U
- vpr* Gene da proteína viral R
- vpx* Gene da proteína viral X

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figuras

Figura 1.	Classificação filogenética do vírus HIV	18
Figura 2.	Ciclo de replicação do HIV-1 e ação dos fármacos antirretrovirais	28
Figura 3.	Manifestação lipoatrofia facial em conjunto com acúmulo de gordura abdominal e dorsocervical (<i>buffalo hump</i> ” ou giba)	40
Figura 4.	Comparação sequência de aminoácidos do sítio catalítico da enzima da protease do HIV-1 com o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP) e proteína de ligação ao ácido retinóico citoplasmático do tipo 1 (CRABP-1)	40
Figura 5.	Conceito de faixa terapêutica	66
Figura 6.	Passo a passo coleta de sangue pela técnica DBS	70

Tabela

Tabela 1.	Fármacos utilizados na terapia antirretroviral (TARV) e seu mecanismo de ação	35
------------------	-------------------------------------------------------------------------------------	----

RESUMO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) infecta, principalmente, linfócitos T *helper* (T auxiliar) que expressam a proteína de superfície CD4 (LT-CD4+) causando o enfraquecimento do sistema imunológico e favorecendo o aparecimento de doenças oportunistas. Na ocorrência dessa situação, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) se desenvolve. A prevalência de pessoas vivendo com HIV (PVHIV) continua a crescer mundialmente. Contudo, novas infecções pelo vírus crescem de forma particular em determinadas regiões do mundo. A terapia antirretroviral (TARV) combinada mudou a perspectiva da infecção pelo HIV de uma doença mortal para uma enfermidade crônica. Apesar destes benefícios, alguns pacientes não atingem a supressão viral. Sabe-se que os fármacos antirretrovirais (ARVs) são capazes de atuar em nível molecular, alterando a atividade de fatores de transcrição em genes do metabolismo glicídico e lipídico, induzindo dislipidemia, resistência à insulina (RI), diabetes mellitus (DM) e síndrome metabólica (SM), além dos efeitos na fisiologia dos adipócitos. Estes últimos favorecem o desenvolvimento da síndrome da lipodistrofia (LD). Diversos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) em genes do metabolismo glicídico e lipídico já foram implicados na susceptibilidade à LD e SM, sendo de especial interesse o fator de necrose tumoral (*TNF*), o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (*PPARG*), o fator de transcrição de ligação ao elemento regulatório de esterol 1 (*SREBF1*), o gene associado a obesidade e massa gorda (*FTO*) e a sirtuína 1 (*SIRT1*). Em conjunto ao monitoramento da carga viral, as PVHIV em TARV também requerem o acompanhamento dos níveis circulantes dos fármacos a fim de assegurar o sucesso terapêutico e evitar níveis sub-terapêuticos, o que aumenta a chance de falha virológica. Uma alternativa minimamente invasiva para dosagem plasmática dos fármacos é a técnica de mancha de sangue seco em papel (DBS). Esta técnica possui inúmeras vantagens em relação ao procedimento padrão, dado que apresenta facilidade na coleta, transporte, armazenamento e, principalmente, a acessibilidade em regiões remotas. Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a contribuição de SNPs nos genes supracitados como fatores de susceptibilidade ao desenvolvimento de LD em PVHIV. Ainda, determinar a os níveis plasmáticos dos fármacos antirretrovirais efavirenz (EFV) e atazanavir (ATV) através do método DBS e avaliar a exequibilidade desta ferramenta para o monitoramento terapêutico de fármacos (MTF) em uma amostra de indivíduos infectados pelo HIV sob TARV vivendo na região Sul do Brasil. Em nossa amostra (N = 832), identificamos que a prevalência de LD foi maior em indivíduos de raça branca do que em não brancos. A variante de risco A no SNP rs9939609 (T > A) do gene *FTO* e o alelo polimórfico G para o SNP rs2297508 (C > G) no gene *SREBF1* contribuíram para o desenvolvimento de LD ($P = 0,006$ e $P = 0,052$, respectivamente), mas não para SM (dados não mostrados). Não encontramos associação significativa entre os polimorfismos rs2273773 T>C, rs12413112 G>A, rs7895833 A>G e rs12049646 T>C no gene da *SIRT1* e o risco de desenvolvimento de LD ($P = 0,949$, $P = 0,841$, $P = 0,797$ and $P = 0,700$, respectivamente) e SM (dados não mostrados). As quantificações dos fármacos EFV e ATV foram altamente correlacionadas entre o método DBS e o plasma. Assim, a técnica DBS pode ser uma alternativa ao método padrão. Contudo, a burocracia e o sistema logístico brasileiro precisa ser superado para que a técnica DBS seja uma realidade no cuidado clínico das PVHIV.

ABSTRACT

The human immunodeficiency virus (HIV) infects T helper lymphocytes that express the CD4 (LT-CD4 +) protein on surface, causing weakness of the immune system and favoring the onset of opportunistic diseases. When this situation occurs, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) develops. The prevalence of people living with HIV (PLHIV) continues to increase worldwide. However, new infections grow up in particular regions of the world. Highly active antiretroviral therapy (HAART) has changed the perception of HIV infection and AIDS from a deadly disease to a chronic illness. Despite these benefits, some patients do not achieve viral suppression. It is known that antiretroviral (ARVs) drugs act in the molecular level because they modify the activity of transcription factors in glycidic and lipid metabolism genes, inducing dyslipidemia, insulin resistance (IR), diabetes mellitus (DM) and metabolic syndrome (MS), besides the effects on adipocyte physiology. The latter favor the development of the lipodystrophy syndrome (LD). Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in glycidic and lipid metabolism genes have already been implicated in the susceptibility to LD and MS, being of special interest the tumor necrosis factor (*TNF*), peroxisome proliferator response elements (*PPARG*), sterol regulatory element binding transcription factor 1 (*SREBF1*), fat mass-and obesity-associated gene (*FTO*) and sirtuin 1 (*SIRT1*). In conjunction with viral load monitoring, PLHIV on HAART also require monitoring of drugs circulating levels to ensure therapeutic success and avoid subtherapeutic levels, which expands the chance of virologic failure. A minimally invasive alternative for plasma drug dosing is dried blood spot (DBS) technique. This method has several advantages over plasma standard procedure, such as ease collection, transportation, storage and, especially, accessibility in remote regions. Thus, the objective of the study was to evaluate the contribution of genetic variants in the aforementioned genes as susceptibility factors to LD and MS development in PLHIV. In addition, to determine plasma levels of efavirenz (EFV) and atazanavir (ATV) antiretroviral drugs through the DBS collection and to evaluate the feasibility of this tool for therapeutic drug monitoring (TDM) in a sample of HIV infected individuals under HAART living in the Southern region of Brazil. In our sample (N = 832), we identified that the prevalence of LD was higher in whites than in non-whites individuals. *FTO* rs9939609 A-carriers and *SREBF1* rs2297508 G-carriers were at higher risk of LD development ($P = 0.006$ e $P = 0.052$, respectively), but not to MS occurrence (data not shown). We found no significant association between the rs2273773 T>C, rs12413112 G>A, rs7895833 A>G and rs12049646 T>C polymorphisms in the *SIRT1* gene and the risk of developing LD ($P = 0.949$, $P = 0.841$, $P = 0.797$ and $P = 0.700$, respectively) and MS (data not shown). The quantifications of the EFV and ATV drugs were highly correlated between the DBS and plasma methods. Thus, the DBS technique may be an alternative to the standard method. However, the bureaucracy and logistics system in Brazil needs to be overcome to DBS collection become a reality in the clinical care of PLHIV.

1 INTRODUÇÃO

1.1. A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) e o vírus HIV

Acredita-se que a transmissão do vírus da imunodeficiência humana – HIV (do inglês, *human immunodeficiency virus*) para o homem tenha acontecido na década de 1930, através da caça e manipulação da carne ensanguentada de chimpanzés de Camarões e Gabão, no Oeste da África. Os caçadores africanos desconheciam a presença de um patógeno viral nestes animais que, através de escoriações e ferimentos na pele, podiam invadir o organismo humano. Após a transmissão, o vírus chegou as secreções genitais onde permitiu sua transmissão a outros indivíduos por meio do contato sexual. As guerras civis, pobreza, prostituição e campanhas de vacinação com agulhas não descartáveis favoreceram a disseminação viral. Mutações modificaram o vírus oriundo dos chimpanzés, tornando-o específico dos seres humanos (1,2).

Na outra extremidade do continente Africano, na floresta da Guiné-Bissau, macacos Sooty mangabey transmitiram aos homens vírus parecidos àqueles dos chimpanzés de Camarão e Gabão. As diferenças entre ambas as linhagens classificaram como vírus do tipo 1 aqueles oriundos de Camarão e Gabão, enquanto os da Guiné-Bissau foram denominados vírus tipo 2. Enquanto o vírus tipo 1 espalhou-se vigorosamente na África, o vírus tipo 2 percorreu o caminho Europeu, especificamente em Portugal, através de soldados que participaram das rebeliões em Guiné-Bissau e Cabo Verde visando sua independência. Nas viagens para outros continentes, o vírus chegou ao Haiti. Lá, contaminou um indivíduo por transfusão de sangue. Chegou aos Canadenses por contato sexual. Possivelmente, haitianos infectados carregaram o vírus para os Estados Unidos da América onde difundiu-se entre homens que se relacionavam com outros homens no final dos anos de 1960 (1,2).

Décadas mais tarde, em 1981, a agência americana encarregada pelo controle de doenças infecciosas, *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), recebeu a notificação dos primeiros casos de uma grave deficiência imunológica entre homens que fazem sexo com outros homens (HSM) (3). No ano seguinte, 1982, fatos semelhantes foram descritos entre usuários de drogas ilícitas intravenosas, em indivíduos com sangue transfundido e em crianças com menos de dois anos cujas mães apresentavam os mesmos sintomas. Esse conjunto de acontecimentos levou o órgão de saúde americano supracitado a reconhecer a real presença de uma moléstia e nomeada como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - Aids (do inglês, *acquired immunodeficiency syndrome*) (4).

O agente etiológico da Aids foi caracterizado apenas em 1983 por dois grupos de pesquisa autônomos. Primeiramente, foi designado como *Lymphadenopathy-Associated Virus* (LAV) pela equipe francesa chefiada por Luc Montagnier (5) e pelo grupo americano comandado por Robert Gallo que encontrou características semelhantes ao Vírus T-linfotrópico humano (HTLV, do inglês, *Human T-Lymphotropic Virus*), batizando-o como HTLV-III (6,7). Posteriormente, em 1986, percebeu-se que se tratava do mesmo micro-organismo causador dos casos de imunodeficiência e, assim, este foi denominado como vírus da imunodeficiência humana (HIV) pelo *Internacional Committee on the Taxonomy Viruses* (8). Os parentes mais próximos do homem continuam com seus vírus, conhecidos por vírus da imunodeficiência do símio (SIV) (1). O HIV-1 e o HIV-2 possuem quase 50% de homologia na sequência de nucleotídeos, idêntica estrutura da partícula viral e tropismo celular (9).

De acordo com suas características biológicas, o vírus HIV foi incluído ao gênero dos *Lentivirus* dentro da família *Retroviridae*. Os vírus pertencentes a este gênero são reconhecidos por permanecer longos períodos em latência clínica, entre a infecção e o início dos sintomas, além do seu caráter crônico e progressivo. A família *Retroviridae* abriga vírus que possuem o ácido ribonucleico (RNA) como material genético e usam a transcrição reversa para sintetizar um ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir de um RNA (10).

O vírus HIV-1 é categorizado filogeneticamente em quatro grupos principais (M, N, O e P) provindo de transmissões independentes entre vírus da imunodeficiência símia de primatas não humanos para os seres humanos. Além desses quatro grupos, o HIV-1 é subdividido em subtipos, sub-subtipos, formas recombinantes circulantes (CRFs) e formas recombinantes únicas (URFs) (Figura 1). O Grupo M (do inglês, *major*) é o mais representativo na pandemia da Aids – presente em mais de 95% das pessoas infectadas pelo vírus HIV-1 no mundo. Está dividido em nove subtipos: A, B, C, D, F, G, H, J e K. As variantes A e F sofrem uma divisão em sub-subtipos: A1-A5 e F1-F2, respectivamente. Grupo O (do inglês, *outlier*) está presente da África Central e Ocidental. O Grupo N (do inglês, *non-M/non-O*) é encontrado em algumas poucas pessoas de Camarões (menos de 20 indivíduos no total) (11,12) e o grupo P (*new group*) foi o último grupo a ser identificado em uma mulher de Camarões e parece ser procedente de um lentivírus dos gorilas (13,14). Cada grupo difere entre si cerca de 37,5% e 14,7% entre os subtipos do HIV-1 (15).

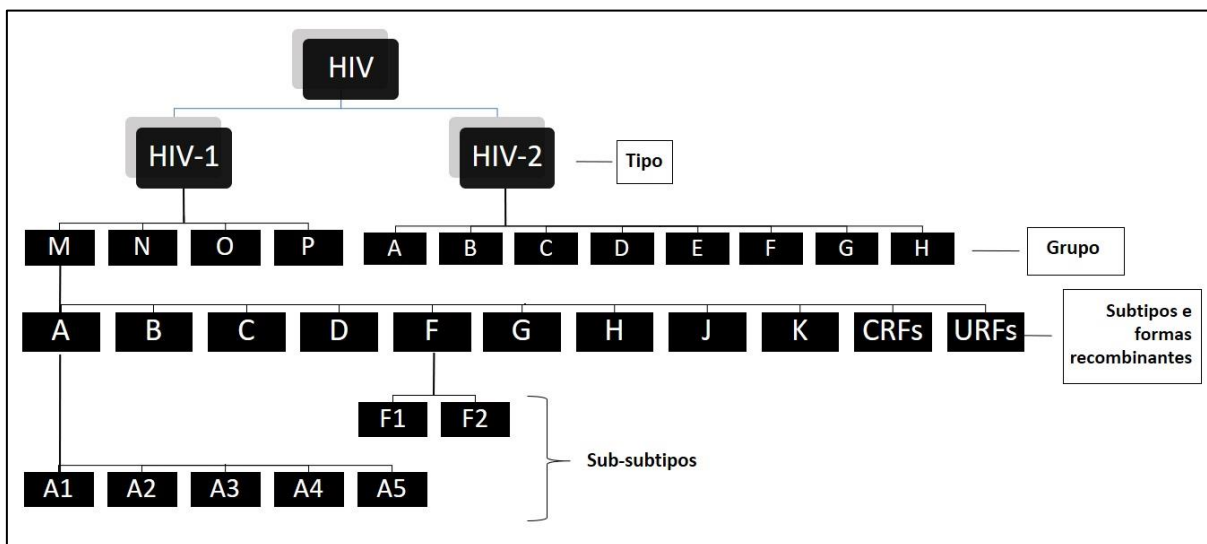


Figura 1. Classificação filogenética do vírus HIV.

Em uma recente revisão sistemática, com 383.519 amostras de 116 países entre 1990 e 2015, Hemelaar *et al.* (2018) apresentaram a epidemiologia molecular do HIV-1. Os autores reportaram que o subtipo C refletiu 46,6% do total de

infectados no mundo, seguido pelo subtipo B com 12,1% das infecções e, por último, o subtipo A (10,3%). As CRFs e URFs contribuíram com 22,8% de todas as infecções globais pelo HIV-1. Na América Latina, o subtipo B é predominante (76,0% dos casos) (16). No Brasil, o subtipo B também é o mais frequente (17,18); mas na região Sul do país o subtipo C é o mais prevalente (19,20), seguido pelos subtipos B, F1, BF1 (mosaico) e formas recombinantes (21) como a linhagem recombinante CRF31_BC, preferencialmente encontrada na cidade de Porto Alegre - provável cidade de origem. Contudo, apesar desta alta prevalência localizada, recentemente um estudo demonstrou que a CRF31_BC está se propagando por diversos locais do país através de transmissão autóctone (22). Acredita-se que esta forma recombinante tenha surgido em 1988 (1982 – 1992), coincidindo com as primeiras detecções de CRF31_BC em indivíduos com HIV no início dos anos 90 (23).

Pacientes infectados com subtipo C do HIV-1 apresentam maiores contagem de LT-CD4+ quando comparados com outros subtipos não-C. Essa característica é, provavelmente, explicada pelo *fitness* viral por três motivos: o primeiro, subtipo 1C reduz a capacidade replicativa em células mononucleares periféricas, o que aumenta a contagem de LT-CD4+ quando comparado com indivíduos infectados por outros subtipos. Segundo, o HIV-1C tem menor virulência devido seu tropismo predominante pelo co-receptor CCR5 do que o CXCR4 que, sabe-se, estar relacionado ao acelerado desenvolvimento da doença. Terceiro, menor patogenicidade, mas com equivalente transmissão aos outros subtipos, aumentando o período assintomático da infecção o que, conseqüentemente, favorece a disseminação da infecção. Apesar disso, as taxas de transmissão do subtipo C em outras regiões do Brasil e em países da América do Sul que fazem fronteira com nosso país ainda são menores quando comparadas às taxas do Sul do Brasil. Assim, é aceitável considerar que outros fatores além dos inerentes ao vírus são responsáveis pelo padrão de infecção na região Sul (20,24).

2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A pandemia de Aids causada pela infecção pelo vírus HIV-1 atinge, neste momento, cerca de 36,9 milhões de pessoas, segundo o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS) no último relatório publicado em 2017. Deste total, 21,7 milhões de indivíduos tiveram acesso à terapia antirretroviral (TARV) e 1,8 milhões de novas infecções ocorreram no mundo – declínio de 47% desde a maior incidência, em 1996, que atingiu 3,4 milhões de pessoas. Contudo, em determinadas regiões do mundo, como no Leste Europeu, Ásia Central, Oriente Médio e Norte da África, novas infecções pelo vírus HIV crescem em maiores proporções. As mortes relacionadas à Aids seguem a mesma tendência de queda nas taxas: 940 mil pessoas em 2017, comparando-se com 1,4 milhão em 2010 e 1,9 milhão em 2004 (25). O declínio na mortalidade e o aumento da qualidade/expectativa de vida das pessoas vivendo com HIV/Aids (PVHIV) são reflexos da maior cobertura à terapia antirretroviral altamente ativa – HAART (do inglês, *highly active antiretroviral therapy*) a contar do diagnóstico, atendendo ao *guideline* “tratamento para todos” recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (26).

Da estatística global em 2017, aproximadamente 1,8 milhão de PVHIV (adultos acima de 15 anos e crianças de 0 a 14 anos) acumulam-se na América Latina. Destes, 1,1 milhão estavam em uso de fármacos ARVs. Em torno de 960 mil estão com a carga viral suprimida. Aproximadamente 100 mil novas infecções foram notificadas em 2017 (27). O Brasil contribui com o total de 860 mil casos de infecção pelo HIV, representando um terço de todas as PVHIV entre os países da América Central e do Sul. Estima-se que 552 mil PVHIV estejam em TARV e que 510 mil tenham a carga viral suprimida. A incidência foi de 48 mil novos casos no ano de 2017, concentrando-se na faixa de 20 a 34 anos (52,6% de todos os casos). De acordo com o mais recente Boletim Epidemiológico HIV-Aids publicado pelo Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde (2018), percebe-se o encolhimento na taxa de detecção de Aids no país: de 21,7/100.000 habitantes (2012) para 18,3/100.000 habitantes (2017), representando uma queda

de 15,7% (28,29). Esta redução é decorrente da implementação, em dezembro de 2013, de acesso aos medicamentos ARVs a todos aqueles diagnosticados com a infecção pelo HIV (30).

Segundo os dados apurados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), de 2007 até junho de 2018, foram notificados 247,795 casos de infecção pelo HIV no Brasil, concentrando-se os maiores números na região Sudeste (117,415 casos - 47,4%) e região Sul (50,890 casos – 20,5%). Neste mesmo período, os homens refletiram 68,6% (169,932) dos casos e as mulheres 31,4% (77,812). Os casos com escolaridade informada, aqueles com ensino médio completo foram a maior parte (27,5%), seguido daqueles com instrução entre a 5ª e 8ª série incompleta do ensino fundamental. Relativo à raça/cor da pele autodeclarada, observa-se entre 2007 e junho de 2018, 46,1% entre os brancos e 52,9% entre não-brancos. Com referência à categoria de exposição nos indivíduos acima de 13 anos, de 2007 até junho de 2018, nos homens constatou-se que 59,4% dos casos foram derivados de exposição homossexual ou bissexual, 36,9% heterossexual e 2,6% entre pessoas que usam drogas injetáveis (PDI). Nas mulheres, 96,8% decorrem de exposição heterossexual e 1,6% de PDI. A razão entre os sexos em 2017, excluindo o HIV em gestantes, foi 2,6 (M:F), isto é, 26 homens para cada 10 mulheres. Importante salientar que a notificação da Aids é compulsória desde 1986, enquanto que a infecção pelo HIV no Sinan iniciou somente no ano de 2014 (28).

O estado do Rio Grande do Sul (RS) lidera as taxas de casos de infecção pelo HIV na região Sul quando comparado aos estados de Santa Catarina e Paraná, totalizando 18,901 casos notificados no Sinan de janeiro de 2007 a junho de 2018. Nosso estado permanece em 2º lugar no ranking dos estados, exibindo taxa de detecção de 31,8 casos em 100,000 habitantes. Porto Alegre é a capital com maior taxa de detecção em 2017: 60,8 casos/100 mil habitantes – valor superior ao dobro da taxa do Rio Grande de Sul e 3,3 vezes maior que a taxa do Brasil. Os homens representam 10.344 casos e as mulheres, 8.557 (apresentando a razão entre sexos de 1,5 M:F). A distribuição dos casos por faixa etária seguiu a

tendência nacional, acumulando-se na porção dos 20 a 39 anos. A maior porcentagem de escolaridade ficou entre a 5ª e 8ª série incompleta do ensino fundamental. Alusivo à etnia autodeclarada, 73,9% são brancos e 25,5% são não-brancos. Identificou-se que 78,2% dos casos de HIV registrados no Sinan foram decorrentes da exposição heterossexual. Todavia, é importante destacar o aumento observado da infecção pelo HIV na categoria de homens que fazem sexo com outros homens (HSH), passando de 12,2% em 2007 para 24,2% em 2016 (31).

Historicamente, o perfil epidêmico da infecção pelo HIV-1 estava concentrado entre pessoas com determinados comportamentos/ambientes de risco, como em HSH, receptores de sangue e pessoas que usam drogas injetáveis (PDI). Ao longo dos anos esse perfil foi se modificando, atingindo outros nichos populacionais por intermédio da transmissão heterossexual que proporcionou o crescimento substancial de casos em mulheres (favorecendo a contaminação de crianças via transmissão vertical) acompanhado pela difusão geográfica da doença dos grandes centros urbanos em direção aos municípios de médio e pequeno porte. Os avanços na indústria farmacêutica e da medicina permitiram o prolongamento da vida sexual ativa, o que tem resultado em um aumento no número de pessoas com diagnóstico de Aids na faixa acima de 60 anos (25,28,32,33).

O HIV-1 presente no sangue, sêmen e outros fluidos corporais como leite materno pode ser transmitido por diferentes rotas e fatores de risco, tais como o contato sexual, parenteral (transfusão de sangue e hemoderivados), vertical (mãe para filho durante a gestação, no trabalho de parto e na amamentação), lesão ocupacional, uso de substâncias ilícitas (drogas injetáveis) e trabalho sexual (34). Além destes aspectos, o baixo nível educacional e socioeconômico bem como o acesso limitado aos serviços de saúde cooperam conjuntamente para disseminação viral. A idade avançada também contribui como elemento de susceptibilidade ao HIV-1 pois indivíduos mais velhos estariam expostos a situações de risco por períodos de tempo prolongados e carentes de informações preventivas (35).

A categoria de exposição contribui diferentemente para a prevalência do HIV-1 em todo o mundo. A transmissão heterossexual responde por mais de 70% no mundo, seguido por HSH, infecção materno infantil e uso de drogas injetáveis. A elevada taxa de transmissão heterossexual reflete, parcialmente, a alta frequência de casais sorodiscordantes e a presença de outros fatores de risco associados, como úlcera genital, circuncisão masculina, carga viral e estágio da doença pelo HIV (fase aguda apresenta maior eficiência na transmissão). Nos países desenvolvidos, estima-se que a transmissão de homens para mulheres é de 0,08% enquanto que de mulheres para homens é de 0,004%. Em contrapartida, países em desenvolvimento, essas taxas são maiores: 0,38% de homens para mulheres e 0,3% de mulheres para homens. O emprego contínuo e regular da TARV além da circuncisão masculina reduz a transmissão em 96% e 60%, respectivamente (36).

3 O VÍRUS HIV-1

3.1. A partícula viral

A partícula viral do HIV-1 é esférica e mede aproximadamente 110 nm (média, 95 a 166 nm) de diâmetro. Apresenta, externamente, um envelope composto por uma bicamada lipídica onde estão fixadas as glicoproteínas de superfície (gp120) e transmembrana (gp41), originadas do precursor gp160. Internamente, encontra-se a matriz proteica (MA; p17) que envolve o capsídeo viral (CA; p24). Incluso a esta última estrutura (CA; p24) está o material genético do HIV-1, constituído por duas fitas similares do ácido ribonucleico (RNA) de polaridade positiva associadas a três principais enzimas virais: transcriptase reversa (TR), integrase (IN) e protease (PR) (10).

Cada fita de RNA, individualmente, pode ser utilizada como molde para transcrição viral. Quando as duas cópias do genoma forem geneticamente distintas, poderá haver recombinação e a progênie resultante será formada por vírions homozigotos e heterozigotos (“*dual infection*”). Qualquer partícula é potencialmente capaz de interagir com as proteínas virais (TR, IN e PR) para formar provírus (genoma viral integrado ao material genético do hospedeiro) que será constituído de um DNA quimérico portando informações genéticas de cada uma das fitas de RNA (37).

3.2. Organização genômica do HIV-1

O genoma do vírus HIV-1 abriga duas cópias idênticas de RNA fita simples com mais de 9,600 nucleotídeos (~ 9,7 Kb) que estão delimitadas por duas sequências de terminação longa (LTR, do inglês *long terminal repeat*) internas (5'-LTR e 3'-LTR) contendo sítios de origem da replicação, ORFs (do inglês, *open reading frames*) e reforçadores (do inglês, *enhancers*). Cada região LTR contém as

sub-regiões U3, R e U5, responsáveis por abrigar sítios de ligação a fatores de transcrição celular e ao elemento de resposta transativadora (TAR) associado com a *trans*-ativação mediada pela proteína Tat (38). Este genoma de organização complexa é capaz de codificar 15 produtos moleculares. As nove ORFs estão agrupados em três categorias: genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), genes regulatórios (*tat* e *rev*) e genes acessórios (*vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*) (9,39).

Os genes estruturais, como o nome sugere, são responsáveis por codificar proteínas que irão compor a estrutura viral. O gene *gag* (antígeno específico do grupo) codifica um polipeptídeo (p55) imaturo que é precursor da matriz proteica (MA; p17), do capsídeo (CA; p24) e das proteínas nucleares (NC; p7), responsáveis pela formação e estabilização dos dímeros de RNA. O gene *pol* (polimerase), que se sobrepõe ao início de leitura do gene *gag*, é sintetizado como parte da fusão entre as proteínas Gag-Pol. Através da clivagem proteolítica pela protease viral, três enzimas fundamentais para o ciclo do vírus são liberadas: transcriptase reversa (TR; p51); protease (PR, p10) e integrase (IN, p32) (9,10,39). A enzima TR é uma polimerase de DNA dependente de RNA formada por uma subunidade reguladora (p51) e uma catalítica (p66) cuja função é retrotranscrever o RNA fita simples viral em um DNA dupla fita. Particularmente, a região p66 possui atividade RNase H na qual degrada a molécula de RNA do híbrido RNA-DNA durante o processo de transcrição reversa. O gene *env* (envelope) codifica a glicoproteína Env que é um heterodímeros composto pelas glicoproteínas de superfície gp120 e transmembrana gp41, geradas a partir da clivagem da glicoproteína gp160 e organizadas em simetria triangular (38).

Ainda, há os genes regulatórios que codificam as seguintes proteínas: o gene *tat* codifica a proteína transativadora transcricional Tat (p14) que interage com o elemento de resposta transativadora (TAR) na região 5'-LTR do mRNA do HIV favorecendo a transcrição e produção de novos vírions. O gene *rev* (regulador de *splicing*) codifica a proteína Rev (p19), responsável pelo transporte do mRNA viral para o citoplasma (10).

Os genes acessórios codificam proteínas relacionadas a infectividade viral (gene *vif*, codifica a proteína p23); replicação (gene *vpr*, codifica a proteína p15 que se associa com o complexo pré-integração – PIC do genoma viral); interferência da atividade imunológica de LT-CD4+ e brotamento (gene *vpu*, codifica a proteína p16) (10). Uma vez infectado pelo HIV-1, o gene *vif* atua dentro do LT-CD4+ como antagonista da atividade antiviral do fator de restrição celular humano *APOBEC3G*, pertencente à família de enzimas APOBEC (do inglês, *APOlipoprotein B mRNA Editing enzyme, Catalytic polypeptide-like 3G or AG3*), cuja função é a deaminação de citosinas em fita simples de DNA para uracilas (C>U). A TR do vírus utiliza as uracilas do cDNA como molde para inserção de adeninas na cadeia genômica nascente, resultando em um cDNA com mutações que bloqueiam de forma não enzimática a transcrição reversa, impedindo, portanto, a produção de proteínas virais funcionais (40). A presença de *vif* bloqueia a tradução e induz a poli-ubiquitinação da *APOBEC3G* pelo complexo ligase E3 com consequente degradação via proteassomo (41). O gene *nef* codifica a proteína Nef (fator negativo, p27) com função pleiotrópica. Diferentemente do HIV-1, o HIV-2 não possui o gene *vpu*. No lugar deste, há o gene *vpx* (proteína viral x, codifica a proteína p15) que é responsável pela menor patogenicidade apresentada pelo HIV-2 (10).

3.3. O ciclo de vida do HIV-1

O HIV-1 invade, primeiramente, o sistema imunológico humano através da infecção de linfócitos T *helper* (T auxiliar) que expressam a proteína de superfície CD4 (LT-CD4+) e, em menor escala, macrófagos e células dendríticas. Posteriormente, o vírus ocupa as mucosas e depois se espalha pelo sistema linfoide (42).

A infecção viral começa quando a proteína gp120 do envelope viral se liga ao receptor de membrana CD4 em linfócitos T (receptor primário). Essa interação modifica a estrutura conformacional da gp120, expondo sua alça V3, o que

possibilita o contato desta glicoproteína com os correceptores de quimiocinas CCR5 e/ou CXCR4 (receptor secundário). A glicoproteína gp41 - peptídeo encarregado da fusão entre a membrana do vírus e da célula do hospedeiro - é formada por uma região aminoterminal e por dois domínios de repetições-hepta de leucina (*heptads*) conhecidos como HR1 (do inglês, *N-terminal heptad repeat 1*) e HR2 (do inglês, *C-terminal heptad repeat 2*). Mudanças estruturais na gp41 em decorrência da ligação nos correceptores altera a disposição entre HR1 e HR2 que, à vista disso, aumentam o contato entre as duas membranas (viral e celular), criando poros de fusão, introduzindo, por fim, o capsídeo viral no citoplasma da célula alvo (43).

Uma vez inserido na célula hospedeira, o capsídeo é desmanchado liberando o genoma do vírus no citoplasma da célula e simultaneamente ativando o processo de transcrição reversa do RNA viral em DNA (cDNA) mediado pela enzima transcriptase reversa (TR). Concomitantemente, ocorre a degradação do RNA do vírus pela enzima RNase H. O DNA viral dupla fita recém-sintetizado é translocado para o núcleo pelo complexo pré-integração (PIC, do inglês *pre-integration complex*), associado a enzima integrase (IN), por meio de um poro nuclear. No núcleo, o PIC se associa a cromatina e a IN cliva as ligações fosfodiéster no DNA cromossômico viabilizando a união entre as extremidades 3'-hidroxila (OH) livres do DNA viral com as pontas 5'-O-fosfato do DNA hospedeiro, formando, por fim, o complexo de integração (38).

A partir desta integração, o DNA viral, agora nomeado provírus, é o agente principal no comando da maquinaria celular para que sua transcrição ocorra e funcione como molde para síntese de proteínas virais a partir da RNA polimerase II da célula hospedeira. A regulação deste processo é executada pelos segmentos LTRs: a região 5'-LTR é o sítio promotor da transcrição enquanto que a região 3'-LTR apoia na poliadenilação do RNA transcrito. Os mRNA recém sintetizados sofrem processamento (*splicing*) no núcleo antes de seguirem para o citoplasma. No citoplasma as proteínas sintetizadas como grandes moléculas precursoras são

clivadas por proteases celulares e virais. A seguir, corre a tradução de proteínas virais que irão compor novas partículas virais, conhecidas como vírions. Os vírions são liberadas ao meio extracelular por brotamento através de canais na membrana da célula hospedeira. No ambiente externo à célula, a maturação dos vírions ocorre pela ação da enzima protease (PR) (Figura 2) (41).

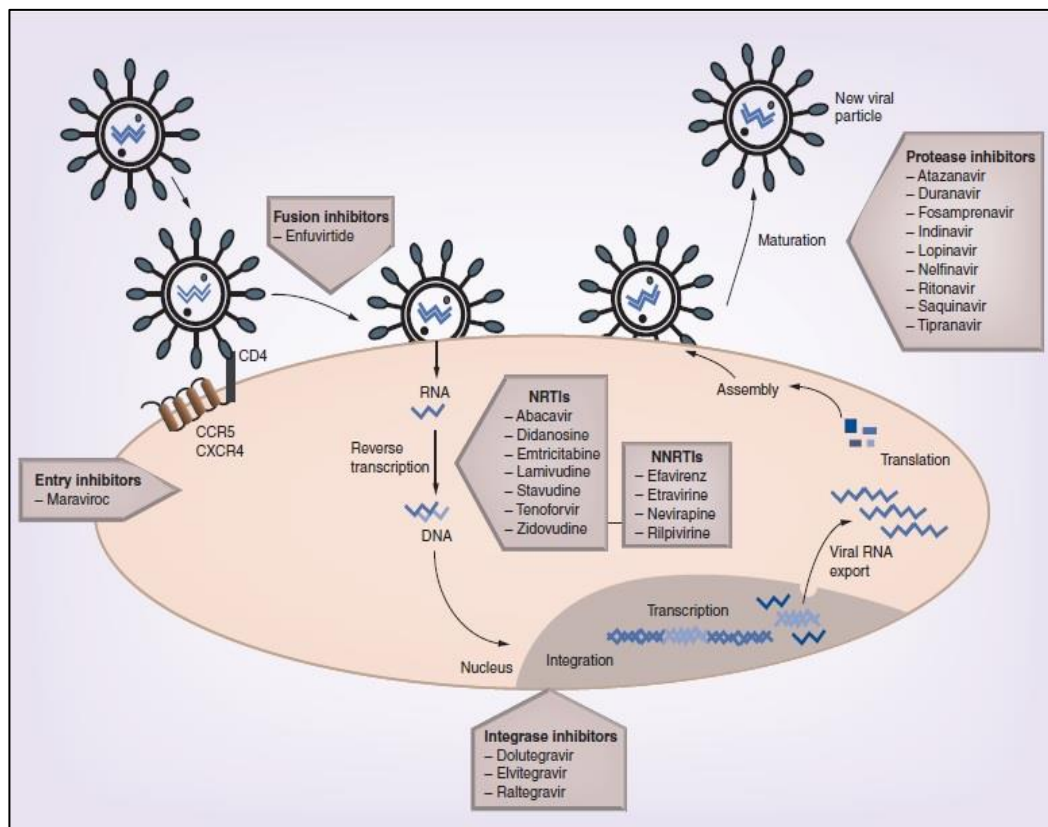


Figura 2. Ciclo de replicação do HIV-1 e ação dos fármacos antirretrovirais.
 Fonte: Mattevi VM and Tagliari CFS. Pharmacogenetic considerations in the treatment of HIV.
Pharmacogenomics, 2016. (44)

No HIV-1, o tropismo é bastante específico: o CD4 é o receptor primário (reconhecimento da célula hospedeira), ao passo que os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 constituem os correceptores secundários - principais mediadores para entrada no vírus na célula hospedeira que, ao interagirem com a alça V3 da glicoproteína gp120 do envelope viral, provocam modificações conformacionais na membrana plasmática da célula alvo e fusão subsequente. A predileção do HIV-1

por um, outro ou ambos correceptores bem como o mecanismo de interação têm efeitos importantes na transmissão, citopaticidade e persistência viral (45,46).

3.4. Curso clínico da infecção pelo HIV-1

A história natural da infecção pelo HIV-1 se apresenta num amplo espectro de manifestações clínicas, desde a fase inicial (aguda), passando por um longo período assintomático (latência) até o estágio final, quando a Aids se estabelece. Acredita-se que o tempo aproximado entre o contágio e o surgimento da doença, nos indivíduos sem tratamento, seja de dez anos (46,47).

Após a contaminação, o vírus do HIV-1 infecta células alvo primeiramente nos tecidos da mucosa e, em alguns dias, se espalha pelo tecido linfoide (conhecida como fase eclipse). Entre o 7° e 10° dia, o RNA do vírus pode ser encontrado no sangue. Depois, continua a se multiplicar exponencialmente atingindo o pico máximo da viremia plasmática no dia 30 (*set point*), quando os anticorpos anti-HIV podem ser detectados, enquanto os níveis de LT-CD4+ caem vertiginosamente, já que são utilizados para replicação viral. Neste período, o indivíduo é altamente infectante. O declínio de LT-CD4+ é acompanhado pelo aumento dos linfócitos T citotóxicos CD8+ (LT-CD8+) cuja principal função é eliminar as células infectadas pelo vírus HIV. Todas estas evidências compõem a fase aguda da infecção pelo HIV-1. A partir deste ponto, a resposta adaptativa imune assume algum grau de controle e o “*set point*” é alcançado – etapa em que a replicação viral torna-se estável por anos, caracterizando a fase assintomática da doença (34,42).

Um conjunto de manifestações transitórias, designada Síndrome Retroviral Aguda (SRA), acompanha a fase aguda da infecção pelo HIV-1. Trata-se de um quadro sintomatológico inespecífico, semelhante à gripe, composto por febre, cefaleia, astenia, faringite e, em alguns casos, linfadenomegalia assim como complicações gastrointestinais (náusea, vômito, diarreia e úlceras orais). A SRA

tem decurso típico e limitado, resolvendo-se dentro de três a quatro semanas. Por apresentar ocorrências clínicas semelhantes à outras infecções virais, eventualmente a contaminação pelo vírus HIV-1 deixa de ser diagnosticada no princípio (48), no entanto está associada com pior desfecho clínico em longo prazo (49).

A fase de latência clínica ou infecção crônica é marcada destruição de LT-CD4+ de forma vagarosa e gradativa, levemente compensada pela sua produção na qual mantém, geralmente, com níveis acima de 350 cél/mm³. Na maior parte dos casos é assintomática, exceto pela linfadenomegalia que pode ser persistente. O final deste período é marcado pelo declínio acentuado dos níveis de LT-CD4+ (≤ 200 cél/ mm³), elevação viremia, aparecimento de infecções oportunistas (IO) e neoplasias. Esses fatores determinam a etapa final do curso clínico da infecção pelo vírus HIV-1, quando a Aids se instaura. O tempo médio de incubação do HIV-1 durante fase crônica da doença é de 8 a 11 anos. Embora, em alguns casos, possa progredir para fase final dentro de um ano (50).

3.5. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV

As políticas de triagem (identificar os indivíduos infectados pelo HIV) e detecção precoce (testes confirmatórios) são importantes para redução da transmissão, pois indivíduos na fase aguda que desconhecem seu estado sorológico são altamente infecciosos (51). A primeira geração de ensaios para detecção do HIV-1 data de 1985. Na época, a identificação de anticorpos estava amparada no ensaio de imunoabsorção enzimática indireta (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA). Em 1987, surgiu a segunda geração de ensaios que também era baseada na detecção indireta, porém com a utilização de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos que elevou a sensibilidade e especificidade. No entanto, a variabilidade do HIV-1 tornou-se evidente além do impasse na detecção de infecções pelo HIV-2. Por isso, no início dos anos 90 novos antígenos para o HIV-2 e para os grupos M, N e O do HIV-1 foram incluídos. A

terceira geração de ensaios ocorreu em 1994, apresentando um novo formato do teste de ELISA (sanduíche ou imunométrico), mais sensível e específico, uma vez que todas as classes de anticorpos anti-HIV (IgG, IgM e IgA) puderam ser detectadas. Posteriormente, o avanço tecnológico propiciou a promoção dos ensaios de quarta geração, na qual foi acrescida a capacidade de detectar anticorpos específicos à antígenos virais, comumente p24, gp41, gp120, gp160, antígenos do grupo O e do HIV-2 (52).

Nos casos de manifestações clínicas com suspeita de infecção recente (ou na fase aguda), os ensaios de 4º geração são mais eficazes pois permitem a detecção conjunta antígeno-anticorpo, reduzindo o período de janela diagnóstica (42). Na fase crônica da infecção, indica-se os testes de 3º e 4º geração que, se reagente, deve ser acompanhado por um teste complementar confirmatório (42,46,53).

O esquema para detecção dos marcadores virológicos durante a progressão da infecção pelo HIV foram descritos por Fiebig *et al.* (2003) e ainda é amplamente utilizado como um sistema de estagiamento laboratorial para classificação da viremia e soroconversão, ou seja, está baseado na manifestação de um determinado marcador na circulação e sua reatividade nos ensaios de detecção (RNA viral, antígeno p24, ELISA e Western blot) (46,53) permitindo, desta forma, classificar a infecção pelo HIV em seis estágios (I – VI). Contudo, a classificação de Fiebig não engloba os testes rápidos e os de 4º geração (54).

Em torno de 10 dias (8-17 dias) após a contaminação, o RNA do HIV torna-se detectável no plasma e, então, continua a se multiplicar exponencialmente, atingindo seu pico máximo após um período de aproximadamente de 30 dias, quando os anticorpos podem ser identificados (42). Os testes moleculares que permitem a detecção e/ou quantificação do RNA viral no plasma do hospedeiro são conhecidos como testes de ácidos nucleicos (do inglês, *nuclei acid test* – NAT) e foram incorporados desde 2002 nos serviços de hemoterapia para detecção de

patógenos transmissíveis, incluindo o HIV (55). São eficazes nas fases agudas/recentes da infecção e possuem bom custo-efetividade (42).

Depois de duas semanas (14-15 dias), os testes sorológicos conseguem detectar o antígeno p24 do HIV-1 bem como os anticorpos anti-HIV (IgG e IgM). Entretanto, a detecção do antígeno p24 é transitória devido a formação de complexos imunes que interferem nos testes de detecção e quando os anticorpos anti-HIV estão abaixo do limite de detecção. Essa fase é caracterizada pelo período de janela de soroconversão, que é o intervalo entre a infecção e a primeira detecção de anticorpos (dia 0 até o dia 21, até o máximo do dia 42) (46).

É possível, também, fazer a detecção de anticorpos contra o HIV em ambiente não laboratorial mediante da utilização de testes rápidos a partir de amostras de sangue obtidas por punção digital ou amostra de fluido oral gerando resultados em até 30 minutos. A oferta gratuita pelo Sistema Único de Saúde (SUS) do teste rápido aliado à sua simplicidade de execução e interpretação, aumenta a autonomia individual no acesso a testagem para o HIV entre aqueles indivíduos distantes dos serviços de saúde especializados. Contudo, os testes rápidos apresentam a limitação de serem aplicáveis para detectar anticorpos anti-HIV, apresentando, portanto, sensibilidade para identificação do HIV na fase aguda. Desta forma, quando as manifestações clínicas levam a suspeita de infecção pelo HIV, testes antígeno-anticorpo de quarta geração e/ou testes de detecção de ácido nucleico devem ser incluídos (54).

4 TERAPIA ANTIRRETROVIRAL (TARV)

O primeiro fármaco aprovado para o tratamento contra o vírus HIV-1 foi a zidovudina (AZT), em 1987. Após os anos 1990, o tratamento, que era baseado em um único medicamento (monoterapia), passou a utilizar um esquema terapêutico composto por, pelo menos, três ou mais medicamentos, conhecido como terapia antirretroviral de alta potência (HAART, do inglês, *highly active antiretroviral therapy*). Com este modelo da terapia antirretroviral (TARV), a infecção pelo vírus HIV-1 mudou seu status de doença mortal para uma enfermidade crônica, uma vez que suprime a carga viral (CV) do HIV-1 a níveis indetectáveis e leva ao aumento sérico na contagem de LT-CD4+, diminuindo a vulnerabilidade a infecções oportunistas além de retardar a progressão à Aids (56).

A TARV está indicada para todas as PVHIV, independente do estágio clínico e/ou imunológico, dado que o início precoce do tratamento oferta benefícios importantes no prolongamento da sobrevida, redução da transmissão e acometimento por IO e a acessibilidade a opções farmacológicas mais toleráveis e menos complexas (57). É importante ressaltar a importância de aceitação e integração das recomendações farmacológicas (adesão) às PVHIV como estratégia ampla de prevenção ao abandono do regime terapêutico, minimizando o estigma e o preconceito e, também, impedindo a seleção de mutações dentro do vírus HIV-1 que geram resistência aos medicamentos (58).

O Brasil é internacionalmente reconhecido, como primeiro país de renda média, por suas políticas de acesso ao diagnóstico da infecção pelo HIV, tratamento universal e gratuito além da assistência especializada às PVHIV através do Sistema Único de Saúde (SUS) (59,60). Igualmente, esta instituição pública disponibiliza a profilaxia pré-exposição (PrEP) (61) que consiste no uso de fármacos antirretrovirais (ARVs) em grupos populacionais com vulnerabilidades sociais específicas e maior risco de contaminação (parceiros heterossexuais ou homossexuais sorodiscordantes, por exemplo) como estratégia adicional de prevenção e redução a transmissão do vírus HIV; por conseguinte, cooperando

para as táticas que visam o fim da epidemia. Ainda, o SUS também concede um esquema antirretroviral de emergência preventiva à infecção pelo HIV, hepatites virais e outras infecções sexualmente transmissíveis (IST), conhecido como Profilaxia Pós-Exposição (PEP) (62), que se destina àqueles indivíduos que sofreram exposição ao HIV, como violência sexual, relação sexual desprotegida e acidente ocupacional. A PEP combina três ARVs e deve ser iniciada o mais rápido possível, com prazo máximo de 72 horas posteriores à exposição, e mantido por 28 dias.

O marco para o desenvolvimento de medicamentos antivirais teve início na década dos anos 60, quando o fármaco idoxuridina foi aprovado para o tratamento de lesões de pele e mucosas causadas pelo vírus herpes simples. Desde então, 41 medicamentos antirretrovirais (ARVs) foram desenvolvidos e aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA) (63), agência regulatória de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos, para o manejo clínico do HIV-1 e HIV-2. Deste total, muitos não são mais recomendados devido a toxicidade e/ou não estão comercialmente disponíveis (56). Os fármacos ARVs usados para tratar a infecção pelo HIV-1 são agrupados em 5 classes de acordo com sua atuação no ciclo de replicação viral (64) (Tabela 1):

- I) Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos/nucleotídeo (ITRN/ITRNT);
- II) Inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (ITRNN);
- III) Inibidores de protease (IP);
- IV) Inibidores da integrase (INI);
- V) Inibidores de entrada (IE);

Tabela 1. Fármacos utilizados na terapia antirretroviral (TARV) e seu mecanismo de ação.

CLASSE DO FÁRMACO	NOME GENÉRICO (sigla, ano aprovação)	MECANISMO DE AÇÃO
ITRN/ITRNt	Zidovudina (AZT, 1987) Lamivudina (3TC, 1995) Didanosina (ddl, 1991) Zalcitabina (ddC, 1992) ^a Estavudina (d4T, 1994) Abacavir (ABC, 1998) Tenofovir Disoproxil Fumarato (TDF, 2001) ^{**} Entricitabina (FTC, 2003) [*]	São pró-fármacos e, por isso, requerem etapas de fosforilação por enzimas quinases para serem ativados. Atuam como miméticos de nucleosídeos/nucleotídeos: a ausência do grupo hidroxil na porção 3' (3'-OH) impedirá a ligação do próximo nucleotídeo, resultando na terminação da cadeia de cDNA nascente.
ITRNN	Rilpivirina (RPV, 2011) [*] Etravirina (ETR, 2008) ^{**} Delavirdina (DLV, 1997) ^a Efavirenz (EFV, 1998) Nevirapina (NVP, 1996)	Não requerem etapa de metabolização primária para inibir a atividade da transcriptase reversa (TR). Os IRTNNs são inibidores não competitivos que agem diretamente no sítio alostérico da TR do HIV-1, provocando mudanças em sua conformação espacial, danificando-o. Assim, sua atividade catalítica. Essa alteração interrompe a replicação viral.
IP	Amprenavir (APV, 1999) ^a Tipranavir (TPV, 2005) ^a Indinavir (IDV, 1996) Saquinavir (SQV, 1995) Lopinavir (LPV) Ritonavir (RTV ou r, 1996) ^c Cobistat ^e Fosamprenavir (FPV, 2003) Darunavir (DRV, 2006) Atazanavir (ATV, 2003) Nelfinavir (NFV, 1997)	Ligam-se à enzima protease, impedindo a clivagem dos precursores de maturação viral na fase final do ciclo de replicação.
INI	Raltegravir (RAL, 2007) Dolutegravir (DTG, 2012) Elvitegravir (EVG, 2012) ^{**}	Conectam-se ao sítio catalítico da enzima integrase viral e impedem que o cDNA recém-sintetizado pela enzima TR se integre no genoma da célula hospedeira.
IE	Antagonista do receptor de quimiocinas ou inibidor CCR5 (Maraviroque, MVC, 2007) ^b Enfuvirtida (T-20, 2003) ^f	Bloqueia a ligação entre a proteína de superfície viral gp120 do vírus HIV-1 ao co-receptor de quimiocina CCR5 na superfície de células CD4+ e macrófagos. Para uso deste fármaco, é necessário a identificação fenotípica de vírus R5, uma vez que o Maraviroque não inibe vírus com tropismo X4. É um polipeptídeo idêntico a região HR2 da glicoproteína transmembrana gp41. Este fármaco obstrui a fusão entre a membrana celular e viral.

^aFármacos descontinuados; ^bFármacos de uso restrito no Brasil; ^cRitonavir é utilizado como *booster* de alguns IPs, aumentando a biodisponibilidade e meia vida. De forma semelhante, o Cobistat é administrado em conjunto com outros IPs cuja função é aumentar a absorção intestinal dos IPs. Sozinho, o Cobistat não possui atividade antiviral; ^fÚnico fármaco que pode ser administrado por via subcutânea. Seu uso clínico é obsoleto devido à grande quantidade de fármacos antirretrovirais aprovados por via oral. *Fármaco utilizado na Profilaxia Pré-Exposição (PrEP); **Fármaco inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleotídeo (IRTnt).

Fonte:

De Clercq E and Li G. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clinical Microbiology Reviews*, 2016.
Novakova L et al 2018 (57).

O tratamento inicial de adultos com HIV no Brasil emprega a utilização de três fármacos ARVs de classes diferentes. Essa combinação aumenta a eficácia terapêutica e diminui o risco de resistência farmacológica. Até 2016, o esquema terapêutico inicial empregava dois ITRNs (geralmente zidovudina/lamivudina - AZT/3TC) associados a um ITRNN (efavirenz, EFV) ou, alternativamente, um IP (atazanavir – ATV ou lopinavir – LPV); este último geralmente potencializado com ritonavir (RTV; r). Contudo, no final do ano de 2016, uma nova orientação do Ministério da Saúde foi divulgada, apresentando as recomendações de substituição (*switch*) dos regimes antirretrovirais contendo a classe dos ITRNN ou IP/r pelo INI dolutegravir (DTG) e o IP darunavir (DRV) para os tratamentos iniciados a partir de 2017 em PVHIV acima de 12 anos de idade. O DTG apresenta taxas superiores de supressão viral e menor chance de descontinuação da TARV devido aos efeitos adversos quando comparados aos fármacos de outras classes. Em relação ao DRV, combinado ao ritonavir (DRV/r), apresenta maior barreira genética ao desenvolvimento de resistência viral, menor taxa de efeitos adversos e maior tolerabilidade ao ser comparado com outros IPs. O DRV está indicado nos esquemas após falha terapêutica (65).

Em meados de 2017, o Ministério da Saúde recomendou a troca do medicamento Kaletra® (lopinavir/ritonavir – LPV/r) para o fármaco atazanavir/ritonavir (ATV/r) em todas as PVHIV acima de 12 anos. Este aconselhamento baseou-se em publicações internacionais que excluíram o Kaletra® dos protocolos terapêuticos em pessoas com HIV devido a sua toxicidade, posologia complexa (dois comprimidos, duas vezes ao dia), baixa barreira genética e efeitos adversos relacionados (intolerância gastrointestinal e prejuízo no metabolismo glicolípido) (66).

Desta forma, a regra de esquema terapêutico preferencial atualmente utilizada para adultos vivendo com HIV, em início de tratamento é a combinação de dois

fármacos da classe dos ITRNt/ITRN (tenofovir/lamivudina, TDF/3TC) combinados a um segundo fármaco da classe do INI (dolutegravir, DTG). Casos de intolerância, contraindicações, coinfeção com tuberculose, gestantes ou mulheres com intenção de engravidar devem seguir o aconselhamento de TARV alternativa disponibilizada pelo Ministério da Saúde (32,57).

Apesar da eficácia da TARV em suprimir a carga viral a níveis indetectáveis, esta não é capaz de eliminar o HIV-1 do corpo humano. Essa dificuldade de erradicação deve-se à latência viral, isto é, as células do hospedeiro atuam como reservatórios persistentes do HIV na sua forma de provírus, ou seja, integrado no DNA, mas sem atividade replicativa, na qual ficam ocultas do sistema imunológico. Os tratamentos farmacológicos, por sua vez, não conseguem atuar nessa situação de latência, apenas nos vírus ativos (em replicação) (67)

Outra abordagem terapêutica, conhecida como “*shock and kill*” (do inglês, atacar e matar), é uma tentativa para erradicação do vírus HIV que se encontra inativo dentro das células hospedeiras em indivíduos em TARV. O objetivo é reativar (“atacar”) o DNA proviral latente nos reservatórios celulares mediante o uso de agentes específicos que irão promover a replicação viral (fase “*shock*”), expressão proteica e produção de vírions. Desta forma, essas células ficam susceptíveis ao reconhecimento pelo sistema imunológico, que eliminaria (“*kill*”) as células infectadas por eventos citopáticos ou pelo próprio vírus. Ademais, os regimes terapêuticos vigentes funcionariam como proteção à infecção em células não infectadas (68,69).

Mesmo diante dos benefícios da TARV, a resistência aos fármacos ARVs proveniente da elevada taxa de mutação do HIV (aumento na variação genética) representa um desafio na prática clínica medicamentosa e um obstáculo para o desenvolvimento de vacinas (64,70). Além disso, a eficácia da TARV é deprimida pelo comprometimento de adesão por toda a vida, o acúmulo de toxicidade, interação com outros fármacos em uso e a ocorrência de efeitos adversos agudos e crônicos. Estes últimos, especialmente, resultam no aumento do risco de vários distúrbios metabólicos e doença cardiovascular, mesmo quando a carga viral está suprimida (71).

4.1. Efeitos adversos da TARV

Na última década, a introdução de medicamentos de alta potência e barreira genética, dose única diária (coformulações) e eventos adversos esporádicos, oportunizaram opções de tratamento mais toleráveis e convenientes para as PVHIV. Apesar de eventuais, os efeitos adversos relacionados à TARV acumulam-se com o prolongamento da expectativa de vida das PVHIV, favorecendo o aparecimento de doenças crônicas relacionadas ao envelhecimento (71) que impactam diretamente na qualidade de vida e aderência ao tratamento antirretroviral (72). Sabe-se que a prevalência de fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV) e o risco para DVC é maior em PVHIV quando comparado aos indivíduos sem HIV. Os fármacos ARV podem induzir mudanças metabólicas e agir em nível molecular, alterando a atuação de fatores de transcrição na expressão de genes chave do metabolismo glicídico e lipídico, induzindo dislipidemia, resistência à insulina (RI) e diabetes mellitus (DM) (73) além dos efeitos nos adipócitos (quantificação, distribuição e armazenamento) que promovam redistribuição da gordura corporal – conhecida como síndrome da lipodistrofia (LD) (74,75).

A síndrome da LD se apresenta clinicamente em três condições, de acordo com a disposição da gordura corporal: a lipoatrofia (LA) é resultado da perda de gordura subcutânea, principalmente na face, nádegas e membros periféricos, com proeminência de veias superficiais. A lipohipertrofia (LH) está relacionada ao acúmulo de gordura subcutânea e visceral, especialmente no abdômen, região dorsocervical (“*buffalo hump*” ou giba) e mamas. Nas mulheres, o aumento do volume das mamas, geralmente, não possui associação com hipertrofia glandular; apenas acúmulo excessivo de tecido adiposo. Nos homens, pode ser observada ginecomastia. É possível, ainda, que alguns pacientes apresentem ambos os fenótipos correlacionados, conhecido como lipodistrofia mista (76,77).

Com relação a LA associada ao HIV, é importante mencionar não há perda de massa magra. Em pacientes com LA periférica, a perda de tecido adiposo subcutâneo (TAS) acentua a musculatura e as veias ficam mais proeminentes. No caso da LA no tronco, esse padrão não é tão nítido e pode se tornar ainda menos perceptível quando

há, concomitantemente, deposição de gordura visceral na região abdominal (padrão misto) (78). Acerca da LH, discussões permanecem se o ganho de gordura nas PVHIV após começar a TARV é um estado patológico ou uma consequência do “fenômeno de regresso à saúde” (do inglês, *The return to health phenomenon*), especialmente naqueles indivíduos com menor contagem de LT-CD4+ e índice de massa corporal (IMC) no início do tratamento (76,79,80).

À vista disso, o manejo da LD não se concentra apenas sob o aspecto estético, mas é extensivo às complicações metabólicas que frequentemente acompanham seus subtipos. Somados, estes dois fatores elevam o risco de desenvolvimento de doenças do coração, piorando a qualidade e expectativa de vida das PVHIV (81). Na LH, é comum a presença de dislipidemia e hipertrigliceridemia, diminuição dos níveis de colesterol de alta densidade (HDL-c, do inglês *High Density Lipoprotein cholesterol*), redução da sensibilidade à insulina e diabetes mellitus (82). Essas modificações são semelhantes às encontradas em indivíduos HIV-negativo com síndrome metabólica (SM). Acredita-se que as PVHIV tenham os fatores de risco à SM piorados em decorrência da infecção em si, TARV e inflamação persistente (83). Na ocorrência de LA, observa-se a perturbação de outros parâmetros bioquímicos, tais como o aumento de citocinas inflamatórias (como a interleucina 6, IL-6), altos níveis de triglicérides circulantes e ácidos graxos livres que, por sua vez, são armazenados no tecido adiposo visceral e no fígado (84).

O primeiro caso relatado de LD foi publicado por Andrew Carr & David A Cooper em 1998, aproximadamente três anos após a implementação da classe dos inibidores de protease (IP) no regime terapêutico contra o HIV. Entre 3 e 6 meses após a inclusão do indinavir (IDV) no esquema farmacológico contendo zidovudina (AZT) e lamivudina (3TC), observou-se, em um homem de 53 anos de idade, perda de gordura na face, braços, nádegas e pernas, com proeminência das veias. Conjuntamente, ocorreu acúmulo de gordura central e hipertrofia dorsocervical (“*buffalo hump*” ou giba) (Figura 3). Todavia, a força e massa muscular não sofreram prejuízos. Tais alterações anatômicas progrediram durante os 19 meses de uso do IDV, até que o paciente relatou seu desejo de descontinuar o referido esquema farmacológico (85).

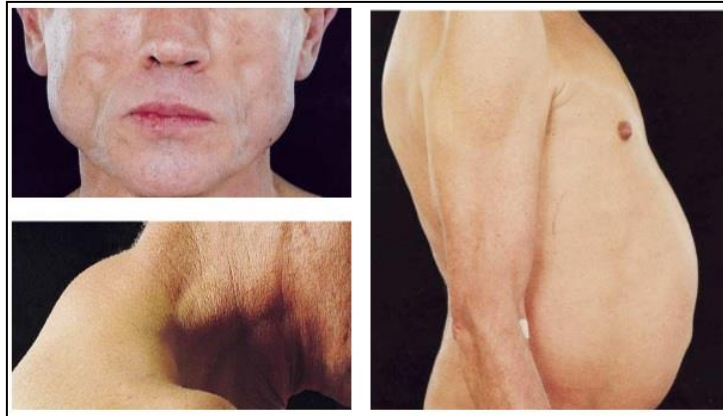


Figura 3. Manifestação lipoatrofia facial em conjunto com acúmulo de gordura abdominal e dorsocervical (*buffalo hump*” ou giba).

Fonte: Carr A and Cooper DA. Lipodystrophy Associated with an HIV-Protease Inhibitor. *The New England Journal of Medicine*, 1998. (88)

Ainda no ano de 1998, Carr *et al.* (1998), postularam o mecanismo de ação dos inibidores de protease no desencadeamento da LD periférica, obesidade central, hipertrofia mamária e sua associação com hiperlipidemia e resistência à insulina. Segundo os autores, a região catalítica da enzima protease do HIV-1, aonde os inibidores de protease se ligam, possui 58% de homologia a regiões da proteína de ligação ao ácido retinóico citoplasmático do tipo 1 (CRABP-1, do inglês *cytoplasmic retinoic-acid binding protein type 1*) e 63% da proteína relacionada com o receptor da lipoproteína de baixa densidade (LRP, do inglês *low density lipoprotein-receptor-related protein*), duas importantes proteínas reguladores do metabolismo lipídico (Figura 4) (89).

AEALLCNGQDDC LRP; aa 2919-2930
::: .: ::
KEALLDTGADDT HIV-1 protease; aa 19-30
: .: ::: .
DELILTFGADDV CRABP-1; aa 116-127

Figura 4. Comparação sequência de aminoácidos do sítio catalítico da enzima da protease do HIV-1 com o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP) e proteína de ligação ao ácido retinóico citoplasmático do tipo 1 (CRABP-1).

Fonte: Carr A et al. Pathogenesis of HIV-1-protease inhibitor-associated peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia, and insulin resistance. *Lancet*, 1998. (89)

A proteína CRABP-1 “apresenta” o ácido retinoico (AR) à citocromo P450 3A (CYP3A) que o converte em ácido cis-9-retinoico (cis-9-AR). Este último, por sua vez, é o único ligante para o receptor do retinoide X (RXR, do inglês, retinoide X receptor) que, nos adipócitos, forma um heterodímero com o receptor ativado por proliferador de peroxissomas gama (PPARG, do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), fator de transcrição chave da diferenciação de adipócitos e adipogênese. A formação do heterodímero RXR:PPARG inibe a apoptose dos adipócitos e favorece a expressão preferencial do PPARG periférico em relação ao central. A hipótese é que o inibidor de protease, ao se ligar na região homóloga dentro da proteína CRABP-1, e não no sítio catalítico da enzima protease do HIV, bloqueia a ligação do AR. Conseqüentemente, menores quantidades de cis-9-AR são produzidas. Isso diminui a atividade do RXR, reduzindo a formação de heterodímeros RXR:PPARG, limitando a adipogênese ao passo que favorece a apoptose de adipócitos periféricos (86).

O LRP é um receptor hepático que age na liberação de quilomícrons pós-prandial e forma um complexo com a lipoproteína lipase (LPL, do inglês *lipoprotein lipase*). Uma vez constituído, o complexo LPL-LRP “quebra” os ácidos graxos a partir dos triglicerídeos circulantes, possibilitando que estes ácidos graxos livres sejam armazenados nos adipócitos. Quando o inibidor de protease se liga ao LRP, não há formação do complexo LPL-LRP, o que bloqueia a captação hepática de quilomícrons. A hiperlipidemia resultante favorece a obesidade central e resistência à insulina, mas não a lipotrofia periférica. Na presença do hormônio estrogênio, os lipídios são abrigados nas mamas. Por isso as mulheres comumente apresentam aumento do tecido adiposo mamário (86).

Ademais, esquemas terapêuticos contendo ITRN análogos de timidina, nomeadamente a estavudina (d4T) e zidovudina (AZT), são inibidores da polimerase- γ do DNA mitocondrial (mtDNA) – enzima fundamental na oxidação de ácidos graxos. Quando isso ocorre, a diferenciação dos adipócitos é alterada, levando ao desenvolvimento LA e ao aumento dos ácidos graxos livres, resultando em dislipidemia e resistência à insulina de forma indireta. Isto posto, a substituição da estavudina (d4T) e zidovudina (AZT) pelo tenofovir (TDF) demonstrou menor impacto deletério no perfil lipídico e ocorrência LA; apesar da sua nefrotoxicidade (87,88). Já os ITRNN, embora apresentem impacto positivo no metabolismo lipídico (aumento

HDL e redução TG), foram associados com dislipidemia e resistência à insulina. O efavirenz (EFV) parece ser o mais prejudicial (88).

O mais recente fármaco utilizado como esquema preferencial de início de tratamento antirretroviral, o dolutegravir (DTG), da classe dos inibidores da integrase (INI), acomete de forma ínfima parâmetros do perfil lipídico (colesterol total, LDL e triglicerídeos) quando comparado com EFV ou DRV/r (89). Contudo, é possível que o uso do DTG predisponha ao ganho de peso (90,91) e obesidade (92) enquanto que modificações na distribuição da gordura corporal tem sido relacionado ao uso do RAL, outro fármaco dos INI (93), apesar do mínimo efeito na adipogênese (94,95). Apesar dos dados escassos, não é recomendada a utilização de esquemas terapêuticos contendo DTG para mulheres em idade fértil que desejam engravidar ou não utilizem métodos contraceptivos eficazes. Tal preocupação veio à tona a partir da publicação de um estudo observacional em Botsuana (África) (96), que constatou 4 casos de defeitos no tubo neural em 426 mulheres que engravidaram enquanto tomavam o DTG. Diante disso, a Organização Mundial da Saúde manifestou-se através de uma declaração quanto a insuficiência de dados que atestem a segurança de uso do DTG em mulheres vivendo com HIV durante a gestação ou amamentação (97). Tal recomendação logo foi acatada pelo Ministério da Saúde brasileiro (98).

Cerca de metade dos pacientes expostos à TARV irão desenvolver alterações na composição corporal. Os sinais físicos aparecem em torno de 10 meses após o início do tratamento, aumentando, progressivamente, entre 18 e 24 meses (75). Usualmente, estabiliza-se por 2 anos (99). A prevalência é amplamente variável em razão da inexistência de consenso metodológico para o diagnóstico e carência de pontos de corte específicos para LD-associada ao HIV (100). Estima-se uma faixa de 10 a 80% entre todas as PVHIV no mundo. A LA apresenta um intervalo de prevalência de 13% a 67%, enquanto que a LH varia entre 6% e 93%. Indivíduos que manifestam ambos os fenótipos juntos (lipodistrofia mista) exibem estreita faixa de prevalência: 20% a 29%. Fatores de susceptibilidade como maior idade, estilo de vida (sedentarismo), gênero (feminino), etnia e características genéticas do indivíduo contribuem para o risco de desenvolvimento da LD (99). Geralmente, as mulheres são mais afetadas pela LH, enquanto os homens pela LA (100).

Em pessoas HIV-negativo, já foi estabelecido que o processo de envelhecimento está associado com desordens do tecido adiposo que se manifestam pela perda de TAS e massa magra ao mesmo tempo que ocorre acúmulo de gordura abdominal. Nos indivíduos infectados pelo HIV, a alteração seletiva de gordura em diversas partes do corpo está associada a dois principais fatores: o primeiro, aos efeitos deletérios da infecção por si só que causa um estado de envelhecimento precoce ao manter de forma permanente a ativação de citocinas inflamatórias e induzir o aumento do estresse oxidativo; e, segundo, à TARV, que ao proporcionar o prolongamento de vida dos pacientes, contribuiu para o aparecimento de doenças crônicas associadas ao aumento da idade e, ainda, a exposição contínua a diferentes ARVs que perturbam o metabolismo e a distribuição do tecido adiposo nas PVHIV (101).

A prática regular de atividade física é a principal recomendação mundial para minimizar o risco de mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis, como doença coronariana, hipertensão arterial, DM2, SM, alguns tipos de câncer e depressão (102) (WHO, 2010). Este aconselhamento, salvo restrições, também é encorajado as PVHIV como importante estratégia sobre o perfil lipídico, capacidade cardiorrespiratória e tônus muscular, melhora do sistema imunológico, prevenção/intervenção frente as complicações da LD e dislipidemia, controlando o peso e, conseqüentemente, a composição corporal. Esta última, por sua vez, impacta diretamente na autoestima, auxiliando no controle de transtornos psiquiátricos como ansiedade e depressão (101,103).

O dimorfismo sexual está bem estabelecido quanto a sua participação na forma de distribuição e fisiologia do tecido adiposo, uma vez que os hormônios sexuais comandam como as calorias ingeridas serão empregadas. Os homens, sob influência da testosterona, tendem a acumular gordura visceral nas regiões centrais e superiores do corpo (abdômen e tórax), conhecido como androide (formato maçã). O excesso de gordura visceral está associado com aumento no risco de DCV. As mulheres, em contrapartida, são mais propensas ao ganho de gordura subcutânea até a menopausa, pois o estrógeno, hormônio predominante no sexo feminino, ativa seus receptores nos adipócitos favorecendo o acúmulo de lipídios. As áreas inferiores preferenciais são as nádegas, coxas e quadris, habitualmente chamado de ginoide

(formato pêra) (104). O aumento da circunferência do quadril é fortemente e inversamente associado ao risco de doenças do coração. Contudo, o início da menopausa e declínios nos níveis do estrogênio, o acúmulo de gordura visceral passa a ser favorecido e o risco de distúrbios metabólicos atinge índices semelhantes aos encontrados nos homens (104,105).

Esse padrão de acúmulo de gordura em sítios específicos do corpo é mantido nas PVHIV, dado o maior risco para o acúmulo, ao invés da perda, de gordura subcutânea observado nas mulheres do que nos homens em TARV. Isso foi comprovado através de um grande estudo transversal (2258 pacientes do sul da Europa) onde as mulheres apresentam maior risco de desenvolvimento de lipodistrofia (LD) apesar do esquema terapêutico ser composto de ARVs significativamente mais vantajosos e do estágio inferior do HIV quando comparado aos homens. Ainda, quando os subtipos de LD foram analisados separadamente, a LA foi a alteração corporal mais frequente em homens e a menos frequente em mulheres, que apresentaram maior frequência de LH e padrão misto (106). Resultados na mesma direção foram constatados em homens infectados pelo HIV (107). Todavia, achados controversos foram observados em mulheres infectadas pelo HIV (108); ambos decorrente do estudo de Redistribuição de Gordura e Mudança Metabólica na Infecção pelo HIV (FRAM, do inglês *Fat Redistribution And Metabolic change in HIV infection*) (82).

Essa predisposição do sexo feminino também foi confirmada no estudo de Gasparotto *et al.* (2012) (109) em uma amostra de 614 pacientes brasileiros vivendo com HIV em TARV por, pelo menos, doze meses. Ao comparar as frequências dos subtipos de LD, o fenótipo de LA foi mais prevalente nos homens (52,6%), enquanto que a LH teve maior prevalência nas mulheres (35,6%). Os autores também observaram maior prevalência de síndrome metabólica nas pacientes do sexo feminino quando comparado ao sexo masculino usando tanto os critérios da Federação Internacional de Diabetes (IDF, do inglês *Internacional Diabetes Federation*) (37,4% x 27,6%) e do Programa Nacional de Educação sobre Colesterol dos Estados Unidos (NCEP, do inglês *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*) (23,4% x 16,1%).

Diferenças na frequência da LD e seus subtipos também são encontradas entre grupos étnicos. A LD é mais prevalente em indivíduos de raça branca (Euro-descendentes) em comparação aos não-brancos (Afro-descendentes), mesmo quando expostos a idênticos esquemas terapêuticos e compartilhando características ambientais (110). Quando se avalia os diferentes fenótipos da LD, observa-se que os indivíduos brancos apresentam maior prevalência de LH e padrão misto, enquanto que a LA é predominante em não-brancos (106).

A população brasileira é caracteristicamente diversa e miscigenada, apresentando elevados níveis de diversidade genômica como resultado de três principais raízes de ancestralidade: Ameríndios, Europeus e Africanos (111). Essa miscigenação dentro e entre as regiões geográficas do país interfere no delineamento e interpretação de pesquisas com seres humanos, principalmente em investigações de genética médica, farmacogenética e variantes de susceptibilidade a doenças complexas. Por isso, a generalização dos dados para grupos mais homogêneos deve ser a razão para as discrepâncias observadas nas taxas de prevalência da LD e seus subtipos entre diferentes estudos populacionais (112).

Esta complexidade aparentemente desvantajosa, cria, na verdade, uma oportunidade única no Brasil para pesquisas científicas, pois é uma amostra valiosa para análise de frequências alélicas e predisposição a doenças. Além disso, a população brasileira representa um significativo grupo de indivíduos acometidos pelo HIV tratados de forma homogênea graças ao programa instituído pelo Ministério da Saúde no país de distribuição gratuita e universal de medicamentos ARVs desde 1996. Esta política pública de atenção ao paciente e tratamento para o HIV em diversos centros de referência espalhados pelo Brasil é um exemplo reconhecido no mundo todo e possibilita o recrutamento expressivo pacientes para pesquisas envolvendo a infecção pelo HIV. Destaca-se dentro deste conjunto de indivíduos, o número relevante de participantes do sexo feminino e indivíduos de ancestralidade africana, frequentemente excluídos ou sub-representados em estudos clínicos.

Aditivo aos fatores de risco supracitados, há inúmeras evidências da contribuição da variabilidade genética individual na regulação do balanço energético bem como na susceptibilidade ao desenvolvimento da LD. Logo, a literatura científica

tem demonstrado a participação de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphism*) na violação da homeostase energética, repressão ou indução da adipogênese, metabolismo lipídico e arranjo do tecido adiposo (87,113,114). Sendo assim, o reconhecimento de aspectos genéticos individuais é crucial na busca do equilíbrio entre o uso contínuo de fármacos mais potentes e o risco de eventos colaterais metabólicos, sobretudo nos níveis de lipídios, diferenciação de adipócitos e metabolismo de fármacos (115,116).

O diagnóstico da LD baseia-se em diversas ferramentas, como o auto-relato do paciente de mudanças na distribuição de gordura corporal, observação médica, exame físico, medidas antropométricas (altura, peso, índice de massa corporal – IMC, dobras cutâneas, circunferência da cintura – CC e do quadril – CQ, razão CC/CQ), análise de impedância bioelétrica (BIA, do inglês *bioelectrical impedance analysis*) e avaliação por imagem, como absorciometria de raios-x de dupla energia (DEXA, do inglês *dual emission X-ray absorptiometry*), tomografia computadorizada ou ressonância magnética para confirmação de mudanças na distribuição da gordura corporal. Contudo, não há método padrão-ouro para determinar a presença de LD e seus subtipos (99,117).

Os exames de imagem compreendem técnicas avançadas e sofisticadas para avaliação da LD. Contudo, são onerosos, de acesso limitado em países em desenvolvimento e requerem interpretação especializada. Por isso, representam um desafio para serem utilizados na prática clínica e, também, em estudos epidemiológicos. Desta forma, o diagnóstico da LD é rotineiramente detectado pelo relato do próprio paciente, pelo olhar apurado do mesmo médico durante as consultas de acompanhamento e medidas antropométricas, que são métodos de baixo custo, não-invasivos e de fácil execução (117). Contudo, alguns casos, a concordância entre os sinais autorreferidos e as medidas antropométricas aferidas é inexistente, conferindo, assim, certo grau de subjetividade no diagnóstico e prevalência (100).

Frente a esta situação, Santos *et al.* (2018) (118) desenvolveram modelos antropométricos objetivos, econômicos e acessíveis de predição para o diagnóstico e monitoramento da LD em homens e mulheres brasileiros vivendo com HIV. Os resultados mostraram que o melhor modelo preditivo para os homens incluiu as

seguintes variáveis antropométricas: razão entre a espessura da dobra cutânea subescapular e média, dobra cutânea da coxa e circunferência da cintura. Adicionado a estes fatores, a educação, o tempo de diagnóstico do HIV e o esquema de ARVs são elementos sociais e fisiológicos pertinentes para determinar as para modificações na distribuição da gordura corporal. Já nas mulheres, as dobras cutâneas da coxa e subescapular e a circunferência das mamas, foi o modelo mais significativo. Os autores relataram que esse modelo está de acordo com achados prévios onde indivíduos do sexo feminino com HIV tiveram aumento no acúmulo de gordura no tronco juntamente com redução do tecido adiposo nas pernas. Além das variáveis antropométricas, o tempo de exposição à TARV e a etnia também contribuíram para o desenvolvimento de LD. O tempo de diagnóstico e o período de exposição aos ARVs foram as variáveis mais significativas, reforçando os efeitos do vírus na perturbação da homeostase metabólica e no padrão na disposição do tecido adiposo no corpo e dos fármacos na severidade da LD.

Os sinais e sintomas revelados pelas PVHIV acometidas pela LD são complexos e requerem olhar apurado na rotina de atendimento ao paciente. O estigma e a conseqüente discriminação provocados pela LD, impactam negativamente a vida das PVHIV. A LA, sobretudo, destaca-se entre os três subtipos por imprimir um aspecto de envelhecimento precoce e imprimindo a indelicada expressão “cara de Aids”. Essa situação pode trazer à tona a condição de soropositividade, afetando diretamente a autoestima das PVHIV, isolamento social, baixa adesão farmacológica ou até mesmo o abandono da TARV; o que provoca falha terapêutica e produz cepas virais resistentes (78,119).

O reconhecimento da LD leva a reavaliação do regime farmacológico que, muitas vezes, modifica o esquema terapêutico (*switch*). Essa abordagem é uma forma de administração da LD cujo fim é reprimir o desejo de abandono da TARV, assim como evitar a exposição permanente do paciente com HIV ao medicamento desencadeador das alterações na forma do corpo. Basicamente, as intervenções destinadas aos pacientes com LA são a restrição de uso aos ITRN análogos de timidina, cirurgia plástica e preenchimento facial. Na ocorrência de LH, indica-se um plano alimentar hipocalórico e prática de exercício físico (81,84).

Diante desse cenário, o Ministério da Saúde implementou junto ao SUS as cirurgias reparadoras para LD (120) e preenchimento facial com polimetilmetacrilato (PMMA) ou tecido gorduroso (121). As intervenções operatórias incluem lipoaspiração de giba, região submandibular, parede abdominal e dorso, redução mamária, tratamento da ginecomastia, lipoenxertia de glúteo (120). Isso destacou o Brasil, mais uma vez, no atendimento às PVHIV sendo o primeiro país a conceder gratuitamente operações cirúrgicas reparadoras para PVHIV com LD (32).

Embora o termo 'lipodistrofia' seja utilizado para se referir a qualquer desordem metabólica e distúrbio na distribuição de gordura corporal, cada subtipo de LD (LA, LH e misto) deve ser considerado como entidades únicas de etiologia complexa e caráter multifatorial (74). Inserido neste conjunto de elementos causais, as características genéticas individuais possuem papel chave na susceptibilidade ao aparecimento de anormalidades metabólicas em PVHIV, já que nem todos os pacientes em uso regular da TARV sofrem alterações no armazenamento lipídico (122).

5 GENES CANDIDATOS

Além da função primária de estocar energia como triacilglicerol e liberar ácidos graxos livres durante períodos de jejum, o tecido adiposo também possui atribuições endócrinas, imunológicas e regulatória da homeostase da glicose e dos lipídios. Fundamental para o desempenho destas atividades, está na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros que, em resposta a sinais externos, armazena lipídios e secreta diversas adipocinas (126,127). Na presença de calorias excedentes sem liberação de energia, o tecido adiposo se expande e a obesidade se estabelece (128).

Quando isso ocorre, o tecido adiposo passa a acumular células imunes que irão subsidiar o estado de inflamação crônica de baixo grau (sub-clínica) e desbalanço metabólico. Os macrófagos são o tipo de leucócitos que predominam no tecido adiposo nessa condição patológica e são os responsáveis por estas características intrínsecas da obesidade que, por sua vez, precedem a ocorrência de resistência à insulina (RI). A RI é o fator chave para o desencadeamento de comorbidades associadas à obesidade, como DM e SM, dado o enfraquecimento da resposta normal à insulina, redução da glicose disponível e comprometimento na supressão da lipólise. A quantidade de LT-CD4+ também aumenta, em especial a razão LT-CD8+/LT-CD4+ que são fundamentais para o recrutamento de macrófagos através da produção de interferon gama (IFN- γ) (129). Esse cenário é potencializado nas PVHIV em razão da deterioração de LT-CD4+ juntamente com a pronunciada ativação e proliferação de LT-CD8+ (130). Por isso, indivíduos infectados pelo HIV estão em maior risco de obesidade e doenças associadas (77).

Os efeitos do HIV no tecido adiposo são investigados desde a sua identificação nos anos 1980 e foram, inicialmente, utilizados como marcadores de progressão da infecção à Aids. Já foi estabelecido que a infecção pelo HIV acarreta num estado generalizado de ativação imune e inflamação persistente em consequência da produção exacerbada de citocinas pelos LT-CD4+ infectados que estão latentes no tecido adiposo. Esta intensificação local de citocinas ativa as células em repouso e desperta o vírus HIV, que aumenta ainda mais a produção de mediadores pró-

inflamatórios nos adipócitos. Não obstante à supressão da viremia plasmática nos indivíduos sob TARV, as proteínas virais permanecem atuando *in loco* no tecido adiposo aonde prejudicam a maturação de pré-adipócitos além de reprimir a expressão de genes envolvidos na regulação da adipogênese (77).

Parte destas desordens metabólicas e distribuição irregular de gordura no corpo também sofrem influência do nosso material genético. A maturação dos adipócitos, assim como a síntese de ácidos graxos e triglicerídeos é comandada por diversos genes que, por sua vez, são finamente orquestrados por fatores de transcrição. Variantes genéticas (SNPs) nos principais reguladores transcricionais da adipogênese e lipogênese podem alterar a cascata de eventos destes processos, reprimindo ou intensificando a expressão gênica e, portanto, cooperando para o desenvolvimento da LD (125).

Evidências genéticas e moleculares ajudaram a encaixar algumas peças do quebra-cabeças oculto à LD. Contudo, muitos enigmas ainda precisam ser desvendados para explicar a sequência de eventos para o desenvolvimento de LD, visto a complexa interação do HIV *per se*, TARV, inflamação e variação genética do hospedeiro (82,125,131). Entre diversos genes envolvidos na diferenciação dos adipócitos e metabolismo lipídico, são de especial interesse o fator de necrose tumoral (*TNF*, do inglês *tumor necrosis factor*), o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (*PPARG*, do inglês *peroxisome proliferator activated receptor gamma*), o fator de transcrição de ligação ao elemento regulatório de estero 1 (*SREBF1*, do inglês *sterol regulatory element binding transcription factor 1*), o gene associado a obesidade e massa gorda (*FTO*, do inglês *fat mass-and obesity-associated gene*) e a sirtuína 1 (*SIRT1*).

5.1. Fator de necrose tumoral (*TNF*)

O fator de necrose tumoral- α (*TNF- α* , codificado pelo gene *TNF*, 6p21.33) é expresso no tecido adiposo branco (TAB) e secretado por macrófagos e LT-CD8+ ali infiltrados (132,133). Os níveis desta adipocina pró-inflamatória são correlacionados com adiposidade e resistência à insulina, possivelmente porque ativa as proteínas Ser/Thr quinase cujo dano na sinalização da insulina e recrutamento de efetores

downstream já foram relatados (118). O TNF- α suprime a lipogênese por meio da ativação da lipoproteína lipase (134) e induz apoptose de pré-adipócitos periféricos (135), além de modular a atividade do gene coativador do receptor ativado por proliferador de peroxissoma- γ (PPAR- γ) através da ligação aos receptores de superfície dos adipócitos. Essa interação aumenta a inflamação do tecido adiposo e suporta a liberação de outros mediadores pró-inflamatórios (77). A presença de níveis circulantes elevados do TNF- α já foram associados com desordens do tecido adiposo como a obesidade e lipodistrofia na população em geral (136).

Nos indivíduos HIV-positivos, a homeostase do TNF- α é drasticamente modificada, elevando as concentrações circulantes antes do início do tratamento antirretroviral e caindo acentuadamente pós-TARV. Todavia, apesar da eficácia do tratamento antirretroviral, o sistema de ativação e parâmetros do TNF- α não atingem a normalidade (137). Na tentativa de avaliar essa relação, Domingo *et al.* (2005) (138) demonstraram, *in vivo*, que PVHIV com LD têm um acentuado grau de apoptose no tecido adiposo subcutâneo (TAS) quando comparado aos sem LD e sujeitos não infectados. Essa correlação positiva foi associada com o aumento nos níveis séricos da fração solúvel dos receptores de TNF- α . Nos experimentos *in vitro*, pré-adipócitos 3T3-L1 cultivados com meio apropriado e, após o período de 9-10 dias de diferenciação, as células foram embebidas com fármacos antirretrovirais. Depois, foi adicionado TNF- α . Os resultados mostraram que a combinação de certos ARVs agiram de forma pró-apoptótica nos adipócitos e que a incorporação de TNF- α no meio potencializou os efeitos de morte celular. O uso de IP, particularmente, apresenta efeito antiadipogênico sinergicamente com o TNF- α e causa lipoatrofia periférica e acúmulo de gordura central (139). Resultados divergentes foram obtidos por Freitas *et al.* (2014) (140), na qual não observaram diferença nos níveis de TNF- α em indivíduos controles e nos adultos com HIV, recebendo TARV, com ou sem diagnóstico de LD.

Associações entre polimorfismos no gene *TNF* e condições inflamatórias já foram descritas. O polimorfismo -238 G>A (rs361525), localizado na região promotora do gene, parece influenciar os níveis circulantes de TNF- α : o alelo G foi associado com baixa produção enquanto que o alelo A foi associado com aumento (141). Em

pacientes com HIV, a susceptibilidade entre esta variante e o desenvolvimento de LD foi demonstrada, pela primeira vez, por Maher *et al.* (2002) (142). Os autores observaram que a frequência do alelo A foi significativamente maior no grupo de pacientes com LD quando comparados àqueles sem LD e concluíram que ser portador do alelo polimórfico A não foi determinante para o desenvolvimento da LD, mas parece ser um fator preditivo para sua manifestação. Similarmente, portadores do A para o SNP -238 G>A apresentaram progressão mais rápida à LD (143). Contudo, ambos estudos não avaliaram os subtipos de LD e os resultados foram baseados em um pequeno tamanho amostral. Posteriormente, de forma contrária aos prévios achados, Tarr e Telenti (2007) (144) não observaram associação entre TNF- α -308 G>A (rs361525) e lipoatrofia.

5.2. Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR)

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) são fatores de transcrição que integram uma superfamília de receptores nucleares com importante função metabólica. Os PPARs são dependentes de ligantes que regulam a expressão gênica através da ligação aos elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma (PPREs, do inglês, *peroxisome proliferator response elements*) na região promotora de cada gene alvo. Cada receptor liga-se ao seu PPRE formando um heterodímero junto com o RXR (PPAR:RXR). Quando um agonista é unido nesta estrutura, a conformação do PPAR se modifica e torna-se estável, criando uma fenda que possibilita a ligação de coativadores transcrpcionais. O resultado é o aumento da transcrição gênica (145).

O grupo dos PPARs são formado por três proteínas, codificadas por genes diferentes: PPAR γ , PPAR α , and PPAR δ . Apesar das similaridades estruturais, cada isoforma difere na distribuição tecidual, funções fisiológicas, afinidade pelos PPREs e interação com inúmeros cofatores. O PPAR γ é amplamente expresso nos adipócitos do tecido adiposo branco e marrom onde atua como regulador *master* da adipogênese. Assim, suas funções estão ligadas a vários processos celulares, incluindo, fundamentalmente, a diferenciação de adipócitos (maturação, armazenamento e mobilização), homeostase da glicose e inflamação (146). Os

agonistas biológicos para o PPAR γ incluem vários ácidos graxos e outros lipídios (147). De forma sintética, os eicosanoides, os fibratos e as tiazolidinedionas (TZDs) são importantes ativadores do PPAR γ (148). As TZDs são utilizadas há muito tempo como sensibilizadores de insulina no tratamento da DM2 (149).

O gene *PPARG* (3p25.2) possui promotores separados que geram diferentes isoformas de mRNA. A isoforma PPAR γ 2 é a mais potente ativador transcricional e expressa exclusivamente no tecido adiposo (146). Algumas variantes no gene *PPARG2* já foram relatadas, sendo o SNP Pro12Ala (rs1801282) *missense* o mais estudado e associado a DM2, IMC, obesidade e fenótipos relacionados na população geral (150–154). Nos indivíduos com HIV, no entanto, as pesquisas são escassas e com resultados controversos (155–158).

5.3. Proteína de ligação ao elemento regulatório de esteróis (SREBP)

A família de proteína de ligação ao elemento regulatório de esteróis (SREBP, do inglês *sterol regulatory element binding proteins*) consiste em elementos regulatórios pró-adipogênicos cuja função é controlar a síntese e a oxidação de ácidos graxos através da regulação de genes envolvidos na biossíntese do colesterol no fígado (159,160). Os SREBP são sintetizados como precursores ancorados na membrana plasmática do retículo endoplasmático (RE) intimamente ligados a proteína ativadora de clivagem SCAP (do inglês *SREBP cleavage activating protein*) que interage com a proteína induzida por insulina INSIG (do inglês, *insulin induced gene*). Esta, por sua vez, mantém o complexo SREBP-SCAP confinado à membrana do RE. Quando as concentrações de esteróis estão altas, a SCAP se associa fortemente com INSIG e promove maior interação entre SREBP-SCAP, mantendo-os ancorados no RE. Ao passo que quando os níveis de esteróis diminuem e aumentam os de insulina, a interação INSIG-SCAP enfraquece, permitindo que a SCAP desloque o precursor SREBP para o Complexo de Golgi. Nesta organela, a forma inativa de SREBP sofre a primeira clivagem pela protease do sítio-1 (S1P, do inglês *site 1 protease*) dentro da alça luminal hidrofílica. Depois, é submetida a segunda clivagem pela protease do sítio-2 (S2P, do inglês *site 2 protease*) que corta o domínio NH₂-terminal dentro do primeiro fragmento transmembrana, liberando a proteína SREBP na sua forma nuclear (nSREBP). O domínio bHLH-LZ remanescente gera um novo tipo de sinalização

nuclear que permite a ligação da proteína importina, cuja função é movimentar a nSREBP para o núcleo. No núcleo, a forma nSREBP liga-se a sequência de nucleotídeos do elemento regulador do esteroide (SRE, do inglês *sterol regulatory element*), no gene da enzima HMG-Coa-redutase, promovendo sua transcrição e consequente biossíntese do colesterol (161).

O gene *SREBF1* (17p11.2) codifica dois transcritos: SREBP1a e SREBP1c. A isoforma SREBP1c é altamente expressa no TAB, fígado, músculo esquelético, glândula adrenal e cérebro. É regulada transcricionalmente pelos carboidratos da dieta. Assim, altos níveis de glicose ativam esse fator de transcrição que, por sua vez, atua na glicólise (162) (Xu X et al. 2013). Curiosamente, o tecido adiposo de indivíduos obesos e diabéticos apresenta menor expressão do mRNA SREBP1c quando comparado a indivíduos magros. Estudos com modelos animais concordam com esses resultados, pois a expressão da SREBP1c está reduzida no tecido adiposo de camundongos ob/ob pré-diabéticos. A explicação pode estar na resistência à insulina observada na obesidade e no fato de que a perda de peso melhora a sensibilidade à insulina e aumenta a expressão da SREBP1c (161). Atua, também, na adipogênese pois produz ligantes endógenos para o PPAR- γ e lipogênese, promovendo a síntese de ácidos graxos. A superexpressão de SREBP1c no fígado pode levar ao acúmulo de lipídios e causar lipotoxicidade, que em consequência, também é responsável pela resistência à insulina (163).

Alguns agentes ARVs podem regular negativamente os níveis de mRNA de *SREBF1* durante a adipogênese (164) provocando lipoatrofia através da perda de adipócitos e redução de tamanho (165). Bastard *et al.* (2002) observaram um aumento em torno de 6 vezes na proteína SREBF1 em biópsias de tecido adiposo de pacientes infectados pelo HIV usando IP. A exposição dos adipócitos aos IPs sequestra o SREBF1 na membrana do retículo endoplasmático impedindo sua clivagem para a forma ativa e entrada no núcleo da célula. Assim, parece que o aumento da concentração de SREBF1 no lúmen é de uma proteína inativa, sem atividade de induzir fatores de transcrição da adipogênese. Isso explica a diminuição de *C/EBP β* , *PPARG* e *C/EBP- α* observada, cujo resultado é a RI e lipoatrofia periférica. Outra possível explicação é que o uso de ITRNN, como o efavirenz (EFV), causa efeitos negativos na diferenciação dos adipócitos e na redução do acúmulo de triglicérides

(TG). O EFV promove efeitos antiadipogênicos pela regulação negativa dos fatores de transcrição adipogênicos (SREBF1, PPARG e C/EBP- α) e diminui os níveis de leptina e adiponectina, que por sua vez prejudicam a sensibilidade à insulina (164).

Polimorfismos no *SREBF1* foram investigados em decorrência da sua associação com RI e DM2. A variante G do SNP rs2297508 (3322 C>G) mostrou uma ligeira associação com hiperglicemia e médio risco para DM2 em duas grandes coortes indivíduos HIV-negativos Dinamarqueses (163). Em um estudo funcional com mesma variante no gene *SREBF1*, homocigotos CC para o SNP 3322 C>G mostraram maior taxa na síntese de colesterol do que os portadores de CG ou GG, mas não observaram efeitos deste polimorfismo nos níveis de colesterol plasmático (166). Em pessoas vivendo com HIV, foi relatado que usuários de IPs portadores do alelo C apresentaram aumento nos níveis de colesterol plasmático. O polimorfismo 3322C>G *SREBF1c* é uma mutação sinônima, onde a modificação de nucleotídeos não resulta em alteração de aminoácidos. Assim, é possível que diferentes padrões de expressão gênica possam ocorrer por modificação do dobramento previsto do RNA mensageiro (RNAm), concentrações de RNA de transferência (RNAt) possam ser variáveis para diferentes codons ou que outro SNP em desequilíbrio de ligação com essa variante possa ser responsável pela associação observada (167).

5.4. Gene associado a obesidade e massa gorda (*FTO*)

O gene associado a obesidade e massa gorda (*FTO*,16q12.2) foi identificado em 2007, quase simultaneamente por dois grupos de pesquisa, para a DM2 através do seu efeito no IMC e fenótipos relacionados (168,169). Os papéis fisiológicos e os mecanismos celulares executados pela proteína codificada pelo *FTO* permanecem obscuros. Acredita-se que execute um papel crucial no controle do consumo energético, pois é altamente expresso no núcleo arqueado do hipotálamo, onde reside o controle do apetite e metabolismo energético. Algumas evidências também apontam a relação do *FTO* com resposta a saciedade, adipogênese, gasto energético e na função mitocondrial dentro do músculo esquelético (170).

Os íntrons 1 e 2 do *FTO* abrigam 89 variantes em forte desequilíbrio de ligação já associadas com ganho de peso, gordura corporal, IMC, CC e escolha alimentar.

Deste conjunto de polimorfismos, o SNP rs9939609 T>A no íntron 1 foi o mais extensamente investigado (171). A maioria dos achados de associação com IMC são em adultos Euro-descendentes (172–176) e crianças/adolescentes (177–180).

Até o momento, sabe-se que o *FTO* codifica uma proteína nuclear pertencente a família das oxigenases 2-oxoglutarato (2-OG) com função demetilase de DNA fita simples. As enzimas oxigenases estão envolvidas no reparo de DNA, metabolismo de ácidos graxos, modificações pós-traducionais, splicing, degradação e tradução de RNA. Utilizam Fe(II) não-heme como co-fator e oxigênio e 2-OG como co-substrato, produzindo succinato e dióxido de carbono como subprodutos. Análises de alinhamento demonstraram que a sequência do *FTO* é homóloga a enzima AlkB da *E. Coli*, cuja função primordial é o reparo oxidativo de bases alquiladas (metil) de DNA e RNA (181). Subsequentemente, Wu *et al.* (2010) (182) mostraram que o *Fto* é um coativador transcricional que acentua a transcrição dos C/EPBs na região promotora de genes não metilados e naqueles reprimidos por metilação, direcionando para um papel epigenético do *Fto* no controle da adipogênese. Esse grupo de pesquisadores também mencionou a atividade endonuclease do *Fto*.

Merkestein *et al.* (2015) (183) demonstraram que a atividade desmetilase do *FTO* ocorre durante os processos iniciais de adipogênese, particularmente durante a expansão clonal mitótica - MCE (do inglês, *mitotic clonal expansion*). No seu estudo com modelos experimentais, camundongos *FTO knockout* suprimiram a adipogênese antes da MEC, enquanto a superexpressão do *FTO* aumentou a expressão do *PPARG* e da proteína alfa estimuladora de ligação a CCAAT (*C/EBP- α* , do inglês *CCAAT-enhancer-binding protein alpha*). Os autores demonstraram que os efeitos dos SNPs no gene *FTO* na suscetibilidade à obesidade não são devidos a alteração da sua expressão, mas sim da alteração na expressão do gene *RUNX1T1* (do inglês, *RUNX1 partner transcriptional co-repressor 1*), adjacente ao *FTO*. O *RUNX1T1* é um fator de transcrição relacionado à adipogênese que existe em duas isoformas de splicing: longa (L) e curta (S). O gene *FTO* atua regulando o splicing do gene *RUNX1T1*, favorecendo a transcrição da isoforma S, que propicia a ativação de *PPARG* e da proteína beta estimuladora de ligação a CCAAT (*C/EBP- β* , do inglês *CCAAT-enhancer-binding protein beta*), ambos diretamente associados a maior estimulação à adipogênese e à proliferação de adipócitos. A isoforma L prejudica a

adipogênese, uma vez que se liga ao C/EBP- β e este, por sua vez, impede a ligação de *RUNX1T1* ao DNA.

Outra atuação do *FTO* está vinculado ao processamento dos precursores SREB1c e *CIDEA* (indutor de morte celular pelo fator de fragmentação de DNA α -efetor c, do inglês *cell death-inducing DFFA - DNA fragmentation factor- α -like effector c*), dois importantes fatores de transcrição que controlam acúmulo de lipídios nos hepatócitos. Células do tipo HepC2 com *FTO* superexpresso foram cultivadas por 24 horas em meio de cultura com ácidos graxos livres, ácido oléico e palmítico. O aumento na expressão do *FTO* favoreceu o acúmulo de triglicerídeos (TG). Ao passo que quando inibidas, as células HepC2 submetidas aos mesmos processos promoveram diminuição no armazenamento hepatocelular de TGs. Estes resultados mostram que o *FTO* controla o conteúdo de TG por elevar *de novo* a lipogênese ou síntese de ácidos graxos em hepatócitos. A hipótese está baseada na atividade desmetilase do *FTO* que parece modular as proteínas SCAP e S2P, aumentando a maturação da SREB1c que, uma vez ativa, se desloca para o núcleo e aumenta a expressão de *CIDEA* – responsável por favorecer o estoque de lipídios nos hepatócitos (184) (Chen A et al. 2018).

Até o momento, temos conhecimento de apenas duas investigações relacionando SNPs no *FTO* e distúrbios metabólicos em pessoas co-infectadas pelo vírus da hepatite C (HCV) e o HIV. O primeiro trabalho, de Pineda-Tenor *et al.* (2014) (185), os indivíduos portadores da variante A tiveram maior chance de apresentar obrepeso, resistência à insulina, fibrose, esteatose e menor resposta virológica sustentada após tratamento para o HCV. Na segunda pesquisa, Núñez-Torres *et al.* (2017) (186) observaram que o SNP rs9940128 (G>A) no *FTO*, que está em alto desequilíbrio de ligação com rs9939609, foi associado com doença hepática gordurosa (FLD) em PVHIV com IMC normal. A frequência do genótipo AA entre os pacientes com FLD foi quase duas vezes maior do que nos indivíduos sem FLD. Todavia, nenhuma destas pesquisas investigou a associação entre o *FTO* e a LD. Desconhecemos trabalhos na literatura científica que tenham verificado efeitos dos ARVs na expressão e atividade do gene *FTO*.

Contudo, parece que o *FTO* não é o responsável pela susceptibilidade ao ganho de peso e complicações metabólicas mas sim os genes *IRX3* (do inglês, *Iroquis homeobox 3*) e *IRX5* (do inglês, *Iroquis homeobox 5*) que são transcritos na fita reversa do *FTO* (187). O risco para obesidade está associado a um nucleotídeo específico no SNP rs1421085 (T>C) no gene *FTO*, que apresenta alto desequilíbrio de ligação com o polimorfismo rs9939609. A presença do alelo C, aumenta a expressão do *IRX3* e *IRX4* que, por sua vez, estimulam a atividade de precursores de adipócitos mesenquimais e diminuem a termogênese mitocondrial (reprime a proteína desacopladora 1 - UCP1, do inglês *uncoupling protein 1* e o co-ativador 1 α PPAR- γ - PGC-1 α , do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), favorecendo o armazenamento de lipídios no TAB. Por outro lado, o alelo T inibe a expressão de *IRX3* e *IRX5* restaurando a termogênese mitocondrial e interrompendo o acúmulo de gordura de forma excessiva (188). Esses resultados foram descritos como “caso resolvido”, onde o "criminoso" direto não é o gene *FTO*, mas são os genes *IRX3* e *IRX5*. Os "locais do crime" são os pré-adipócitos. O "crime" é que eles inibem a queima de lipídios e o metabolismo energético (189).

5.5. Sirtuina 1 (*SIRT1*)

Investigações científicas mostram que a restrição calórica (RC), definida como uma intervenção nutricional de redução da ingestão energética (20-50%), sem desnutrição, é capaz de diminuir o peso corporal total e massa gorda, minimizar níveis plasmáticos de marcadores do perfil lipídico (como colesterol total e triglicerídeos), atenuar mediadores de inflamação (proteína C reativa, interleucina-6, fator de necrose tumoral) e melhorar a homeostase da glicose, inibindo rotas inflamatórias ao mesmo tempo que ativa múltiplas vias moléculas que promovem diminuição da lipogênese (190,191).

Em organismos inferiores, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila Melanogaster*, esses efeitos são mediados pelo regulador de silenciamento da informação 2 (Sir2, do inglês *Silent Information Regulator 2*). Os efeitos desta proteína no aumento do tempo de vida ocorrem por mecanismos de regulação downstream sob determinadas condições em tecidos específicos, enquanto que sua inativação encurta este período. Uma vez que a atividade enzimática da *Sir2*

como desacetilase de histonas dependente de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) está conectada com a detecção do estado energético celular (nutrientes), esta proteína é altamente conservada diversas espécies (190) e os genes ortólogos em eucariotos superiores são conhecidos como sirtuínas - SIRTs (191), do inglês *Silent Information Regulator Two proteins* (192).

As sirtuínas (SIRTs) são uma classe de enzimas com atividade de desacetilases de histonas (HDACs classe III) e não histonas, ADP-ribosiltransferase, desuccinilases e demanólises, categorizadas pelo domínio de ligação catalítico dependente de NAD⁺ (193). Em mamíferos, sete SIRTs foram identificadas (SIRT1-7) e ainda que apresentem o mesmo domínio catalítico, variam em sua atividade enzimática e localização celular. As SIRTs 1, 6 e 7 são predominantes no núcleo. A SIRT1, particularmente, está associada a eucromatina e pode se deslocar para o citosol quando necessária para atuação em genes alvos. A SIRT2 encontra-se no citoplasma. As SIRTs 3, 4 e 5 são mitocondriais (192).

A função mais bem elucidada das SIRTs é sua capacidade de reverter a acetilação de proteínas tipo histonas, influenciando diretamente na estrutura dos nucleossomos e, portanto, na transcrição gênica (194). Além disso, são sensores energéticos celulares, uma vez que dependem dos níveis de NAD⁺ para executar suas atividades biológicas. Essa capacidade de controlar sistemas em um ambiente *redox* faz com que as SIRTs possam neutralizar danos oxidativos associados a doenças comuns do envelhecimento. Também são fundamentais na regulação da homeostase celular, especialmente no que tange o metabolismo, inflamação, estresse oxidativo e senescência. Logo, acredita-se que a ativação das sirtuínas possa ter um papel central em doenças metabólicas como DM2 e obesidade, assim como em doenças neurodegenerativas associadas com o envelhecimento. Isso se deve, em parte, à capacidade das SIRTs em estimular a atividade das mitocôndrias, prevenindo mudanças subjacentes a diversas enfermidades (195).

A atividade desacetilase remove grupos acetila de resíduos proteicos acetil-lisina modificados. Tal modificação pós-traducional começa com a hidrólise de NAD⁺. Para cada acetil-lisina desacetilada, uma molécula de NAD⁺ é clivada formando dois produtos: O-acetil-ADP-ribose (O-AADPR) e a nicotinamida (NAM); liberando o

substrato desacetilado. Pouco se sabe sobre O-AADPR, mas alguns trabalhos insinuam que este pode formar complexos com a SIRT que o produziu, possivelmente ocasionando sua inibição. Assim, mudanças intracelulares na razão NAD⁺/NADH impactam diretamente na atividade das SIRTs: NAD⁺ ativa enquanto que NADH inibe. Quando a disponibilidade energética é baixa, alto nível de NAD⁺ e baixo de NADH ativam as SIRTs ao passo que, quando a energia celular está alta, a relação NAD⁺/NADH será baixa e as SIRTs também terão sua atividade reduzida (196).

O gene homólogo à Sir2 em humanos foi nomeado de sirtuínas (SIRTs). Sua popularidade cresceu quando foi identificada sua capacidade de imitar a RC e retardar o aparecimento de doenças ligadas ao envelhecimento. Em leveduras, a RC diminui os níveis de NADH, aumentando a atividade da Sir2. Camundongos privados de alimentos aumentam os níveis de NAD⁺ no fígado em mais de 50%, favorecendo a atividade da *SIRT1* (196,197). Também se evidenciou que compostos naturais como o resveratrol (RVS) pode induzir a atividade das SIRTs em modelos de organismos inferiores (198).

A sirtuína 1, codificada pelo gene *SIRT1* (10q21.3) é a integrante mais bem caracterizada do grupo das SIRTs. Já foi comparada sua atuação na regulação do metabolismo da gordura e da glicose em consequência de alterações nos níveis de energia (199) bem como da inflamação (200) e do estresse oxidativo (201). Diversos estudos já mostraram a habilidade da *SIRT1* em mimetizar os efeitos da RC (190,198,202–204). Algumas evidências confirmam essa hipótese: primeiro, camundongos *knockout* para *SIRT1* sob RC mostram apenas algumas mudanças metabólicas desencadeadas pela privação alimentar; desta forma, a atividade da *SIRT1* parece ser essencial (190). Segundo, a *SIRT1* controla a adipogênese e a mobilização de gordura no TAB através da sua ligação e repressão do *PPARG* que, nesta situação, passa a reprimir genes alvo (197). Terceiro, a *SIRT1* é capaz de induzir a secreção de insulina em células β -pancreáticas. A influência na homeostase da insulina ocorre via ligação direta ao promotor do gene da proteína desacopladora mitocondrial 2 (*UCP-2*, do inglês *uncoupling protein 2*) e inibição da sua expressão. A supressão da *UCP-2* causa um aumento na produção de ATP e secreção de insulina. Por fim, a *SIRT1* também atua no equilíbrio da glicose no fígado. Os hepatócitos

respondem aos sinais de jejum com aumento da gliconeogênese e diminuição da glicólise. Essas respostas, no entanto, são acentuadamente enfraquecidas quando a *SIRT1* é *knocked down*. A gliconeogênese regulada pela *SIRT1* nesse órgão ocorre pela desacetilação e ativação do receptor co-ativado 1- α (*PCG1- α*) – regulador chave da biogênese mitocondrial (205). Outrossim, a capacidade da *SIRT1* em desacetilar o fator nuclear *kappa* B (NF-Kb) diminui a sua expressão e, conseqüentemente, sua ação pró-inflamatória (Yang H et al. 2012). Já foi mostrado que o envelhecimento está associado a ativação permanente do sistema NF-Kb (206). Ainda, Mattagajasingh *et al.* (2007) (201) demonstraram que a *SIRT1* é capaz de melhorar a função endotelial ao promover relaxamento vascular através da desacetilação do óxido nítrico sintase endotelial – eNOS (do inglês, *endothelial nitric oxide synthase*) (201,207).

Também é importante citar a relação coordenada entre a *SIRT1* e a proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK), outro importante mediador metabólico. A via da AMPK é ativada através da auto-fosforilação da AMPK (pAMPK) na treonina 172. Quando a relação AMP/ATP intracelular aumenta devido ao estresse metabólico, a AMPK é fosforilada. Posteriormente, as moléculas alvo *downstream* são ativadas, promovendo o catabolismo. Porém, quando a relação AMP/ATP cai, a AMPK aumenta o anabolismo (208). Em camundongos, Cantó *et al.* (2009) (209) foram capazes de demonstrar que a ativação de AMPK estimula a atividade da *SIRT1* através do aumento nos níveis intracelulares de NAD⁺, co-substrato fundamental para seu mecanismo energético. Por isso, a *SIRT1* é considerada intermediador do estado metabólico celular, já que sua atividade é dependente concentração intracelular de NAD⁺.

As implicações da *SIRT1* no curso clínico de patologias virais já foram ilustradas (210). Na infecção pelo HIV-1, a participação da *SIRT1* é ampla. A proteína Tat é um substrato para atividade desacetilase da *SIRT1*. Assim, *SIRT1* pode desacetilar a proteína Tat do HIV-1 e induzir ativação transcricional proviral, levando a hiperativação de células T. Contudo, ao contrário, a proteína Tat pode inibir a atividade da *SIRT1* através da ligação ao sítio catalítico da enzima, inibindo-a. Quando isso ocorre, a *SIRT1* perde a capacidade de desacetilação da lisina 310 (K310) na subunidade p65 no NF-Kb e desencadeia a cascata de ativação de NF-Kb, o que

intensifica a excitação de LT-CD4+ favorecendo a replicação do HIV-1 (211,212). Análises *in vitro* e de biologia molecular demonstraram que células em cultivo quando tratadas com a proteína Tat, mostraram uma redução significativa nos níveis de ativação de AMPK o que conseqüentemente reduziu a ativação da *SIRT1* e aumento da transativação da região LTR do HIV-1, potencializando sua replicação. Esse resultado indica que a participação da *SIRT1* na replicação do HIV-1 é dependente da via de sinalização AMPK (213).

Compostos ativadores naturais, como o resveratrol (RVS) (214) e pequenas moléculas sintéticos das SIRTs podem ser uma nova classe de agentes terapêuticos (200). Os efeitos do RVS como simulador da restrição calórica via ativação do sistema das SIRTs já foi demonstrado em estudos experimentais (198,215–218). Ensaio clínicos avaliando a suplementação de RVS como indutor da atividade das *SIRT1* ainda são escassos e os trabalhos publicados apresentam dados contraditórios (220–228).

Dado o múltiplo envolvimento da *SIRT1* no controle da homeostase metabólica em diversos tecidos, variantes genéticas na *SIRT1* podem alterar sua expressão e atividade, predispondo indivíduos à obesidade e comorbidades associadas (229). Nessa perspectiva, quatro SNPs apresentam relevância: rs7895833 A>G e 12049646 T>C (ambos localizados na região promotora), rs12413112 G>A no íntron 4 e o rs2273773 T>C no éxon 5. Um estudo baseado numa grande coorte de Holandeses (n = 3575), encontrou que indivíduos portadores do genótipo TC para variante rs2273773 T>C tiveram 0,5 Kg/m² a mais que os portadores homocigotos para o alelo selvagem T (230). Em Japoneses, Shimoyama *et al.* (2011) (231) observaram que os SNPs rs7895833 G>A e rs2273773 T>C foram associados a parâmetros laboratoriais e antropométricos. Quando a amostra foi estratificada por sexo, a variante rs7895833 G>A foi relacionada com adiposidade em homens: os portadores do alelo polimórfico A (GA + AA) em comparação com portadores do alelo selvagem G (GG) apresentaram maior IMC e razão de gordura corporal. Esta última variável também foi relacionada com o SNP rs2273773 T>C em homens, na qual os indivíduos TT também exibiram maior razão de gordura corporal e hiperglicemia. É importante observar que na população Japonesa, o alelo G é selvagem, enquanto em Caucasianos é o

polimórfico. Essa diferença na frequência alélica pode explicar por que os japoneses apresentam obesidade menos pronunciada em comparação aos caucasóides.

Estudos de associação genômica falharam em encontrar uma relação entre os SNPs rs7895833 (A>G), 12049646 (T>C), rs12413112 (G>A) e rs2273773 (T> C) na *SIRT1* com obesidade e fenótipos relacionados. Weyrich *et al.* (2008) (232) em um estudo transversal, genotiparam tagSNPs na *SIRT1* (rs730821 A> G, rs12413112 G> A, rs7069102 G> C, rs2273773 T> C) a fim de avaliar a associação entre gasto energético e características metabólicas em indivíduos pré-diabéticos (história familiar tipo 2 e BMI > 27 Kg/m²). Os genótipos não diferiram significativamente quanto ao IMC, gordura corporal total e circunferência da cintura-quadril, mas o gasto energético basal foi significativamente menor em portadores menores de alelo A do rs12413112. Essa variante comum foi analisada em um subgrupo de participantes submetidos a intervenção no estilo de vida por 9 meses. Após o seguimento, não houve associação entre rs12413112 e IMC ou peso. Em contraste, os indivíduos portadores do alelo A foram menos responsivos à glicose plasmática em jejum. Assim, parece que a variante rs12413112 A afeta negativamente a expressão de *SIRT1*, prejudicando a sensibilidade à insulina no fígado (232). Meneguetto *et al.* (2016) (233) não encontraram diferença no genótipo e na frequência alélica de rs7895833 A> G SNP *SIRT1* entre indivíduos adultos brasileiros com síndrome metabólica (SM) e aqueles sem (P = 0,24). A frequência menor do alelo G foi de 0,28 em indivíduos com SM e 0,265 em não-SM.

Achados na mesma direção foram publicados por Liguori *et al.* (2014) (234), que analisaram cinco variantes comuns na *SIRT1*, incluindo rs12413112 (G> A), e nenhum polimorfismo foi associado com obesidade mórbida em uma coorte de indivíduos italianos (IMC = 46,5 ± 0,23 Kg/m²). Um estudo em pacientes turcos relatado por Kilic *et al.* (2014) (207) não encontrou associação entre o SNP rs7895833 (A> G) e risco para doença cardiovascular (DCV); no entanto, o alelo mutante T para o SNP rs2273773 (C> T) aumenta em 1,9 vezes o risco para DCV quando comparado ao alelo tipo C selvagem. Os autores também encontraram um aumento no nível de *SIRT1* que levou à especulação de que as modificações epigenéticas mediadas pela *SIRT1* sejam um mecanismo compensatório para proteger as pessoas dos efeitos nocivos das DCV. Um estudo longitudinal sobre DM2 e obesidade em indianos Pima

não encontrou a contribuição de rs7895933 no desenvolvimento de DM2. Outros SNPs em *SIRT1* avaliados neste estudo não foram associados com IMC ou percentual de gordura corporal (235).

Por outro lado, estudos mostraram efeitos opostos, uma vez que o alelo raro de variantes genéticas pode ser protetor em vez de risco à obesidade grave em populações não infectadas pelo HIV, como descrito por Clark *et al.* (2012) (236) em um estudo de caso-controle com indivíduos caucasianos obesos e não obesos. Os autores descobriram que cada alelo raro de rs12413112 G>A na *SIRT1* estava associado a um menor IMC no grupo magro. Outro SNP, o alelo raro de rs12049646 T>C também foi associado com redução do IMC apenas em homens da Espanha, onde portadores do alelo C tiveram uma diferença média de 0,82 Kg/m² em relação ao genótipo TT. As análises experimentais realizadas pelos autores indicam que a troca de nucleotídeos C>T resulta em menor interação com fatores de transcrição ou proteínas nucleares e indicou que outros estudos são necessários para esclarecer a interação entre polimorfismos da *SIRT1* e dimorfismo sexual (237). Como a *SIRT1* tem efeitos pleiotrópicos que são tecido-específicos, especula-se que a expressão generalizada da *SIRT1* possa propiciar o envelhecimento. Por esse motivo, Zillikens *et al.* (2009) (238) investigaram como as variantes genéticas na *SIRT1* poderiam se comportar em relação ao risco de obesidade em duas grandes populações independentes de idosos caucasianos holandeses. Os resultados mostraram que os portadores de ambos os alelos raros para rs7895833 A>G e rs1467569 G>A apresentaram menor IMC ao longo do tempo, o que representa uma redução de 9-11% no risco de sobrepeso e 13-18% menor risco de obesidade quando comparado aos portadores AA e GG-homozigotos, respectivamente.

Pesquisas envolvendo a influência de polimorfismos genéticos na *SIRT1* com LD e alterações metabólicas correlacionadas em PVHIV em uso regular de TARV ainda não foram analisadas. Ao que se sabe, este é o primeiro estudo a investigar esta possível associação. A ação dos fármacos antirretrovirais sobre a expressão e atividade da *SIRT1* tampouco já foi avaliada.

6 MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DE FÁRMACOS (MTF)

Apesar da eficácia dos novos fármacos ARVs e menor potencial tóxico, alguns pacientes não atingem a supressão viral. Por isso é importante acompanhar os níveis de fármacos circulantes a fim de detectar pacientes em falha terapêutica e iniciar a terapia de resgate, bem como assegurar o sucesso da TARV mantendo a resposta virológica sustentada e restaurando o sistema imune (239). Conceitualmente, o monitoramento terapêutico de fármacos (MTF) é uma rotina clínica de aferição dos níveis de fármacos em matrizes biológicas (plasma, geralmente) a fim de garantir que fiquem dentro da faixa ou janela terapêutica (240). O processo de MTF está baseado na relação entre a dose e a concentração plasmática ou os efeitos terapêuticos. Por isso, quanto mais afastada a concentração plasmática de um fármaco estiver da faixa terapêutica, maior será a chance de ineficácia clínica. Ao passo que quanto mais próxima da concentração ideal um fármaco estiver, mínimas serão as oportunidades de falha terapêutica (Figura 5) (241,242).

Geralmente, os argumentos a favor do MTF incluem fármacos que apresentem correlação direta entre eficácia e toxicidade, variabilidade farmacocinética, estreita faixa terapêutica e dificuldade em avaliar clinicamente efeitos terapêuticos ou tóxicos. Os ARVs preenchem a maioria destes critérios (243); sendo o primeiro bem estabelecido para os fármacos da classe dos ITRNN e IP (244–246). Contudo, os ITRNs não são candidatos para o MTF por serem pró-fármacos e necessitarem de metabolização intracelular antes de se tornarem metabólitos trifosforilados ativos (247).

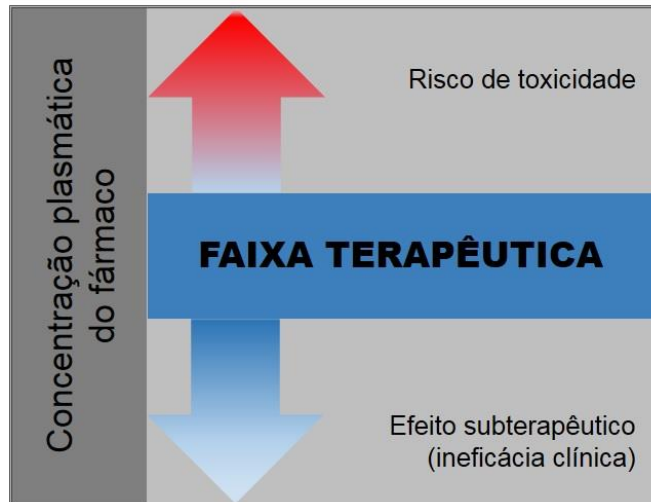


Figura 5. Conceito de faixa terapêutica.

Adaptado de Kang J-S and Lee M-H. Overview of Therapeutic Drug Monitoring. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 2009. (240)

O maior objetivo do monitoramento das concentrações plasmáticas dos ARV, além da supressão viral e reconstituição imune, é, sem dúvida, controlar o contato exacerbado com os antirretrovirais, já que as interações farmacocinéticas destes com outros medicamentos tem grande impacto clínico e requerem ajuste de dose. Os ARVs interagem com contraceptivos hormonais, antituberculínicos, antidepressivos, anti-hipertensivos, analgésicos, antimaláricos, corticoides, estatinas e muitos outros medicamentos (33). Dos ITRNNs e IPs, o efavirenz (EFV) e o atazanavir (ATV), respectivamente, são amplamente utilizados nos esquemas ARVs (248,249). A correlação entre a concentração plasmática de ambos os fármacos e a eficácia clínica já foram comprovadas (250,251). Por isso, foi estabelecido o intervalo terapêutico do EFV é de 1,0 – 4,0 µg/mL (meia vida longa de 52-76 horas após uma dose e de 40-55h após uso contínuo) (252) e do ATV é 150 – 800 µg/mL (meia vida média de 8,35 horas) (253,254). Níveis plasmáticos elevados do EFV foram associados com efeitos severos no sistema nervoso central, como tontura, sonolência, sonhos vívidos e dificuldade de concentração, em vários grupos étnicos. Em torno de 20% a 50% dos pacientes em uso de ATV irão desenvolver hiperbilirrubinemia. Destes, 6% podem sofrer icterícia (248,255) (Tozzi V 2010; Asensi V et al. 2015).

Rotineiramente, a genotipagem de resistência viral e o monitoramento do tratamento são parte do cuidado médico em países desenvolvidos como ação tanto

para oportunizar uma terapia individualizada (ajuste de dose) quanto assegurar a aderência do paciente (256,257). Não obstante, o acompanhamento dos níveis plasmáticos dos fármacos ARVs é de particular importância para grupos especiais como crianças, gestantes e idosos (258–263). Em países de média e baixa renda esta prática é eventual, pois há inúmeros desafios na implementação do MTF, tais como a indispensável presença de pessoas capacitadas para realizar a coleta do plasma, transporte do material biológico, necessidade de armazenamento e transporte adequado (264). (Ainda, é requerida infraestrutura laboratorial complexa em centros especializados, o que pode dificultar o acesso dos pacientes (265).

Em locais onde o MTF não está disponível, a OMS sugere o acompanhamento da terapia através do relato do paciente acerca de efeitos adversos, parâmetros imunológicos (contagem de LT-CD4+) e virais (nível RNA do HIV-1) (266). Porém, as informações obtidas através desses critérios apresentam baixa sensibilidade e especificidade em detectar real falha terapêutica, pois os pacientes nesta condição só serão diagnosticados quando apresentarem doença oportunista ou imunodeficiência grave, apesar da resposta virológica adequada (264). Nesse cenário se enquadra o Brasil que, apesar de ser referência mundial nas políticas públicas de atendimento, cuidado e fornecimento gratuito da TARV ao portador de HIV, não possui o MTF implementado na prática clínica de atenção as PVHIV. Por isso, a utilização de metodologias práticas, acessíveis e simples é urgente como estratégia importante para regiões com recursos limitados (265,267,268).

Os parâmetros farmacocinéticos usados para quantificar a exposição do indivíduo a um dado fármaco são apresentados como área sob a curva (AUC, do inglês *area under the curve*), pico máximo de concentração plasmática (C_{max} , do inglês *maximun or peak plasma concentration*) e de concentração mínima (C_{trough} do inglês, *trough concentration*). Este último representa o nível mínimo do fármaco durante um intervalo entre duas doses (também conhecido como “período do vale”) e é o indicador mais aceito para o MTF dos fármacos ARVs (256). Para que o MTF seja válido e limitar as variações farmacocinéticas entre a última dose do medicamento e a coleta de sangue, é fundamental atentar para o horário da coleta (preferencialmente quando a concentração do fármaco estiver o mais próximo do C_{trough}), via de administração,

dose, tempo de tratamento e a utilização de outros medicamentos concomitantemente (260).

A determinação plasmática dos fármacos ARVs é realizada por métodos sensíveis baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) com detecção ultravioleta (HPLC-UV, do inglês *high performance liquid chromatography with ultravioleta detection*) e espectrometria de massa (HPLC-MS, do inglês *high performance liquid chromatography with mass spectrometry*; LC-MS/MS e LC-MS). Ao utilizar essa metodologia, cada laboratório precisa desenvolver e validar seus próprios ensaios. Além da ausência de *kits* comercialmente disponíveis para o MTF, a logística para coleta de sangue, armazenamento adequado, cumprimento de orientações sanitárias para o transporte de amostras biológicas e risco de exposição a patógenos tornam essa prática invasiva, laboriosa e cara, posto que requer treinamento de profissionais para gerenciamento de riscos e processamento da amostra, inúmeros aparatos para coleta e laboratórios bem equipados (269–271).

Com o intuito de superar esses obstáculos, outras matrizes biológicas foram propostas, visando estratégias de coleta mais acessíveis e de simples armazenamento, como o cabelo (272,273), a saliva (274,275)(Gras A et al. 2011; Malamud D 2011) e a mancha de sangue seco em papel ou DBS (do inglês, *dried blood spot*) (276).

6.1. Mancha de sangue seco em papel (DBS)

A técnica de DBS é realizada através da punção capilar da ponta do dedo, coleta de gotas de sangue que são embebidas em papel filtro e mantidas em temperatura ambiente para secagem. Não há necessidade de flebotomia, acessibilidade ao monitoramento terapêutico em regiões remotas, facilidade na coleta (passível de ser realizada pelo próprio paciente), armazenamento e transporte, além de reduzir a produção de resíduos biológicos (276–278). A recomendação do método DBS para o MTF de fármacos ARVs é bem estabelecida (54,61,267,279–286). A substituição do método convencional para a coleta domiciliar do DBS mostrou uma redução financeira de 43% para pacientes da hemato-oncológicos e 61% para os da

nefrologia (287) e sua aplicação tem sido encorajada como opção alternativa ao plasma em locais com infraestrutura laboratorial restrita, comumente encontrado países de baixa e média renda (264).

Materiais biológicos humanos expostos ao papel absorvente e/ou com capacidade de neutralização/inativação/esterilização são consideradas amostras isentas de risco de contaminação (288). É importante ressaltar que o vírus do HIV-1 perde sua infecciosidade porque seu envelope proteico é rompido em consequência da secagem em temperatura ambiente, o que facilita a utilização do DBS para as rotinas de monitoramento do HIV e nos programas de seguimento em países em desenvolvimento (268) (Duthaler U et al 2018).

A aplicabilidade do DBS foi apresentada em 1963 por Guthrie e Susi para triagem da fenilcetonúria em recém-nascidos (289). Desde então, amostras DBS têm sido empregadas em diversos cenários, como na fase pré-clínica inicial no desenvolvimento de fármacos (toxicocinética) assim como na fase tardia (farmacovigilância, farmacocinética e MTF), abuso de substâncias ilícitas, toxicologia forense, investigação dos metabólitos da cocaína e nicotina em recém-nascidos para determinação da prevalência destes produtos durante a gestação, contaminantes ambientais (poluentes e pesticidas, por exemplo), intoxicação de animais e biomonitorização de metais pesados (como chumbo, arsênio, cádmio e outros) (290), quantificação da carga viral de HIV-1 e teste de resistência genotípica (257).

O processo de coleta por DBS (Figura 6) inicia a partir da punção digital na extremidade do dedo médio do paciente usando-se apenas uma agulha (dispensando o uso de seringas). A gota de sangue do dedo é, então, transferida diretamente para o papel filtro especial. Em seguida, é necessário deixar a amostra secar em temperatura ambiente, para estabilização dos analitos, e isso elimina a necessidade de refrigeração (280). Uma vez seco, o papel filtro especial com a amostra poderá ser enviado ao laboratório por meio do serviço postal convencional, o que facilita o transporte, visto que o sangue seco não é considerado uma amostra com risco biológico (267,277). Recomenda-se manter em temperatura ambiente por, no máximo, duas semanas até o envio para o laboratório de análise. Caso seja necessário maior

tempo de armazenamento, as amostras devem ser mantidas a $\leq 20^{\circ}\text{C}$ em sacos do tipo *ziplock* com desumidificador a base de sílica (264).

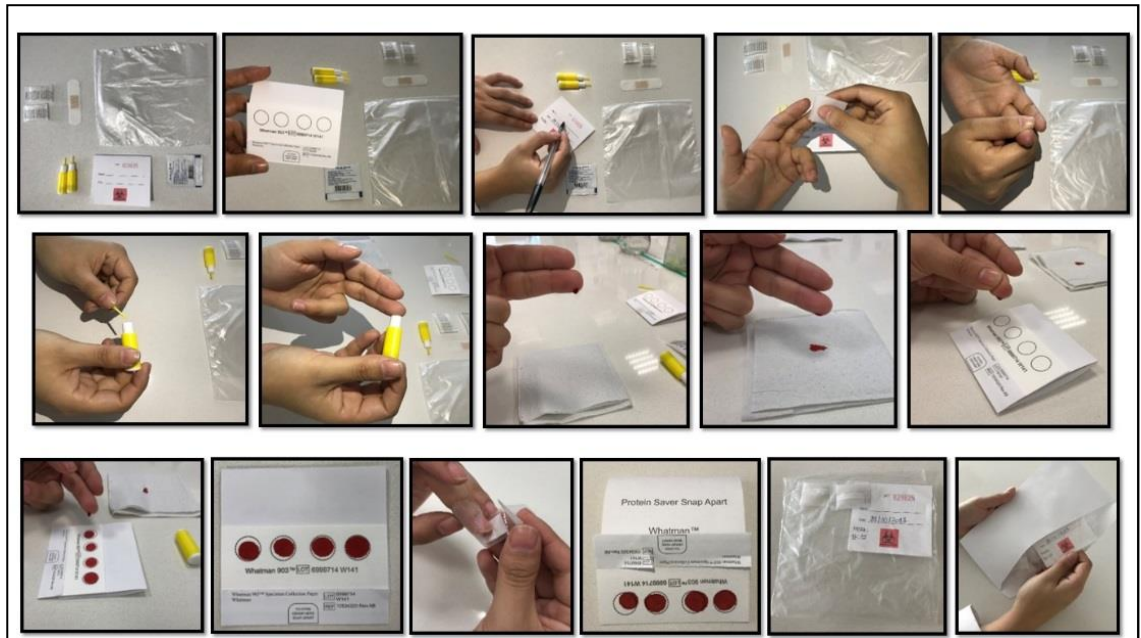


Figura 6. Passo a passo coleta de sangue pela técnica DBS.

No entanto, as concentrações de fármacos na mancha de sangue seco não são iguais aos níveis plasmáticos, pois o sangue capilar obtido da punção digital é uma mistura de sangue venoso, líquido intersticial e intracelular, o que pode explicar os valores diferentes dos obtidos por flebotomia. Portanto, é fundamental estabelecer uma concordância entre os dois métodos a fim de viabilizar o emprego do DBS na prática clínica (291). Para tal, leva-se em consideração dois principais fatores: primeiro, o hematócrito (Hct): representa a porcentagem de glóbulos vermelhos no sangue e interfere no “espalhamento” da gota de sangue no papel filtro em diferentes formas como a viscosidade, homogeneidade, tempo de secagem e recuperação de analitos e segundo, a fração do analito ligada às proteínas plasmáticas (fbpp, do inglês *fraction of analyte bound to plasma proteins*), que é variável dentro do mesmo valor de Hct e influencia na concentração de fármaco obtida a partir do DBS (277,292–294).

As concentrações dos fármacos entre plasma *versus* DBS são avaliadas por regressão linear (correlação). Contudo, não basta os dois métodos apresentarem uma ótima correlação, é preciso que eles concordem entre si. Para tal, utiliza-se o gráfico de Bland-Altman (295). Adicionalmente, as

concentrações O tratamento inicial de adultos com HIV no Brasil emprega a utilização de três fármacos ARVs de classes diferentes. Essa combinação aumenta a eficácia terapêutica e diminui o risco de resistência farmacológica. Até 2016, o esquema terapêutico inicial empregava dois ITRNs (geralmente zidovudina/lamivudina - AZT/3TC) associados a um ITRNN (efavirenz, EFV) ou, alternativamente, um IP (atazanavir – ATV ou lopinavir – LPV); este último geralmente potencializado com ritonavir (RTV; r). Contudo, no final do ano de 2016, uma nova orientação do Ministério da Saúde foi divulgada, apresentando as recomendações de substituição (*switch*) dos regimes antirretrovirais contendo a classe dos ITRNN ou IP/r pelo INI dolutegravir (DTG) e o IP darunavir (DRV) para os tratamentos iniciados a partir de 2017 em PVHIV acima de 12 anos de idade. O DTG apresenta taxas superiores de supressão viral e menor chance de descontinuação da TARV devido aos efeitos adversos quando comparados aos fármacos de outras classes. Em relação ao DRV, combinado ao ritonavir (DRV/r), apresenta maior barreira genética ao desenvolvimento de resistência viral, menor taxa de efeitos adversos e maior tolerabilidade ao ser comparado com outros IPs. O DRV está indicado nos esquemas após falha terapêutica (65).

Em meados de 2017, o Ministério da Saúde recomendou a troca do medicamento Kaletra® (lopinavir/ritonavir – LPV/r) para o fármaco atazanavir/ritonavir (ATV/r) em todas as PVHIV acima de 12 anos. Este aconselhamento baseou-se em publicações internacionais que excluíram o Kaletra® dos protocolos terapêuticos em pessoas com HIV devido a sua toxicidade, posologia complexa (dois comprimidos, duas vezes ao dia), baixa barreira genética e efeitos adversos relacionados (intolerância gastrointestinal e prejuízo no metabolismo glicolípido) (66).

Desta forma, a regra de esquema terapêutico preferencial atualmente utilizada para adultos vivendo com HIV, em início de tratamento é a combinação de dois fármacos da classe dos ITRNt/ITRN (tenofovir/lamivudina, TDF/3TC) combinados a um segundo fármaco da classe do INI (dolutegravir, DTG). Casos de intolerância, contraindicações, coinfeção com tuberculose, gestantes ou mulheres com intenção de engravidar devem seguir o aconselhamento de TARV alternativa disponibilizada pelo Ministério da Saúde (32,57).

Apesar da eficácia da TARV em suprimir a carga viral a níveis indetectáveis, esta não é capaz de eliminar o HIV-1 do corpo humano. Essa dificuldade de erradicação deve-se à latência viral, isto é, as células do hospedeiro atuam como reservatórios persistentes do HIV na sua forma de provírus, ou seja, integrado no DNA, mas sem atividade replicativa, na qual ficam ocultas do sistema imunológico. Os tratamentos farmacológicos, por sua vez, não conseguem atuar nessa situação de latência, apenas nos vírus ativos (em replicação) (67)

Outra abordagem terapêutica, conhecida como “*shock and kill*” (atacar e matar), é uma tentativa para erradicação do vírus HIV que se encontra inativo dentro das células hospedeiras em indivíduos em TARV. O objetivo é reativar (“atacar”) o DNA proviral latente nos reservatórios celulares mediante o uso de agentes específicos que irão promover a replicação viral (fase “*shock*”), expressão proteica e produção de vírions. Desta forma, essas células ficam susceptíveis ao reconhecimento pelo sistema imunológico, que eliminaria (“*kill*”) as células infectadas por eventos citopáticos ou pelo próprio vírus. Ademais, os regimes terapêuticos vigentes funcionariam como proteção à infecção em células não infectadas (68,69).

Mesmo diante dos benefícios da TARV, a resistência aos fármacos ARVs proveniente da elevada taxa de mutação do HIV (aumento na variação genética) representa um desafio na prática clínica medicamentosa e um obstáculo para o desenvolvimento de vacinas (64,70). Além disso, a eficácia da TARV é deprimida pelo comprometimento de adesão por toda a vida, o acúmulo de toxicidade, interação com outros fármacos em uso e a ocorrência de efeitos adversos agudos e crônicos. Estes últimos, especialmente, resultam no aumento do risco de vários distúrbios metabólicos e doença cardiovascular, mesmo quando a carga viral está suprimida (71).

4.1. Efeitos adversos da TARV

Na última década, a introdução de medicamentos de alta potência e barreira genética, dose única diária (coformulações) e eventos adversos esporádicos, oportunizaram opções de tratamento mais toleráveis e convenientes para as PVHIV. Apesar de eventuais, os efeitos adversos relacionados à TARV acumulam-se com o

prolongamento da expectativa de vida das PVHIV, favorecendo o aparecimento de doenças crônicas relacionadas ao envelhecimento (71) que impactam diretamente na qualidade de vida e aderência ao tratamento antirretroviral (72). Sabe-se que a prevalência de fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV) e o risco para DVC é maior em PVHIV quando comparado aos indivíduos sem HIV. Os fármacos ARV podem induzir mudanças metabólicas e agir em nível molecular, alterando a atuação de fatores de transcrição na expressão de genes chave do metabolismo glicídico e lipídico, induzindo dislipidemia, resistência à insulina (RI) e diabetes mellitus (DM) (73) além dos efeitos nos adipócitos (quantificação, distribuição e armazenamento) que promovam redistribuição da gordura corporal – conhecida como síndrome da lipodistrofia (LD) (74,75).

A síndrome da LD se apresenta clinicamente em três condições, de acordo com a disposição da gordura corporal: a lipoatrofia (LA) é resultado da perda de gordura subcutânea, principalmente na face, nádegas e membros periféricos, com proeminência de veias superficiais. A lipohipertrofia (LH) está relacionada ao acúmulo de gordura subcutânea e visceral, especialmente no abdômen, região dorsocervical (“*buffalo hump*” ou giba) e mamas. Nas mulheres, o aumento do volume das mamas, geralmente, não possui associação com hipertrofia glandular; apenas acúmulo excessivo de tecido adiposo. Nos homens, pode ser observada ginecomastia. É possível, ainda, que alguns pacientes apresentem ambos os fenótipos correlacionados, conhecido como lipodistrofia mista (76,77).

Com relação a LA associada ao HIV, é importante mencionar não há perda de massa magra. Em pacientes com LA periférica, a perda de tecido adiposo subcutâneo (TAS) acentua a musculatura e as veias ficam mais proeminentes. No caso da LA no tronco, esse padrão não é tão nítido e pode se tornar ainda menos perceptível quando há, concomitantemente, deposição de gordura visceral na região abdominal (padrão misto) (78). Acerca da LH, discussões permanecem se o ganho de gordura nas PVHIV após começar a TARV é um estado patológico ou uma consequência do “fenômeno de regresso à saúde” (do inglês, *The return to health phenomenon*), especialmente naqueles indivíduos com menor contagem de LT-CD4+ e índice de massa corporal (IMC) no início do tratamento (76,79,80).

À vista disso, o manejo da LD não se concentra apenas sob o aspecto estético, mas é extensivo às complicações metabólicas que frequentemente acompanham seus subtipos. Somados, estes dois fatores elevam o risco de desenvolvimento de doenças do coração, piorando a qualidade e expectativa de vida das PVHIV (81). Na LH, é comum a presença de dislipidemia e hipertrigliceridemia, diminuição dos níveis de colesterol de alta densidade (HDL-c, do inglês *High Density Lipoprotein cholesterol*), redução da sensibilidade à insulina e diabetes mellitus (82). Essas modificações são semelhantes às encontradas em indivíduos HIV-negativo com síndrome metabólica (SM). Acredita-se que as PVHIV tenham os fatores de risco à SM piorados em decorrência da infecção em si, TARV e inflamação persistente (83). Na ocorrência de LA, observa-se a perturbação de outros parâmetros bioquímicos, tais como o aumento de citocinas inflamatórias (como a interleucina 6, IL-6), altos níveis de triglicérides circulantes e ácidos graxos livres que, por sua vez, são armazenados no tecido adiposo visceral e no fígado (84).

O primeiro caso relatado de LD foi publicado por Andrew Carr & David A Cooper em 1998, aproximadamente três anos após a implementação da classe dos inibidores de protease (IP) no regime terapêutico contra o HIV. Entre 3 e 6 meses após a inclusão do indinavir (IDV) no esquema farmacológico contendo zidovudina (AZT) e lamivudina (3TC), observou-se, em um homem de 53 anos de idade, perda de gordura na face, braços, nádegas e pernas, com proeminência das veias. Conjuntamente, ocorreu acúmulo de gordura central e hipertrofia dorsocervical (“*buffalo hump*” ou giba) (Figura 3). Todavia, a força e massa muscular não sofreram prejuízos. Tais alterações anatômicas progrediram durante os 19 meses de uso do IDV, até que o paciente relatou seu desejo de descontinuar o referido esquema farmacológico (85).



Figura 3. Manifestação lipoatrofia facial em conjunto com acúmulo de gordura abdominal e dorsocervical (*buffalo hump*” ou giba).

Fonte: Carr A and Cooper DA. Lipodystrophy Associated with an HIV-Protease Inhibitor. *The New England Journal of Medicine*, 1998. (85)

Ainda no ano de 1998, Carr *et al.* (1998), postularam o mecanismo de ação dos inibidores de protease no desencadeamento da LD periférica, obesidade central, hipertrofia mamária e sua associação com hiperlipidemia e resistência à insulina. Segundo os autores, a região catalítica da enzima protease do HIV-1, aonde os inibidores de protease se ligam, possui 58% de homologia a regiões da proteína de ligação ao ácido retinóico citoplasmático do tipo 1 (CRABP-1, do inglês *cytoplasmic retinoic-acid binding protein type 1*) e 63% da proteína relacionada com o receptor da lipoproteína de baixa densidade (LRP, do inglês *low density lipoprotein-receptor-related protein*), duas importantes proteínas reguladores do metabolismo lipídico (Figura 4) (86).

AEALLCNGQDDC LRP; aa 2919-2930
: : : : . : : :
KEALLDTGADDT HIV-1 protease; aa 19-30
: . : : : : .
DELILTFGADDV CRABP-1; aa 116-127

Figura 4. Comparação sequência de aminoácidos do sítio catalítico da enzima da protease do HIV-1 com o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP) e proteína de ligação ao ácido retinóico citoplasmático do tipo 1 (CRABP-1).

Fonte: Carr A et al. Pathogenesis of HIV-1-protease inhibitor-associated peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia, and insulin resistance. *Lancet*, 1998. (86)

A proteína CRABP-1 “apresenta” o ácido retinoico (AR) à citocromo P450 3A (CYP3A) que o converte em ácido cis-9-retinoico (cis-9-AR). Este último, por sua vez, é o único ligante para o receptor do retinoide X (RXR, do inglês, *retinoide X receptor*) que, nos adipócitos, forma um heterodímero com o receptor ativado por proliferador de peroxissomas gama (PPARG, do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), fator de transcrição chave da diferenciação de adipócitos e adipogênese. A formação do heterodímero RXR:PPARG inibe a apoptose dos adipócitos e favorece a expressão preferencial do PPARG periférico em relação ao central. A hipótese é que o inibidor de protease, ao se ligar na região homóloga dentro da proteína CRABP-1, e não no sítio catalítico da enzima protease do HIV, bloqueia a ligação do AR.

Conseqüentemente, menores quantidades de cis-9-AR são produzidas. Isso diminui a atividade do RXR, reduzindo a formação de heterodímeros RXR:PPARG, limitando a adipogênese ao passo que favorece a apoptose de adipócitos periféricos (86).

O LRP é um receptor hepático que age na liberação de quilomícrons pós-prandial e forma um complexo com a lipoproteína lipase (LPL, do inglês *lipoprotein lipase*). Uma vez constituído, o complexo LPL-LRP “quebra” os ácidos graxos a partir dos triglicerídeos circulantes, possibilitando que estes ácidos graxos livres sejam armazenados nos adipócitos. Quando o inibidor de protease se liga ao LRP, não há formação do complexo LPL-LRP, o que bloqueia a captação hepática de quilomícrons. A hiperlipidemia resultante favorece a obesidade central e resistência à insulina, mas não a lipoatrofia periférica. Na presença do hormônio estrogênio, os lipídios são abrigados nas mamas. Por isso as mulheres comumente apresentam aumento do tecido adiposo mamário (86).

Ademais, esquemas terapêuticos contendo ITRN análogos de timidina, nomeadamente a estavudina (d4T) e zidovudina (AZT), são inibidores da polimerase- γ do DNA mitocondrial (mtDNA) – enzima fundamental na oxidação de ácidos graxos. Quando isso ocorre, a diferenciação dos adipócitos é alterada, levando ao desenvolvimento LA e ao aumento dos ácidos graxos livres, resultando em dislipidemia e resistência à insulina de forma indireta. Isto posto, a substituição da estavudina (d4T) e zidovudina (AZT) pelo tenofovir (TDF) demonstrou menor impacto deletério no perfil lipídico e ocorrência LA; apesar da sua nefrotoxicidade (87,88). Já os ITRNN, embora apresentem impacto positivo no metabolismo lipídico (aumento HDL e redução TG), foram associados com dislipidemia e resistência à insulina. O efavirenz (EFV) parece ser o mais prejudicial (88).

O mais recente fármaco utilizado como esquema preferencial de início de tratamento antirretroviral, o dolutegravir (DTG), da classe dos inibidores da integrase (INI), acomete de forma ínfima parâmetros do perfil lipídico (colesterol total, LDL e triglicerídeos) quando comparado com EFV ou DRV/r (89). Contudo, é possível que o uso do DTG predisponha ao ganho de peso (90,91) e obesidade (92) enquanto que modificações na distribuição da gordura corporal tem sido relacionado ao uso do RAL, outro fármaco dos INI (93), apesar do mínimo efeito na adipogênese (94,95). Apesar

dos dados escassos, não é recomendada a utilização de esquemas terapêuticos contendo DTG para mulheres em idade fértil que desejam engravidar ou não utilizem métodos contraceptivos eficazes. Tal preocupação veio à tona a partir da publicação de um estudo observacional em Botsuana (África) (96), que constatou 4 casos de defeitos no tubo neural em 426 mulheres que engravidaram enquanto tomavam o DTG. Diante disso, a Organização Mundial da Saúde manifestou-se através de uma declaração quanto a insuficiência de dados que atestem a segurança de uso do DTG em mulheres vivendo com HIV durante a gestação ou amamentação (97). Tal recomendação logo foi acatada pelo Ministério da Saúde brasileiro (98).

Cerca de metade dos pacientes expostos à TARV irão desenvolver alterações na composição corporal. Os sinais físicos aparecem em torno de 10 meses após o início do tratamento, aumentando, progressivamente, entre 18 e 24 meses (75). Usualmente, estabiliza-se por 2 anos (99). A prevalência é amplamente variável em razão da inexistência de consenso metodológico para o diagnóstico e carência de pontos de corte específicos para LD-associada ao HIV (100). Estima-se uma faixa de 10 a 80% entre todas as PVHIV no mundo. A LA apresenta um intervalo de prevalência de 13% a 67%, enquanto que a LH varia entre 6% e 93%. Indivíduos que manifestam ambos os fenótipos juntos (lipodistrofia mista) exibem estreita faixa de prevalência: 20% a 29%. Fatores de susceptibilidade como maior idade, estilo de vida (sedentarismo), sexo (feminino), etnia e características genéticas do indivíduo contribuem para o risco de desenvolvimento da LD (99). Geralmente, as mulheres são mais afetadas pela LH, enquanto os homens pela LA (100).

Em pessoas HIV-negativo, já foi estabelecido que o processo de envelhecimento está associado com distúrbios do tecido adiposo que se manifestam pela perda de TAS e massa magra ao mesmo tempo que ocorre acúmulo de gordura abdominal. Nos indivíduos infectados pelo HIV, a alteração seletiva de gordura em diversas partes do corpo está associada a dois principais fatores: o primeiro, aos efeitos deletérios da infecção por si só que causa um estado de envelhecimento precoce ao manter de forma permanente a ativação de citocinas inflamatórias e induzir o aumento do estresse oxidativo; e, segundo, à TARV, que ao proporcionar o prolongamento de vida dos pacientes, contribuiu para o aparecimento de doenças crônicas associadas ao aumento da idade e, ainda, a exposição contínua a diferentes

ARVs que perturbam o metabolismo e a distribuição do tecido adiposo nas PVHIV (101).

A prática regular de atividade física é a principal recomendação mundial para minimizar o risco de mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis, como doença coronariana, hipertensão arterial, DM2, SM, alguns tipos de câncer e depressão (102) (WHO, 2010). Este aconselhamento, salvo restrições, também é encorajado as PVHIV como importante estratégia sobre o perfil lipídico, capacidade cardiorrespiratória e tônus muscular, melhora do sistema imunológico, prevenção/intervenção frente as complicações da LD e dislipidemia, controlando o peso e, conseqüentemente, a composição corporal. Esta última, por sua vez, impacta diretamente na autoestima, auxiliando no controle de transtornos psiquiátricos como ansiedade e depressão (101,103).

O dimorfismo sexual está bem estabelecido quanto a sua participação na forma de distribuição e fisiologia do tecido adiposo, uma vez que os hormônios sexuais comandam como as calorias ingeridas serão empregadas. Os homens, sob influência da testosterona, tendem a acumular gordura visceral nas regiões centrais e superiores do corpo (abdômen e tórax), conhecido como androide (formato maçã). O excesso de gordura visceral está associado com aumento no risco de DCV. As mulheres, em contrapartida, são mais propensas ao ganho de gordura subcutânea até a menopausa, pois o estrogênio, hormônio predominante no sexo feminino, ativa seus receptores nos adipócitos favorecendo o acúmulo de lipídios. As áreas inferiores preferenciais são as nádegas, coxas e quadris, habitualmente chamado de ginoide (formato pêra) (104). O aumento da circunferência do quadril é fortemente e inversamente associado ao risco de doenças do coração. Contudo, o início da menopausa e declínios nos níveis do estrogênio, o acúmulo de gordura visceral passa a ser favorecido e o risco de distúrbios metabólicos atinge índices semelhantes aos encontrados nos homens (104,105).

Esse padrão de acúmulo de gordura em sítios específicos do corpo é mantido nas PVHIV, dado o maior risco para o acúmulo, ao invés da perda, de gordura subcutânea observado nas mulheres do que nos homens em TARV. Isso foi comprovado através de um grande estudo transversal (2258 pacientes do sul da

Europa) onde as mulheres apresentam maior risco de desenvolvimento de lipodistrofia (LD) apesar do esquema terapêutico ser composto de ARVs significativamente mais vantajosos e do estágio inferior do HIV quando comparado aos homens. Ainda, quando os subtipos de LD foram analisados separadamente, a LA foi a alteração corporal mais frequente em homens e a menos frequente em mulheres, que apresentaram maior frequência de LH e padrão misto (106). Resultados na mesma direção foram constatados em homens infectados pelo HIV (107). Todavia, achados controversos foram observados em mulheres infectadas pelo HIV (108); ambos decorrente do estudo de Redistribuição de Gordura e Mudança Metabólica na Infecção pelo HIV (FRAM, do inglês *Fat Redistribution And Metabolic change in HIV infection*) (82).

Essa predisposição do sexo feminino também foi confirmada no estudo de Gasparotto *et al.* (2012) (109) em uma amostra de 614 pacientes brasileiros vivendo com HIV em TARV por, pelo menos, doze meses. Ao comparar as frequências dos subtipos de LD, o fenótipo de LA foi mais prevalente nos homens (52,6%), enquanto que a LH teve maior prevalência nas mulheres (35,6%). Os autores também observaram maior prevalência de síndrome metabólica nas pacientes do sexo feminino quando comparado ao sexo masculino usando tanto os critérios da Federação Internacional de Diabetes (IDF, do inglês *Internacional Diabetes Federation*) (37,4% x 27,6%) e do Programa Nacional de Educação sobre Colesterol dos Estados Unidos (NCEP, do inglês *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*) (23,4% x 16,1%).

Diferenças na frequência da LD e seus subtipos também são encontradas entre grupos étnicos. A LD é mais prevalente em indivíduos de raça branca (Euro-descendentes) em comparação aos não-brancos (Afro-descendentes), mesmo quando expostos a idênticos esquemas terapêuticos e compartilhando características ambientais (110). Quando se avalia os diferentes fenótipos da LD, observa-se que os indivíduos brancos apresentam maior prevalência de LH e padrão misto, enquanto que a LA é predominante em não-brancos (106).

A população brasileira é caracteristicamente diversa e miscigenada, apresentando elevados níveis de diversidade genômica como resultado de três

principais raízes de ancestralidade: Ameríndios, Europeus e Africanos (111). Essa miscigenação dentro e entre as regiões geográficas do país interfere no delineamento e interpretação de pesquisas com seres humanos, principalmente em investigações de genética médica, farmacogenética e variantes de susceptibilidade a doenças complexas. Por isso, a generalização dos dados para grupos mais homogêneos deve ser a razão para as discrepâncias observadas nas taxas de prevalência da LD e seus subtipos entre diferentes estudos populacionais (112).

Esta complexidade aparentemente desvantajosa, cria, na verdade, uma oportunidade única no Brasil para pesquisas científicas, pois é uma amostra valiosa para análise de frequências alélicas e predisposição a doenças. Além disso, a população brasileira representa um significativo grupo de indivíduos acometidos pelo HIV tratados de forma homogênea graças ao programa instituído pelo Ministério da Saúde no país de distribuição gratuita e universal de medicamentos ARVs desde 1996. Esta política pública de atenção ao paciente e tratamento para o HIV em diversos centros de referência espalhados pelo Brasil é um exemplo reconhecido no mundo todo e possibilita o recrutamento expressivo pacientes para pesquisas envolvendo a infecção pelo HIV. Destaca-se dentro deste conjunto de indivíduos, o número relevante de participantes do sexo feminino e indivíduos de ancestralidade africana, frequentemente excluídos ou sub-representados em estudos clínicos.

Aditivo aos fatores de risco supracitados, há inúmeras evidências da contribuição da variabilidade genética individual na regulação do balanço energético bem como na susceptibilidade ao desenvolvimento da LD. Logo, a literatura científica tem demonstrado a participação de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphism*) na violação da homeostase energética, repressão ou indução da adipogênese, metabolismo lipídico e arranjo do tecido adiposo (87,113,114). Sendo assim, o reconhecimento de aspectos genéticos individuais é crucial na busca do equilíbrio entre o uso contínuo de fármacos mais potentes e o risco de eventos colaterais metabólicos, sobretudo nos níveis de lipídios, diferenciação de adipócitos e metabolismo de fármacos (115,116).

O diagnóstico da LD baseia-se em diversas ferramentas, como o auto-relato do paciente de mudanças na distribuição de gordura corporal, observação médica,

exame físico, medidas antropométricas (altura, peso, índice de massa corporal – IMC, dobras cutâneas, circunferência da cintura – CC e do quadril – CQ, razão CC/CQ), análise de impedância bioelétrica (BIA, do inglês *bioelectrical impedance analysis*) e avaliação por imagem, como absorciometria de raios-x de dupla energia (DEXA, do inglês *dual emission X-ray absorptiometry*), tomografia computadorizada ou ressonância magnética para confirmação de mudanças na distribuição da gordura corporal. Contudo, não há método padrão-ouro para determinar a presença de LD e seus subtipos (99,117).

Os exames de imagem compreendem técnicas avançadas e sofisticadas para avaliação da LD. Contudo, são onerosos, de acesso limitado em países em desenvolvimento e requerem interpretação especializada. Por isso, representam um desafio para serem utilizados na prática clínica e, também, em estudos epidemiológicos. Desta forma, o diagnóstico da LD é rotineiramente detectado pelo relato do próprio paciente, pelo olhar apurado do mesmo médico durante as consultas de acompanhamento e medidas antropométricas, que são métodos de baixo custo, não-invasivos e de fácil execução (117). Contudo, alguns casos, a concordância entre os sinais autorreferidos e as medidas antropométricas aferidas é inexistente, conferindo, assim, certo grau de subjetividade no diagnóstico e prevalência (100).

Frente a esta situação, Santos *et al.* (2018) (118) desenvolveram modelos antropométricos objetivos, econômicos e acessíveis de predição para o diagnóstico e monitoramento da LD em homens e mulheres brasileiros vivendo com HIV. Os resultados mostraram que o melhor modelo preditivo para os homens incluiu as seguintes variáveis antropométricas: razão entre a espessura da dobra cutânea subescapular e média, dobra cutânea da coxa e circunferência da cintura. Adicionado a estes fatores, a educação, o tempo de diagnóstico do HIV e o esquema de ARVs são elementos sociais e fisiológicos pertinentes para determinar as para modificações na distribuição da gordura corporal. Já nas mulheres, as dobras cutâneas da coxa e subescapular e a circunferência das mamas, foi o modelo mais significativo. Os autores relataram que esse modelo está de acordo com achados prévios onde indivíduos do sexo feminino com HIV tiveram aumento no acúmulo de gordura no tronco juntamente com redução do tecido adiposo nas pernas. Além das variáveis antropométricas, o tempo de exposição à TARV e a etnia também contribuíram para

o desenvolvimento de LD. O tempo de diagnóstico e o período de exposição aos ARVs foram as variáveis mais significativas, reforçando os efeitos do vírus na perturbação da homeostase metabólica e no padrão na disposição do tecido adiposo no corpo e dos fármacos na severidade da LD.

Os sinais e sintomas revelados pelas PVHIV acometidas pela LD são complexos e requerem olhar apurado na rotina de atendimento ao paciente. O estigma e a conseqüente discriminação provocados pela LD, impactam negativamente a vida das PVHIV. A LA, sobretudo, destaca-se entre os três subtipos por imprimir um aspecto de envelhecimento precoce e imprimindo a indelicada expressão “cara de Aids”. Essa situação pode trazer à tona a condição de soropositividade, afetando diretamente a autoestima das PVHIV, isolamento social, baixa adesão farmacológica ou até mesmo o abandono da TARV; o que provoca falha terapêutica e produz cepas virais resistentes (78,119).

O reconhecimento da LD leva a reavaliação do regime farmacológico que, muitas vezes, modifica o esquema terapêutico (*switch*). Essa abordagem é uma forma de administração da LD cujo fim é reprimir o desejo de abandono da TARV, assim como evitar a exposição permanente do paciente com HIV ao medicamento desencadeador das alterações na forma do corpo. Basicamente, as intervenções destinadas aos pacientes com LA são a restrição de uso aos ITRN análogos de timidina, cirurgia plástica e preenchimento facial. Na ocorrência de LH, indica-se um plano alimentar hipocalórico e prática de exercício físico (81,84).

Diante desse cenário, o Ministério da Saúde implementou junto ao SUS as cirurgias reparadoras para LD (120) e preenchimento facial com polimetilmetacrilato (PMMA) ou tecido gorduroso (121). As intervenções operatórias incluem lipoaspiração de giba, região submandibular, parede abdominal e dorso, redução mamária, tratamento da ginecomastia, lipoenxertia de glúteo (120). Isso destacou o Brasil, mais uma vez, no atendimento às PVHIV sendo o primeiro país a conceder gratuitamente operações cirúrgicas reparadoras para PVHIV com LD (32).

Embora o termo ‘lipodistrofia’ seja utilizado para se referir a qualquer desordem metabólica e distúrbio na distribuição de gordura corporal, cada subtipo de LD (LA, LH

e misto) deve ser considerado como entidades únicas de etiologia complexa e caráter multifatorial (74). Inserido neste conjunto de elementos causais, as características genéticas individuais possuem papel chave na susceptibilidade ao aparecimento de anormalidades metabólicas em PVHIV, já que nem todos os pacientes em uso regular da TARV sofrem alterações no armazenamento lipídico (122).

5 GENES CANDIDATOS

Além da função primária de estocar energia como triacilglicerol e liberar ácidos graxos livres durante períodos de jejum, o tecido adiposo também possui atribuições endócrinas, imunológicas e regulatória da homeostase da glicose e dos lipídios. Fundamental para o desempenho destas atividades, está na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros que, em resposta a sinais externos, armazena lipídios e secreta diversas adipocinas (123,124). Na presença de calorias excedentes sem liberação de energia, o tecido adiposo se expande e a obesidade se estabelece (125).

Quando isso ocorre, o tecido adiposo passa a acumular células imunes que irão subsidiar o estado de inflamação crônica de baixo grau (sub-clínica) e desbalanço metabólico. Os macrófagos são o tipo de leucócitos que predominam no tecido adiposo nessa condição patológica e são os responsáveis por estas características intrínsecas da obesidade que, por sua vez, precedem a ocorrência de resistência à insulina (RI). A RI é o fator chave para o desencadeamento de comorbidades associadas à obesidade, como DM e SM, dado o enfraquecimento da resposta normal à insulina, redução da glicose disponível e comprometimento na supressão da lipólise. A quantidade de LT-CD4+ também aumenta, em especial a razão LT-CD8+/LT-CD4+ que são fundamentais para o recrutamento de macrófagos através da produção de interferon gama (IFN- γ) (126). Esse cenário é potencializado nas PVHIV em razão da deterioração de LT-CD4+ juntamente com a pronunciada ativação e proliferação de LT-CD8+ (127). Por isso, indivíduos infectados pelo HIV estão em maior risco de obesidade e doenças associadas (74).

Os efeitos do HIV no tecido adiposo são investigados desde a sua identificação nos anos 1980 e foram, inicialmente, utilizados como marcadores de progressão da infecção à Aids. Já foi estabelecido que a infecção pelo HIV acarreta num estado generalizado de ativação imune e inflamação persistente em consequência da produção exacerbada de citocinas pelos LT-CD4+ infectados que estão latentes no tecido adiposo. Esta intensificação local de citocinas ativa as células em repouso e desperta o vírus HIV, que aumenta ainda mais a produção de mediadores pró-

inflamatórios nos adipócitos. Não obstante à supressão da viremia plasmática nos indivíduos sob TARV, as proteínas virais permanecem atuando *in loco* no tecido adiposo aonde prejudicam a maturação de pré-adipócitos além de reprimir a expressão de genes envolvidos na regulação da adipogênese (74).

Parte destas desordens metabólicas e distribuição irregular de gordura no corpo também sofrem influência do nosso material genético. A maturação dos adipócitos, assim como a síntese de ácidos graxos e triglicerídeos é comandada por diversos genes que, por sua vez, são finamente orquestrados por fatores de transcrição. Variantes genéticas (SNPs) nos principais reguladores transcricionais da adipogênese e lipogênese podem alterar a cascata de eventos destes processos, reprimindo ou intensificando a expressão gênica e, portanto, cooperando para o desenvolvimento da LD (122).

Evidências genéticas e moleculares ajudaram a encaixar algumas peças do quebra-cabeças oculto à LD. Contudo, muitos enigmas ainda precisam ser desvendados para explicar a sequência de eventos para o desenvolvimento de LD, visto a complexa interação do HIV *per se*, TARV, inflamação e variação genética do hospedeiro (79,122,128). Entre diversos genes envolvidos na diferenciação dos adipócitos e metabolismo lipídico, são de especial interesse o fator de necrose tumoral (*TNF*, do inglês *tumor necrosis factor*), o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (*PPARG*, do inglês *peroxisome proliferator activated receptor gamma*), o fator de transcrição de ligação ao elemento regulatório de estero 1 (*SREBF1*, do inglês *sterol regulatory element binding transcription factor 1*), o gene associado a obesidade e massa gorda (*FTO*, do inglês *fat mass-and obesity-associated gene*) e a sirtuína 1 (*SIRT1*).

5.6. Fator de necrose tumoral (*TNF*)

O fator de necrose tumoral- α (*TNF- α* , codificado pelo gene *TNF*, 6p21.33) é expresso no tecido adiposo branco (TAB) e secretado por macrófagos e LT-CD8+ ali infiltrados (129,130). Os níveis desta adipocina pró-inflamatória são correlacionados com adiposidade e resistência à insulina, possivelmente porque ativa as proteínas Ser/Thr quinase cujo dano na sinalização da insulina e recrutamento de efetores

downstream já foram relatados (115). O TNF- α suprime a lipogênese por meio da ativação da lipoproteína lipase (131) e induz apoptose de pré-adipócitos periféricos (132), além de modular a atividade do gene coativador do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (*PPARG*) através da ligação aos receptores de superfície dos adipócitos. Essa interação aumenta a inflamação do tecido adiposo e suporta a liberação de outros mediadores pró-inflamatórios (74). A presença de níveis circulantes elevados do TNF- α já foram associados com desordens do tecido adiposo como a obesidade e lipodistrofia na população em geral (133).

Nos indivíduos HIV-positivos, a homeostase do TNF- α é drasticamente modificada, elevando as concentrações circulantes antes do início do tratamento antirretroviral e caindo acentuadamente pós-TARV. Todavia, apesar da eficácia do tratamento antirretroviral, o sistema de ativação e parâmetros do TNF- α não atingem a normalidade (134). Na tentativa de avaliar essa relação, Domingo *et al.* (2005) (135) demonstraram, *in vivo*, que PVHIV com LD têm um acentuado grau de apoptose no tecido adiposo subcutâneo (TAS) quando comparado aos sem LD e sujeitos não infectados. Essa correlação positiva foi associada com o aumento nos níveis séricos da fração solúvel dos receptores de TNF- α . Nos experimentos *in vitro*, pré-adipócitos 3T3-L1 cultivados com meio apropriado e, após o período de 9-10 dias de diferenciação, as células foram embebidas com fármacos antirretrovirais. Depois, foi adicionado TNF- α . Os resultados mostraram que a combinação de certos ARVs agiram de forma pró-apoptótica nos adipócitos e que a incorporação de TNF- α no meio potencializou os efeitos de morte celular. O uso de IP, particularmente, apresenta efeito antiadipogênico sinergicamente com o TNF- α e causa lipoatrofia periférica e acúmulo de gordura central (136). Resultados divergentes foram obtidos por Freitas *et al.* (2014) (137), na qual não observaram diferença nos níveis de TNF- α em indivíduos controles e nos adultos com HIV, recebendo TARV, com ou sem diagnóstico de LD.

Associações entre polimorfismos no gene *TNF* e condições inflamatórias já foram descritas. O polimorfismo -238 G>A (rs361525), localizado na região promotora do gene, parece influenciar os níveis circulantes de TNF- α : o alelo G foi associado com baixa produção enquanto que o alelo A foi associado com aumento (138). Em

pacientes com HIV, a susceptibilidade entre esta variante e o desenvolvimento de LD foi demonstrada, pela primeira vez, por Maher *et al.* (2002) (139). Os autores observaram que a frequência do alelo A foi significativamente maior no grupo de pacientes com LD quando comparados àqueles sem LD e concluíram que ser portador do alelo polimórfico A não foi determinante para o desenvolvimento da LD, mas parece ser um fator preditivo para sua manifestação. Similarmente, portadores do A para o SNP -238 G>A apresentaram progressão mais rápida à LD (140). Contudo, ambos estudos não avaliaram os subtipos de LD e os resultados foram baseados em um pequeno tamanho amostral. Posteriormente, de forma contrária aos prévios achados, Tarr e Telenti (2007) (141) não observaram associação entre TNF- α -308 G>A (rs361525) e lipoatrofia.

5.7. Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR)

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) são fatores de transcrição que integram uma superfamília de receptores nucleares com importante função metabólica. Os PPARs são dependentes de ligantes que regulam a expressão gênica através da ligação aos elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma (PPREs, do inglês, *peroxisome proliferator response elements*) na região promotora de cada gene alvo. Cada receptor liga-se ao seu PPRE formando um heterodímero junto com o RXR (PPAR:RXR). Quando um agonista é unido nesta estrutura, a conformação do PPAR se modifica e torna-se estável, criando uma fenda que possibilita a ligação de coativadores transcrpcionais. O resultado é o aumento da transcrição gênica (142).

O grupo dos PPARs são formado por três proteínas, codificadas por genes diferentes: PPAR γ , PPAR α , and PPAR δ . Apesar das similaridades estruturais, cada isoforma difere na distribuição tecidual, funções fisiológicas, afinidade pelos PPREs e interação com inúmeros cofatores. O PPAR γ é amplamente expresso nos adipócitos do tecido adiposo branco e marrom onde atua como regulador *master* da adipogênese. Assim, suas funções estão ligadas a vários processos celulares, incluindo, fundamentalmente, a diferenciação de adipócitos (maturação, armazenamento e mobilização), homeostase da glicose e inflamação (143). Os

agonistas biológicos para o PPAR γ incluem vários ácidos graxos e outros lipídios (144). De forma sintética, os eicosanoides, os fibratos e as tiazolidinedionas (TZDs) são importantes ativadores do PPAR γ (145). As TZDs são utilizadas há muito tempo como sensibilizadores de insulina no tratamento da DM2 (146).

O gene *PPARG* (3p25.2) possui promotores separados que geram diferentes isoformas de mRNA. A isoforma PPARG2 é o mais potente ativador transcricional e expressa exclusivamente no tecido adiposo (143). Algumas variantes no gene *PPARG2* já foram relatadas, sendo o SNP Pro12Ala (rs1801282) *missense* o mais estudado e associado a DM2, IMC, obesidade e fenótipos relacionados na população geral (147–151). Nos indivíduos com HIV, no entanto, as pesquisas são escassas e com resultados controversos (152–155).

5.8. Proteína de ligação ao elemento regulatório de esteróis (SREBP)

A família de proteína de ligação ao elemento regulatório de esteróis (SREBP, do inglês *sterol regulatory element binding proteins*) consiste em elementos regulatórios pró-adipogênicos cuja função é controlar a síntese e a oxidação de ácidos graxos através da regulação de genes envolvidos na biossíntese do colesterol no fígado (156,157). Os SREBP são sintetizados como precursores ancorados na membrana plasmática do retículo endoplasmático (RE) intimamente ligados a proteína ativadora de clivagem SCAP (do inglês *SREBP cleavage activating protein*) que interage com a proteína induzida por insulina INSIG (do inglês, *insulin induced gene*). Esta, por sua vez, mantém o complexo SREBP-SCAP confinado à membrana do RE. Quando as concentrações de esteróis estão altas, a SCAP se associa fortemente com INSIG e promove maior interação entre SREBP-SCAP, mantendo-os ancorados no RE. Ao passo que quando os níveis de esteróis diminuem e aumentam os de insulina, a interação INSIG-SCAP enfraquece, permitindo que a SCAP desloque o precursor SREBP para o Complexo de Golgi. Nesta organela, a forma inativa de SREBP sofre a primeira clivagem pela protease do sítio-1 (S1P, do inglês *site 1 protease*) dentro da alça luminal hidrofílica. Depois, é submetida a segunda clivagem pela protease do sítio-2 (S2P, do inglês *site 2 protease*) que corta o domínio NH₂-terminal dentro do primeiro fragmento transmembrana, liberando a proteína SREBP na sua forma nuclear (nSREBP). O domínio bHLH-LZ remanescente gera um novo tipo de sinalização

nuclear que permite a ligação da proteína importina, cuja função é movimentar a nSREBP para o núcleo. No núcleo, a forma nSREBP liga-se a sequência de nucleotídeos do elemento regulador do esteroide (SRE, do inglês *sterol regulatory element*), no gene da enzima HMG-Coa-redutase, promovendo sua transcrição e consequente biossíntese do colesterol (158).

O gene *SREBF1* (17p11.2) codifica dois transcritos: SREBP1a e SREBP1c. A isoforma SREBP1c é altamente expressa no TAB, fígado, músculo esquelético, glândula adrenal e cérebro. É regulada transcricionalmente pelos carboidratos da dieta. Assim, altos níveis de glicose ativam esse fator de transcrição que, por sua vez, atua na glicólise (159) (Xu X et al. 2013). Curiosamente, o tecido adiposo de indivíduos obesos e diabéticos apresenta menor expressão do mRNA SREBP1c quando comparado a indivíduos magros. Estudos com modelos animais concordam com esses resultados, pois a expressão da SREBP1c está reduzida no tecido adiposo de camundongos ob/ob pré-diabéticos. A explicação pode estar na resistência à insulina observada na obesidade e no fato de que a perda de peso melhora a sensibilidade à insulina e aumenta a expressão da SREBP1c (158). Atua, também, na adipogênese pois produz ligantes endógenos para o PPAR- γ e lipogênese, promovendo a síntese de ácidos graxos. A superexpressão de SREBP1c no fígado pode levar ao acúmulo de lipídios e causar lipotoxicidade, que em consequência, também é responsável pela resistência à insulina (160).

Alguns agentes ARVs podem regular negativamente os níveis de mRNA de *SREBF1* durante a adipogênese (161) provocando lipoatrofia através da perda de adipócitos e redução de tamanho (162). Bastard *et al.* (2002) observaram um aumento em torno de 6 vezes na proteína SREBF1 em biópsias de tecido adiposo de pacientes infectados pelo HIV usando IP. A exposição dos adipócitos aos IPs sequestra o SREBF1 na membrana do retículo endoplasmático impedindo sua clivagem para a forma ativa e entrada no núcleo da célula. Assim, parece que o aumento da concentração de SREBF1 no lúmen é de uma proteína inativa, sem atividade de induzir fatores de transcrição da adipogênese. Isso explica a diminuição de *C/EBP β* , *PPARG* e *C/EBP- α* observada, cujo resultado é a RI e lipoatrofia periférica. Outra possível explicação é que o uso de ITRNN, como o efavirenz (EFV), causa efeitos

negativos na diferenciação dos adipócitos e na redução do acúmulo de triglicérides (TG). O EFV promove efeitos antiadipogênicos pela regulação negativa dos fatores de transcrição adipogênicos (SREBF1, PPARG e C/EBP- α) e diminui os níveis de leptina e adiponectina, que por sua vez prejudicam a sensibilidade à insulina (161).

Polimorfismos no *SREBF1* foram investigados em decorrência da sua associação com RI e DM2. A variante G do SNP rs2297508 (3322 C>G) mostrou uma ligeira associação com hiperglicemia e médio risco para DM2 em duas grandes coortes indivíduos HIV-negativos Dinamarqueses (160). Em um estudo funcional com mesma variante no gene *SREBF1*, homozigotos CC para o SNP 3322 C>G mostraram maior taxa na síntese de colesterol do que os portadores de CG ou GG, mas não observaram efeitos deste polimorfismo nos níveis de colesterol plasmático (163). Em pessoas vivendo com HIV, foi relatado que usuários de IPs portadores do alelo C apresentaram aumento nos níveis de colesterol plasmático. O polimorfismo 3322C>G *SREBP1c* é uma mutação sinônima, onde a modificação de nucleotídeos não resulta em alteração de aminoácidos. Assim, é possível que diferentes padrões de expressão gênica possam ocorrer por modificação do dobramento previsto do RNA mensageiro (RNAm), concentrações de RNA de transferência (RNAt) possam ser variáveis para diferentes codons ou que outro SNP em desequilíbrio de ligação com essa variante possa ser responsável pela associação observada (164).

5.9. Gene associado a obesidade e massa gorda (*FTO*)

O gene associado a obesidade e massa gorda (*FTO*,16q12.2) foi identificado em 2007, quase simultaneamente por dois grupos de pesquisa, para a DM2 através do seu efeito no IMC e fenótipos relacionados (165,166). Os papéis fisiológicos e os mecanismos celulares executados pela proteína codificada pelo *FTO* permanecem obscuros. Acredita-se que execute um papel crucial no controle do consumo energético, pois é altamente expresso no núcleo arqueado do hipotálamo, onde reside o controle do apetite e metabolismo energético. Algumas evidências também apontam a relação do *FTO* com resposta a saciedade, adipogênese, gasto energético e na função mitocondrial dentro do músculo esquelético (167).

Os íntrons 1 e 2 do *FTO* abrigam 89 variantes em forte desequilíbrio de ligação já associadas com ganho de peso, gordura corporal, IMC, CC e escolha alimentar.

Deste conjunto de polimorfismos, o SNP rs9939609 T>A no íntron 1 foi o mais extensamente investigado (168). A maioria dos achados de associação com IMC são em adultos Euro-descendentes (169–173) e crianças/adolescentes (174–177).

Até o momento, sabe-se que o *FTO* codifica uma proteína nuclear pertencente a família das oxigenases 2-oxoglutarato (2-OG) com função demetilase de DNA fita simples. As enzimas oxigenases estão envolvidas no reparo de DNA, metabolismo de ácidos graxos, modificações pós-traducionais, splicing, degradação e tradução de RNA. Utilizam Fe(II) não-heme como co-fator e oxigênio e 2-OG como co-substrato, produzindo succinato e dióxido de carbono como subprodutos. Análises de alinhamento demonstraram que a sequência do *FTO* é homóloga a enzima AlkB da *E. Coli*, cuja função primordial é o reparo oxidativo de bases alquiladas (metil) de DNA e RNA (178). Subsequentemente, Wu *et al.* (2010) (179) mostraram que o *Fto* é um coativador transcricional que acentua a transcrição dos C/EPBs na região promotora de genes não metilados e naqueles reprimidos por metilação, direcionando para um papel epigenético do *Fto* no controle da adipogênese. Esse grupo de pesquisadores também mencionou a atividade endonuclease do *Fto*.

Merkestein *et al.* (2015) (180) demonstraram que a atividade desmetilase do *FTO* ocorre durante os processos iniciais de adipogênese, particularmente durante a expansão clonal mitótica - MCE (do inglês, *mitotic clonal expansion*). No seu estudo com modelos experimentais, camundongos *FTO knockout* suprimiram a adipogênese antes da MEC, enquanto a superexpressão do *FTO* aumentou a expressão do *PPARG* e da proteína alfa estimuladora de ligação a CCAAT (*C/EBP- α* , do inglês *CCAAT-enhancer-binding protein alpha*). Os autores demonstraram que os efeitos dos SNPs no gene *FTO* na suscetibilidade à obesidade não são devidos a alteração da sua expressão, mas sim da modificação na expressão do gene *RUNX1T1* (do inglês, *RUNX1 partner transcriptional co-repressor 1*), adjacente ao *FTO*. O *RUNX1T1* é um fator de transcrição relacionado à adipogênese que existe em duas isoformas de splicing: longa (L) e curta (S). O gene *FTO* atua regulando o splicing do gene *RUNX1T1*, favorecendo a transcrição da isoforma S, que propicia a ativação de *PPARG* e da proteína beta estimuladora de ligação a CCAAT (*C/EBP- β* , do inglês *CCAAT-enhancer-binding protein beta*), ambos diretamente associados a maior estimulação à adipogênese e à proliferação de adipócitos. A isoforma L prejudica a

adipogênese, uma vez que se liga ao C/EBP- β e este, por sua vez, impede a ligação de *RUNX1T1* ao DNA.

Outra atuação do *FTO* está vinculado ao processamento dos precursores SREB1c e *CIDEA* (indutor de morte celular pelo fator de fragmentação de DNA α -efetor c, do inglês *cell death-inducing DFFA - DNA fragmentation factor- α -like effector c*), dois importantes fatores de transcrição que controlam acúmulo de lipídios nos hepatócitos. Células do tipo HepC2 com *FTO* superexpresso foram cultivadas por 24 horas em meio de cultura com ácidos graxos livres, ácido oléico e palmítico. O aumento na expressão do *FTO* favoreceu o acúmulo de triglicerídeos (TG). Ao passo que quando inibidas, as células HepC2 submetidas aos mesmos processos promoveram diminuição no armazenamento hepatocelular de TGs. Estes resultados mostram que o *FTO* controla o conteúdo de TG por elevar *de novo* a lipogênese ou síntese de ácidos graxos em hepatócitos. A hipótese está baseada na atividade desmetilase do *FTO* que parece modular as proteínas SCAP e S2P, aumentando a maturação da SREB1c que, uma vez ativa, se desloca para o núcleo e aumenta a expressão de *CIDEA* – responsável por favorecer o estoque de lipídios nos hepatócitos (181).

Até o momento, temos conhecimento de apenas duas investigações relacionando SNPs no *FTO* e distúrbios metabólicos em pessoas co-infectadas pelo vírus da hepatite C (HCV) e o HIV. O primeiro trabalho, de Pineda-Tenor *et al.* (2014) (182), os indivíduos portadores do alelo A para a variante rs9939609 (T>A) tiveram maior chance de apresentar sobrepeso, resistência à insulina, fibrose, esteatose e menor resposta virológica sustentada após tratamento para o HCV. Na segunda pesquisa, Núñez-Torres *et al.* (2017) (183) observaram que o SNP rs9940128 (G>A) no *FTO*, que está em alto desequilíbrio de ligação com rs9939609, foi associado com doença hepática gordurosa (FLD) em PVHIV com IMC normal. A frequência do genótipo AA entre os pacientes com FLD foi quase duas vezes maior do que nos indivíduos sem FLD. Todavia, nenhuma destas pesquisas investigou a associação entre o *FTO* e a LD. Desconhecemos trabalhos na literatura científica que tenham verificado efeitos dos ARVs na expressão e atividade do gene *FTO*.

Contudo, parece que o *FTO* não é o responsável pela susceptibilidade ao ganho de peso e complicações metabólicas mas sim os genes *IRX3* (do inglês, *Iroquis homeobox 3*) e *IRX5* (do inglês, *Iroquis homeobox 5*) que são transcritos na fita reversa do *FTO* (184). O risco para obesidade está associado a um nucleotídeo específico no SNP rs1421085 (T>C) no gene *FTO*, que apresenta alto desequilíbrio de ligação com o polimorfismo rs9939609. A presença do alelo C, aumenta a expressão do *IRX3* e *IRX5* que, por sua vez, estimulam a atividade de precursores de adipócitos mesenquimais e diminuem a termogênese mitocondrial (reprime o gene da proteína desacopladora 1 - *UCP1*, do inglês *uncoupling protein 1* e o co-ativador 1 α PPAR γ - *PGC-1 α* , do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha*), favorecendo o armazenamento de lipídios no TAB. Por outro lado, o alelo T inibe a expressão de *IRX3* e *IRX5* restaurando a termogênese mitocondrial e interrompendo o acúmulo de gordura de forma excessiva (185). Esses resultados foram descritos como “caso resolvido”, onde o "criminoso" direto não é o gene *FTO*, mas são os genes *IRX3* e *IRX5*. Os "locais do crime" são os pré-adipócitos. O "crime" é que eles inibem a queima de lipídios e o metabolismo energético (186).

5.10. Sirtuina 1 (*SIRT1*)

Investigações científicas mostram que a restrição calórica (RC), definida como uma intervenção nutricional de redução da ingestão energética (20-50%), sem desnutrição, é capaz de diminuir o peso corporal total e massa gorda, minimizar níveis plasmáticos de marcadores do perfil lipídico (como colesterol total e triglicerídeos), atenuar mediadores de inflamação (proteína C reativa, interleucina-6, fator de necrose tumoral) e melhorar a homeostase da glicose, inibindo rotas inflamatórias ao mesmo tempo que ativa múltiplas vias moléculas que promovem diminuição da lipogênese (187,188).

Em organismos inferiores, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila Melanogaster*, esses efeitos são mediados pelo regulador de silenciamento da informação 2 (Sir2, do inglês *Silent Information Regulator 2*). Os efeitos desta proteína no aumento do tempo de vida ocorrem por mecanismos de regulação *downstream* sob determinadas condições em tecidos específicos, enquanto que sua inativação encurta este período. Uma vez que a atividade enzimática da *Sir2*

como desacetilase de histonas dependente de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) está conectada com a detecção do estado energético celular (nutrientes), esta proteína é altamente conservada diversas espécies (187) e os genes ortólogos em eucariotos superiores são conhecidos como sirtuínas - SIRTs (188), do inglês *Silent Information Regulator Two proteins* (189).

As sirtuínas (SIRTs) são uma classe de enzimas com atividade de desacetilases de histonas (HDACs classe III) e não histonas, ADP-ribosiltransferase, desuccinilases e demanólises, categorizadas pelo domínio de ligação catalítico dependente de NAD⁺ (190). Em mamíferos, sete SIRTs foram identificadas (SIRT1-7) e ainda que apresentem o mesmo domínio catalítico, variam em sua atividade enzimática e localização celular. As SIRTs 1, 6 e 7 são predominantes no núcleo. A SIRT1, particularmente, está associada a eucromatina e pode se deslocar para o citosol quando necessária para atuação em genes alvos. A SIRT2 encontra-se no citoplasma. As SIRTs 3, 4 e 5 são mitocondriais (189).

A função mais bem elucidada das SIRTs é sua capacidade de reverter a acetilação de proteínas tipo histonas, influenciando diretamente na estrutura dos nucleossomos e, portanto, na transcrição gênica (191). Além disso, são sensores energéticos celulares, uma vez que dependem dos níveis de NAD⁺ para executar suas atividades biológicas. Essa capacidade de controlar sistemas em um ambiente *redox* faz com que as SIRTs possam neutralizar danos oxidativos associados a doenças comuns do envelhecimento. Também são fundamentais na regulação da homeostase celular, especialmente no que tange o metabolismo, inflamação, estresse oxidativo e senescência. Logo, acredita-se que a ativação das sirtuínas possa ter um papel central em doenças metabólicas como DM2 e obesidade, assim como em doenças neurodegenerativas associadas com o envelhecimento. Isso se deve, em parte, à capacidade das SIRTs em estimular a atividade das mitocôndrias, prevenindo mudanças subjacentes a diversas enfermidades (192).

A atividade desacetilase remove grupos acetila de resíduos proteicos acetil-lisina modificados. Tal modificação pós-traducional começa com a hidrólise de NAD⁺. Para cada acetil-lisina desacetilada, uma molécula de NAD⁺ é clivada formando dois produtos: O-acetil-ADP-ribose (O-AADPR) e a nicotinamida (NAM); liberando o

substrato desacetilado. Pouco se sabe sobre O-AADPR, mas alguns trabalhos insinuem que este pode formar complexos com a SIRT que o produziu, possivelmente ocasionando sua inibição. Assim, mudanças intracelulares na razão NAD⁺/NADH impactam diretamente na atividade das SIRTs: NAD⁺ ativa enquanto que NADH inibe. Quando a disponibilidade energética é baixa, alto nível de NAD⁺ e baixo de NADH ativam as SIRTs ao passo que, quando a energia celular está alta, a relação NAD⁺/NADH será baixa e as SIRTs também terão sua atividade reduzida (193).

O gene homólogo à Sir2 em humanos foi nomeado de sirtuínas (SIRTs). Sua popularidade cresceu quando foi identificada sua capacidade de imitar a RC e retardar o aparecimento de doenças ligadas ao envelhecimento. Em leveduras, a RC diminui os níveis de NADH, aumentando a atividade da Sir2. Camundongos privados de alimentos aumentam os níveis de NAD⁺ no fígado em mais de 50%, favorecendo a atividade da *SIRT1* (193,194). Também se evidenciou que compostos naturais como o resveratrol (RVS) pode induzir a atividade das SIRTs em modelos de organismos inferiores (195).

A sirtuína 1, codificada pelo gene *SIRT1* (10q21.3) é a integrante mais bem caracterizada do grupo das SIRTs. Já foi comparada sua atuação na regulação do metabolismo da gordura e da glicose em consequência de alterações nos níveis de energia (196) bem como da inflamação (197) e do estresse oxidativo (198). Diversos estudos já mostraram a habilidade da *SIRT1* em mimetizar os efeitos da RC (187,195,199–201). Algumas evidências confirmam essa hipótese: primeiro, camundongos *knockout* para *SIRT1* sob RC mostram apenas algumas mudanças metabólicas desencadeadas pela privação alimentar; desta forma, a atividade da *SIRT1* parece ser essencial (187). Segundo, a *SIRT1* controla a adipogênese e a mobilização de gordura no TAB através da sua ligação e repressão do *PPARG* que, nesta situação, passa a reprimir genes alvo (194). Terceiro, a *SIRT1* é capaz de induzir a secreção de insulina em células β -pancreáticas. A influência na homeostase da insulina ocorre via ligação direta ao promotor do gene da proteína desacopladora mitocondrial 2 (*UCP-2*, do inglês *uncoupling protein 2*) e inibição da sua expressão. A supressão da *UCP-2* causa um aumento na produção de ATP e secreção de insulina. Por fim, a *SIRT1* também atua no equilíbrio da glicose no fígado. Os hepatócitos

respondem aos sinais de jejum com aumento da gliconeogênese e diminuição da glicólise. Essas respostas, no entanto, são acentuadamente enfraquecidas quando a *SIRT1* é *knocked down*. A gliconeogênese regulada pela *SIRT1* nesse órgão ocorre pela desacetilação e ativação do receptor co-ativado 1- α (*PCG1- α*) – regulador chave da biogênese mitocondrial (202). Outrossim, a capacidade da *SIRT1* em desacetilar o fator nuclear *kappa* B (NF-Kb) diminui a sua expressão e, conseqüentemente, sua ação pró-inflamatória (Yang H et al. 2012). Já foi mostrado que o envelhecimento está associado a ativação permanente do sistema NF-Kb (203). Ainda, Mattagajasingh *et al.* (2007) (198) demonstraram que a *SIRT1* é capaz de melhorar a função endotelial ao promover relaxamento vascular através da desacetilação do óxido nítrico sintase endotelial – eNOS (do inglês, *endothelial nitric oxide synthase*) (198,204).

Também é importante citar a relação coordenada entre a *SIRT1* e a proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK), outro importante mediador metabólico. A via da AMPK é ativada através da auto-fosforilação da AMPK (pAMPK) na treonina 172. Quando a relação AMP/ATP intracelular aumenta devido ao estresse metabólico, a AMPK é fosforilada. Posteriormente, as moléculas alvo *downstream* são ativadas, promovendo o catabolismo. Porém, quando a relação AMP/ATP cai, a AMPK aumenta o anabolismo (205). Em camundongos, Cantó *et al.* (2009) (206) foram capazes de demonstrar que a ativação de AMPK estimula a atividade da *SIRT1* através do aumento nos níveis intracelulares de NAD⁺, co-substrato fundamental para seu mecanismo energético. Por isso, a *SIRT1* é considerada intermediador do estado metabólico celular, já que sua atividade é dependente concentração intracelular de NAD⁺.

As implicações da *SIRT1* no curso clínico de patologias virais já foram ilustradas (207). Na infecção pelo HIV-1, a participação da *SIRT1* é ampla. A proteína Tat é um substrato para atividade desacetilase da *SIRT1*. Assim, *SIRT1* pode desacetilar a proteína Tat do HIV-1 e induzir ativação transcricional proviral, levando a hiperativação de células T. Contudo, ao contrário, a proteína Tat pode inibir a atividade da *SIRT1* através da ligação ao sítio catalítico da enzima, inibindo-a. Quando isso ocorre, a *SIRT1* perde a capacidade de desacetilação da lisina 310 (K310) na subunidade p65 no NF-Kb e desencadeia a cascata de ativação de NF-Kb, o que

intensifica a excitação de LT-CD4+ favorecendo a replicação do HIV-1 (208,209). Análises *in vitro* e de biologia molecular demonstraram que células em cultivo quando tratadas com a proteína Tat, mostraram uma redução significativa nos níveis de ativação de AMPK o que conseqüentemente reduziu a ativação da *SIRT1* e aumento da transativação da região LTR do HIV-1, potencializando sua replicação. Esse resultado indica que a participação da *SIRT1* na replicação do HIV-1 é dependente da via de sinalização AMPK (210).

Compostos ativadores naturais, como o resveratrol (RVS) (211) e pequenas moléculas sintéticos das SIRTs podem ser uma nova classe de agentes terapêuticos (197). Os efeitos do RVS como simulador da restrição calórica via ativação do sistema das SIRTs já foi demonstrado em estudos experimentais (198,215–218). Ensaio clínicos avaliando a suplementação de RVS como indutor da atividade das *SIRT1* ainda são escassos e os trabalhos publicados apresentam dados contraditórios (217–225).

Dado o múltiplo envolvimento da *SIRT1* no controle da homeostase metabólica em diversos tecidos, variantes genéticas na *SIRT1* podem alterar sua expressão e atividade, predispondo indivíduos à obesidade e comorbidades associadas (226). Nessa perspectiva, quatro SNPs apresentam relevância: rs7895833 A>G e 12049646 T>C (ambos localizados na região promotora), rs12413112 G>A no íntron 4 e o rs2273773 T>C no éxon 5. Um estudo baseado numa grande coorte de Holandeses (n = 3575), encontrou que indivíduos portadores do genótipo TC para variante rs2273773 T>C tiveram 0,5 Kg/m² a mais que os portadores homocigotos para o alelo selvagem T (227). Em Japoneses, Shimoyama *et al.* (2011) (228) observaram que os SNPs rs7895833 G>A e rs2273773 T>C foram associados a parâmetros laboratoriais e antropométricos. Quando a amostra foi estratificada por sexo, a variante rs7895833 G>A foi relacionada com adiposidade em homens: os portadores do alelo polimórfico A (GA + AA) em comparação com portadores do alelo selvagem G (GG) apresentaram maior IMC e razão de gordura corporal. Esta última variável também foi relacionada com o SNP rs2273773 T>C em homens, na qual os indivíduos TT também exibiram maior razão de gordura corporal e hiperglicemia. É importante observar que na população Japonesa, o alelo G é selvagem, enquanto em Caucasianos é o

polimórfico. Essa diferença na frequência alélica pode explicar por que os japoneses apresentam obesidade menos pronunciada em comparação aos caucasóides.

Estudos de associação genômica falharam em encontrar uma relação entre os SNPs rs7895833 (A>G), 12049646 (T>C), rs12413112 (G>A) e rs2273773 (T> C) na *SIRT1* com obesidade e fenótipos relacionados. Weyrich *et al.* (2008) (229) em um estudo transversal, genotiparam tagSNPs na *SIRT1* (rs730821 A> G, rs12413112 G> A, rs7069102 G> C, rs2273773 T> C) a fim de avaliar a associação entre gasto energético e características metabólicas em indivíduos pré-diabéticos (história familiar tipo 2 e BMI > 27 Kg/m²). Os genótipos não diferiram significativamente quanto ao IMC, gordura corporal total e circunferência da cintura-quadril, mas o gasto energético basal foi significativamente menor em portadores menores de alelo A do rs12413112. Essa variante comum foi analisada em um subgrupo de participantes submetidos a intervenção no estilo de vida por 9 meses. Após o seguimento, não houve associação entre o SNP rs12413112 e IMC ou peso. Em contraste, os indivíduos portadores do alelo A foram menos responsivos à glicose plasmática em jejum. Assim, parece que a variante A do polimorfismo rs12413112 afeta negativamente a expressão de *SIRT1*, prejudicando a sensibilidade à insulina no fígado (229). Meneguette *et al.* (2016) (230) não encontraram diferença no genótipo e na frequência alélica do SNP rs7895833 A>G na *SIRT1* entre indivíduos adultos brasileiros com síndrome metabólica (SM) e aqueles sem ($P = 0,24$). A frequência menor do alelo G foi de 0,28 em indivíduos com SM e 0,265 em não-SM.

Achados na mesma direção foram publicados por Liguori *et al.* (2014) (231), que analisaram cinco variantes comuns na *SIRT1*, incluindo rs12413112 (G> A), e nenhum polimorfismo foi associado com obesidade mórbida em uma coorte de indivíduos italianos (IMC = $46,5 \pm 0,23$ Kg/m²). Um estudo em pacientes turcos relatado por Kilic *et al.* (2014) (204) não encontrou associação entre o SNP rs7895833 (A> G) e risco para doença cardiovascular (DCV); no entanto, o alelo mutante T para o SNP rs2273773 (C> T) aumenta em 1,9 vezes o risco para DCV quando comparado ao alelo tipo C selvagem. Os autores também encontraram um aumento no nível de *SIRT1* que levou à especulação de que as modificações epigenéticas mediadas pela *SIRT1* sejam um mecanismo compensatório para proteger as pessoas dos efeitos nocivos das DCV. Um estudo longitudinal sobre DM2 e obesidade em indianos Pima

não encontrou a contribuição de rs7895933 no desenvolvimento de DM2. Outros SNPs na *SIRT1* avaliados neste estudo não foram associados com IMC ou percentual de gordura corporal (232).

Por outro lado, estudos mostraram efeitos opostos, uma vez que o alelo raro de variantes genéticas pode ser protetor em vez de risco à obesidade grave em populações não infectadas pelo HIV, como descrito por Clark *et al.* (2012) (233) em um estudo de caso-controle com indivíduos caucasianos obesos e não obesos. Os autores descobriram que cada alelo raro de rs12413112 G>A na *SIRT1* estava associado a um menor IMC no grupo de indivíduos eutróficos. Outro SNP, o alelo raro de rs12049646 T>C também foi associado com redução do IMC apenas em homens da Espanha, onde portadores do alelo C tiveram uma diferença média de 0,82 Kg/m² em relação ao genótipo TT. As análises experimentais realizadas pelos autores indicam que a troca de nucleotídeos C>T resulta em menor interação com fatores de transcrição ou proteínas nucleares e indicou que outros estudos são necessários para esclarecer a interação entre polimorfismos no gene da *SIRT1* e dimorfismo sexual (234). Como a *SIRT1* tem efeitos pleiotrópicos que são tecido-específicos, especula-se que a expressão generalizada da *SIRT1* possa propiciar o envelhecimento. Por esse motivo, Zillikens *et al.* (2009) (235) investigaram como as variantes genéticas na *SIRT1* poderiam se comportar em relação ao risco de obesidade em duas grandes populações independentes de idosos caucasianos holandeses. Os resultados mostraram que os portadores de ambos os alelos raros para rs7895833 A>G e rs1467569 G>A apresentaram menor IMC ao longo do tempo, o que representa uma redução de 9-11% no risco de sobrepeso e 13-18% menor risco de obesidade quando comparado aos portadores AA e GG-homozigotos, respectivamente.

Pesquisas envolvendo a influência de polimorfismos genéticos na *SIRT1* com LD e alterações metabólicas correlacionadas em PVHIV em uso regular de TARV ainda não foram analisadas. Ao que se sabe, este é o primeiro estudo a investigar esta possível associação. A ação dos fármacos antirretrovirais sobre a expressão e atividade da *SIRT1* tampouco já foi avaliada.

6 MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DE FÁRMACOS (MTF)

Apesar da eficácia dos novos fármacos ARVs e menor potencial tóxico, alguns pacientes não atingem a supressão viral. Por isso é importante acompanhar os níveis de fármacos circulantes a fim de detectar pacientes em falha terapêutica e iniciar a terapia de resgate, bem como assegurar o sucesso da TARV mantendo a resposta virológica sustentada e restaurando o sistema imune (236). Conceitualmente, o monitoramento terapêutico de fármacos (MTF) é uma rotina clínica de aferição dos níveis de fármacos em matrizes biológicas (plasma, geralmente) a fim de garantir que fiquem dentro da faixa ou janela terapêutica (237). O processo de MTF está baseado na relação entre a dose e a concentração plasmática ou os efeitos terapêuticos. Por isso, quanto mais afastada a concentração plasmática de um fármaco estiver da faixa terapêutica, maior será a chance de ineficácia clínica. Ao passo que quanto mais próxima da concentração ideal um fármaco estiver, mínimas serão as oportunidades de falha terapêutica (Figura 5) (238,239).

Geralmente, os argumentos a favor do MTF incluem fármacos que apresentem correlação direta entre eficácia e toxicidade, variabilidade farmacocinética, estreita faixa terapêutica e dificuldade em avaliar clinicamente efeitos terapêuticos ou tóxicos. Os ARVs preenchem a maioria destes critérios (240); sendo o primeiro bem estabelecido para os fármacos da classe dos ITRNN e IP (241–243). Contudo, os ITRNs não são candidatos para o MTF por serem pró-fármacos e necessitarem de metabolização intracelular antes de se tornarem metabólitos trifosforilados ativos (244).

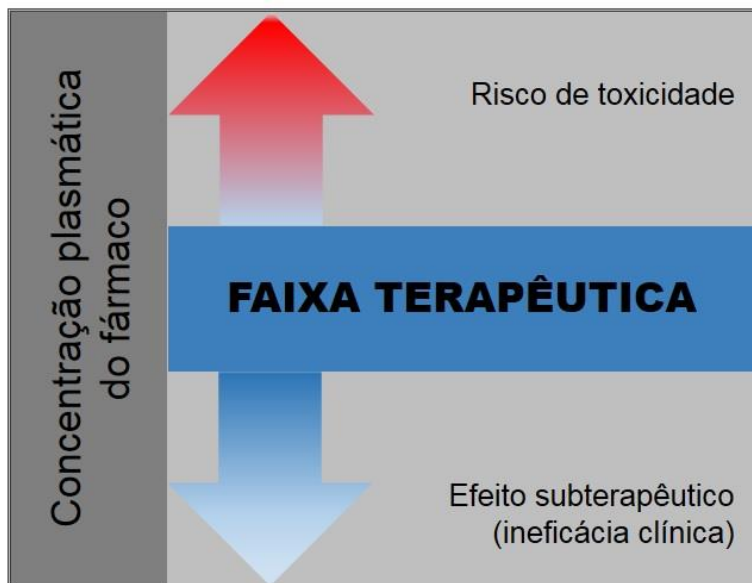


Figura 5. Conceito de faixa terapêutica.

Adaptado de Kang J-S and Lee M-H. Overview of Therapeutic Drug Monitoring. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 2009. (237)

O maior objetivo do monitoramento das concentrações plasmáticas dos ARV, além da supressão viral e reconstituição imune, é, sem dúvida, controlar o contato exacerbado com os antirretrovirais, já que as interações farmacocinéticas destes com outros medicamentos tem grande impacto clínico e requerem ajuste de dose. Os ARVs interagem com contraceptivos hormonais, antitubercúlicos, antidepressivos, anti-hipertensivos, analgésicos, antimaláricos, corticoides, estatinas e muitos outros medicamentos (32). Dos ITRNNs e IPs, o efavirenz (EFV) e o atazanavir (ATV), respectivamente, são amplamente utilizados nos esquemas ARVs (245,246). A correlação entre a concentração plasmática de ambos os fármacos e a eficácia clínica já foram comprovadas (247,248). Foi estabelecido que o intervalo terapêutico do EFV é de 1,0 – 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (meia vida longa de 52-76 horas após uma dose e de 40-55h após uso contínuo) (249) e do ATV é 150 – 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (meia vida média de 8,35 horas) (250,251). Níveis plasmáticos elevados do EFV foram associados com efeitos severos no sistema nervoso central, como tontura, sonolência, sonhos vívidos e dificuldade de concentração, em vários grupos étnicos. Em torno de 20% a 50% dos pacientes em uso de ATV irão desenvolver hiperbilirrubinemia. Destes, 6% podem sofrer icterícia (245,252).

Rotineiramente, a genotipagem de resistência viral e o monitoramento do tratamento são parte do cuidado médico em países desenvolvidos como ação tanto para oportunizar uma terapia individualizada (ajuste de dose) quanto assegurar a aderência do paciente (253,254). Não obstante, o acompanhamento dos níveis plasmáticos dos fármacos ARVs é de particular importância para grupos especiais como crianças, gestantes e idosos (255–260). Em países de média e baixa renda esta prática é eventual, pois há inúmeros desafios na implementação do MTF, tais como a indispensável presença de pessoas capacitadas para realizar a coleta do plasma, transporte do material biológico, necessidade de armazenamento e transporte adequado (261). Ainda, é requerida infraestrutura laboratorial complexa em centros especializados, o que pode dificultar o acesso dos pacientes (262).

Em locais onde o MTF não está disponível, a OMS sugere o acompanhamento da terapia através do relato do paciente acerca de efeitos adversos, parâmetros imunológicos (contagem de LT-CD4+) e virais (nível RNA do HIV-1) (263). Porém, as informações obtidas através desses critérios apresentam baixa sensibilidade e especificidade em detectar real falha terapêutica, pois os pacientes nesta condição só serão diagnosticados quando apresentarem doença oportunista ou imunodeficiência grave, apesar da resposta virológica adequada (261). Nesse cenário se enquadra o Brasil que, apesar de ser referência mundial nas políticas públicas de atendimento, cuidado e fornecimento gratuito da TARV ao portador de HIV, não possui o MTF implementado na prática clínica de atenção às PVHIV. Por isso, a utilização de metodologias práticas, acessíveis e simples é urgente como estratégia importante para regiões com recursos limitados (262,264,265).

Os parâmetros farmacocinéticos usados para quantificar a exposição do indivíduo a um dado fármaco são apresentados como área sob a curva (AUC, do inglês *area under the curve*), pico máximo de concentração plasmática (C_{max} , do inglês *maximum or peak plasma concentration*) e de concentração mínima (C_{trough} do inglês, *trough concentration*). Este último representa o nível mínimo do fármaco durante um intervalo entre duas doses (também conhecido como “período do vale”) e é o indicador mais aceito para o MTF dos fármacos ARVs (253). Para que o MTF seja válido e limitar as variações farmacocinéticas entre a última dose do medicamento e a coleta de sangue, é fundamental atentar para o horário da coleta (preferencialmente quando

a concentração do fármaco estiver o mais próximo do C_{trough}), via de administração, dose, tempo de tratamento e a utilização de outros medicamentos concomitantemente (257).

A determinação plasmática dos fármacos ARVs é realizada por métodos sensíveis baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) com detecção ultravioleta (HPLC-UV, do inglês *high performance liquid chromatography with ultravioleta detection*) e espectrometria de massa (HPLC-MS, do inglês *high performance liquid chromatography with mass spectrometry*; LC-MS/MS e LC-MS). Ao utilizar essa metodologia, cada laboratório precisa desenvolver e validar seus próprios ensaios. Além da ausência de *kits* comercialmente disponíveis para o MTF, a logística para coleta de sangue, armazenamento adequado, cumprimento de orientações sanitárias para o transporte de amostras biológicas e risco de exposição a patógenos tornam essa prática invasiva, laboriosa e cara, posto que requer treinamento de profissionais para gerenciamento de riscos e processamento da amostra, inúmeros aparatos para coleta e laboratórios bem equipados (266–268).

Com o intuito de superar esses obstáculos, outras matrizes biológicas foram propostas, visando estratégias de coleta mais acessíveis e de simples armazenamento, como o cabelo (269,270), a saliva (271,272) e a mancha de sangue seco em papel ou DBS (do inglês, *dried blood spot*) (273).

6.1. Mancha de sangue seco em papel (DBS)

A técnica de DBS é realizada através da punção capilar da ponta do dedo, coleta de gotas de sangue que são embebidas em papel filtro e mantidas em temperatura ambiente para secagem. Não há necessidade de flebotomia, acessibilidade ao monitoramento terapêutico em regiões remotas, facilidade na coleta (passível de ser realizada pelo próprio paciente), armazenamento e transporte, além de reduzir a produção de resíduos biológicos (273–275). A recomendação do método DBS para o MTF de fármacos ARVs é bem estabelecida (53,60,283,264,276–282). A substituição do método convencional para a coleta domiciliar do DBS mostrou uma redução financeira de 43% para pacientes da hemato-oncológicos e 61% para os da

nefrologia (284) e sua aplicação tem sido encorajada como opção alternativa ao plasma em locais com infraestrutura laboratorial restrita, comumente encontrado países de baixa e média renda (261).

Materiais biológicos humanos expostos ao papel absorvente e/ou com capacidade de neutralização/inativação/esterilização são consideradas amostras isentas de risco de contaminação (285). É importante ressaltar que o vírus do HIV-1 perde sua infecciosidade porque seu envelope proteico é rompido em consequência da secagem em temperatura ambiente, o que facilita a utilização do DBS para as rotinas de monitoramento do HIV e nos programas de seguimento em países em desenvolvimento (265).

A aplicabilidade do DBS foi apresentada em 1963 por Guthrie e Susi para triagem da fenilcetonúria em recém-nascidos (286). Desde então, amostras DBS têm sido empregadas em diversos cenários, como na fase pré-clínica inicial no desenvolvimento de fármacos (toxicocinética) assim como na fase tardia (farmacovigilância, farmacocinética e MTF), abuso de substâncias ilícitas, toxicologia forense, investigação dos metabólitos da cocaína e nicotina em recém-nascidos para determinação da prevalência destes produtos durante a gestação, contaminantes ambientais (poluentes e pesticidas, por exemplo), intoxicação de animais e biomonitorização de metais pesados (como chumbo, arsênio, cádmio e outros) (287), quantificação da carga viral de HIV-1 e teste de resistência genotípica (254).

O processo de coleta por DBS (Figura 6) inicia a partir da punção digital na extremidade do dedo médio do paciente usando-se apenas uma agulha (dispensando o uso de seringas). A gota de sangue do dedo é, então, transferida diretamente para o papel filtro especial. Em seguida, é necessário deixar a amostra secar em temperatura ambiente, para estabilização dos analitos, e isso elimina a necessidade de refrigeração (276). Uma vez seco, o papel filtro especial com a amostra poderá ser enviado ao laboratório por meio do serviço postal convencional, o que facilita o transporte, visto que o sangue seco não é considerado uma amostra com risco biológico (264,274). Recomenda-se manter em temperatura ambiente por, no máximo, duas semanas até o envio para o laboratório de análise. Caso seja necessário maior

tempo de armazenamento, as amostras devem ser mantidas a $\leq 20^{\circ}\text{C}$ em sacos do tipo *ziplock* com desumidificador a base de sílica (261).

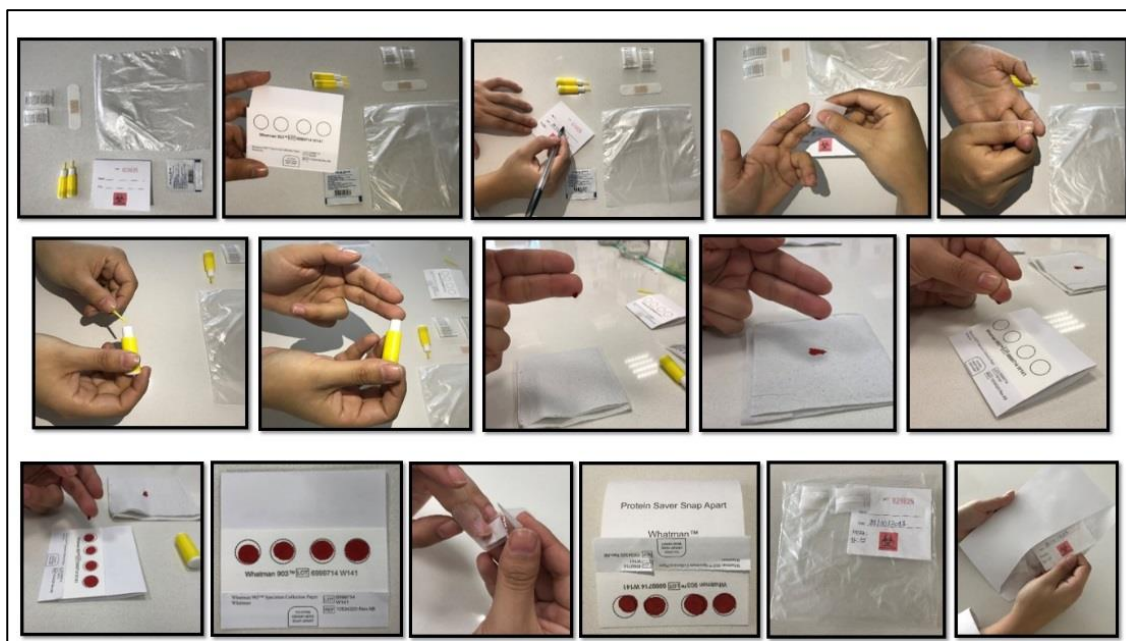


Figura 6. Passo a passo coleta de sangue pela técnica DBS.

No entanto, as concentrações de fármacos na mancha de sangue seco não são iguais aos níveis plasmáticos, pois o sangue capilar obtido da punção digital é uma mistura de sangue venoso, líquido intersticial e intracelular, o que pode explicar os valores diferentes dos obtidos por flebotomia. Portanto, é fundamental estabelecer uma concordância entre os dois métodos a fim de viabilizar o emprego do DBS na prática clínica (288). Para tal, leva-se em consideração dois principais fatores: primeiro, o hematócrito (Hct): representa a porcentagem de glóbulos vermelhos no sangue e interfere no “espalhamento” da gota de sangue no papel filtro em diferentes formas como a viscosidade, homogeneidade, tempo de secagem e recuperação de analitos e segundo, a fração do analito ligada às proteínas plasmáticas (fbpp, do inglês *fraction of analyte bound to plasma proteins*), que é variável dentro do mesmo valor de Hct e influencia na concentração de fármaco obtida a partir do DBS (274,289–291).

As concentrações dos fármacos entre plasma *versus* DBS são avaliadas por regressão linear (correlação). Contudo, não basta os dois métodos apresentarem uma ótima correlação, é preciso que eles concordem entre si. Para tal, utiliza-se o gráfico

de Bland-Altman (292). Adicionalmente, as concentrações estimadas do plasma (EPC, do inglês *Estimated Plasma Concentration*) são calculadas a partir do DBS usando a fórmula:

$$\text{EPC} = (\text{DBS}_{\text{conc}}/[1-(\text{Hct}/100)]) \times f_p$$

onde DBS_{conc} é a concentração medida em DBS, Hct é o hematócrito individual do paciente e f_p é a fração do fármaco no plasma (277). No trabalho de Antunes *et al.* (2015) (293), o valor de f_p foi ajustado para obter a razão média entre as concentrações plasmáticas de EFV e ATV e EPC de 1, usando a equação acima. Em outra forma de abordagem, a EPC foi calculada usando um fator de correção com base na relação média do EFV e ATV do plasma para concentrações de DBS, sem considerar o Hct individual nem o f_p (fator de correção EPC) (294).

Diversos estudos internacionais mostraram a alta correlação e concordância entre as dosagens do EFV e ATV no plasma e DBS (265,276–279,281,295). Entretanto, no Brasil, publicações utilizando a metodologia DBS para determinação das concentrações de fármacos ARVs em pacientes com HIV são exíguos.

7 JUSTIFICATIVA

Considerando a importância dos efeitos adversos como fatores de não adesão à TARV e as possíveis contribuições da farmacogenômica, a investigação de polimorfismos em genes do metabolismo lipídico e homeostase da glicose, como *TNF*, *PPARG*, *FTO* e *SREBF1*, são de extrema relevância como fatores de susceptibilidade ao desenvolvimento de lipodistrofia (LD) e síndrome metabólica (SM) em PVHIV. Nesse sentido, especula-se o papel da *SIRT1* na ocorrência de alterações na distribuição da gordura corporal e distúrbios metabólicos associados, uma vez que atua como regulador chave de fatores de transcrição envolvidos na adipogênese, inflamação, estresse oxidativo e senescência. Ainda, já foi estabelecida a capacidade da *SIRT1* modular a replicação viral agindo diretamente na proteína Tat do HIV, essencial para ativação de provírus e hiperativação de LT-DC4+.

A despeito da eficácia dos fármacos ARVs no controle da replicação viral e restauração imunológica, alguns pacientes não atingem a supressão viral e/ou apresentam concentrações plasmáticas acima da faixa terapêutica, causando toxicidade e maior risco de abandono do tratamento. Por isso, o MTF constitui uma tentativa de determinar a exposição individual do paciente a um medicamento e evitar uma alta ou baixa dosagem. A utilização de técnicas de baixo custo logístico e acessibilidade são ferramentas fundamentais para assegurar a eficácia e adesão aos programas de tratamento e atenção às PVHIV. Por isso, o DBS amplia o acesso dos pacientes ao monitoramento da terapia medicamentosa, devido à facilidade de coleta, baixo risco biológico, possibilidade de conservação em temperatura ambiente e transporte por correio convencional. A implementação deste procedimento contribuirá para alcançar as metas 90-90-90, estratégia ambicioso definida pela UNAIDS que prevê, até 2020, que 90% das pessoas com HIV saibam do diagnóstico, 90% estejam em tratamento e 90% apresentam carga viral indetectável.

8 OBJETIVOS

8.1. Objetivo geral

Investigar o papel de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) em genes do metabolismo lipídico e glicídico na susceptibilidade ao desenvolvimento de lipodistrofia e síndrome metabólica e determinar os níveis plasmáticos de fármacos antirretrovirais através da metodologia de sangue impregnado em papel (DBS) como alternativa para monitoramento terapêutico farmacológico em pessoas vivendo com HIV.

8.2. Objetivos específicos

- Genotipar variantes em genes candidatos do metabolismo lipídico e glicídico e avaliar a susceptibilidade ao desenvolvimento de lipodistrofia e síndrome metabólica em pacientes com HIV sob uso regular da TARV:

- *FTO*, rs9939609 T>A;
- *TNF* -238, rs361525 G>A;
- *PPARG* Pro12Ala, rs1801282 C>G;
- *SREBF1* 3322, rs2297508 C>G;

- Genotipar 4 SNPs no do gene da *SIRT1* e investigar a contribuição de cada variante como fator preditivo ao desenvolvimento de lipodistrofia e síndrome metabólica em pacientes com HIV sob uso regular da TARV:

- rs7895833 A>G, região promotora;
- 12049646 T>C, região promotora;
- rs12413112 G>A, íntron 4;
- rs2273773 T>C, éxon 5;

- Dosar os níveis plasmáticos dos fármacos efavirenz (ITRNN) e atazanavir (IP) no plasma e na gota de sangue seco empregada em papel (técnica DBS), comparando com as concentrações plasmáticas previamente validadas em outros estudos;
- Investigar a exequibilidade da técnica DBS para o monitoramento terapêutico de fármacos antirretrovirais em pacientes com HIV vivendo na região Sul do Brasil;
- Avaliar a eficácia da técnica de DBS em relação aos testes padrão para o monitoramento terapêutico da TARV.

9 ARTIGO 1

Artigo de Revisão

“Pharmacogenetic considerations in the treatment of HIV”

Vanessa Suñé Mattevi & Carmela Farias da Silva Tagliari

Pharmacogenomics, 2017

doi: 10.2217/pgs-2016-0097

Review

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Pharmacogenomics



Pharmacogenetic considerations in the treatment of HIV

After the introduction of highly active antiretroviral therapy in the 1990s, the perception of the diagnosis of HIV infection gradually shifted from a 'death sentence' to a chronic disease requiring long-term treatment. The host genetic variability has been shown to play a relevant role in both antiretroviral drugs bioavailability and adverse effects susceptibility. Knowledge about pharmacogenetics role in HIV infection treatment has largely increased over the last years, and is reviewed in the present report, as well as future perspectives for the inclusion of pharmacogenetics information in the directing of HIV infection treatment.

First draft submitted: 31 May 2016; Accepted for publication: 30 September 2016; Published online: 15 December 2016

Keywords: CYP2B6 • CYPs • drug transporters • HAART • HIV • HLA • non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors • nucleoside reverse transcriptase inhibitors • protease inhibitors • UGT1A1

The perspective about the HIV/AIDS epidemics has completely changed in the late 1990s due to the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART). In the early days of AIDS epidemic, a diagnosis of HIV-1 infection was seen as a death sentence. This scenario has been modified due to the development of HAART, one of the greatest successes achieved by medical science so far. Today, life expectancy of patients who are treated with HAART can be considered almost normal [1].

History of HAART

The first antiretroviral (ARV) drug, zidovudine (AZT), was approved by the US FDA in 1987. However, soon after its introduction, it was shown that therapy consisting only by AZT selects drug resistant HIV strains and becomes ineffective, which prompted the search for other drugs [1,2]. A few years later, other nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) were introduced (Table 1), but treatment success was still limited. The first

protease inhibitor, saquinavir, was launched in 1995 (Table 2), and the first non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), nevirapine (NVP), was released in 1996. The use of such drugs in monotherapy was soon shown to be unsuccessful to prevent the emergence of resistant viruses, therefore, combination therapy was introduced in clinical practice [1,3].

HIV infection treatment was revolutionized in 1997, by the introduction of HAART, consisting in three drug combinations (two NRTIs and either a protease inhibitor or an NNRTI) that were shown to be effective in the reduction of viremia to undetectable levels. The use of HAART has changed the status of HIV-1 infection to a chronic disease requiring lifelong treatment. Following the approval of HAART, several other drugs were introduced to treat patients with resistance or intolerance to treatment. In the 2000s, the new classes of fusion and entry inhibitors and integrase strand transfer inhibitors (InSTIs) were introduced (Table 2). The combination

Vanessa S Mattevi*¹
& Carmela FS Tagliari¹

¹Graduate Program in Biosciences,
Federal University of Health Sciences of
Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

*Author for correspondence:

Tel.: +55 51 33038763

Fax: +55 51 33038718

vmattevi@ufcspa.edu.br

Future
Medicine  part of 

Class	Drug	Year of approval	Adverse effects
NRTIs	Zidovudine (AZT, ZDV)	1987	Mitochondrial toxicity, hematological toxicity, myopathy and lactic acidosis
	Didanosine (ddI)	1991	Pancreatitis, peripheral neuropathy, diarrhea, hyperuricemia and hepatic dysfunction
	Stavudine (d4T)	1994	Peripheral neuropathy, fatal lactic acidosis, severe liver enlargement and liver failure
	Lamivudine (3TC)	1995	Skin discoloration
	Abacavir (ABC)	1998	Potentially life-threatening allergic reactions
	Tenofovir disoproxil Fumarate (TDF)	2001	Renal proximal tubulopathy and kidney tubular dysfunction
	Emtricitabine (FTC)	2003	Skin discoloration, lactic acidosis/severe hepatomegaly with steatosis
NNRTIs	Nevirapine (NVP)	1996	Rash and/or hepatotoxicity during the first 6–18 weeks of therapy
	Delavirdine (DLV)	1997	Rash
	Efavirenz (EFV)	1998	Dizziness, drowsiness, trouble sleeping, unusual dreams and trouble concentrating, rash, hepatotoxicity, lipodystrophy, dyslipidemia
	Etravirine (ETR)	2008	Rash, elevations in hepatic transaminases
	Rilpivirine (RPV)	2011	Rash, elevations in hepatic transaminases, CNS disturbances, depression

Data taken from [2,4].
 NNRTI: Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI: Nucleoside reverse transcriptase inhibitor.

of ARVs into single pills was another advance, improving patients' adherence to treatment. At present, early initiation of HAART is recommended for all people living with HIV (PLWH) [2,5–7].

HAART components

HAART exerts its effect through the blockade of different steps of HIV life-cycle (Figure 1) [2,8]. Presently, there are five classes of drugs designed to treat HIV infection (Tables 1 & 2):

- NRTIs (Table 1): these drugs are analogs of nucleosides or nucleotides that block the action of viral reverse transcriptase (RT) by being incorporated in the nascent DNA molecules. All NRTIs compete with endogenous analogs and stop DNA elongation, due to the lack of a 3'-OH moiety in the ribose ring. NRTIs require to be activated in the intracellular space to become active, once that only triphosphorylated nucleosides can be incorporated into DNA. Members of this class include AZT, the oldest ARV drug, abacavir (ABC), didanosine (ddI), stavudine (d4T), lamivudine (3TC), emtricitabine (FTC) and tenofovir (TDF), this last being a nucleotide analog [2,8,9];
- NNRTI (Table 1): interfere directly with the action of viral RT. NNRTIs do not require phosphorylation to inhibit RT. They act through binding to noncatalytic enzyme sites, leading to steric blockage of structural changes in HIV RT. NVP and efavirenz (EFV) are the most frequently used. Delavirdine is available in some countries, and etravirine and rilpivirine are the NNRTIs most recently approved in the EU and in the USA [2,8,9];
- Protease inhibitors (PIs; Table 2): prevent cleavage of viral precursor protein into the subunits required to form new virions. PIs include amprenavir (APV), fosamprenavir (FPV), atazanavir (ATV), darunavir (DRV), indinavir (IDV), lopinavir/ritonavir (LPV/r), nelfinavir (NFV), ritonavir (RTV), saquinavir (SQV) and tipranavir (TPV). They all are substrate and inhibitors of CYP3A, which worsens their pharmacokinetic characteristics. These properties have been overcome by the co-administration of RTV with all PIs but NFV, a drug that inhibits CYP3A activity [2,8,9];
- Entry inhibitors/fusion inhibitors (Table 2): these drugs exert their action in the extracellular space,

blocking the virus attachment to receptors on the cell surface [8]. Enfuvirtide (T-20) is an HIV-1 fusion inhibitor, which prevents the fusion between the viruses with host cell membranes. Maraviroc exerts its action by preventing the binding of HIV to CCR5 chemokine co-receptor in the cellular membrane [2,8,9];

- InSTIs (Table 2): these are the most recently introduced ARVs (Table 2). They act through the inhibition of HIV-DNA integration into the host genome. Raltegravir (RAL) was approved in 2008 and dolutegravir and elvitegravir were approved in 2013 and 2014, respectively [2,8,9].

According to the most recent guidelines [2,5-7], first-line antiretroviral therapy (ART) should consist of two NRTIS plus a NNRTI or an InSTI). This combina-

tion of drugs is utilized in order to avoid selection of viral mutations. Drugs selection takes into account the risk/benefit ratio and the viral genotype.

Genomic information has two main roles in the utilization of ART: the first is the identification of HIV mutations that make the virus resistant to ARVs and the second is the identification of variants in the host genome that modulate the response to ARVs and their side effects. The first approach has become mandatory in the monitoring of ART treatment in high-income countries [10]. Drug resistance is a phenomenon that arises spontaneously, attributed to the absence of 3'-5'exonuclease proofreading activity in the HIV RT [11]. Genetic barrier to resistance has been defined as the number of mutations needed by the virus to acquire resistance to a given drug. Therefore, a higher genetic barrier indicates the drug to be more efficient

Table 2. Protease inhibitors, fusion inhibitor, entry inhibitor and integrase inhibitors and their main side effects.

Class	Drug	Year of approval	Adverse effects
PIs	Saquinavir (SQV)	1995	Dyslipidemia, insulin resistance, hyperglycemia and lipodystrophy
	Ritonavir (RTV)	1996	Dyslipidemia, insulin resistance, hyperglycemia and lipodystrophy
	Indinavir (IDV)	1996	Dyslipidemia, insulin resistance, hyperglycemia and lipodystrophy
	Nelfinavir (NFV)	1997	Dyslipidemia, insulin resistance, hyperglycemia and lipodystrophy
	Lopinavir (LPV)	2000	Dyslipidemia, insulin resistance, hyperglycemia and lipodystrophy
	Atazanavir (ATV)	2003	Hyperbilirubinemia
	Fosamprenavir (FOS-APV, FPV)	2003	The use of fosamprenavir is pending revision due to a potential association between the drug and myocardial infarction and dyslipidemia in HIV infected adults.
	Tipranavir (TPV)	2005	Rash, hepatitis, intracranial hemorrhage, headache, diarrhea
	Darunavir (DRV)	2006	Rash, hepatotoxicity, less metabolic abnormalities than other PIs
Fusion inhibitor	Enfuvirtide (T-20)	2003	Local injection site reactions, hypersensitivity reaction, increased rate of pneumonia in clinical trials
Entry inhibitor	Maraviroc (MVC)	2007	Hepatotoxicity with hypersensitivity reactions, may be in conjunction with severe systemic symptoms, such as fever, rash, eosinophilia
InSTIs	Raltegravir (RAL)	2007	Rash, nausea, insomnia, CPK elevations
	Dolutegravir (DTG)	2013	Headache, insomnia
	Elvitegravir (EVG)	2014	Nausea, diarrhea, renal impairment (caused by cobicistat and tenofovir)

Data taken from [2,4].
InSTI: Integrase strand transfer inhibitor; PI: Protease inhibitor.

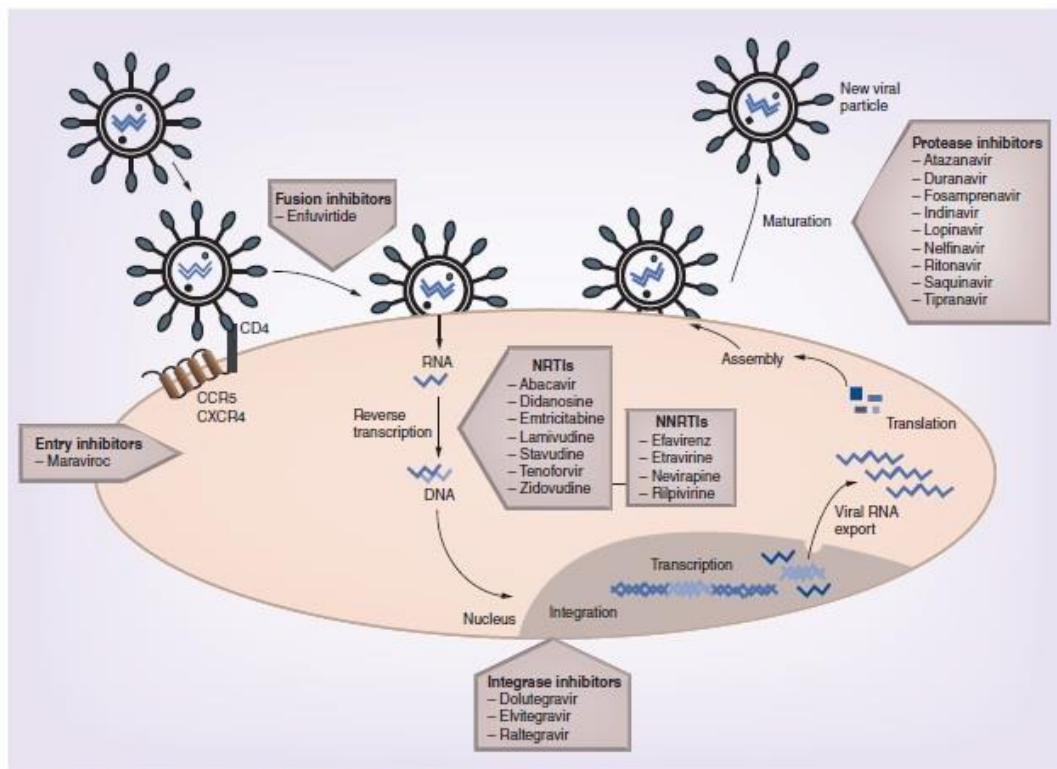


Figure 1. HIV life-cycle and site of action of different antiretroviral classes.

in terms of resistance. Mutations in the RT gene can generate resistance to NRTIs or NNRTIs. In general, NRTIs have a higher genetic barrier than NNRTIs. The cross-resistance among ARVs of a same class is also a problem to be solved. Mutations in the viral protease gene are able to create resistance to PIs. However, in comparison with NRTIs and NNRTIs, PIs were shown to present a high genetic barrier against resistant viruses. INSTIs present genetic barriers to resistance lower than the PIs and most of the NRTIs.

As a consequence of the goals proposed by the WHO [7], advising that all people with known HIV infection should be receiving ART, drug resistance will probably increase in the next years, and HIV genotyping will acquire even more importance in the choice and management of ART. For an in-depth revision of ARVs drug resistance, we suggest readers to refer the paper by Clutter *et al.* [10].

Many studies have already been performed regarding pharmacogenetics of ART focusing on the host genome, but there is still place for studies in this field. Therefore, the present review will examine and evalu-

ate evidence of pharmacogenetic markers in the human genome predictive of response and side effects of ART. The published literature has been retrieved from the PubMed database using the following keywords: anti HIV drugs and genetic polymorphism. Other relevant articles have been selected among the references of the obtained papers.

The first report about ART pharmacogenetics was published in 2002 by Hetherington *et al.* [12], regarding genetic variations in HLA-B region and hypersensitivity reactions to abacavir, but it was not until 2009 to we see the number of published papers significantly increasing. Previous review papers addressing pharmacogenetics of HIV treatment focused in each drug used in ART [13–16], rather than in the genes involved in their pharmacokinetics or pharmacodynamics. Thus, the present paper will be focused in the different genes that have been involved in the response modulation and side effects of ART. The aim of the present review is to highlight the most significant advances in the field, rather than to provide a comprehensive literature survey.

Polymorphisms influencing ART pharmacokinetics

Phase I metabolizing enzymes

This group is composed almost exclusively by the CYP450 enzymes. Humans have 57 genes and more than 59 pseudogenes divided among 18 families of CYP genes and 43 subfamilies [17]. Polymorphisms in several genes from this superfamily have been associated to ART pharmacogenetics and are described in the following sections.

CYP2B6

The *CYP2B6* gene is located at chromosome 19q13.2, spanning a region of 28 kb and containing nine exons [18].

As CYP2B6 is the major enzyme involved in the metabolism of EFV and NVP, its genetic variation has become highly relevant for HIV treatment. EFV shows a narrow therapeutic window, causing adverse effects in the CNS associated with high plasma concentrations, and low concentrations potentially leading to therapy failure. Polymorphisms *CYP2B6* 516G>T (Q172H, rs3745274) and *CYP2B6* 983T>C (I328T, rs28399499), and two haplotypes, *CYP2B6**4 (K262R, rs2272343) and *CYP2B6**6, have been associated with EFV undesirable effects [19]. The haplotype *CYP2B6**6 comprehends two SNPs, Q172H and K262R, and its frequencies range from 15% to over 60% in distinct populations around the globe. This haplotype causes an alteration in *CYP2B6* splicing, leading to increased amounts of a variant that lacks exons 4–6 in the liver, and concurrently decreasing the expression of the normal functional transcript. Haplotype*6 comprises two SNPs that also occur in isolation, but with lower prevalences [4]. Several pharmacogenetic studies have associated the 516G>T change to increased plasma concentrations of EFV, thus suggesting it leads to lower enzymatic activity *in vivo*. Additionally, the 516G>T polymorphism has been associated with an increased prevalence in neurotoxicity and other CNS adverse events. Studies have also shown that daily EFV dose may be reduced in *6 carriers, with consequent reduction in CNS undesired effects. Furthermore, *CYP2B6* genotype was shown to affect NVP plasma levels [18].

CYP3A4 & CYP3A5

CYP3A4 and CYP3A5 enzymes participate in the hepatic metabolism of most PIs and play secondary roles in the metabolism of NNRTIs. RTV is a competitive inhibitor of CYP3A4, and thus is usually included in PI regimens as a booster, in order to increase bioavailability of other PIs, such as LPV and ATV. These two genes are located in a cluster at chromosome 7q. A high number of studies investigated SNPs in these two genes, mainly *CYP3A4*-392 A>G (*1B, rs2740574)

and *CYP3A5**3 (6986 A>G, rs776746). These two SNPs are in strong linkage disequilibrium, and different authors suggest that the *CYP3A4*-392 A>G effect is indeed due to the *CYP3A5* *3 variant, which causes an improperly spliced mRNA and a nonfunctional protein truncated at amino acid 102 [20].

Most studies evaluate the association of these gene variants with plasma levels and/or side effects of NVP and EFV, with negative results [21–28]. These studies were performed in populations from different countries, such as Puerto Rico, USA, Italy, South Africa, Mozambique and Haiti. It is noteworthy that these SNPs present very different frequencies in Euro-derived and Afro-derived populations, and it is mandatory to take these differences into consideration when evaluating these polymorphisms. Other important aspect is that, although these enzymes exert an important role in the metabolism of PIs, few studies reported so far have evaluated their association with PI levels or side effects.

A more recently described *CYP3A4* polymorphism, *CYP3A4**22 (c.522-191 C>T; rs35599367), has been related to lower *CYP3A4* mRNA expression and activity [29] and one study has reported a lower LPV clearance in homozygotes for this variant when compared with noncarriers [30]. However, the frequency of this SNP is quite low in different populations, so studies with large sample sizes are required to confirm this finding. Due to its proven influence on CYP3A4 functionality *in vivo* [29], we believe this variant warrants further investigation.

Other CYPs

Other CYPs already studied are *CYP2C19* [22], *CYP1A2* [31] and *CYP2A6* [31–33], but no consistent associations with HAART efficacy or side effects were reported for these genes.

Phase II metabolizing enzymes

UGT1A1

The UGT enzymes consist in a superfamily of enzymes that catalyze the transfer of glucuronic acid to xenobiotics and other endogenous substrates. The glucuronidation increases the solubility of these compounds in water, facilitating their elimination via bile or kidneys. These enzymes are found in several tissues, such as liver, gastrointestinal tract and breast [4].

The UGT1A1 enzyme is expressed in the liver and other tissues, and is the only responsible for the hepatic metabolism of bilirubin [4], catalyzing the conjugation of free bilirubin with glucuronic acid. Atazanavir and indinavir have been shown to be inhibitors of UGT1A1, thus promoting the elevation of unconjugated bilirubin levels in blood and reducing its elimination [34].

A polymorphism located in the promoter region of the *UGT1A1* gene, the *UGT1A1*28* allele (rs8175347), is constituted by a TA dinucleotide repeat. The wild-type allele (*UGT1A1*1*) has six TA repeats, while the **28* allele is characterized by the insertion of a seventh repeat, which affect its transcription, decreasing its transcriptional activity [4], thus leading to hyperbilirubinemia. Homozygote individuals for the **28* allele present a condition called Gilbert's syndrome. Although the condition is benign, it is an indicator of reduced *UGT1A1* activity, and must be considered in the context of drug toxicity.

The *UGT1A1*28* allele occurs with a frequency of 0.26–0.31 in Caucasians, 0.42–0.56 in African-Americans and only 0.09–0.16 in Asian populations. This variant has been consistently associated with hyperbilirubinemia in patients treated with ATV and this association is one of the higher number of replications in different populations [35–39]. Cost-effectiveness evaluation studies have suggested that testing for *UGT1A1* may be cost effective in clinical practice, depending on the cost of genotyping and the alternative treatment [40].

Drug transporters

Drug transporters have a crucial role in absorption, distribution, metabolism and elimination of drugs and, for this reason, polymorphisms located in their genes have a considerable pharmacological significance. They are comprised in two transporter superfamilies: the solute carrier (SLC) transporters and the ATP-binding cassette (ABC) transporters [41].

ABCB1

The *ABCB1* gene, also known as *MDR1*, is located in chromosome 7q21.12 and encodes the P-glycoprotein (P-gp). P-gp is an efflux pump, which expels several compounds from the interior of cells. It is expressed in several tissues, such as intestine, liver, kidneys and blood-tissue barriers (e.g., blood-brain, blood-cerebral spinal fluid, blood-placenta, blood-testis barriers) [4].

Some NRTIs are substrates for P-gp, including AZT and 3TC. For NRTIs, there is no direct correlation between drug plasma levels and efficacy, but their intracellular concentrations are critical for their action. Although some of the other ARVs are not substrates for P-gp, a high number of studies investigating the association between *ABCB1* SNPs and pharmacogenetics of NNRTIs and PIs can be found in the literature [24,25,32,42–46].

A large number of *ABCB1* gene SNPs have been investigated for their possible functionality and association with different ART-related phenotypes, but the results of the majority of studies have been dis-

cordant so far. Undoubtedly, the most studied SNP in the *ABCB1* gene is 3435 C>T (rs1045642), a silent mutation in the 1145Ile codon of the protein [25]. Associations of this and other *ABCB1* variants with several different phenotypes, such as NVP hepatotoxicity [23,24], effectiveness of PI treatment [44], response to EFV [27], lipodystrophy [43] and glomerular filtration rate [46] were investigated in populations from different countries, such as Mozambique [24], United States [23], Italy [23,43], Haiti [27] and Brazil [46], but the results of these and other studies were mostly discordant.

ABCC2, ABCC4 & ABCC10

These transporters have been implicated in the renal tubular secretion of TDF, although the importance of *ABCC2* remains controversial [47]. The main side effect of this drug is kidney tubular dysfunction (Table 1). The most studied SNPs in these genes are *ABCC2-24* C>T (rs717620) [45,46,48], *ABCC4* 3463 A>G (rs1751034) and *ABCC4* 4131 T>G (rs3742106) [42,46,48]. These previous report showed limited replication for *ABCC4* SNPs, but a higher reproducibility of associations with *ABCC2-24* C>T [42,45,46,49].

A study performed by Pushpakom *et al.* [50] established that TDF is also a substrate for *ABCC10*, a more recently characterized member of the ABC family, and found two *ABCC10* SNPs, rs9349256 and rs2125739, and their haplotype, significantly associated with kidney tubular disease. The first SNP was also associated with urine phosphorous wasting and β 2 microglobulinuria. Although promising, these results were not replicated until the present moment [47]. However, another study reported that the rs2125739 SNP was significantly associated with NVP plasma concentrations [51].

SLCs

The SLCs are a superfamily of transporters that are mainly involved in the uptake of small molecules into cells [41]. Several members of this family play relevant roles in drug transport: OCT, organic cation/carnitine transporters and organic anion transporters (OAT) and the uric acid transporter, URAT1 (SLC22A12). Furthermore, two proteins from the SLC47 family are involved in drug transport, SLC47A1 (also known as MATE1) and SLC47A2 (also known as MATE2). It also known that *SLC22A6* (OAT1) and *SLC22A8* (OAT3) gene products participate in the transport of TDF into the proximal tubule cells of the kidneys and SNPs in these and other genes from this family have been investigated regarding the kidney side effects of TDF [42,44,46], but with a lack of concordance between them.

Genes encoding proteins involved in HAART pharmacodynamics

This group comprises genetic variations that affect the structure or expression of proteins targeted by the drugs (intentionally or not).

HLA

The association of *HLA-B*5701* and hypersensitivity reactions with the use of ABC is the most well-established pharmacogenetic determinant of the use of HAART. Several Health Agencies from different countries, such as Health Canada (Santé Canada), FDA, Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (Japan), and European Medicines Agency, have approved the inclusion of this information in drug labels [4]. This reaction occurs in about 8% of Caucasian individuals shortly after starting ABC therapy. *HLA-B*5701* allele frequency is lower in African populations (<1%), about 1% in Asians and reaches about 5% in European populations. Genotyping for *HLA-B*5701* has a negative predictive value of almost 100% and a positive predictive value of about 50%. In other words, patients who are not carriers of this allele are highly unlikely to show hypersensitivity reactions to ABC, but approximately half of those bearing *HLA-B*5701* will present hypersensitivity [15].

HLA associations with NVP hypersensitivity, comprising fever, skin rash and/or hepatitis have also been reported in different populations [52]. Alleles associated with NVP hypersensitivity include *HLA-DRB1*0101* (Australia) [53], *HLA-B*1402* (Sardinia) [54], *HLA-Cw8* (Japan) [55], *HLA-B*3505* (Thailand), *HLA-B*5801* and *HLA-DRB1*0102* (South Africa) [52]. These results indicate the need of further studies of *HLA* and drug hypersensitivity in other populations, due to the high interpopulation differences in the prevalence of *HLA* alleles.

Apolipoproteins

Lipodystrophy, the ectopic accumulation of body fat mainly in the waist and dorsocervical regions (lipohypertrophy), occurring alone or together with loss of fat in the face and limbs (lipoatrophy), is one of the long-term HAART complications. This condition is usually accompanied by disturbances in lipid metabolism (dyslipidemia) and increased risk of diabetes mellitus. Lipodystrophy deeply affects the quality of PLWH, frequently leading to nonadherence to the treatment [56].

One of the first pharmacogenetic HAART studies reported the association of a *TNFA* SNP (238 G>A) with the onset of lipodystrophy [57]. However, this association was based in a sample of nine individuals with lipodystrophy carrying the risk allele and most of

later studies did not replicate these results [58,59], with few exceptions [60].

Alterations in lipid profile caused by the use of HAART may be, at least in part, a result of variations in genes encoding proteins involved in lipid metabolism and transport [59]. The knowledge about the role of several variants located in the apolipoprotein and lipid metabolizing enzymes genes in the etiology of dyslipidemia prompted the investigation of these same SNPs in the lipid alterations associated with the use of HAART. Polymorphisms in the *APOA5* [59,61,62], *APOB* [62,63], *APOC3* [58,59], *ABCA1* [59], *APOE* [58,59,62] and other genes [59,64] have been associated with the risk of hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia or low high-density lipoprotein (HDL) levels. However, some of these results have been controversial regarding specific gene variants, direction and magnitude of association, and prospective confirmative trials are still needed regarding these genes and phenotypes. A recent paper by Guardiola *et al.* [65], including 321 ARV-treated HIV-infected individuals, investigated the potential effect of 13 polymorphisms located in nine genes involved in lipid transport and metabolism (*APOA5*, *APOC3*, *LPL*, *CETP*, *HL*, *MTP*, *APOE*, *LRP5* and *VLDLR*). Their results indicated that variants in *LPL*, *CETP* and *HL* protect HIV-infected patients from developing dyslipidemia. The observed effect of these polymorphisms was cumulative, being dependent on the number of protective alleles but independent of the ARV regimen administered.

The increased risk for cardiovascular diseases (CVD) has also become a concern in PLWH. Patients with HIV infection were shown to have a 1.5–2-fold greater risk of developing coronary artery disease compared with noninfected individuals, raising the independent risk of coronary artery disease in HIV infection to levels similar to those in diabetes. This phenomenon has been ascribed to the inflammatory sequelae of the infection as well as the greater prevalence of cardiac risk factors in HIV-positive populations and the side effects of life-prolonging ART [66]. This increased cardiovascular risk is believed to be partially mediated by dyslipidemia. The lipid abnormalities generally seen in patients on ART are increased total cholesterol, with decreased HDL and hypertriglyceridemia, and polymorphisms in several genes encoding proteins involved in lipid metabolism have been associated with these phenotypes, as described in the previous paragraph.

mtDNA

It has been shown that NRTIs, besides acting on the HIV RT, are also inhibitors of the human mitochondrial DNA (mtDNA) polymerase- γ , potentially causing mitochondrial dysfunction and depletion of

mtDNA. Mitochondrial dysfunction, together with altered glucose and fatty-acid metabolism, and insulin resistance, is believed to contribute to the high incidence of Type 2 diabetes, CVD and nonalcoholic fatty liver disease presented by PLWH [67].

A recent review [68] found 21 studies that have investigated associations between patterns of mtDNA polymorphisms (haplogroups) and HIV infection and/or side effects of ART, but results have been mostly divergent so far. A posterior longitudinal study [69] analyzed associations between mtDNA variants and changes in markers of endothelial function among non-Hispanic white subjects beginning the use of ART. Although mtDNA haplogroups were not associated with these phenotypes, a nonsynonymous mtDNA SNP, m.10398A>G, was associated with higher baseline and changes regarding this SNP in adiponectin levels and lower brachial artery flow-mediated dilation in these patients. As adiponectin levels have been associated with CVD risk, validation studies in larger samples from distinct world populations may provide interesting results.

Other targets

Pharmacogenetic studies of HAART including polymorphisms in several other genes have been published in the last years. Candidate genes analyzed include adiponectin and its receptors [43,70,71], *CCR5* and *CX3CR1* [72], estrogen receptors 1 and 2 [73] and many others.

Drug–drug interactions

A problem faced by those who investigate the pharmacogenomics of ART is the number of drugs used in this therapy, which includes, at least, three drugs from two different ARV classes. The interaction among these drugs consists in a further complication to understand genetic effects in the modulation of ART response or side effects. Furthermore, the presence of important comorbidities, such as dyslipidemia, tuberculosis and hepatitis C co-infection, that frequently require pharmacological interventions, adds further complexity to this picture. The consideration of drug–drug interactions in pharmacogenetic studies is still under-explored, but some studies that addressed this question will be mentioned in the following paragraphs.

As aforementioned, both HIV infection and ART lead to dyslipidemia, in general with increased total cholesterol (TC), decreased HDL and hypertriglyceridaemia [66]. Lipid-lowering medications, mainly statins, effectively lower TC, triglycerides and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in HIV-infected patients [74]. However, statins are less effective at reducing LDL levels in PLWH who are also at

greater risk for adverse effects from statin treatment. Among the available ARVs, PIs are the most associated with alterations with lipid blood levels, so the potential interaction between PIs and statins must be considered when selecting a statin to lower lipid levels. A pharmacokinetic study using HIV-1 seronegative individuals [75] reported that the coadministration of darunavir and ritonavir increases rosuvastatin levels, whereas the lipid-lowering effects of this statin are impaired. Polymorphisms in the gene encoding the solute carrier organic anion transporter 1B1, which encodes the OATP1B1 influx transporter, have been shown to predict a lower decrease in cholesterol levels or the development of myopathy for different statins [76]. However, one study showed no evidence that darunavir/ritonavir intake decrease the transport of pravastatin through organic anion transporter polypeptide 1B1 *in vivo* [77]. It becomes evident from the analysis of the published literature that the interaction between ARVs and statins should be a matter of deeper investigations, since these lipid-lowering agents have been very important in the management of lipid alterations and in the prevention of CVD in PLWH.

Tuberculosis (TB) is the most common cause of death in hospitalized adults and children living with HIV, accounting for about a third of all mortality [7]. Rifampicin (RIF), used in TB treatment, may decrease EFV concentrations by inducing expression of *CYP2B6* [78]. The interaction between RIF and EFV has been the target of pharmacogenetics studies regarding *CYP2B6* polymorphisms, already known to influence EFV levels in PLWH. The effect of the 516 G>T genotype on EFV levels seems to be independent of the RIF use [78–82], suggesting EFV can be combined to rifampicin-based therapy without the need of dose adjustment, although not all studies are in agreement with this conclusion [83]. Other authors [84] suggest that the inducing effect of RIF is counterbalanced by a concentration-dependent inhibitory effect of isoniazid on EFV clearance. These authors suggest that the inducing effect of the rifampicin-isoniazid combination is affected by the *CYP2B6* G516T genotype and that the *NAT2* genotype also influences the direction of this interaction. *NAT2* polymorphisms are known to influence isoniazid concentrations, so they conclude that these discrepancies are likely to be related to isoniazid exposure.

In conclusion, given that several drugs used for HIV comorbidities have the potential to interact with proteins involved in ART pharmacokinetics and pharmacodynamics, an analysis of the published papers in this field indicates that this is an area that clearly warrants further research.

GWAS

During the last few years, there was a shift from the analysis of single or a few candidate genes to genome-wide association studies (GWAS) in the investigation of all complex phenotypes, including the pharmacogenomics of HAART response and adverse effects.

The first GWAS regarding HAART was published in 2011 [85] and focused in the NVP-induced rash in the Thai population, comprising 72 patients with rash and 77 NVP-tolerant patients. This study verified that SNPs located inside or near the *CCHCR1* gene were significantly associated with this phenotype. *CCHCR1* has been previously associated with psoriasis susceptibility, but no evidence of its association with HAART side effects was reported before.

In 2012, another GWAS [86] investigated the genetic factors associated with EFV pharmacokinetics. This study detected three *CYP2B6* polymorphisms (*CYP2B6* 516G>T [rs3745274], *CYP2B6* 983T>C [rs28399499] and *CYP2B6* 15582C>T [rs4803419]), independently associated with EFV estimated C_{min} (24-h post-dose plasma EFV concentration) at genome-wide significance, which explained a third of interindividual variability in this phenotype.

The same group published another GWAS in 2014 [87] regarding the occurrence of peripheral neuropathy with D-drug-containing regimens (d4T and ddI). The study included 90 individuals presenting peripheral neuropathy and 164 controls from three different ethnicities (white, black and Hispanic). However, no variants were consistently associated with this side effect in the whole sample and in patients from the three ethnic groups analyzed separately.

In the same year, this group published a second GWAS [88] searching for polymorphisms predicting ATV pharmacokinetics and hyperbilirubinemia. Their findings confirmed the role of variation in the *UGT1A1* gene and higher bilirubin levels in patients on ATV. No other polymorphism was associated with hyperbilirubinemia and no polymorphism predicted ATV pharmacokinetics.

Furthermore, in 2015, two new GWAS were published by this group. The first analyzed the possible role of gene variants on virologic response with EFV or ABC-containing regimens [89]. Unfortunately, meta-analysis of association results across race/ethnic groups showed no genome-wide significant associations regarding response to treatment with these drugs. The second [47] searched for polymorphisms associated with TDF pharmacokinetics and creatinine clearance. This work reported a polymorphism in *SLC17A1* significantly associated with TDF clearance (rs12662869). However, no polymorphism achieved genome-wide significance for association with changes in creatinine clearance.

Conclusion & future perspective

The introduction of HAART has been a very important landmark in the history of the AIDS epidemics, representing an unprecedented scientific progress in the drug discovery and development process, and bringing a whole new life perspective for the HIV infected individuals. However, current treatment does not completely eradicate the virus from the host organism, making necessary the lifetime use of HAART. In this context, adverse reactions acquire a major role for the patient and the clinician, frequently decreasing the quality of life of the individual and even impairing the adherence to treatment. In this sense, pharmacogenetics studies bring the promise of directing the choice of ARV drugs even before the initiation of the therapy, helping clinicians to select a regimen most suitable for each specific patient.

HAART is typically composed by a combination of drugs, usually, at least, three ARVs. The inclusion of several drugs that act in different stages of the virus life cycle is very important for the success of the therapy, but also adds further complexity to the pharmacogenetic studies. Although a high number of studies have already been published in this field, until this moment only three pharmacogenetic tests have been widely replicated and have attained the point of practical utilization in the clinical setting. The genotyping of the *HLA-B*5701* is an excellent predictor of hypersensitivity reactions to the use of abacavir and its use is already preconized in various countries. The *CYP2B6* 516G>T polymorphism has proven to be an important predictor of response and susceptibility to side effects with the use of EFV. Furthermore, the *UGT1A1*28* allele has been consistently associated with hyperbilirubinemia in patients treated with atazanavir and could be used as a predictor of susceptibility to this adverse reaction.

The main limitation for the incorporation of other pharmacogenetics markers into clinical practice is the high number of discrepancies among studies. Although the reasons for these inconsistencies remain unclear, some possibilities could be addressed. First, non-replication of positive findings may be a result of association studies with small sample sizes. In our review, a high number of unpowered studies have been retrieved from literature scrutiny. Second, not all associations may be true for different populations, due to differences in risk allele frequencies among ethnic groups or to different patterns of linkage disequilibrium, when the investigated variants may not be functional. Third, the problem of publication bias, leading to the under-report of negative associations, which hampers the performance of meta-analyses and induces false-positive results from the meta-analytical approach. It becomes clear that, although a high number of articles has

been published, further association studies with larger samples and in different populations are still needed to overcome these limitations. Other noteworthy aspect is that additional studies investigating the functional consequences of the candidate polymorphisms are indeed necessary to solve these questions.

The promise brought by GWAS to uncover genetic variations subjacent to the ARVs effectivity or adverse reactions using a hypothesis-free approach is still to be fulfilled, as the studies performed so far with this approach added very few information beyond that conveyed by the traditional candidate-gene approach. In

Executive summary
<p>History of highly active antiretroviral therapy</p> <ul style="list-style-type: none"> HIV infection treatment was revolutionized in 1997, by the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART). <p>HAART components</p> <ul style="list-style-type: none"> There are five groups of antiretrovirals, namely: nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), protease inhibitors, entry inhibitors/fusion inhibitors, integrase strand transfer inhibitors. First-line HAART consists in three-drug combinations (two NRTIs and either an NNRTI or an integrase strand transfer inhibitor). <p>Polymorphisms influencing ART pharmacokinetics</p> <p>Phase I metabolizing enzymes</p> <ul style="list-style-type: none"> CYP2B6 is the major enzyme involved in the metabolism of efavirenz and nevirapine. CYP2B6 516G>T variant is associated with efavirenz and nevirapine efficacy and side effects. CYP3A4 and CYP3A5 enzymes participate in the hepatic metabolism of most protease inhibitors and play secondary roles in the metabolism of NNRTIs, but no consistent associations between single nucleotide polymorphisms in these two genes with response or adverse drug effects have been reported so far. No consistent associations with HAART efficacy or side effects were reported for other CYPs, also. <p>Phase II metabolizing enzymes</p> <ul style="list-style-type: none"> UGT1A1*28 allele has been consistently associated with hyperbilirubinemia in patients treated with atazanavir. <p>Drug transporters</p> <ul style="list-style-type: none"> P-glycoprotein, encoded by the <i>ABCB1</i> gene, promotes the intracellular extrusion of several antiretrovirals and is very important for the determination of intracellular concentrations of NRTIs. Several prevalent coding variants in <i>ABCB1</i> have been studied for their possible association with molecular or clinical HAART phenotypes, but the results from different studies were mostly discordant. ABCC2, ABCC4 and ABCC10 transporters are important for the renal metabolism of tenofovir, but associations with single nucleotide polymorphisms in these genes have been inconsistent so far. Members of the solute carrier transporters gene family have also been investigated regarding the kidney side effects of tenofovir, with few concordant results. <p>Genes encoding proteins involved in HAART pharmacodynamics</p> <ul style="list-style-type: none"> HLA-B*5701 and hypersensitivity reactions with the use of abacavir is the most well-established pharmacogenetic determinant of the use of HAART and this information is now present in abacavir drug labels from several countries. Other targets investigated include apolipoprotein and lipid metabolizing enzymes, mtDNA haplogroups, adiponectin and its receptors, CCR5 and CX3CR1 receptors and estrogen receptors 1 and 2. <p>Drug–drug interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> This question is still underexplored in pharmacogenetics studies and may be responsible for several inconsistencies found among association studies. <p>GWAS</p> <ul style="list-style-type: none"> Some genome-wide association studies regarding HAART-associated phenotypes have already been performed, but they brought very few new information so far. <p>Conclusion & future perspective</p> <ul style="list-style-type: none"> Although a high number of studies have already been published in this field, until this moment only three pharmacogenetic markers have been widely replicated and have attained the point of practical utilization in the clinical setting: HLA-B*5701, CYP2B6 516 G>T and UGT1A1*28. The main limitation for the incorporation of other pharmacogenetics markers into clinical practice is the high number of discrepancies among studies, which warrants the need for further studies, preferentially with larger sample sizes. Cost-effectivity studies are also needed to improve the introduction of pharmacogenetic analyses in clinical settings.

the next years, we will probably see an increasing number of GWAS regarding HAART effectiveness and adverse reactions, using higher density arrays and next-generation sequencing technologies. Another important innovation is represented by phenome-wide association studies, designed to identify genetic associations across multiple phenotypes simultaneously [90].

Once pharmacogenomic relationships have been discovered and validated, there are still obstacles to their translation into clinical practice. Such translation requires, additionally, the performance of cost-effectiveness analyses. For *HLA-B*5701*, *UGT1A1*28* and *CYP2B6* 516G>T some studies were already performed. For *UGT1A1*, analyses revealed that testing for *UGT1A1*28* could be cost effective depending in assay cost and improvement of retention in care, but only when comparing with ART combinations that display similar costs and efficacy [40]. In contrast, it was reported that genotyping for *HLA-B*5701* to prevent ABC hypersensitivity [91] and *CYP2B6* genotyping to dose adjusting were both cost effective [92]. It is clear that this kind of study is increasingly necessary to take pharmacogenetics studies from bench to bedside. Furthermore, the expectations of reducing the cost of genetic testing, brought by the US\$1000 genome initiative, may improve accessibility to pharmacogenetics information.

In our opinion, future research should focus in higher collaboration between groups in order to analyze larger, prospective cohorts. Epigenetics know-

ledge is bringing a new light about gene expression regulation and has the potential to elucidate at least part of the unexplained heritability that affects drug response. We believe in the next years we will experience the incorporation of epigenetic studies in the pharmacogenomics research arsenal. Far from being completed, the potential of pharmacogenomics is just starting to be realized, and we will probably see great improvements in its contribution to the clinical practice in the future. One of the great challenges to this accomplishment is the diffusion of this knowledge to all healthcare professionals and this is a task that should be fulfilled by all the pharmacogenomics researchers.

Financial & competing interests disclosure

Research at the Molecular Biology laboratory from Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSA) is supported by the following governmental funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest; •• of considerable interest

- Laskey SB, Siliciano RF. A mechanistic theory to explain the efficacy of antiretroviral therapy. *Nat. Rev. Microbiol.* 12(11), 772–780 (2014).
- Pau AK, George JM. Antiretroviral therapy: current drugs. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 28(3), 371–402 (2014).
- Detailed description of drugs, their mechanism of action and side effects.
- Tozzi V. Pharmacogenetics of antiretrovirals. *Antiviral Res.* 85(1), 190–200 (2010).
- Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM *et al.* Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 92(4), 414–417 (2012).
- Database that gathers information about pharmacogenes, drugs, pathways and genetic variations.
- Gunthard HF, Aberg JA, Eron JJ *et al.* Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2014 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA* 312(4), 410–425 (2014).
- Gunthard HF, Saag MS, Benson CA *et al.* Antiretroviral drugs for treatment and prevention of HIV infection in adults: 2016 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA* 316(2), 191–210 (2016).
- 7 World Health Organization. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: recommendations for a public health approach (2016). www.who.int/hiv/pub/arv/arv-2016/en/
- More recent guidelines for HIV infection treatment.
- Bazzoli C, Jullien V, Le Tiec C, Rey E, Mentre F, Taburet AM. Intracellular pharmacokinetics of antiretroviral drugs in HIV-infected patients, and their correlation with drug action. *Clin. Pharmacokinet.* 49(1), 17–45 (2010).
- Bhatti AB, Usman M, Kandi V. Current scenario of HIV/AIDS, treatment options, and major challenges with compliance to antiretroviral therapy. *Cureus* 8(3), e515 (2016).
- Clutter DS, Jordan MR, Bertagnolio S, Shafer RW. HIV-1 drug resistance and resistance testing. *Infect. Genes. Evol.* doi:10.1016/j.meegid.2016.08.031 (2016) (Epub ahead of print).
- Complete revision about HIV drug resistance mutations.
- Michaud V, Bar-Magen T, Turgeon J, Flockhart D, Desta Z, Wainberg MA. The dual role of pharmacogenetics in HIV treatment: mutations and polymorphisms regulating

- antiretroviral drug resistance and disposition. *Pharmacol. Rev.* 64(3), 805–855 (2012).
- 12 Hetherington S, Hughes AR, Mueller M *et al.* Genetic variation in HLA-B region and hypersensitivity reactions to abacavir. *Lancet* 359(9312), 1121–1122 (2002).
 - 13 Barrios F, Ferrández-Montero JV, de Mendoza C, Lahuerta P, Soriano V. Pharmacogenetics of antiretroviral therapy. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 10(8), 1119–1150 (2004).
 - 14 Amani V, Collier AC, Valle-Garay E. Can antiretroviral therapy be tailored to each human immunodeficiency virus-infected individual? Role of pharmacogenetics. *World J. Virol.* 4(5), 169–177 (2013).
 - 15 Aceti A, Giannone L, Lambiasi L, Pennica A, Tosi E. Pharmacogenetics as a tool to tailor antiretroviral therapy: a review. *World J. Virol.* 4(3), 198–208 (2013).
 - 16 Haas DW, Tarr PI. Perspectives on pharmacogenetics of antiretroviral medications and HIV-associated comorbidities. *Curr. Opin. HIV AIDS* 10(2), 116–122 (2015).
 - 17 Lakhtam SS, Ma C, Moore GD. Pharmacogenetics of CYP3A: considerations for HIV treatment. *Pharmacogenomics* 10(8), 1525–1539 (2009).
 - 18 Zanger UM, Klein E. Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Pharm. Genet.* 4, 24 (2013).
 - **Sumnerham recent advances on the functional and clinical significance of CYP2B6 and its genetic polymorphisms.**
 - 19 Thom CF, Lamba JK, Lamba V, Klein TE, Akman RB. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP2B6. *Pharmacogenomics* 20(8), 520–525 (2019).
 - 20 Amintani S, Ning B, Deitz AC, Weber BL, Kadlubar FF, Rebbeck TR. Increased transcriptional activity of the CYP2B6*6B promoter variant. *Environ. Mol. Mutagen.* 42(6), 299–305 (2005).
 - 21 Haas DW, Ribaud HJ, Kim RB *et al.* Pharmacogenetics of efavirenz and central nervous system side effects: an Adult AIDS Clinical Trials Group study. *AIDS* 18(18), 2391–2400 (2004).
 - 22 Haas DW, Swenson LM, Shafer RW *et al.* Pharmacogenetics of long-term responses to antiretroviral regimens containing efavirenz and/or zalcitabine: an Adult AIDS Clinical Trials Group study. *J. Infect. Dis.* 192(11), 1935–1942 (2005).
 - 23 Haas DW, Bartles JA, Andersen JW *et al.* Pharmacogenetics of nevirapine-associated hepatotoxicity: an Adult AIDS Clinical Trials Group collaboration. *Clin. Infect. Dis.* 45(6), 785–786 (2004).
 - 24 Cirranci C, Bergiani F, Coffa S *et al.* Nevirapine-induced hepatotoxicity and pharmacogenetics: a retrospective study in a population from Mozambique. *Pharmacogenomics* 11(1), 25–31 (2010).
 - 25 Cirranci C, Di Paolo D, Marzoni MC *et al.* Association between CYP2B6 polymorphisms and nevirapine-induced SJS/TEN: a pharmacogenetics study. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 65(11), 1909–1916 (2013).
 - 26 Swart M, Skelton M, Ren Y, Smith E, Takaya S, Dandara C. High predictive value of CYP2B6 SNPs for steady-state plasma efavirenz levels in South African HIV/AIDS patients. *Pharmacogenomics* 25(8), 415–427 (2013).
 - 27 Haas DW, Severe P, Jean Juste MA, Pape JW, Ritzgenild DW. Functional CYP2B6 variants and virologic response to an efavirenz-containing regimen in Prei-au-Prince, Haiti. *J. Antimicrob. Chemother.* 69(8), 2187–2190 (2004).
 - 28 Sakuma C, Marumachi W, Kozomike N *et al.* Low level of efavirenz in HIV-1-infected Thai adults is associated with the CYP2B6 polymorphism. *Hepatitis* 42(5), 465–474 (2004).
 - 29 Wang D, Gao Y, Wrigglesworth SA, Cooke GE, Sacke W. Intrinsic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics* 11(4), 274–286 (2011).
 - 30 Oluogunju A, Schipani A, Siccardi M *et al.* CYP3A4*22 (c.522-191 C>T; rs3599567) is associated with lopinavir pharmacokinetics in HIV-positive adults. *Pharmacogenomics* 24(7), 459–465 (2014).
 - 31 Swart M, Dandara C. Genetic variation in the 5'-UTR of CYP3A2, CYP2B6, CYP2D6, CYP3A4, NR1H2, and UGT2B7: potential effects on regulation by microRNA and pharmacogenetics relevance. *Pharm. Genet.* 5, 167 (2004).
 - 32 Haas DW, Kwera A, Richardson DM *et al.* Secondary metabolism pathway polymorphisms and plasma efavirenz concentrations in HIV-infected adults with CYP2B6 slow metabolizer genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 69(3), 2175–2182 (2014).
 - 33 Sakuma C, Channanaphon M, Kozomike N *et al.* Pharmacogenetics and clinical biomarkers for subtherapeutic plasma efavirenz concentration in HIV-1 infected Thai adults. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 29(4), 289–295 (2014).
 - 34 Zhang D, Chando TJ, Everett DW, Paton CJ, Dehal SS, Humphreys WC. *In vivo* inhibition of UDP-glucosyltransferases by efavirenz and other HIV protease inhibitors and the relationship of this property to *in vivo* bilirubin glucuronidation. *Drug Metab. Dispos.* 35(11), 1725–1733 (2007).
 - 35 Laskovich TO, Modhau U, Weinzier M *et al.* Gilbert's disease and efavirenz: from phenotype to UDP-glucosyltransferase haplotype. *Hepatology* 44(3), 1524–1532 (2004).
 - 36 Park WB, Choi PG, Song KH *et al.* Genetic factors influencing severe efavirenz-associated hyperbilirubinemia in a population with low UDP-glucosyltransferase 1A1*28 allele frequency. *Clin. Infect. Dis.* 51(1), 100–106 (2010).
 - 37 Ferrario L, Vignoli O, Pini A *et al.* Switching to unboosted efavirenz reduces bilirubin and triglycerides without compromising treatment efficacy in UGT1A1*28 polymorphism carriers. *J. Antimicrob. Chemother.* 67(7), 2236–2242 (2012).
 - 38 Rodriguez-Nielsen S, Martin-Carbonero L, Barrios F *et al.* Genetic factors influencing efavirenz plasma concentrations and the risk of severe hyperbilirubinemia. *AIDS* 21(1), 41–46 (2007).
 - 39 Tarant L, Spritz E, Lazzarini RK *et al.* Short communication: UGT1A1*28 variant allele is a predictor of severe hyperbilirubinemia in HIV-infected patients on HAART in southern Brazil. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28(9), 1005–1010 (2012).



- 40 Schackman BR, Haas DW, Becker JT *et al*. Cost-effectiveness analysis of *CCR5Δ32* genetic testing to inform antiretroviral prescribing in HIV disease. *Amer. J. Ther.* 18(3), 399–408 (2015).
- 41 Nigan SK. What do drug transporters really do? *Nat. Rev. Drug Discov.* 14(1), 29–44 (2015).
- 42 Rodriguez-Navas S, Labarga P, Soriano V. Pharmacogenetics of zidovudine treatment. *Pharmacogenetics* 10(10), 1675–1680 (2009).
- 43 Marzocchi A, Schwarz J, Di Giambenedetto S *et al*. The effect of polymorphisms in candidate genes on the long-term risk of lipodystrophy and dyslipidemia in HIV-infected white patients starting antiretroviral therapy. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 27(12), 1299–1309 (2011).
- 44 Coelho AV, Silva SP, de Almeida LC *et al*. *ABCG2* and *ABCC7* variants associated with virological failure of first-line protease inhibitors antiretroviral regimens in Northeast Brazil patients. *J. Clin. Pharmacol.* 55(12), 1286–1293 (2015).
- 45 Maronishi W, Sakuma C, Thongyen S, Nilkanhang S, Sangkaranarong S. *ABCC2/7* and plasma zidovudine concentration are correlated to decreased glomerular filtration rate in patients receiving a zidovudine-containing antiretroviral regimen. *J. Antimicrob. Chemother.* 69(9), 2195–2201 (2014).
- 46 da Rocha IM, Casparotto AS, Lazzaretti RK, Netti RK, Sprinz E, Marzetti VS. Polymorphisms associated with renal adverse effects of antiretroviral therapy in a Southern Brazilian HIV cohort. *Pharmacogenet. Genomics* 25(11), 541–547 (2015).
- 47 Wang Y, Venuto C, Mone GD *et al*. Genomewide association study of zidovudine pharmacokinetics and creatinine clearance in AIDS Clinical Trials Group protocol A5202. *Pharmacogenet. Genomics* 25(9), 450–460 (2015).
- 48 Rangaswamy K, Arshingoran A, Thammajanak N *et al*. Influence of *ABCC2* and *ABCC4* polymorphisms on zidovudine plasma concentrations in Thai HIV-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(6), 3240–3245 (2015).
- 49 Dalvin A, Witzner M, de la Cruz M *et al*. A pharmacogenetic candidate gene study of zidovudine-associated Fanconi syndrome. *Pharmacogenet. Genomics* 25(2), 82–92 (2015).
- 50 Pushpakum SF, Liptrott NJ, Rodriguez-Navas S *et al*. Genetic variants of *ABCC10*, a novel zidovudine transporter, are associated with kidney tubular dysfunction. *J. Infect. Dis.* 204(1), 145–153 (2011).
- 51 Liptrott NJ, Pushpakum S, Wren C *et al*. Association of *ABCC10* polymorphisms with nevirapine plasma concentrations in the German Competence Network for HIV/AIDS. *Pharmacogenet. Genomics* 22(1), 10–19 (2012).
- 52 Phillips E, Bartlett JA, Sanna I *et al*. Associations between *HLA-DRA*0102*, *HLA-B*5801*, and hepatotoxicity during initiation of nevirapine-containing regimens in South Africa. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 62(2), e55–e57 (2015).
- 53 Martin AM, Nolan D, James I *et al*. Predisposition to nevirapine hypersensitivity associated with *HLA-DRA*0102* and abrogated by low CD4 T-cell counts. *AIDS* 19(1), 97–99 (2005).
- 54 Litwin R, Cascazi C, Maeda A *et al*. HLA-dependent hypersensitivity to nevirapine in Sardinian HIV patients. *AIDS* 20(12), 1621–1626 (2006).
- 55 Gatanaga H, Yasuki H, Tamura J *et al*. *HLA-C*08* primarily associated with hypersensitivity to nevirapine. *AIDS* 23(2), 264–265 (2007).
- 56 Prineas JL, Gale P, Rochford R, Glesby MJ, Mehta S. HIV/AIDS and lipodystrophy: implications for clinical management in resource-limited settings. *J. Int. AIDS Soc.* 18, 19055 (2015).
- 57 Maher B, Alifirovic A, Vilas FJ, Wilkins DG, Park BK, Ferozmand M. TNF- α promoter region gene polymorphisms in HIV-positive patients with lipodystrophy. *AIDS* 16(15), 2015–2018 (2002).
- 58 Tse PE, Taffe P, Hsueh G *et al*. Modeling the influence of *APOC3*, *APOE*, and *770P* polymorphisms on the risk of antiretroviral therapy-associated lipid disorders. *J. Infect. Dis.* 191(9), 1419–1426 (2005).
- 59 Amado M, Taffe P, Sahli R *et al*. Contribution of 20 single nucleotide polymorphisms of 15 genes to dyslipidemia associated with antiretroviral therapy. *Pharmacogenet. Genomics* 17(9), 755–764 (2007).
- 60 Mahajan SD, Garwood A, Ponce J *et al*. Cardiac morbidity in an HIV-1 lipodystrophy patient cohort expressing the TNF- α -238 G/A single nucleotide gene polymorphism. *Curr. HIV Res.* 15(2), 98–108 (2015).
- 61 Chang SY, Ho WS, Kao JT *et al*. Association of single-nucleotide polymorphism 5 and c.555C>T of *APOA5* with hypertriglyceridemia after treatment with highly active antiretroviral therapy containing protease inhibitors in HIV-infected individuals in Taiwan. *Clin. Infect. Dis.* 48(6), 832–835 (2009).
- 62 Lazzaretti RK, Casparotto AS, Sassi MG *et al*. Genetic markers associated to dyslipidemia in HIV-infected individuals on HAART. *ScientificWorldJournal* 2015, 608–615 (2015).
- 63 Egata-Girotto L, Martinez E, Cormand B, Escobal T, Gaudel J, Arnoult M. Impact of genetic factors on dyslipidemia in HIV-infected patients starting antiretroviral therapy. *AIDS* 27(4), 529–538 (2013).
- 64 Reiger M, Bayard C, Taffe P *et al*. Contribution of genome-wide significant single-nucleotide polymorphisms and antiretroviral therapy to dyslipidemia in HIV-infected individuals: a longitudinal study. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2(6), 620–628 (2009).
- 65 Guardiola M, Echeverria F, Gonzalez M *et al*. Polymorphisms in *LPL*, *CETP*, and *HDL* protease HIV-infected patients from atherogenic dyslipidemia in an allele-dependent manner. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 31(9), 882–888 (2015).
- 66 Nadel J, Holloway CJ. Scoring and risk assessment for coronary artery disease in HIV infection: an urgent need. *HIV Med. doi:10.1111/hiv.12422* (2016) (Epub ahead of print).
- 67 Willig AL, Overton ET. Metabolic complications and glucose metabolism in HIV infection: a review of the evidence. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 15(5), 289–296 (2016).
- 68 Hart AB, Samuels DC, Halgan T. The other genome: a systematic review of studies of mitochondrial DNA

- haplogroups and outcomes of HIV infection and antiretroviral therapy. *AIDS Rev* 15(4), 215–220 (2013).
- Summarize the published literature on associations between mtDNA haplogroups and clinical outcomes in populations of European and African descent.
- 69 Hülsgen T, Stein JH, Coster RR *et al*. Mitochondrial DNA variation and changes in adiponectin and endothelial function in HIV-infected adults after antiretroviral therapy initiation. *AIDS Rev. Rev. Neurobiol* 29(30), 1259–1299 (2013).
 - 70 Trinka JR, Sprinz E, Lazaretti RK *et al*. SNPs in the *APM2* gene promoter are associated with adiponectin levels in HIV-infected individuals receiving HAART. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 55(3), 299–305 (2010).
 - 71 Castillon JK, Sprinz E, Lazaretti RK, Kahrman R, Mattivi VS. Polymorphisms in adiponectin receptor genes are associated with lipodystrophy-related phenotype in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *HIV Med.* 14(8), 494–501 (2013).
 - 72 Brumme ZL, Dong WW, Chan EJ *et al*. Influence of polymorphisms within the *CXCR4* and *MDR-1* genes on initial antiretroviral therapy response. *AIDS* 17(2), 201–208 (2003).
 - 73 Gargano AS, Sprinz E, Lazaretti RK *et al*. Genetic polymorphisms in estrogen receptors and sexual dimorphism in fat redistribution in HIV-infected patients on HAART. *Aids* 26(1), 19–26 (2012).
 - 74 Chantais DB, King TS, Stever KR. Infectious and non-infectious etiologies of cardiovascular disease in human immunodeficiency virus infection. *Open AIDS J.* 10, 113–126 (2016).
 - 75 Santoni D, Denti PE, Sallaro L, Fichtenbaum CJ. Steady-state pharmacokinetic interactions of darunavir/ritonavir with lipid-lowering agent rosuvastatin. *J. Clin. Pharmacol.* 52(6), 922–931 (2012).
 - 76 Bermane SF, Bailey KM, Hall AS, Balmforth AJ. The influence of *SLCO1B1* (*MATP1B1*) gene polymorphisms on response to statin therapy. *Pharmacogenomics J.* 10(1), 1–11 (2010).
 - 77 Aquilante CL, Khar JJ, Anderson PI *et al*. Influence of *SLCO1B1* polymorphisms on the drug–drug interaction between darunavir/ritonavir and pravastatin. *J. Clin. Pharmacol.* 52(11), 1725–1738 (2012).
 - 78 Cohen K, Grant A, Dandara C *et al*. Effect of rifampicin-based antitubercular therapy and the cytochrome P450 2D6 *550C>T* polymorphism on efavirenz concentrations in adults in South Africa. *Antivir. Ther.* 14(5), 687–695 (2009).
 - 79 Muroyoshi W, Sakason C, Lucangiyondal A *et al*. Impact of pharmacogenetic markers of CYP2B6, clinical factors, and drug–drug interaction on efavirenz concentrations in HIV/tuberculosis-coinfected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(2), 1019–1024 (2013).
 - 80 Bawana F, Swart M, Dandara C, Ashon M. The role of genetic polymorphisms in cytochrome P450 and effects of tuberculosis co-treatment on the predictive value of CYP2B6 SNPs and on efavirenz plasma levels in adult HIV patients. *Antivir. Res.* 102, 44–55 (2014).
 - 81 Ngantzi E, Magari S, Miri O *et al*. Effect of rifampicin and CYP2B6 genotype on long-term efavirenz autoinduction and plasma exposure in HIV patients with or without tuberculosis. *Clin. Pharmacol. Ther.* 90(3), 406–415 (2011).
 - 82 Lee KY, Lin SW, Sun HY *et al*. Therapeutic drug monitoring and pharmacogenetic study of HIV-infected ethnic Chinese receiving efavirenz-containing antiretroviral therapy with or without rifampicin-based anti-tuberculous therapy. *PLoS ONE* 9(2), e88497 (2014).
 - 83 Kweza A, Laray M, Sagne KW, Court MH. Paradoxically elevated efavirenz concentrations in HIV/tuberculosis-coinfected patients with CYP2B6 550TT genotype on rifampicin-containing antituberculous therapy. *AIDS* 25(5), 583–590 (2011).
 - 84 Bertrand J, Venyafi C, Chou M *et al*. Dependence of efavirenz- and rifampicin- (isoniazid)-based antitubercular treatment drug–drug interaction on CYP2B6 and MDR2 genetic polymorphisms: ANRS 12154 study in Cambodia. *J. Infect. Dis.* 209(5), 599–608 (2014).
 - 85 Chantaram S, Muthusethi T, Mahasirimongkol S *et al*. Genome-wide association study identifies variation in *Gp21.3* associated with nevirapine-induced rash. *Clin. Infect. Dis.* 55(4), 541–548 (2011).
 - 86 Holmgren ER, Gladly B, Ritchie MD *et al*. Genome-wide association study of plasma efavirenz pharmacokinetics in AIDS Clinical Trials Group protocols implicates several CYP2B6 variants. *Pharmacogen. Genomics* 22(12), 858–867 (2012).
 - 87 Lager PD, Johnson DH, Robbins GC *et al*. Genome-wide association study of peripheral neuropathy with D-drug-containing regimen in AIDS Clinical Trials Group protocol 384. *J. Neurosci.* 30(3), 304–308 (2010).
 - 88 Johnson DH, Verma C, Ritchie MD *et al*. Genomewide association study of zidovudine pharmacokinetics and hyperbilirubinemia in AIDS Clinical Trials Group protocol A5202. *Pharmacogen. Genomics* 24(6), 195–205 (2014).
 - 89 Lehmann DS, Ribaldo HJ, Durr ES *et al*. Genome-wide association study of virologic response with efavirenz-containing or abacavir-containing regimens in AIDS clinical trials group protocols. *Pharmacogen. Genomics* 25(2), 50–59 (2015).
 - 90 Moore CB, Verma A, Pedrigran S *et al*. Phenome-wide association study relating pretreatment laboratory parameters with human genetic variants in AIDS clinical trials group protocols. *Open Forum Infect. Dis.* 2(1), ofiu115 (2013).
 - Define properties and principles of phenome-wide association studies and discuss their potential applications.
 - 91 Schackman BR, Scott CA, Walensky RP, Louisa T, Freedberg KA, Sax PE. The cost-effectiveness of *HLA-B*57:01* genetic screening to guide initial antiretroviral therapy for HIV. *AIDS* 22(15), 2025–2033 (2008).
 - 92 Schackman BR, Hays DW, Park SS, Li XC, Freedberg KA. Cost-effectiveness of CYP2B6 genotyping to optimize efavirenz dosing in HIV clinical practice. *Pharmacogenomics* 16(10), 2007–2018 (2015).
 - Exemplify cost-effectiveness studies.



10 ARTIGO 2

Artigo Original

“Association between FTO and SREBF1 gene variants and lipodystrophy in HIV-infected patients on HAART”

Submetido ao periódico *Pharmacogenomics*

ISSN (print): 1462-2416 | ISSN (online): 1744-8042

Impact Factor: 2.302 (2017)

Qualis Ciências Biológicas 1: B1

Association between *FTO* and *SREBF1* gene variants and lipodystrophy in HIV-infected patients on HAART

Carmela Farias da Silva Tagliari¹; Cáren Nunes de Oliveira¹; Greice Meyer Vogel¹; Patrícia Baptista da Silva¹; Rafael Linden²; Marina Venzon Antunes², Natália Bordin Andriguetti², Rosmeri Kuhmmer Lazzaretti³; Regina Kuhmmer Notti³; Eduardo Sprinz³; Aline Simas Gasparotto¹; Juciane Rodrigues Trinca¹; Vanessa Suñé Mattevi¹

¹ Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, RS, Brazil

² Feevale University, Novo Hamburgo, RS, Brazil

³ Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence:

Prof. Vanessa Suñé Mattevi, PhD

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Rua Sarmiento Leite, 245, sala 309, prédio 1

CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil

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

E-mail: vmattevi@ufcspa.edu.br

ABSTRACT

Aims: To investigate whether variants in the *FTO*, *PPARG*, *TNF* and *SREBF1* genes are implicated in the development of lipodystrophy and metabolic syndrome among HIV-infected individuals on highly-active antiretroviral therapy (HAART).

Patients & Methods: Four polymorphisms were genotyped by real-time polymerase chain reaction in 706 HIV-infected patients receiving HAART.

Results: The prevalence of lipodystrophy was 51.1%. The prevalence of lipodystrophy was higher in white (58.6%) than in non-white individuals (41.7%). *FTO* rs9939609 A-carriers presented a higher prevalence of lipoatrophy and lipohypertrophy, while *SREBF1* rs2297508 G-carriers presented a higher risk of lipohypertrophy development.

Conclusion: This *FTO* variant may contribute to the predisposition to the development of lipodystrophy, while *SREBF1* polymorphism may be predictive to lipohypertrophy.

KEYWORDS: HIV, lipodystrophy, metabolic syndrome, anthropometric disorders, *TNF*, *PPARG*, *SREBF1*, *FTO*.

INTRODUCTION

The last record published by The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS in 2017, estimates a prevalence of about 36.9 million people living with HIV (PLHIV) worldwide (3). In Brazil, over 882 thousand people are currently living with human immunodeficiency virus (HIV) and an annual average of 40 thousand new cases were recorded in the last five years. Porto Alegre, capital of the State of Rio Grande do Sul, where this research was carried out, showed a rate of 60.8/100.000 people, almost four times greater of the country as a whole (4).

The introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) for HIV infection and AIDS in the 1990's decade, dramatically changed HIV natural history reducing morbidity and improving survival of PLHIV since it has reduced the incidence of opportunistic infections in addition to prevent transmission. HAART includes a combination of antiretroviral (ARV) drug classes, classified according to their mechanism of action on viral replication: nucleoside transcriptase inhibitors (NRTIs), non-NRTIs (NNRTIs) and protease inhibitors (PIs). More recently, fusion inhibitors and integrase inhibitors have been included on therapeutic regime (5).

HAART changed the perspective of HIV infection from a fatal to a chronic illness. However, patients are at a higher risk of developing chronic diseases when compared to the general population. The development of lipodystrophy syndrome, soon described after the introduction of HAART, is a long-term adverse effect which can lead to treatment discontinuation due to its stigmatizing effects, frequently associated with discrimination of PLHIV (6). Lipodystrophy (LD) may present three subtypes: lipoatrophy (LA), related to peripheral fat loss, lipohypertrophy (LH), with central fat accumulation, and mixed lipodystrophy, when LH and LA occur in combination in the same individual (7). The prevalence of LD has been shown to range between 10 to 80% in different settings, due to a lack of methodological consensus for the diagnosis besides age, lifestyle factors and genetic background (7–9).

LD has been associated with insulin resistance (IR) and dyslipidemia, characterized mainly by hypertriglyceridemia combined with or not low levels of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol (10). These abnormalities contribute to development of metabolic syndrome (MetS), defined by a cluster of risk factors for cardiovascular disease (CVD), including central obesity (high waist circumference),

high triglycerides (TG), reduced HDL cholesterol, raised blood pressure (or hypertension treatment) and hyperglycemia (or diagnosed type 2 diabetes mellitus, T2DM) (11). The prevalence of MetS in PLHIV is variable according to different studies, ranging from 7 to 52%, probably due to distinct design, sample characteristics, selection criteria and ART (12).

Although HIV infection *per se* and different antiretroviral drugs have been associated with LD development, there are evidence of variability in individual susceptibility to LD, suggesting genetic factors may contribute to this phenotype. Several studies have shown that adipocyte functions may be altered by these and other factors (13,14). Among the several genes involved in adipogenesis and lipid metabolism, four arouse interest: tumor necrosis factor (*TNF*), peroxisome proliferator activated receptor gamma (*PPARG*), sterol regulatory element-binding transcription factor 1 (*SREBF1*) and fat mass and obesity associated gene (*FTO*).

Considering the importance of adverse effects as factors of non-adherence to HAART and the possible contributions that pharmacogenomics can bring to the elucidation of their causes, this study aimed to investigate the association between polymorphisms in *TNF*, *PPARG*, *SREBF1* and *FTO* genes and the occurrence of lipodystrophy (LD) and metabolic syndrome (MetS) in HIV-infected individuals on HAART.

METHODS

Subjects: We conducted a cross-sectional study with 706 consecutive HIV-infected patients recruited from three reference centers in southern Brazil (HIV/AIDS Ambulatory Unit of Hospital de Clínicas from Porto Alegre/RS, HIV Ambulatory Care of Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Correa Jr. from Rio Grande/RS, and HIV/AIDS Specialized Assistance Service from Pelotas/RS) from March 2006 to November 2008 and between October 2016 to June 2018. Subjects were older than 18 years old, receiving HAART for at least 12 months using two NRTIs (tenofovir or zidovudine plus lamivudine) and one NNRTI (efavirenz) or IP (atazanavir with and without ritonavir), and with viral load below the limit of detection of the test (50 copies/mL). Pregnant women and patients with neurological disease were excluded from the study.

Ethical considerations: all participants were informed about the study and signed the free and informed consent form. This research was approved by the Research Ethics Committees from all centers above mentioned and of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre with numbers 05/295, 718/08, 154/07, and 141/06, respectively.

Subjects characteristics: demographic and lifestyle characteristics were obtained through interviews. Details of the infection and treatment (time diagnosis, current ARVs and use of other drugs) and another relevant information were obtained from medical records. The patient's ethnicity was phenotypically defined by the interviewer as white and non-white individuals, as discussed in previous works by our group (15).

Biochemical and anthropometric parameters: LD diagnosis was performed by the accompanying physician and patients were classified as follows: without LD; lipoatrophy (LA), when there was fat reduction in peripheral regions such face, arms and/or legs, thin buttocks and venous prominence; lipohypertrophy (LH), defined by presence of abdominal fat accumulation, gynecomastia in men or increased breasts in women, lipomas through the body or buffalo hump; or mixed pattern, when at least one feature of both LA and LH were present together (7). Moreover, metabolic syndrome (MetS) was defined according to International Diabetes Federation (IDF) consensus (16): waist circumference ≥ 94 cm in males or ≥ 80 cm in females plus any two of the following four factors: serum triglycerides ≥ 150 mg/dL or treatment for this lipid abnormality; HDL-cholesterol < 40 mg/dL in males and < 50 mg/dL in females or drug treatment for reduced HDL-cholesterol; systolic blood pressure ≥ 130 or diastolic blood pressure ≥ 85 mm Hg (or treatment to hypertension); fasting plasma glucose ≥ 100 mg/dL or previously diagnosed type 2 diabetes.

Molecular analysis: genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes using a high salt concentration precipitation standard method. Four polymorphisms in *TNF* (-238 G>A, rs361525), *PPARG* (Pro12Ala, C>G, rs1801282), *SREBF1* (3322 C>G, rs2297508) and *FTO* (T>A, rs9939609) genes were genotyped by real-time polymerase chain reaction (PCR) using hydrolysis probe allele discrimination assays (TaqMan; Applied Biosystems, Foster City, CA).

Statistical analysis: the results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) for continuous variables and as proportions for categorical variables. A chi-squared test was used to assess the agreement of genotype frequencies with those expected under Hardy-Weinberg equilibrium. Poisson regression models with robust variance were used to estimate the contribution of genotypes to LD, LA and LH phenotypes separately. Poisson regression was used because it provides more accurate estimates than logistic regression and it is considered to be the best statistical method for analysis of cross-sectional studies with frequent binary outcomes (17). Due of the low number of *PPARG* Ala/Ala ($n = 1$) and *TNF* -238 G/G ($n = 4$) subjects, analysis for these two SNPs were carried out under a dominant genetic model. All statistical analyses were performed with SPSS version 22.0 for Windows software (IBM, Armonk, NY). The differences were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Subjects characteristics

The main demographic, clinical and anthropometric characteristics of the 706 HIV patients enrolled in this study are shown in Table 1. Men represented 55.2% of the sample. Mean age was 43.0 ± 9.6 years. The median time on therapy was 61.0 months. Almost all patients were on at least 3 ART drugs (96.7%). Approximately half of the sample was on NNRTIs (52.4%), while 49.9% were receiving PIs. Diabetes mellitus was present in 6.2% of patients and MetS in 37.1%.

The prevalence of LD in the whole sample was 51.1%. When analyzing LD subtypes among individuals with LD (Table 2), lipoatrophy (LA) was the most prevalent (41.1%), followed by mixed pattern (33.6%), while lipohypertrophy (LH) comprised 25.3% of LD patients.

Regarding ethnicity, the sample comprised 391 (55.4%) individuals of European ancestry (white) and 315 (44.6%) of African ancestry (non-white). Comparisons of demographic, clinical and anthropometric characteristics between ethnic groups are also shown in Table 1. LD prevalence was higher in white (58.6%) than in non-white individuals (41.7%; $P < 0.001$, Pearson chi-square with continuity correction). When

comparing only individuals with LD (Table 2), analyses showed that lipoatrophy (LA) was the most prevalent in both groups. While lipoatrophy (LA) prevalence was higher in non-white (49.6%) than in white individuals (36.2%, $P = 0.013$), lipohypertrophy (LH) prevalence was almost twice higher in white (29.7%) than in non-white individuals (17.6%, $P = 0.011$).

Genotype and Allele Frequencies

Genotype and allele frequencies of the SNPs analyzed are shown in Table 3. All genotype frequencies were in agreement with those expected on Hardy–Weinberg equilibrium. Minor allele frequencies for SNPs in our sample were: *TNF* -238 G>A (rs361525): 0.07; *PPARG* Pro12Ala C>G (rs1801282): 0.07; *SREBF1* 3322 C>G (rs2297508): 0.43 and *FTO* T>A (rs9939609): 0.39. The frequencies of *SREBF1* rs2297508 were significantly different between white and non-white individuals. For this reason, ethnicity was included as a covariate in all analyses.

Association Analyses

Genotype frequencies were compared among individuals without and those with different subtypes of LD (Table 4). The *FTO* rs9939609 AA genotype frequencies were higher in individuals with the three subtypes than in those without LD, although with marginal significance ($P = 0.062$).

Poisson regression multivariate analyses were used to test which biodemographic variables and SNPs were predictors of the development of lipodystrophy (LD) (Table 5). The analyses indicated that higher age, HAART duration, ethnic group (white individuals) and *FTO* rs9939609 A-carriers had a significantly higher prevalence of lipodystrophy (LD). *SREBF1* rs2297508 (3322 C>G) G-carriers had marginal significance. Then, we used the same Poisson regression model to evaluate the possible predictors of lipoatrophy and lipohypertrophy subtypes separately (Table 5). The results showed that higher age, HAART duration, ethnic group (white individuals) and *FTO* rs9939609 A-allele remained significantly associated with lipoatrophy (LA) phenotype. Regarding lipohypertrophy, the variables significantly associated with this outcome were female sex, HAART duration, ethnic

group (white individuals), *FTO* rs9939609 A-carriers and *SREBF1* rs2297508 G-carriers. We also carried out this same analysis with metabolic syndrome, but none of the polymorphisms contributed significantly for this phenotype (data not shown).

DISCUSSION

In this study, we evaluated the association between variants in *TNF*, *PPARG*, *SREBF1* and *FTO* genes and lipodystrophy development in HIV-infected patients on HAART. This is the first study to report the relationship between polymorphisms in the *FTO* and *SREBF1* genes with lipodystrophy among HIV-infected individuals on regular HAART.

Our results have shown that *FTO* rs9939609 A-allele is associated with both LD subtypes. The fat mass and obesity associated gene (*FTO*) was identified in 2007 by a genome-wide association study (GWAS) for T2DM, through its effect on body mass index (BMI) and related phenotypes (18). Since this gene is highly expressed in the hypothalamus, it is believed to play a fundamental role in the control of body metabolism. From a set of SNPs identified in *FTO* first intron, rs9939609 T>A has been the most extensively investigated (19). *FTO* has been consistently associated with increased BMI and adiposity across different ages and populations, including from Brazil (20).

We are aware of only two studies relating *FTO* variants with metabolic disturbances in HIV-infected individuals. First, Pineda-Tenor *et al.* (21) described the link between *FTO* rs9939609 SNP and metabolic disorders in HCV/HIV-coinfected patients. Individuals with the minor A-allele had increased odds for overweight, glucose homeostasis impairment, liver fibrosis, steatosis and lower successful virologic HCV therapy. Second, Núñez-Torres *et al.* (22) found that *FTO* rs9940128 (G>A) polymorphism, which is in higher linkage disequilibrium with rs9939609, was associated with fatty liver disease (FLD) in HIV-infected patients with normal BMI. However, neither of them investigated the association of this gene with LD risk development. Thus, we believe our work was the first to explore this possible relationship.

In the present sample, the rs9909609 A variant was not associated with BMI, but its frequency was higher in patients with lipohypertrophy and mixed pattern than in patients with lipodystrophy. Previous studies from our group with other gene variants failed to replicate associations with BMI found in the general population in HIV+ individuals on HAART (15,23). Furthermore, a study by our group showed that the relation between body fat and adiponectin levels is altered in LD patients, suggesting that gene-environment interactions are different in these patients (23).

The sterol regulatory element-binding transcription factor 1 (*SREBF1*) is another proadipogenic transcription factor expressed in adipose tissue that controls synthesis and oxidation of fatty acids by regulating genes involved in cholesterol biosynthesis in the liver (24,25). Some ART agents can down-regulate *SREBF1* mRNA levels during adipogenesis (26) and lipodystrophy through adipocyte loss and size reduction (27). The minor allele G of rs2297508 (3322 C>G) has already been associated with higher plasma glucose levels and mildly increased risk of T2DM in non HIV-infected subjects (28).

Our results show that the G-allele of *SREBF1* 3322 C>G is associated with the occurrence of lipohypertrophy. To our knowledge, this is the first evidence of association between this polymorphism and LD in HIV-infected individuals. *SREBF1* 3322C>G is a synonymous mutation in exon 18c. However, it is possible that different gene expression patterns might occur by modification of the predicted messenger RNA (mRNA) folding, transfer RNA (tRNA) concentrations for different codons or that another SNP in linkage disequilibrium with this variant could be responsible for the observed association.

Laaksonen et al. (29), in a functional study of this same *SREBF1* variant, showed that CC homozygotes had a higher cholesterol synthesis rate than CG or GG carriers, but they found no effect of the gene variant on plasma cholesterol levels. Another report performed by Miserez et al. (30), in HIV-infected individuals, found that PI users who were C-allele carriers presented increase in plasma cholesterol levels. In

our study we found no differences in plasma cholesterol levels between genotype groups, but these results also argue for some functional effect of this nucleotide change.

In our study, LD prevalence was higher in white than in non-white individuals. The white ethnicity was more prevalent in LD and its subtypes (Poisson regression analysis). We found different patterns of LD: LH was more prevalent in white individuals, whereas LA was more prevalent in non-white individuals. Our findings are in agreement with other reports that show differences in the prevalence of LD between white and non-white individuals (31), even when they live in the same environment. However, differences exist between ethnic groups between countries. Therefore, our results suggest that differences in genetic background may influence these discrepancies in LD prevalence among studies.

Regarding *PPARG*, our results are in line with those by Saumoy *et al.*, who did not find relationship between *PPARG* Pro12Ala SNP and presence of LD or metabolic disturbances in Spanish HIV-infected individuals on HAART (32). In the opposite direction, the Ala variant (G-allele) seems to be associated with a protective cardiometabolic risk profile when compared to Pro in HIV/HCV co-infected patients, since it was associated with lower total cholesterol, LDL cholesterol and HOMA-IR (33). Despite Pro12Ala polymorphism is associated with greater insulin sensitivity in individuals not infected with HIV, a higher prevalence of Ala variant was observed in diabetic subjects with HIV receiving HAART. In this way, it is suggested that *PPARG* genetic variation could have deleterious effect in insulin signaling in this specific group of patients (34), but our findings did not corroborate these results.

The first study to report susceptibility between the -238 G>A polymorphism in the *TNF* promoter region and the development of LD in HIV-infected patients was done by Maher *et al.* (35). The authors observed that the frequency of A variant was significantly different in patients with LD when compared to those without LD. However, their results were based on a sample of 96 patients with only 9 carriers of the A allele. We did not find evidence corroborating their results.

The prevalence of MetS in PLHIV can range from 7% to 52%, due to study design, sample population and definition used (12). In our sample, we found a prevalence of 37.1%. Even through high prevalence of LD that we observed (51.1%), such anthropometric modifications are not following by glycemic and lipid profile alterations (data not shown). This results according to Sacilotto *et al.* 2017 (36). Also, we did not detect the influence of risk alleles in *SREBF1*, *PPARG*, *TNF* and *FTO* genes on MetS development.

The HIV virus and ARV drugs negatively impact adipocytes, modifying their metabolic function, distribution and energy storage; but not singly. Together, aspects of lifestyle, age, sex, ethnicity and genetic background contributes to changes in adipose tissue and genes related to its metabolism, regulation, maturation and immunology. All these factors demonstrate the complex interaction between HIV infection, therapeutic regimen and host characteristics to LD developmet - a clinically heterogeneous syndrome (6).

This study has some limitations. First, its cross-sectional design provides associations and not causality. Secondly, each antiretroviral does not cause the same effect on metabolic traits and can interact with each other. Thirdly, the lipodystrophy diagnosis was done by clinical observations and therefore there is some degree of subjectivity. Fourthly, we analyzed only one SNP in each gene; we cannot rule out that other variants in these same genes are involved in the phenotypes evaluated herein.

In conclusion, our results show that *FTO* rs9939609 A-carriers presented a higher prevalence of lipoatrophy and lipohypertrophy development, while *SREBF1* rs2297508 G-carriers presented a higher risk of lipohypertrophy. This is the first study to our knowledge that analyzed *FTO* and *SREBF1* SNPs with lipodystrophy among HIV-infected population on regular HAART. Thus, we believe that further genetic studies will be helpful to uncover the molecular mechanisms underlying adipose tissue redistribution and its related metabolic disorders in PLHIV on HAART.

Future perspective
<ul style="list-style-type: none"> • Development of new classes of antiretroviral drugs acting more effectively in blocking the HIV replication cycle.
<ul style="list-style-type: none"> • Availability of new generation drugs with a better pharmacokinetic profile, higher rates of viral suppression, high genetic barrier, lower toxicity and risk of discontinuation to adverse events, besides greater dosage easy.
<ul style="list-style-type: none"> • Drugs with lower impact on lipid metabolism disorders and lipodystrophy syndrome.
<ul style="list-style-type: none"> • More representative studies using the Phenome-wide association study (PheWAS) approach, in order to effectively identify pharmacogenetic traits associated with multiple phenotypes observed in HIV-infected patients on HAART.
<ul style="list-style-type: none"> • Reducing the cost of genetic testing and increasing the accessibility of pharmacogenetic tests in clinical practice in order to target the choice of antiretroviral drugs individually, increasing therapeutic success and minimizing viral resistance.
<ul style="list-style-type: none"> • Epigenetics as a tool to narrow the gaps regarding responses to drugs.
<ul style="list-style-type: none"> • Disseminate the importance of pharmacogenetics among health professionals.

Executive summary
HIV infection and highly active antiretroviral therapy (HAART)
<ul style="list-style-type: none"> • The human immunodeficiency virus (HIV) is a chronic disease which weakens the immune system defense (CD4+ T cells); • The landscape of HIV infection changed by introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) in the 90's;
HAART
<ul style="list-style-type: none"> • Is composed by five groups of drugs according to the mechanism of action on viral replication: nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), non-NRTIs (NNRTIs), protease inhibitors (PIs), and, more recently, integrase inhibitors and entry inhibitors;
Metabolic side effects
<ul style="list-style-type: none"> • HIV infection is accompanied by chronic adverse effects, such as dyslipidemia and lipodystrophy syndrome, as consequence of a complex interaction between antiretrovirals, HIV infection itself and genetic background;
Polymorphisms in candidate genes
<ul style="list-style-type: none"> • Genetic variations contribute to metabolic and lipidic disorders and changes in fat distribution; • The <i>FTO</i> rs9939609 T/A polymorphism was associated with lipoatrophy and lipohypertrophy in our HIV-infected sample; • The <i>SREBF1</i> rs2297508 G-allele carriers were significantly associated with lipohypertrophy development; • We did not find association <i>PPARG</i> Pro12Ala C>G and <i>TNF</i>-238 G>A with presence of LD or metabolic disturbances;
Ethnicity contribution in lipodystrophy development
<ul style="list-style-type: none"> • Lipodystrophy prevalence was higher in white individuals. The lipohypertrophy was more prevalent in white individuals whereas lipoatrophy subtype was the most prevalent in non-white individuals.
Conclusions
<ul style="list-style-type: none"> • This is the first study to evaluate the influence of <i>FTO</i> and <i>SREBF1</i> variants in lipodystrophy syndrome in HIV-infected subjects on HAART; • Other studies with follow up are needed to replicate and further investigate the contribution of these and other variants in metabolic complications and lipodystrophy syndrome in HIV-infected individuals.

Financial disclosure/Acknowledgements

This research was performed at the Molecular Biology laboratory from Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA) and supported by the following governmental funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed. No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

This research was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Research Ethics Committees from all participating institutions, as mentioned in Methods section. The eligible patients were invited to participate and underwent an interview to understand, clear and detailed manner, the aims of this research. Agreeing to participate, all subjects signed the free and informed consent form.

Table 1. Main demographic, clinical and anthropometric characteristics of 706 HIV-infected individuals on HAART.

Characteristics	HIV-infected patients (n = 706)	White individuals (n = 391)	Non-white individuals (n = 315)	<i>P</i> (White vs. Non-white individuals)
Demographic				
Age, years	43.0 ± 9.6	43.0 ± 9.8	42.9 ± 9.4	0.813 ^a
Male sex, % (n)	55.2 (390)	52.4 (205)	58.7 (185)	0.110 ^b
Clinical				
HAART duration (months), median [IQR]	61.0 [33.0 – 106.2]	65.0 [34.0 – 105.0]	59.0 [30.0 – 107.0]	0.312 ^c
PI users, % (n)	49.9 (352)	52.9 (207)	46.0 (145)	0.080 ^b
NNRTI users, % (n)	52.4 (370)	49.9 (195)	55.6 (175)	0.153 ^b
Diabetes mellitus, % (n)	6.2 (38) ¹	5.4 (19)	7.2 (19)	0.452 ^b
Metabolic syndrome, % (n)	37.1 (262)	40.2 (157)	33.3 (105)	0.074 ^b
Anthropometric				
Lipodystrophy, % (n)	51.1 (360) ²	58.6 (229)	41.7 (131)	<0.001 ^b
BMI (kg/m ²)	25.1 ± 4.5 ³	25.4 ± 4.8	24.8 ± 4.1	0.090 ^a

Data are mean ± SD or percentage; ^aIndependent samples *T*-test; ^bPearson chi-square with continuity correction; ^cMann-Whitney's U non-parametric test; ^d*P* from adjusted residuals from chi-square; ¹Data available for 614 individuals; ²Data available for 705 individuals; ³Data available for 389 individuals.

Table 2. Prevalence of lipoatrophy, lipohypertrophy and mixed subtypes in HIV-infected individuals on HAART with lipodystrophy.

Characteristics	HIV-infected patients (n = 360)	White individuals (n = 229)	Non-white individuals (n = 131)	<i>P</i>^a (White vs. Non-white individuals)
Lipoatrophy, % (n)	41.1 (148)	36.2 (83)	49.6 (65)	0.013 ^b
Lipohypertrophy, % (n)	25.3 (91)	29.7 (68)	17.6 (23)	0.011 ^b
Mixed, % (n)	33.6 (121)	34.1 (78)	32.8 (43)	0.811 ^b

^aPearson chi-square with continuity correction = 8.519: *P* = 0.014; ^b*P* from chi-square adjusted residuals.

Table 3. Genotype frequencies of *TNF* rs361525, *PPARG* rs1801282, *SREBF1* rs2297508, *FTO* rs9939609 gene variants according to ethnicity in HIV-infected individuals.

GENE	Genotype	Frequencies n (%)	Ethnicity		P value ¹
			White individuals n (%)	Non-white individuals n (%)	
<i>TNF</i> rs361525	GG	600 (87.0)	327 (86.7)	266 (86.9)	0.453
	GA	86 (12.5)	49 (13.0)	37 (12.1)	
	AA	4 (0.6)	1 (0.3)	3 (1.0)	
<i>PPARG</i> rs1801282	CC	605 (85.7)	332 (84.9)	273 (86.7)	0.400
	CG	100 (14.2)	59 (15.1)	41 (13.0)	
	GG	1 (0.1)	0	1 (0.3)	
<i>SREBF1</i> rs2297508	CC	224 (31.8)	142 (36.3)	82 (26.1)	0.003
	CG	357 (50.6)	193 (49.4)	164 (52.2)	
	GG	124 (17.6)	56 (14.3)	68 (21.7)	
<i>FTO</i> rs9939609	TT	259 (37.2)	144 (37.3)	115 (37.1)	0.955
	TA	326 (46.8)	182 (47.2)	144 (46.5)	
	AA	111 (15.9)	60 (15.5)	51 (16.5)	

¹Pearson χ^2 test; *TNF*, Tumor Necrosis Factor; *PPARG*, Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma; *SREBF1*, Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1; *FTO*, Fat Mass and Obesity associated. Total genotyped individuals to *TNF* rs361525 = 690; *PPARG* rs1801282 (Pro12Ala) = 706; *SREBF1* rs2297508 = 705; *FTO* rs9939609 = 696.

Table 4. Genotype frequencies of *TNF* rs361525, *PPARG* rs1801282, *SREBF1* rs2297508, *FTO* rs9939609 gene variants under dominant model in HIV-infected patients with lipodystrophy (LD) and subtypes and no LD.

GENE, rs	Genotype	No LD % (n)	LA % (n)	LH % (n)	MIXED % (n)	P¹
<i>TNF</i>, rs361525	GG	87.3 (290)	84.9 (124)	86.4 (76)	87.9 (102)	0.879
	A-carriers	12.7 (42)	15.1 (22)	13.6 (12)	12.1 (14)	
<i>PPARG</i>, rs1801282	CC	87.5 (302)	83.8 (124)	82.4 (75)	85.1 (103)	0.529
	G-carriers	12.5 (43)	16.2 (24)	17.6 (16)	14.9 (18)	
<i>SREBF1</i>, rs2297508	CC	33.3 (114)	32.7 (48)	29.7 (27)	28.1 (34)	0.712
	G-carriers	66.7 (228)	67.3 (99)	70.3 (64)	71.9 (87)	
<i>FTO</i>, rs9939609	TT	41.8 (141)	33.3 (48)	28.6 (26)	34.5 (41)	0.062
	A-carriers	58.2 (196)	66.7 (96)	71.4 (65)	65.5 (78)	

¹Pearson χ^2 test; LD, lipodystrophy; LA, lipoatrophy; LH, lipohypertrophy. *TNF*, Tumor Necrosis Factor; *PPARG*, Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma; *SREBF1*, Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1; *FTO*, Fat Mass and Obesity associated.

Table 5. Poisson regression model and predictive variables for lipodystrophy development and their subtypes in HIV-infected individuals on HAART.

Outcome	Variables	PR	95% CI	P value
Lipodystrophy (n = 668)	Sex (female)	1.12	0.98 – 1.29	0.106
	Age (years)	1.01	1.00 – 1.02	0.001
	HAART duration (months)	1.00	1.00 – 1.01	<0.001
	Ethnic group (white individuals)	1.37	1.18 – 1.59	<0.001
	<i>TNF</i> rs361525 (A-carriers)	1.00	0.81 – 1.23	0.992
	<i>PPARG</i> rs1801282 (G-carriers)	1.17	1.00 – 1.40	0.088
	<i>SREBF1</i> rs2297508 (G-carriers)	1.18	1.00 – 1.36	0.052
	<i>FTO</i> rs9939609 (A-carriers)	1.23	1.06 – 1.44	0.006
P < 0.001				
Lipoatrophy (n = 580)	Sex (female)	1.03	0.87 – 1.23	0.713
	Age	1.02	1.01 – 1.03	<0.001
	HAART duration	1.01	1.00 – 1.01	<0.001
	Ethnic group (white individuals)	1.32	1.11 – 1.58	0.002
	<i>TNF</i> rs361525 (A-carriers)	0.99	0.99 – 0.77	0.912
	<i>PPARG</i> rs1801282 (G-carriers)	1.19	0.95 – 1.49	0.130
	<i>SREBF1</i> rs2297508 (G-carriers)	1.19	0.98 – 1.44	0.076
	<i>FTO</i> rs9939609 (A-carriers)	1.25	1.25 – 1.04	0.018
P < 0.001				
Lipohypertrophy (n = 526)	Sex (female)	1.40	1.14 – 1.73	0.002
	Age	1.01	1.00 – 1.02	0.215
	HAART duration	1.01	1.00 – 1.01	<0.001
	Ethnic group (white individuals)	1.70	1.35 – 2.16	<0.001
	<i>TNF</i> rs361525 (A-carriers)	1.07	0.76 – 1.49	0.708
	<i>PPARG</i> rs1801282 (G-carriers)	1.18	0.90 – 1.55	0.239
	<i>SREBF1</i> rs2297508 (G-carriers)	1.31	1.04 – 1.65	0.024
	<i>FTO</i> rs9939609 (A-carriers)	1.31	1.04 – 1.63	0.019
P < 0.001				

PR, prevalence ratio, 95% CI, 95% confidence interval; *TNF*, Tumor Necrosis Factor; *PPARG*, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma; *SREBF1*, Sterol Regulatory Element-Binding Transcription Factor 1; *FTO*, Fat Mass and Obesity associated.

REFERENCES

1. Ujvari SC. A história da humanidade contada pelos vírus. 2nd ed. São Paulo: Contexto; 2015. 202 p.
2. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. 2015;
3. UNAIDS. Global HIV & AIDS statistics [Internet]. 2017. Available from: <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
4. SECRETARIA VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico HIV AIDS Brasil 2018. 2018.
5. Nijhawan A. HIV Medications. *Hosp Med Clin*. 2012;1(1):e36–49.
6. Koethe JR. Adipose tissue in HIV infection. *Compr Physiol*. 2017;7(4):1339–57.
7. Alves MD, Brites C, Sprinz E. HIV -associated lipodystrophy: A review from a Brazilian perspective. *Ther Clin Risk Manag*. 2014;10(1):559–66.
8. Santos AP, Navarro AM, Schwingel A, Alves TC, Abdalla PP, Venturini ACR, et al. Lipodystrophy diagnosis in people living with HIV / AIDS : prediction and validation of sex-specific anthropometric models. *BMC Public Health*. 2018;18(806):1–14.
9. Guzman N, Aboud AK Al. HIV-associated Lipodystrophy [Internet]. 2018. 1–5 p. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493183/>
10. Non LR, Escota G V., Powderly WG. HIV and its relationship to insulin resistance and lipid abnormalities. *Transl Res [Internet]*. 2017;183:41–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2016.12.007>
11. Swami A. Metabolic Syndrome and HIV Infection. *J HIV Retro Virus*. 2016;2(1:14):1–5.
12. Calza L, Colangeli V, Magistrelli E, Rossi N, Rosselli Del Turco E, Bussini L, et al. Prevalence of metabolic syndrome in HIV-infected patients naive to antiretroviral therapy or receiving a first-line treatment. *HIV Clin Trials [Internet]*. 2017;18(3):110–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/15284336.2017.1311502>
13. Srinivasa S, Grinspoon SK. Metabolic and body composition effects of newer antiretrovirals in HIV-infected patients. *Eur J Endocrinol*. 2014;170(5):R185–R202.
14. Cunha J da., Maselli LMF, Stern ACB, Spada C, Bydlowski SP. Impact of antiretroviral therapy on lipid metabolism of human immunodeficiency virus-infected patients: Old and new drugs. *World J Virol*. 2015;4(2):56–77.
15. Castilhos JK, Sprinz E, Lazzaretti RK, Kuhmmer R, Mattevi VS. Polymorphisms in adiponectin receptor genes are associated with lipodystrophy-related phenotypes in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *HIV Med*. 2015;16(8):494–501.
16. IDF. The International Diabetes Consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome. 2006; Available from: <https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definitionof-the-metabolic-syndrome>
17. Barros AJ, Hirakata VN. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. *BMC Med Res Methodol*. 2003;3(21):1–13.
18. Yang Q, Xiao T, Guo J, Su Z. Complex Relationship between Obesity and the Fat Mass and Obesity Locus. *Int J Biol Sci [Internet]*. 2017;13(5):615–29. Available from: <http://www.ijbs.com/v13p0615.htm>
19. Speakman JR. The “Fat Mass and Obesity Related” (FTO) gene: Mechanisms of

- Impact on Obesity and Energy Balance. *Curr Obes Rep.* 2015;4(1):73–91.
20. Silva CF da, Zandoná MR, Vitolo MR, Dal P, Campagnolo B, Rotta LN, et al. Association between a frequent variant of the FTO gene and anthropometric phenotypes in Brazilian children. *BMC Med Genet.* 2013;14:1.
 21. Pineda-Tenor D, Berenguer J, Jiménez-Sousa MA, García-Alvarez M, Aldámiz-Echevarria T, Carrero A, et al. FTO rs9939609 polymorphism is associated with metabolic disturbances and response to HCV therapy in HIV/HCV-coinfected patients. *BMC Med [Internet].* 2014;12(198):1–11. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4224698&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
 22. Núñez-Torres R, Macías J, Rivero-Juarez A, Neukam K, Merino D, Téllez F, et al. Fat mass and obesity-associated gene variations are related to fatty liver disease in HIV-infected patients. *HIV Med [Internet].* 2017;18(8):546–54. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/hiv.12489>
 23. 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;55(3):299–305.
 24. Rui L. Energy Metabolism in the Liver. *Compr Physiol.* 2014;4(1):177–97.
 25. Park HY, Kang HS, Im S. Recent Insight into the Correlation of SREBP- Mediated Lipid Metabolism and Innate Immune Response. *J Mol Endocrinol.* 2018;1–26.
 26. Díaz-Delfín J, del Mar Gutiérrez M, Gallego-Escuredo JM, Domingo JC, Gracia Mateo M, Villarroya F, et al. Effects of nevirapine and efavirenz on human adipocyte differentiation, gene expression, and release of adipokines and cytokines. *Antiviral Res.* 2011;91(2):112–9.
 27. Bastard JP, Caron M, Vidal H, Jan V, Auclair M, Vigouroux C, et al. Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipotrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance. *Lancet.* 2002;359(9311):1026–31.
 28. Grarup N, Stender-Petersen KL, Andersson EA, Jørgensen T, Borch-Johnsen K, Sandbæk A, et al. Association of variants in the sterol regulatory element-binding factor 1 (SREBF1) gene with type 2 diabetes, glycemia, and insulin resistance A study of 15,734 danish subjects. *Diabetes.* 2008;57(4):1136–42.
 29. Laaksonen R, Thelen KM, Päivä H, Matinheikki J, Vesalainen R, Janatuinen T, et al. Genetic variant of the SREBF-1 gene is significantly related to cholesterol synthesis in man. *Atherosclerosis.* 2006;185(1):206–9.
 30. Miserez AR, Muller PY, Barella L, Schwietert M, Erb P, Vernazza PL BM. A single-nucleotide polymorphism in the sterol-regulatory element-binding protein 1c gene is predictive of HIV-related hyperlipoproteinaemia. *AIDS.* 2001;15(15):2045–9.
 31. Andany N, Raboud JM, Walmsley S, Diong C, Rourke SB, Rueda S, et al. Ethnicity and Gender Differences in Lipodystrophy of HIV-Positive Individuals Taking Antiretroviral Therapy in Ontario, Canada. *HIV Clin Trials [Internet].* 2011;12(2):89–103. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1310/hct1202-89>
 32. Saumoy M, Veloso S, Alonso-Villaverde C, Domingo P, Chacón MR, Miranda M, Aragonès G, Gutiérrez MM, Viladés C, Peraire J, Sirvent JJ, López-Dupla M, Aguilar C, Richart C VF. PPARgamma Pro12Ala polymorphism in HIV-1-infected patients with HAART-related lipodystrophy. *Curr HIV Res.* 2008;7(5):533–40.

33. Garcia-Broncano P, Berenguer J, Fernánde z-Rodríguez A, Pineda-Tenor D, Jiménez-Sousa MT, García-Alvarez M, et al. PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphism was associated with favorable cardiometabolic risk profile in HIV/HCV coinfect ed patients: A cross-sectional study. *J Transl Med*. 2014;12(1):1–9.
34. Nazih H, Raffi F, Taïeb A, Reynes J, Choutet P, Cassuto J-P, et al. Peroxisome Proliferator Activating Receptor Alpha and Gamma Polymorphisms and Metabolic Abnormalities in HIV-Infected Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy: The ANRS CO8 APROCO-COPILOTE Study. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 2012;28(4):393–9. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/aid.2010.0311>
35. Maher B, Alfirevic A, Vilar FJ, Wilkins EG, Park BK, Pirmohamed M. TNF-alpha promoter region gene polymorphisms in HIV-positive patients with lipodystrophy. *Aids* [Internet]. 2002;16(15):2013–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12370499>
36. Sacilotto LB, Pereira PCM, Manechini JPV, Papini SJ. Body Composition and Metabolic Syndrome Components on Lipodystrophy Different Subtypes Associated with HIV. *J Nutr Metab*. 2017;1:1–8.
37. Guaraldi G, Stentarelli C, Zona S, Santoro A. HIV-associated lipodystrophy: Impact of antiretroviral therapy. *Drugs*. 2013;73(13):1431–50.
38. 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* [Internet]. 2012;26(1):19–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22011627>
39. Lazzaretti RK, Gasparotto AS, Sassi MGD, Polanczyk CA, Kuhmmer R, Silveira JM, et al. Genetic markers associated to dyslipidemia in HIV-infected individuals on HAART. *Sci World J*. 2013;2013.
40. Chen D, Guarente L. SIR2: a potential target for calorie restriction mimetics. *Trends Mol Med*. 2007;13(2):64–71.
41. Kitada M, Kume S, Takeda-Watanabe A, Tsuda SI, Kanasaki K, Koya D. Calorie restriction in overweight males ameliorates obesity-related metabolic alterations and cellular adaptations through anti-aging effects, possibly including AMPK and SIRT1 activation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* [Internet]. 2013;1830(10):4820–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.014>
42. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2010;5(1):253–95. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250>
43. Lomb DJ, Laurent G, Haigis MC. Sirtuins regulate key aspects of lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2010;1804(8):1652–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.021>
44. Clark SJ, Falchi M, Olsson B, Jacobson P, Cauchi S, Balkau B, et al. Association of sirtuin 1 (SIRT1) gene SNPs and transcript expression levels with severe obesity. *Obesity*. 2012;20(1):178–85.
45. Pinzone MR, Cacopardo B, Condorelli F, Rosa M Di, Nunnari G. Sirtuin-1 and HIV-1: An Overview. *Curr Drug Targets* [Internet]. 2013;14(6):648–52. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-4501&volume=14&issue=6&spage=648>
46. Kwon H, Brent MM, Getachew R, Jayakumar P, Schnolzer M, Mcburney MW, et al.

- Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Protein Inhibits the SIRT1 Deacetylase and Induces T-Cell Hyperactivation. *Cell Host Microbe*. 2009;3(3):158–67.
47. Pagans S, Pedal A, North BJ, Kaehlcke K, Marshall BL, Dorr A, et al. SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation. *PLoS Biol*. 2005;3(2):0210–20.
 48. Shirakawa K, Chavez L, Hakre S, Calvanese V, Verdin E. Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors. *Trends Microbiol* [Internet]. 2013;21(6):277–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2013.02.005>
 49. Zhang HS, Wu MR. SIRT1 regulates Tat-induced HIV-1 transactivation through activating AMP-activated protein kinase. *Virus Res*. 2009;146(1–2):51–7.
 50. Florindo AA, de Oliveira Latorre M do RD, Morandi dos Santos EC, Borelli A, de Souza Rocha M, Segurado AAC. Validação de métodos de estimativa da gordura corporal em portadores do HIV/Aids. *Rev Saude Publica*. 2004;38(5):643–9.
 51. Van Der Klaauw AA, Farooqi IS. The hunger genes: Pathways to obesity. *Cell* [Internet]. 2015;161(1):119–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.008>
 52. Dali-Youcef N, Lagouge M, Froelich S, Koehl C, Schoonjans K, Auwerx J. Sirtuins: the “magnificent seven”, function, metabolism and longevity. *Ann Med*. 2007;39(5):335–45.
 53. Kurylowicz A. In search of new therapeutic targets in obesity treatment: Sirtuins. *Int J Mol Sci*. 2016;17(572):1–26.
 54. Shimoyama Y, Suzuki K, Hamajima N, Niwa T. Sirtuin 1 gene polymorphisms are associated with body fat and blood pressure in Japanese. *Transl Res* [Internet]. 2011;157(6):339–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2011.02.004>
 55. Meneguette MV de O, Oliveira CA de, Lima, Melo MH de, Pina, Nicole K, et al. Polymorphism in the SIRT1 gene and parameters of metabolic syndrome in a sample of the adult Brazilian population. *Rev Nutr*. 2016;29(1):1–10.
 56. Palmer BF, Clegg DJ. The sexual dimorphism of obesity. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2015;402:113–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2014.11.029>
 57. Lauretta R, Sansone M, Sansone A, Romanelli F, Appetecchia M. Gender in Endocrine Diseases: Role of Sex Gonadal Hormones. *Int J Endocrinol* [Internet]. 2018;1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30420884><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6215564>
 58. Galli M, Veglia F, Angarano G, Santambrogio S, Meneghini E, Gritti F, et al. Gender Differences in Antiretroviral Drug-Related Adipose Tissue Alterations. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003;34(1):58–61.
 59. Loonam CR, Mullen A. Nutrition and the HIV-Associated lipodystrophy syndrome. *Nutr Res Rev*. 2012;25(2):267–87.
 60. de Goede AL, Vulto AG, Osterhaus ADME, Gruters RA. Understanding HIV infection for the design of a therapeutic vaccine. Part I: Epidemiology and pathogenesis of HIV infection. *Ann Pharm Fr* [Internet]. 2015;73(2):87–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharma.2014.11.002>
 61. Thakur BK, Chandra A, Dittrich T, Welte K, Chandra P. Inhibition of SIRT1 by HIV-1 viral protein Tat results in activation of p53 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*

[Internet]. 2012;424(2):245–50. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.06.084>

Artigo Original

“Investigation of SIRT1 gene variants in HIV-associated lipodystrophy and metabolic syndrome”

Submetido ao periódico ***Genetics and Molecular Biology***

ISSN (print): 1415-4757 | ISSN (online): 1678-4685

Impact Factor: 1.493 (2017)

Qualis Ciências Biológicas 1: B1

26 Abstract

27 HIV-infected individuals on chronic use of highly active antiretroviral therapy (HAART)
28 are more likely to develop adipose tissue and metabolic disorders, such as
29 lipodystrophy (LD) and metabolic syndrome (MetS). The development of these
30 phenotypes is known to be multifactorial. Thus, variants in genes implicated in
31 adipogenesis and lipid metabolism may increase susceptibility to LD and MetS. It is
32 speculated that sirtuin 1 (*SIRT1*), due to its role in the regulation of transcription factors
33 involved in energy regulation, may influence the outcome of these disturbances.
34 Therefore, we genotyped four polymorphisms located in *SIRT1* (rs2273773 T>C,
35 rs12413112 G>A, rs7895833 A>G, rs12049646 T>C) in 832 HIV-infected patients
36 receiving HAART by real-time polymerase chain reaction. The prevalence of LD was
37 55.8% and MetS was 35.3%. Lipodystrophy was the most prevalent subtype in all sample
38 (38.0%) and showed significant difference between white and non-white. None of the
39 genetic variants investigated in *SIRT1* was associated with the phenotypes. White
40 individuals and those in longer time of HAART use were more likely to develop LD. We
41 concluded that these *SIRT1* polymorphisms are not predictive factors to development
42 of lipodystrophy and metabolic syndrome in HIV-infected individuals.

43

44

45

46

47

48

49

50 Introduction

51 The Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), caused by the human
52 immunodeficiency virus (HIV), is globally recognized as an epidemiological
53 phenomenon. Currently, approximately 37 million people are living with HIV (PLHIV)
54 in the world (UNAIDS, 2017). The Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART)
55 improves the quality of life of HIV-infected individuals, since it completely or almost
56 completely inhibits viral replication, improves the immune system and decreases the
57 incidence of opportunistic infections (Nijhawan, 2012).

58

59 It has been shown that HIV-infected individuals in regular use of HAART are at
60 increased risk of developing a variety of metabolic disorders and fat redistribution
61 (Cunha *et al.*, 2015). The latter is known as lipodystrophy syndrome (LD) and can be
62 present as the following subtypes: lipoatrophy (LA), which consist of peripheral
63 subcutaneous fat loss, whereas lipohypertrophy (LH) occurs when there is
64 accumulation of adipose tissue, mainly central fat gain. It is possible, also, to observe
65 both phenotypes simultaneously, namely mixed lipodystrophy (Guaraldi *et al.*, 2013).
66 The LD prevalence is highly variable among studies due to lack of consensus to
67 definition, diagnostic methods, genetic background, antiretroviral (ARV) drugs scheme
68 and lifestyle factors (Alves, 2014).

69

70 LD can be accompanied by insulin resistance and dyslipidemia. These changes
71 are predictive to metabolic syndrome (MetS) development, characterized by a set of
72 cardiovascular disease risk factors (CVD), including hypertriglyceridemia, decreased
73 high-density lipoprotein cholesterol levels (HDL-c) and central obesity (Swami, 2016).
74 The prevalence of MetS among HIV-infected patients is also variable among studies,

75 mainly due to the criteria of classification, antiretroviral regimen, sample size and study
76 design (Calza *et al.*, 2017).

77

78 The exact mechanism subjacent to LD and MetS development is not elucidated
79 and is believed to be multifactorial (Sacilotto *et al.*, 2017). We have shown evidence
80 that genetic variants in candidate genes involved in adipogenesis and lipid metabolism
81 may be predictors of the occurrence of these metabolic and anthropometric disorders
82 (Gasparotto *et al.*, 2012; Lazzaretti *et al.*, 2013).

83

84 The silent information regulator 2 (Sir2) regulates aging and lifespan through
85 caloric restriction in *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* and
86 *Drosophila melanogaster* (Chen and Guarente, 2007). Caloric restriction (CR) is
87 defined as a nutritional intervention to reduce energy intake (20-50%), without
88 malnutrition, able to decrease total body weight and fat mass, to minimize plasma
89 levels of lipid profile markers (such as total cholesterol and triglycerides), attenuating
90 mediators of inflammation (C-reactive protein, interleukin-6, tumor necrosis factor) and
91 improving glucose homeostasis by inhibiting inflammatory pathways while activating
92 multiple routes that promote decreased lipogenesis (Chen and Guarente, 2007; Kitada
93 *et al.*, 2013).

94

95 In lower species, as previously mentioned, the effects of CR have been shown
96 to be mediated by Sir2 regulator. The effects of this protein in extending lifespan occur
97 by *downstream* regulation mechanisms under certain conditions in specific tissues,
98 whereas its inactivation shortens this period. The enzymatic activity of Sir2 is based as
99 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)-dependent deacetylation reaction and is

100 connected with the detection of cellular energetic state (nutrients). This protein is highly
101 conserved in several species, from bacteria to mammals (Chen and Guarente, 2007)
102 and presents orthologous genes in higher eukaryotes that are known as sirtuins -
103 *SIRT*s (Kitada *et al.*, 2013), abbreviation of Silent Information Regulator Two proteins
104 (Michan and Sinclair, 2007).

105

106 In mammals, the sirtuin family is comprised by seven proteins (SIRT1-7). Sirtuin
107 1 (SIRT1), encoded by *SIRT1* gene (10q21.3), homologous to yeast Sir2, is the most
108 well-characterized member of class III histone deacetylases group (HDACs) (Haigis
109 and Sinclair, 2010). *SIRT1* exerts important biological functions in the regulation of
110 cellular homeostasis, especially metabolism, inflammation, oxidative stress and
111 senescence (Lomb, 2010). *SIRT1* deacetylates various transcription factors and target
112 proteins involved in lipid and energy regulation, that play roles in adipogenesis and
113 mobilization of fat in white adipose tissue (Clark *et al.*, 2012).

114

115 So far, studies have shown a relationship between *SIRT1* and the HIV virus,
116 due to its ability to modulate viral replication: *SIRT1* recycles HIV-Tat protein, which is
117 critical for transcriptional activation of HIV-1 provirus and induces T-cell hyperactivation
118 (Pagans *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2009; Zhang e Wu, 2009; Pinzone *et al.*, 2013;
119 Shirakawa *et al.*, 2013). Studies examining the influence of genetic variants on *SIRT1*
120 and the occurrence of metabolic disorders in HIV-infected individuals under HAART
121 have not been performed yet. In order to investigate this possible relationship, we
122 selected four single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *SIRT1* gene: two in the
123 promoter region (rs7895833 A> G and 12049646 T> C), one in in the intron 4

124 (rs12413112 G> A) and one in exon 5 (rs2273773 T> C), in order to evaluate their
125 possible contribution to LD and MetS occurrence in PLHIV on regular HAART.

126

127 **Material and Methods**

128 **Subjects:** this cross-sectional study was conducted with 832 consecutive HIV-infected
129 patients recruited from three reference centers in southern region (RS) Brazil
130 (HIV/AIDS Ambulatory Unit of Hospital de Clínicas from Porto Alegre/RS, HIV
131 Ambulatory Care of Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Correa Jr. from Rio
132 Grande/RS, and HIV/AIDS Specialized Assistance Service from Pelotas/RS) from
133 March 2006 to November 2008 and between October 2016 and June 2018. The
134 enrolled subjects were older than 18 years old, in regular use of HAART for at least 12
135 months, using two nucleoside reverse transcriptase inhibitors - NRTIs (tenofovir or
136 zidovudine plus lamivudine) and one non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor -
137 NNRTI (efavirenz) or protease inhibitors - PI (lopinavir and atazanavir with and without
138 ritonavir), and viral load below the detection limit of test (50 copies/mL). Pregnant
139 women and patients with neurological illness that impairs the understanding of the
140 study were excluded.

141

142 **Ethical considerations:** this research was approved by the Research Ethics
143 Committees from all centers above mentioned and of the Federal University of Health
144 Sciences of Porto Alegre. All participants signed an informed consent statement before
145 assenting to participate in this study.

146

147 **Subjects characteristics:** demographic and lifestyle characteristics were obtained
148 through interviews. Particularities about HIV infection and treatment (time of diagnosis,

149 current ARVs and use of other drugs) as well as other clinical information were
150 obtained from medical records. Patients were classified phenotypically by the
151 interviewer as white and non-white individuals, as discussed in previous works by our
152 group (Lazzaretti *et al.*, 2013; Castilhos *et al.*, 2015).

153

154 **Biochemical and anthropometric parameters:** lipid profile determinations
155 (triglycerides, total cholesterol, and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol), fasting
156 serum glucose and viral load are part of patients' routine care. Physical examination
157 was evaluated through weight (kilograms), height (meters), waist circumference
158 (centimeters) and seven skinfolds by physician. To assess total subcutaneous fat, the
159 sum of skinfolds was grouped into three categories: limb subcutaneous fat (LSF):
160 biceps, triceps and calf folds; central subcutaneous fat (CSF): subscapular, axillary,
161 suprailiac and abdominal; and total subcutaneous fat (TSF) was the sum of LSF and
162 CSF (Florindo *et al.*, 2004). Body mass index (BMI) was calculated using the following
163 formula: $BMI = \text{weight in kilograms}/(\text{height in meters})^2$. LD diagnosis was performed
164 by the physician at each center and patients were classified as follows: without LD;
165 lipoatrophy (LA), was defined when observed fat reduction in face, arms and/or legs,
166 thin buttocks and venous prominence; lipohypertrophy (LH) was identified by
167 abdominal fat accumulation, gynecomastia in men or increased breasts in women,
168 lipomas through the body or in dorsocervical region (buffalo hump); mixed pattern
169 occurred when at least one feature of LA and LH were present together (Alves, Brites
170 e Sprinz, 2014). Metabolic syndrome (MetS) classification was based on International
171 Diabetes Federation (IDF) consensus (IDF, 2006) as waist perimeter ≥ 94 cm in male
172 or ≥ 80 cm in female plus any two of the following four factors: serum triglycerides \geq
173 150 mg/dL or treatment for this lipid abnormality; HDL-cholesterol < 40 mg/dL in males

174 and < 50 mg/dL in females or drug treatment for reduced HDL-cholesterol; systolic
175 blood pressure \geq 130 or diastolic blood pressure \geq 85 mm Hg (or hypertension
176 treatment); fasting plasma glucose \geq 100mg/dL or previously diagnosed type 2
177 diabetes (T2D).

178

179 **Molecular analysis:** blood samples were collected and sent to Molecular Biology
180 Laboratory for DNA extraction from peripheral leukocytes using a high salt
181 concentration precipitation standard method. Four polymorphisms in *SIRT1* gene,
182 rs7895833 A>G (promoter region), 12049646 T>C (promoter region), rs12413112 G>A
183 (intron 4) and rs2273773 T>C (exon 5) were genotyped by real-time polymerase chain
184 reaction (PCR) using hydrolysis probe allele discrimination assays (TaqMan; Applied
185 Biosystems, Foster City, CA). Appropriate controls were used in all the analyses.

186

187 **Statistical analysis:** a chi-squared test was used to assess the agreement of
188 genotype frequencies with those expected under Hardy-Weinberg equilibrium.
189 Anthropometric and lipid parameter means were compared between genotypes using
190 analysis of variance (ANOVA) and *T*-tests for independent samples when normally
191 distributed. Differences between groups were compared with the post-hoc Tukey test
192 when appropriate. Asymmetrically distributed data (triglycerides levels, LSF, CSF,
193 TSF, leptin and adiponectin levels and leptin/adiponectin ratio) were transformed into
194 natural logarithm before statistical analysis. To estimate the contribution of genotypes
195 to LD, LA and LH phenotypes separately and MetS we used Poisson regression with
196 robust variance due to its increased accuracy for analysis of cross-sectional studies
197 with frequent binary outcomes (Barros and Hirakata, 2003). Data analyses were

198 performed with SPSS version 22.0 for Windows software (IBM, Armonk, NY). All tests
199 were two-sided and the differences were considered significant when $P < 0.05$.

200

201 **Results**

202 ***Subjects characteristics of the participants***

203 Table 1 summarizes the main demographic, clinical and anthropometric
204 characteristics of the 832 HIV-infected subjects enrolled in this research. More than
205 half the sample were males (55.3%). Of total individuals, 59.5% were phenotypically
206 characterized as white (European ancestry) and 40.5% were non-white individuals
207 (African ancestry); and their mean age was 43.3 ± 10.0 years. The median of HAART
208 duration was 66.0 months. Nearly all patients were on at least 3 ART drugs, comprising
209 96.6% using NRTIs, 51.3% on NNRTIs, while 50.8% were receiving PIs. Diabetes
210 mellitus (DM) showed a prevalence of 7.6% of patients and MetS of 35.3%.

211 The mean BMI in our sample was 25.2 ± 4.6 kg/m² and the prevalence of LD
212 was 55.8%. Among LD patients, the most prevalent subtype was LA (38.0%), followed
213 by mixed pattern (36.4%) and LH (25.6%).

214 LD prevalence was higher in white (63.2%) than in non-white individuals (43.9%;
215 $P < 0.001$, Table 1). When we compared prevalence of LD subtypes between both
216 ethnic groups, we observed that the mixed subtype was the most prevalent in white
217 individuals (38.7%) while LA was the most prevalent in non-white individuals (47.9%).
218 LH prevalence was higher in white than non-white individuals with marginal
219 significance (28.1% versus 20.3%, respectively, $P = 0.072$). The LA subtype presented
220 a frequency of 47.9% in non-white individuals and 33.2% in white individuals ($P =$

221 0.002). The mixed phenotype did not present a significant difference between the two
222 ethnic groups ($P = 0.151$).

223

224 ***Allele and genotype frequencies***

225 Minor allele frequencies of *SIRT1* polymorphisms analyzed in our study were:
226 rs2273773 (T>C): 0.11; rs7895833 (A>G): 0.25; rs12049646 (T>C): 0.09 and
227 rs12413112 (G>A): 0.11 and are close to those found by 1000 Genomes Project Phase
228 3 (www.ensembl.org) in European and African populations. However, the rs2273773
229 and rs7895833 genotype frequencies were not distributed according to Hardy-
230 Weinberg equilibrium in our sample (Pearson's chi-squared test). The values seen for
231 SNP rs2273773 were: TT = 636; TC = 140 and CC = 18 while the expected values
232 would be: TT = 629; TC = 155 and CC = 10. The values seen for SNP 7895833 were:
233 AA = 465; AG = 280 and GG = 60 while the expected values would be: AA = 452; AG
234 = 302 and GG = 50. No deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was found for
235 rs12049646 and rs12413112 variants.

236

237 The success rate of the genotyping assay by real-time PCR was 100% to
238 rs12413112, 95.4% to rs7895833; 94.0% to rs2273773 and 92.5% to rs12049646.

239

240 Genotype frequencies of all SNPs are shown in Table 2. The SNPs frequencies
241 when compared between white and non-white individuals and no significant
242 differences were observed.

243

244

245

246 ***Association analyses between SIRT1 polymorphism and lipodystrophy and***
247 ***metabolic syndrome***

248 The genotypes frequencies for the *SIRT1* polymorphisms were compared in
249 individuals without LD and presenting the three LD subtypes separately (Table 3). No
250 significant differences in variants frequencies among these subgroups were observed.

251

252 Next, we used Poisson regression multivariate analyses to evaluate if the *SIRT1*
253 genetic variants adjusted by biodemographic variables could be predictors to MetS
254 (Table 4) and LD development (Table 5). Regarding the polymorphisms, none was a
255 significant contributor for both phenotypes. The same Poisson regression model was
256 tested on LA and LH separately (Table 6) and we found identical results, with no
257 significant association of SNPs in the *SIRT1* gene and risk of different LD
258 subphenotypes development.

259

260 Nevertheless, the analyses with biodemographic variables showed that age
261 (years), HAART duration (months) and white individuals are predictors to a higher risk
262 to LD development. The same predictive variables were significant predictors of LA,
263 particularly. For LH, in addition to HAART duration and ethnicity (white individuals), the
264 female gender also contributed to occurrence of this phenotype. Regarding MetS, only
265 higher age contributed significantly to this metabolic disorder.

266

267 **Discussion**

268 In this study, we analyzed the association between variants in *SIRT1* gene with
269 lipodystrophy and metabolic syndrome occurrence in HIV-infected patients on HAART.

270 To our knowledge, this is the first study to investigate this relationship and our results
271 suggest that genotypes of rs12413112, rs7895833, rs2273773 and rs12049646
272 polymorphisms in *SIRT1* are not predictor factors of metabolic disorders in Brazilian
273 patients infected by HIV using regular antiretroviral regimen.

274

275 The Brazilian population consists a unique setting to study HIV-infected
276 patients, due to a highly successful program of antiretroviral therapy distribution to all
277 infected patients free of charge and according to the same guidelines all over the
278 country. These patients are mostly treated in reference centers maintained by the
279 Brazilian Ministry of Health, which favors the recruitment of a higher number of patients
280 as presented herein. Furthermore, this work includes a high number of women and
281 individuals of African ancestry, mainly neglected in other studies.

282

283 Metabolic balance results from a complex interaction between calorie intake,
284 expenditure and energy storage, intimately orchestrated by many signaling pathways
285 and genetic expression. The physiological and molecular mechanisms underlying this
286 regulation are variable between individuals. It is widely accepted that genetic
287 background, gender, behavior factors and environmental influences act in the
288 disruption of energy homeostasis and adipose tissue distribution (van der Klaauw and
289 Farooqi, 2015).

290

291 In this context, mammalian sirtuin 1 protein (encoded by *SIRT1* gene) has
292 attracted attention into metabolic disorders studies due to its contribution in several
293 physiological processes, including glucose metabolism and adipogenesis. Its yeast
294 orthologue, silent information regulator 2 (encoded by *SIR2* gene), was capable of

295 extend lifespan in lower organisms thought prolonged calorie restriction (CR). The
296 positive effects of prolonged CR in health are due its ability to delay the onset of age-
297 related diseases (Dali-Youcef *et al.*, 2007).

298

299 Some studies have shown that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in
300 *SIRT1* can change their expression and activity leading to individual susceptibility to
301 obesity and related metabolic disturbances in non-HIV infected subjects (Kurylowicz,
302 2016). In a large Dutch cohort (n = 3575), subjects bearing the TC genotype of
303 rs2273773 T>C presented a BMI 0.5 kg/m² higher than TT homozygotes. In another
304 study with Japanese healthy subjects, the rs7895833 G>A and rs2273773 T>C SNPs
305 were associated with laboratory (biochemical, metabolic and lipid) and anthropometric
306 parameters. Men carriers of the A allele of rs7895833 compared to GG homozygotes
307 had higher body fat ratio and BMI. Body fat ratio was also higher in men TT
308 homozygotes for rs2273773 as well as hyperglycemia (Shimoyama *et al.*, 2011). Our
309 results do not support these findings and are in accordance with some genome
310 association studies who failed to find relationship between *SIRT1* SNPs and obesity-
311 related phenotypes in the general population. Meneguetto *et al.* (2016) did not find
312 difference in genotype and allele frequency of rs7895833 A>G SNP *SIRT1* between
313 Brazilian adult's individuals with metabolic syndrome (MetS) and those without (P =
314 0.24). The minor allele-G frequency was 0.28 in subjects with MetS and 0.265 in non-
315 MetS (Meneguetto *et al.*, 2016).

316

317 In the present study, the genotype frequencies of rs12413112, rs7895833,
318 rs2273773 and rs12049646 polymorphisms in *SIRT1* gene were compared between
319 LD subtypes and no-LD patients, but no significant differences were detected. Then,

320 we used Poisson regression multivariate analyzes to evaluate the contribution of
321 demographic and clinical variables and common allele SNPs to MetS and LD
322 development. Again, none of the genetic polymorphisms were predictive to the
323 occurrence of this phenotypes. We observed that the higher age (years) was a risk
324 factor to MetS. Regarding LD and LA subtypes development, age (years), HAART
325 duration (months) and ethnic group (white individuals) were predictive to lipodystrophy
326 development. However, for LH subtype we found that HAART duration (months),
327 ethnic group (white individuals) and female gender were significantly associated with
328 this outcome.

329

330 It has already been established that sex and gender influence fat deposition
331 pattern as well as adipose tissue function (Palmer and Clegg, 2015) and endocrine
332 diseases (Lauretta *et al.*, 2018). Galli *et al.* (2003) reported that in HIV-infected
333 individuals, abdominal and breast fat accumulation rather than subcutaneous fat
334 wasting has been shown to be the dominant manifestation in women on HAART in
335 addition to hypertriglyceridemia. Regarding ethnicity, white individuals were more likely
336 to develop LD than non-whites. However, while in white individuals the lipohypertrophy
337 and mixed subtypes were more prevalent than in non-whites, the predominant pattern
338 in non-whites was lipoatrophy (Galli *et al.*, 2003). Andany *et al.* (2011), studying HIV-
339 infected subjects from Canada, verified that white individuals had a greater chance of
340 presenting body fat changes, especially central lipohypertrophy and peripheral
341 lipoatrophy in males but not females, when compared to their non-white counterparts
342 (Andany *et al.*, 2011). Although their population is hardly comparable to the studied
343 herein regarding ethnicity, their and our results reinforce the idea that lipoatrophy and

344 lipohypertrophy phenotypes are singular entities, with distinct multifactorial underlying
345 etiology.

346

347 The prevalence of LD and MetS in PLHIV is widely variable due to study design,
348 sample heterogeneity and criteria used to diagnosis (Loonam and Mullen, 2012; Alves,
349 2014). LD is a complex syndrome, which requires an accurate clinical view, patient
350 report and anthropometric evaluation, classifying it as an unique entity (Koethe, 2017).
351 Similarly, the pathophysiology of MetS in HIV-infected population may include the HIV
352 itself, ARVs drugs chronic use and persistent inflammation (Srinivasa and Grinspoon,
353 2014). In our research, we found a prevalence of 55.8% of LD and of 35.5% of MetS.
354 Although more than half of our sample had lipodystrophy, glycemic and lipid
355 disturbances did not always follow this phenotype. These findings are corroborated by
356 Sacilotto *et al.* (2017) that did not find statistical significant differences between
357 metabolic profile alterations among lipodystrophy subtypes (Sacilotto *et al.*, 2017).

358

359 In the present study, the genotypic frequencies of the SNPs rs2273773 T>C and
360 rs7895833 A>G in *SIRT1* gene were not according Hardy-Weinberg equilibrium. We
361 considered some possibilities: first, recruitment bias. However, the other two
362 polymorphisms (rs12049646 T>C and rs12413112 G>A) and several other SNPs
363 previously investigated by our group in this same sample are in compliance with Hardy-
364 Weinberg equilibrium. Second, error in genotyping assay by real time PCR.
365 Nonetheless, appropriate controls were used in each batch and the probes used
366 clearly were able to discriminate genotypes Third, the Hardy-Weinberg deviation
367 occurred by chance because the differences observed between expected and
368 observed were small.

369

370 It is known that HIV infection causes immune activation and persistent
371 inflammation condition via cytokine production of latently infected CD4+ T cells in
372 adipose tissue. The exacerbated local cytokines activate these resting cells and
373 promote viral shedding which, hence, increases proinflammatory mediators from
374 adipocytes thus releasing the viral protein R (Vpr) and Trans-activator of transcription
375 (Tat) HIV-proteins (Koethe, 2017). Tat is a crucial regulatory protein with a key role on
376 viral transcription and HIV pathogenesis (de Goede *et al.*, 2015). Experimental studies
377 showed that preadipocytes exposed to Tat protein do not achieve maturation due to
378 decreased mRNA of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor gamma
379 (PPAR γ) and glucose transporter type 4 (GLUT4), while increase proinflammatory
380 cytokine and reduce glucose uptake (Koethe, 2017). The relationship of *SIRT1* and
381 HIV-infection has already been described, once *SIRT1* is able to promote deacetylation
382 and acetylation cycles that regulated HIV transcription, acting as transcriptional
383 coactivator and inducing T-cells hyperactivation (Pagans *et al.*, 2005; Kwon *et al.*,
384 2009). Also, Tat is a substrate to SIRT1 enzymatic activity, through binding in the active
385 center of deacetylase domain, leading to inhibition of SIRT1 function (Zhang and Wu,
386 2009).

387

388 Once suppressed, SIRT1 induces the acetylation of p53 that can arrest cell
389 cycle in HIV infected cells and high expression of p21 and BAX (Thakur *et al.*, 2012).
390 This information could explain why we did not find any association between variants in
391 *SIRT1* with metabolic imbalance and anthropometric disturbances in our sample. Thus,
392 we suggest that HIV virus and infection itself should act in other ways in the *SIRT1*

393 activity besides its suppression by Tat-HIV protein. Also, the ARV drugs may impair
394 *SIRT1* expression and their target genes in a manner that has not been yet identified.

395

396 The present study has some limitations. First, this is a cross-sectional study. So,
397 it is only able to find associations and not causality. Second, treatment heterogeneity
398 in our sample. Each antiretroviral drug may act on a different molecular level in *SIRT1*
399 expression. We did not investigate this possibility. As far as we know, no study
400 analyzed this influence at the cellular level yet. Thirdly, the loss of association between
401 the SNPs investigated in this study and LD and MetS occurrence may be due to non-
402 genotyping of causative variant within *SIRT1* gene. Fourthly, the lipodystrophy
403 syndrome has heterogeneous character in addition to absence of a methodological
404 guideline for the diagnosis; thus, there is some subjectivity in classification.

405

406 In conclusion, our results show that the genetic variants rs12413112,
407 rs7895833, rs2273773 and rs12049646 in *SIRT1* gene are not predictive factors of
408 higher risk of LD and MetS among HIV-infected population on regular HAART. To our
409 knowledge, the present study is a pioneer investigation of this relationship in the
410 population infected by HIV. Further experimental research is required to elucidate the
411 gaps on the mechanism of action of HIV virus and ARV drugs in *SIRT1* activity as
412 deacetylase of genes involved in lipid metabolism and adipogenesis in PLHIV.

413

414

415

416

417

418 Acknowledgments

419 This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
420 Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio
421 Grande do Sul (FAPERGS, Brazil), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
422 de Nível Superior (CAPES, Brazil) and performed at the Molecular Biology laboratory
423 from Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA). No writing
424 assistance was utilized in the production of this manuscript.

425

426 Conflict of interest

427 The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as
428 prejudicial to the impartiality of the reported research.

429

430

431 Authors contributions

432 C. F. S. T. <recruited patients, genotyped the patients, performed the experiments and
433 wrote the manuscript >, C. N. O., G. M. V., P. B. S. <performed laboratory
434 experiments>, R. L. < assistance in conceiving and designing of the study>, R. K. L.,
435 R. K. N. <sample collection and nutritional evaluation>, E. S. <clinical assistance and
436 manuscript writing>, V. S. M. <conceived and designed the study>. All co-authors read
437 and approved the final version.

438

439

440

441

442

443

444

445 **References**

- 446 Alves MD, Brites C and Sprinz E (2014) HIV-associated lipodystrophy: A review from
447 a Brazilian perspective. *Ther Clin Risk Manag* 10:559–566.
- 448 Andany N, Raboud JM, Walmsley S, Diong C, Rourke SB, Rueda S, Rachlis A,
449 Wobeser W, MacArthur RD, Binder L *et al.* (2011) Ethnicity and Gender Differences in
450 Lipodystrophy of HIV-Positive Individuals Taking Antiretroviral Therapy in Ontario,
451 Canada. *HIV Clin Trials* 12:89–103.
- 452 Barros AJD and Hirakata VN (2003) Alternatives for logistic regression in cross-
453 sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the
454 prevalence ratio. *BMC Med Res Methodol* 3:1–13.
- 455 Calza L, Colangeli V, Magistrelli E, Rossi N, Del Turco R, Bussini L, Borderi M and
456 Viale P (2017) Prevalence of metabolic syndrome in HIV-infected patients naive to
457 antiretroviral therapy or receiving a first-line treatment. *HIV Clin Trials* 18:110–117.
- 458 Castilhos JK, Sprinz E, Lazzaretti RK, Kuhmmer R and Mattevi VS (2015)
459 Polymorphisms in adiponectin receptor genes are associated with lipodystrophy-
460 related phenotypes in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *HIV Med*
461 16:494–501.
- 462 Chen D and Guarente L (2007) SIR2: a potential target for calorie restriction mimetics.
463 *Trends Mol Med* 13:64–71.
- 464 Clark SJ, Falchi M, Olsson B, Jacobson P, Cauchi S, Balkau B, Marre M, Lantieri O,
465 Andersson JC, Jernas M *et al.* (2012) Association of sirtuin 1 (SIRT1) gene SNPs and
466 transcript expression levels with severe obesity. *Obesity* 20:178–185.
- 467 Cunha J, Maselli LMF, Stern ACB, Spada C and Bydlowski SP (2015) Impact of
468 antiretroviral therapy on lipid metabolism of human immunodeficiency virus-infected
469 patients: Old and new drugs. *World J Virol* 4:56–77.
- 470 Dali-Youcef N, Lagouge M, Froelich S, Koehl C, Schoonjans K and Auwerx J (2007)
471 Sirtuins: the “magnificent seven”, function, metabolism and longevity. *Ann Med*
472 39:335–345.
- 473 de Goede AL, Vulto AG, Osterhaus ADME and Gruters RA (2015) Understanding HIV
474 infection for the design of a therapeutic vaccine. Part I: Epidemiology and pathogenesis
475 of HIV infection. *Ann Pharm Fr* 73:87–99.
- 476 Florindo AA, Latorre MRDO, Santos ECM dos, Borelli A, Rocha MS and Segurado
477 AAC (2004) Validação de métodos de estimativa da gordura corporal em portadores
478 do HIV/Aids. *Rev Saude Publica* 38:643–649.
- 479 Galli M, Veglia F, Angarano G, Santambrogio S, Menehini E, Gritti F, Cargnel A,
480 Mazzotta F and Lazzarin A (2003) Gender Differences in Antiretroviral Drug-Related
481 Adipose Tissue Alterations. *J Acquir Immune Defic Syndr* 34:58–61.
- 482 Gasparotto AS, Sprinz E, Lazzaretti RK, Kuhmmer R, Silveira JM, Basso RP, Pinheiro
483 CAT, Silveira MF, Ribeiro JP and Mattevi VS (2012) Genetic polymorphisms in
484 estrogen receptors and sexual dimorphism in fat redistribution in HIV-infected patients
485 on HAART. *AIDS J* 26:19–26.
- 486 Guaraldi G, Stentarelli C, Zona S and Santoro A (2013) HIV-associated lipodystrophy:

- 487 Impact of antiretroviral therapy. *Drugs* 73:1431–1450.
- 488 Haigis MC and Sinclair DA (2010) Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease
489 Relevance. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 5:253–295.
- 490 International Diabetes Federation (IDF) (2006), The International Diabetes Consensus
491 worldwide definition of the Metabolic Syndrome, [https://www.idf.org/e-](https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definition-of-the-metabolic-syndrome)
492 [library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definition-of-the-metabolic-](https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definition-of-the-metabolic-syndrome)
493 [syndrome](https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definition-of-the-metabolic-syndrome) (March 5, 2019).
- 494 Kitada M, Kume S, Takeda-Watanabe A, Tsuda S, Kanasaki K and Koya D (2013)
495 Calorie restriction in overweight males ameliorates obesity-related metabolic
496 alterations and cellular adaptations through anti-aging effects, possibly including
497 AMPK and SIRT1 activation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1830:4820–4827.
- 498 Koethe JR (2017) Adipose tissue in HIV infection. *Compr Physiol* 7:1339–1357.
- 499 Kurylowicz A (2016) In search of new therapeutic targets in obesity treatment: Sirtuins.
500 *Int J Mol Med Sci* 17:1–26.
- 501 Kwon H-S, Brent MM, Getachew R, Jayakumar P, Chen L-F, Schnolzer M, McBurney
502 MW, Marmorstein R, Greene WC and Ott M (2009) Human Immunodeficiency Virus
503 Type 1 Tat Protein Inhibits the SIRT1 Deacetylase and Induces T-Cell Hyperactivation.
504 [Cell Host Microbe](https://doi.org/10.1007/s12250-009-9158-1) 3:158–167.
- 505 Laretta R, Sansone M, Sansona A, Romanelli F and Appetecchia M (2018) Gender
506 in Endocrine Diseases: Role of Sex Gonadal Hormones. *Int J Endocrinol* 1–11.
- 507 Lazzaretti RK, Gasparotto AS, Sassi MGM, Polanczyk CA, Kuhmmer R, Silveira JM,
508 Basso RP, Pinheiro CAT, Silveira MF, Sprinz E *et al.* (2013) Genetic markers
509 associated to dyslipidemia in HIV-infected individuals on HAART. *Sci World J* 26:1-10.
- 510 Lomb DJ, Laurent G and Haigis MC (2010) Sirtuins regulate key aspects of lipid
511 metabolism. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1804:1652–1657.
- 512 Loonam CR and Mullen A (2012) Nutrition and the HIV-Associated lipodystrophy
513 syndrome. *Nutr Res Rev* 2:267–287.
- 514 Meneguette MVO, Oliveira CA de, Lima MHM, Pina KN and Amaral MEC (2016)
515 Polymorphism in the SIRT1 gene and parameters of metabolic syndrome in a sample
516 of the adult Brazilian population. *Rev Nutr* 29:1–10.
- 517 Michan S and Sinclair D (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological
518 function. *Biochem J* 404:1-13.
- 519 Nijhawan A (2012) HIV Medications. *Hosp Med Clin* 1:e36–e49.
- 520 Pagans S, Pedal A, North BJ, Kaehlcke K, Marshall BL, Dorr A, Hetzer-Egger C,
521 Henklein P, Frye R, McBurney MW *et al.* (2005) SIRT1 regulates HIV transcription via
522 Tat deacetylation. *PLoS Biol* 3:0210–0220.
- 523 Palmer BF and Clegg DJ (2015) The sexual dimorphism of obesity. *Mol Cell Endocrinol*
524 402:113–119.
- 525 Pinzone MR, Cacopardo B, Condorelli F, Rosa MD and Nunnari G (2013) Sirtuin-1 and
526 HIV-1: An Overview. *Curr Drug Targets* 14:648–652.

- 527 Sacilotto LB, Pereira PCM, Manechini JPV and Papini SJ (2017) Body Composition
528 and Metabolic Syndrome Components on Lipodystrophy Different Subtypes
529 Associated with HIV. *J Clin Nutr Metab* 1:1-8.
- 530 Shimoyama Y, Suziki K, Hamajima N and Niwa T (2011) Sirtuin 1 gene polymorphisms
531 are associated with body fat and blood pressure in Japanese. *Transl Res* 157:339–
532 347.
- 533 Shirakawa K, Chavez L, Hakre, Calvanese V and Verdin E (2013) Reactivation of latent
534 HIV by histone deacetylase inhibitors. *Trends Microbiol* 21:277–285.
- 535 Srinivasa S and Grinspoon SK (2014) Metabolic and body composition effects of newer
536 antiretrovirals in HIV-infected patients. *Eur J Endocrinol* 170:R185–R202.
- 537 Swami A (2016) Metabolic Syndrome and HIV Infection. *J HIV Retro Virus* 2:1–5.
- 538 Thakur BK, Chandra A, Dittrich T, Welte K and Chandra P (2012) Inhibition of SIRT1
539 by HIV-1 viral protein Tat results in activation of p53 pathway. *Biochem Biophys Res*
540 *Commun* 424:245–250.
- 541 The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS), Global HIV & AIDS
542 statistics, <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet> (March 5, 2019).
- 543 van der Klaauw AA and Farooqi IS (2015) The hunger genes: Pathways to obesity.
544 *Cell* 161:119–132.
- 545 Zhang H-S and Wu MR (2009) SIRT1 regulates Tat-induced HIV-1 transactivation
546 through activating AMP-activated protein kinase. *Virus Res* 146:51–57.

Table 1 - Main demographic, clinical and anthropometric characteristics of 832 HIV-infected individuals on HAART.

Characteristics	HIV-infected patients (n = 832)	White individuals (n = 495)	Non-white individuals (n = 337)	<i>P</i> (White vs. Non-white individuals)
Demographic				
Age, years	43.3 ± 10.0	43.8 ± 10.2	42.6 ± 9.72	0.084 ^a
Male sex, % (n)	55.3 (460)	57.2 (263)	42.8 (197)	0.148 ^b
Clinical				
HAART duration (months), median [IQR]	66.0 [33.0 – 109.0]	69.0 [35.0 – 113.0]	60.0 [30.0 – 107.0]	0.024 ^c
PI users, % (n)	50.8 (423)	62.9 (266)	37.1 (157)	0.051 ^b
NNRTI users, % (n)	51.3 (427)	56.4 (241)	43.6 (186)	0.076 ^b
Diabetes mellitus, % (n)	7.6 (56) ¹	62.5 (35)	37.5 (21)	0.990 ^b
Metabolic syndrome, % (n)	35.3 (294)	63.3 (186)	36.7 (108)	0.118 ^b
Anthropometric				
BMI (kg/m ²)	25.2 ± 4.6 ³	25.6 ± 4.9	24.8 ± 4.2	0.025 ^a
Lipodystrophy, % (n)	55.8 (461) ²	63.2 (313)	43.9 (148)	<0.001 ^b
Lipoatrophy subtype, % (n)	38.0 (175) ²	33.2 (104)	47.9 (71)	0.002 ^d
Lipohypertrophy subtype, % (n)	25.6 (118) ²	28.1 (88)	20.3 (30)	0.072 ^d
Mixed subtype, % (n)	36.4 (168) ²	38.7 (121)	31.8 (47)	0.151 ^d

Data are mean ± SD or percentage; ^aIndependent samples *T*-test; ^bPearson chi-square with continuity correction; ^cMann-Whitney's U non-parametric test; ^d*P* from adjusted residuals from chi-square; ¹Data available for 733 individuals; ²Data available for 826 individuals; ³Data available for 716 individuals.

Table 2 - Genotype frequencies of *SIRT1* rs2273773, rs7895833, rs12049646, rs12413112 genetics variants according to ethnicity in HIV-infected individuals.

<i>SIRT1</i> SNPs	Genotype	Frequencies n (%)	Ethnicity		<i>P</i> value ¹
			White individuals n (%)	Non-white individuals n (%)	
rs2273773	TT	626 (80.1)	378 (81.6)	248 (77.7)	0.405
	TC	138 (17.6)	75 (16.2)	63 (19.7)	
	CC	18 (2.3)	10 (2.2)	8 (2.6)	
rs7895833	AA	459 (57.8)	272 (57.3)	187 (58.6)	0.606
	AG	277 (34.9)	171 (36.0)	106 (33.2)	
	GG	58 (7.3)	32 (6.7)	26 (8.2)	
rs12049646	TT	645 (83.8)	382 (84.0)	263 (83.5)	0.605
	TC	117 (15.2)	67 (14.7)	50 (15.9)	
	CC	8 (1.0)	6 (1.3)	2 (0.6)	
rs12413112	GG	662 (79.6)	385 (77.8)	277 (82.2)	0.121
	GA	162 (19.5)	103 (20.8)	59 (17.5)	
	AA	8 (1.0)	7 (1.4)	1 (0.3)	

¹Pearson χ^2 test; number of genotyped individuals: rs2273773 = 782; rs7895833 = 794, rs12049646 = 770; rs12413112 = 832.

Table 3 - Comparison of genotype frequencies of rs2273773, rs7895833, rs12049646, rs12413112 genetics variants in *SIRT1* among lipodystrophy subtypes.

<i>SIRT1</i> SNPs	Genotype	No LD % (n)	LA % (n)	LH % (n)	MIXED % (n)	<i>P</i>
rs2273773	TT	78.1 (268)	80.2 (130)	77.7 (87)	86.2 (137)	0.427 ²
	TC	19.5 (67)	17.9 (29)	18.8 (21)	12.6 (20)	
	CC	2.3 (8)	1.9 (3)	3.6 (4)	1.3 (2)	
rs7895833	AA	55.5 (192)	62.4 (103)	57.0 (65)	58.9 (96)	0.533 ¹
	AG	36.1 (125)	30.9 (51)	34.2 (39)	36.8 (60)	
	GG	8.4 (29)	6.7 (11)	8.8 (10)	4.3 (7)	
rs12049646	TT	82.2 (282)	85.7 (138)	81.1 (86)	87.7 (136)	0.570 ²
	TC	16.9 (58)	13.7 (22)	17.9 (19)	11.0 (17)	
	CC	0.9 (3)	0.6 (1)	0.9 (1)	1.3 (2)	
rs12413112	GG	80.8 (295)	80.6 (141)	79.7 (94)	75.6 (127)	0.197 ²
	GA	18.9 (69)	18.9 (33)	19.5 (23)	21.4 (36)	
	AA	0.3 (1)	0.6 (1)	0.8 (1)	3.0 (5)	

¹Pearson χ^2 test; ²Fisher's Exact Test; LD, lipodystrophy; LA, lipoatrophy; LH, lipohypertrophy.

Table 4 - Poisson regression model and predictive variables for metabolic syndrome (MetS) development in HIV-infected individuals on HAART.

Outcome	Variables	PR	95% CI	P value
Metabolic syndrome	Sex (female)	0.95	0.74 – 1.21	0.664
	Age (years)	1.03	1.01 – 1.04	<0.001
	HAART duration (months)	1.00	1.00 – 1.00	0.976
	Ethnic group (white individuals)	1.09	0.85 – 1.41	0.504
	rs2273773 (C - carriers)	1.01	0.65 – 1.59	0.954
	rs7895833 (G - carriers)	0.98	0.74 – 1.30	0.887
	rs12049646 (C - carriers)	1.11	0.71 – 1.74	0.643
	rs12413112 (A -carriers)	0.85	0.62 – 1.17	0.314
Complete model				<i>P</i> = 0.006

PR, prevalence ratio, 95% CI, 95% confidence interval;

Table 5 - Poisson regression model and predictive variables for lipodystrophy development and their subtypes in HIV-infected individuals on HAART.

Outcome	Variables	PR	95% CI	P value
Lipodystrophy	Sex (female)	0.89	0.73 – 1.09	0.259
	Age (years)	1.01	1.00 – 1.02	0.054
	HAART duration (months)	1.00	1.00 - 100	<0.001
	Ethnic group (white individuals)	1.36	1.10 – 1.68	0.004
	rs2273773 (C - carriers)	0.99	0.69 – 1.42	0.949
	rs7895833 (G - carriers)	0.97	0.77 – 1.22	0.797
	rs12049646 (C - carriers)	0.93	0.64 - 1.34	0.700
	rs12413112 (A -carriers)	0.98	0.77 – 1.24	0.841
Complete model				<i>P</i> < 0.001
Lipoatrophy	Sex (female)	1.00	0.80 – 1.26	0.982
	Age (years)	1.01	1.00 – 1.03	0.023
	HAART duration (months)	1.00	1.00 – 1.01	<0.001
	Ethnic group (white individuals)	1.35	1.06 – 1.71	0.016
	rs2273773 (C - carriers)	0.94	0.60 – 1.47	0.798
	rs7895833 (G - carriers)	0.97	0.75 – 1.26	0.812
	rs12049646 (C - carriers)	0.91	0.58 – 1.44	0.694
	rs12413112 (A -carriers)	0.97	0.74 – 1.28	0.842
Complete model				<i>P</i> < 0.001
Lipohypertrophy	Sex (female)	0.72	0.56 – 0.93	0.010
	Age (years)	1.01	1.00 – 1.02	0.173
	HAART duration (months)	1.00	1.00 – 1.01	<0.001
	Ethnic group (white individuals)	1.66	1.25 – 2.20	<0.001
	rs2273773 (C - carriers)	0.912	0.58 – 1.44	0.693
	rs7895833 (G - carriers)	1.04	0.79 – 1.39	0.765
	rs12049646 (C - carriers)	0.96	0.61 – 1.54	0.880
	rs12413112 (A -carriers)	1.01	0.74 – 1.36	0.968
Complete model				<i>P</i> < 0.001

PR, prevalence ratio; 95% CI, 95% confidence interval;

Artigo Original

**DBS sampling to clinical quantification of efavirenz and atazanavir
in HIV-infected Brazilians on HAART: why we gave up**

Em preparação para submissão ao periódico ***Memórias do Instituto
Oswaldo Cruz***

ISSN (print): 0074-0276 | ISSN (online): 1678-8060

Impact Factor: 2.833 (2017)

Qualis Ciências Biológicas 1: B2

DBS sampling to clinical quantification of efavirenz and atazanavir in HIV-infected Brazilians on HAART: why we gave up

Carmela Farias da Silva Tagliari¹; Érica Zeferino de Aguiar¹, Vivian Silveira Vasques¹, Alice Eloisa Szlachta¹, Cáren Nunes de Oliveira¹; Greice Meyer Vogel¹; Patrícia Baptista da Silva¹; Caroline de Araújo Barroco¹, Rafael Linden²; Marina Venzon Antunes², Natália Bordin Andriguetti², Rosmeri Kuhmmer Lazzaretti³; Regina Kuhmmer Notti³; Eduardo Sprinz³; Vanessa Suñé Mattevi¹

¹ Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, RS, Brazil

² Feevale University, Novo Hamburgo, RS, Brazil

³ Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence:

Prof. Vanessa Suñé Mattevi, PhD

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Rua Sarmiento Leite, 245, sala 309, prédio 1

CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil

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

E-mail: vmattevi@ufcspa.edu.br

ABSTRACT

BACKGROUND: therapeutic drug monitoring (TDM) is crucial to maintenance of antiretroviral plasma concentrations within the therapeutic window in people living with HIV (PLHIV).

OBJECTIVES: to evaluate the feasibility of quantifying atazanavir (ATV) and efavirenz (EFV) drugs in dried blood spot (DBS) collection in PLHIV of Southern Brazil.

METHODS: analysis of plasma EFV and ATV was performed according to previously developed and validated methods. For DBS samples, ATV and EFV were extracted from one disk (6mm punch diameter), followed by chromatographic separation in a Kinetex C18 (50×4.6 mm, 2.6 μm) column. Detection was performed in a 5500-QTRAP® mass spectrometer, with a run time of 2.3 min. The sample consisted in 128 individuals taking EFV or ATV for, at least, 1 year.

FINDINGS: DBS data had a strong positive correlation with validated plasma method (EFV $r_{\text{Spearman}} = 0.945$, $P < 0.001$ and ATV $r_{\text{Spearman}} = 0.946$, $P < 0.001$).

CONCLUSIONS: EFV and ATV concentration on DBS and plasma measurements have comparable results and can be an alternative tool to TDM in PLVHI. However, bureaucratic and logistic settings need to be overcome to DBS implementation in Brazil in the future.

KEYWORDS: HIV, HAART, therapeutic drug monitoring, DBS.

1 INTRODUCTION

In 2017, there were 36.9 million people living with human immunodeficiency virus (PLHIV) worldwide and 1.8 million people were newly infected (UNAIDS, 2016). Of these, 21.7 million are on antiretroviral therapy (ART). Of the global statistics, about 1.8 million are in Latin America (Joint United Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) 2017a). In Brazil, there are more than 860.000 PLHIV and 40.000 new cases every year (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2018). It is estimated that more than 60% of Brazilian PLHIV were accessing ART (Joint United Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) 2017b).

Since the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART), the scenario about HIV/AIDS has changed from a deadly to a chronic disease, since this therapy reduces the occurrence of opportunistic infections while prevents the transmission of virus and restores the immune system (Deeks et al. 2015). The treatment consists in a combination of, at least, three drugs, classified according to their mechanism of action on viral replication: nucleoside transcriptase inhibitors (NRTIs), non-NRTIs (NNRTIs) and protease inhibitors (PIs). More recently, entry inhibitors and integrase strand transfer inhibitors (INSTIs) were included (Nováková et al. 2018). The most widely prescribed HIV treatment regimen in developing countries are: two NRTIs and one NNRTI or PI, specially efavirenz (EFV, NNRTI) and atazanavir (ATV, PI) (Boyd e Cooper, 2007; Mbuagbaw *et al.*, 2010).

Despite the efficacy of new antiretroviral (ARV) drugs and lower toxic potential, some patients do not achieve viral suppression. Thus, the maintenance of ARVs plasma concentrations within the therapeutic window is highly important, in order to prevent viral resistance and ensure viral suppression, safeguarding therapeutic success, avoiding virological failure and development of adverse effects (Punyawudho et al. 2016).

Commonly, evaluations of therapeutic drug monitoring (TDM) are performed in plasma matrix. Obtaining this sample is done by venipuncture and

requires trained personnel, infrastructure besides cold storage transport to the laboratory. This logistics for TDM is costly and scarce in resource-limited settings. As an alternative, dried blood spot (DBS) assay, generally obtained by fingerprick and collection of blood on filter card, is cheaper and easier than venous blood collection. The advantages include small sample volume, self-sampling by patients at through level, store in room temperature after dry, convenient transport via normal post from distant areas to reference laboratory, biosafety and stability of some analytes. These characteristics are beneficial to special individuals as children, pregnant women, elderly and patients that need routinely information about drug concentrations (Edelbroek, Heijden e Stolk, 2009; Enderle, Foerster e Burhenne, 2016; Wilhelm, Burger, den e Swart, 2014).

Usually, to measure the circulating ARVs levels, the trough concentration parameter (C_{trough}) is the most used. This index represents the minimum level of the drug during the interval between two doses (Liu et al. 2010). To limit pharmacokinetic variations, it is important that blood collection (venipuncture or DBS) occurs, preferably, around the time of the next dose of the drug (AIDSinfo 2018).

Before application in clinical practice for TDM, it is necessary to validate DBS drug measurement assays, in order to translate DBS concentration to plasma levels, because the capillary blood obtained from digital puncture may show different drug concentrations from those obtained by phlebotomy. This is because capillary blood is a mixture of venous blood and interstitial plus intracellular fluid, that could explain different values between the two matrices (Antunes et al. 2016). Additionally, two important facts need to be considered to convert the information obtained by DBS to plasma level. First, the hematocrit (Hct): range of Hct values affect the spread of blood across spot in different forms such as viscosity, homogeneity, drying time and recovery of analyte (Edelbroek, Heijden e Stolk, 2009; Enderle, Foerster e Burhenne, 2016; Velghe, Troyer e Stove, 2018; Wilhelm, Burger, den e Swart, 2014). And second, is the fraction of analyte bound to plasma proteins (fbpp), which is variable within the same Hct and influences DBS concentration (Li & Tse 2010, Kromdijk et al. 2012).

Brazil is internationally recognized for its policies of access to the diagnosis of HIV infection and free access to HAART. Monitoring of circulating drug levels is essential to ensure patient adherence and decrease the impact on quality of life (Hawkins 2010). Pharmacological studies using DBS to assess ARVs in Brazilian HIV-infected individuals are scarce. Hoagland et al. (2017) evaluated the concentration of emtricitabine/tenofovir among men who have sex with men (MSM) and transgender women (TGW) to evaluate the feasibility of pre-exposure prophylaxis (PrEP) (Hoagland et al. 2017).

Therefore, the aim of this work was to quantify atazanavir (ATV) and efavirenz (EFV) in DBS sample and to compare with reference plasma concentrations using previously validated methods (Koal et al. 2005, ter Heine et al. 2008, Van Schooneveld et al. 2010, Antunes et al. 2011, Kromdijk et al. 2012, Amara et al. 2015) in order to establish the feasibility of monitoring antiretroviral treatment using DBS collection in Southern Brazil.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1. Standards, solvents and materials

EFZ, ATZ sulfate and Saquinavir (SAQ) were kindly donated by the National Institute of Health (NIH), AIDS Research and Reference Reagent Program (Germantown, USA). Acetonitrile and methanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), formic acid, tris buffer and methyl tert-butyl ether (MTBE) were acquired from Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). Whatman 903[®] paper was obtained from GE Healthcare (Westborough, USA). Ultra-pure deionized water was supplied by a Milli-Q RG unit from Millipore (Billerica, MA, USA).

2.2. Solutions

Stock ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$), and working (0.50, 1.00, 10.00, 50.00, $100.00 \mu\text{g mL}^{-1}$) solutions of EFZ+ATZ were prepared by dissolution in methanol. SAQ, the internal standard (IS) working solution, at $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, was prepared by dilution of stock solution ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) of SAQ with methanol. Working solutions of EFZ+ATZ were prepared at concentrations 20 times higher than calibration and control levels by dilution with methanol. DBS extraction solution was a mixture of methanol and acetonitrile (3:1, v/v), containing SAQ at $0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$. The IS solution for plasma analysis was SAQ at $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, also in methanol and acetonitrile (3:1, v/v).

2.3. Chromatographic and mass spectrometric conditions

The analysis of plasma EFV and ATV was performed according previously developed and validated by ter HEINE R et al. 2007 and ANTUNES MV et al. 2011. For DBS we followed the reported procedures by ter HEINE R et al. 2008. Briefly, DBS and plasma samples were analyzed using a TSQ Quantum Access triplequadrupole mass spectrometer with an electrospray source, coupled to an Ultimate 3000 XRS UHPLC system, controlled by the Xcalibur software, all from Thermo Scientific (San Jose, USA). The chromatographic separation was performed with a Kinetex C18 ($50 \times 4.6 \text{ mm}$, $2.6 \mu\text{m}$) column, from Phenomenex (Torrance, CA, USA), maintained at $30 \text{ }^\circ\text{C}$. The mobile phase consisted of ultra-pure water (A) and methanol (B), both containing 0.1 % formic acid, eluted with the following gradient: 60% A up to 10 min; 10% 10-12 min; 60% by 15 min. The mobile phase flow rate was 0.5 mL min^{-1} . The MS conditions were: ionization in positive mode for atazanavir and negative mode for efavirenz, sheath gas nitrogen at a flow rate of 50 arb; auxiliary gas nitrogen at flow rate of 20 arb; collision gas argon; vaporizer temperature of 383°C ; capillary temperature of $259 \text{ }^\circ\text{C}$. MRM monitored transitions of EFZ and ATZ were: EFZ m/z 317 \rightarrow 232 (quantitation); m/z 317 \rightarrow 167 and 317 \rightarrow 224 (qualification) and ATZ m/z 706 \rightarrow 168 (quantitation); m/z 706 \rightarrow 335 and 706 \rightarrow 535 (qualification). Collision energies were 14, 41 and 25 for EFZ and 41, 29 and 27 for ATZ. Monitored

transitions for SAQ were m/z 672 \rightarrow 224 (quantification); m/z 672 \rightarrow 416 and 672 \rightarrow 571 (qualification). The therapeutic range of efavirenz is 1.0 – 4.0 $\mu\text{g/mL}$, where subtherapeutic levels are less than 1 mg/L and toxic levels higher than 4.0 mg/L (VROUENRAETS SME ET AL 2007). For atazanavir, desirable plasma concentration is 150-800 ng/mL (GERVASONI et al. 2015).

2.4. DBS sample preparation

One DBS disk (fixed punch diameter of 6 mm) was cut in 2 pieces and transferred to a 2 mL polypropylene micro tube, followed by addition of 500 μL of the extraction solution (mixture of methanol and acetonitrile (3:1, v/v) containing internal standard (IS) at the concentration of 0.02 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The tube was agitated at 500 RPM for 60 min in a ThermoMixer® (Eppendorf, Hamburg, Germany), at 30°C. An aliquot of 450 μL from the supernatant was evaporated in a vacuum centrifuge at 45 °C and recovered with 150 μL of mobile phase, followed by 10 min of centrifugation at 15.000g. An aliquot of 10 μL of the resulting supernatant was injected into the liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) system.

2.5. Linearity, precision and accuracy

Calibration samples had concentrations of 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 and 5 ng mL^{-1} , processed in quintuplicate. Calibration curves were obtained relating the area ratios from EFZ and ATZ to SAQ peaks. QC samples were prepared at the concentration levels of 0.025 (quality control at low concentration, QCL), 0.4 (quality control at medium concentration, QCM) and 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (quality control at high concentration, QCH). QC samples were processed and analyzed in triplicate, in each of 3 days. Within-assay precision and between-day precision were calculated by one-way analysis of variance and expressed as CV%. Accuracy was evaluated as the percentage of the nominal concentration represented by the concentration estimated with the calibration curve. The acceptance criteria for accuracy were mean values within $\pm 15\%$ of the theoretical

value, and for precision, a maximum CV of 15% was accepted (FDA - Guidance for Industry: Bioanalytical method validation 2001).

2.6. Determination of EFZ and ATZ in plasma

Plasma samples were prepared using liquid-liquid extraction. Briefly, 200 μL plasma samples were transferred to polypropylene tubes and added with 50 μL of IS solution (SAQ, $2 \mu\text{g mL}^{-1}$), 100 μL tris buffer pH 10 and 1000 μL of the MTBE. After 1 minute of homogenization in vortex, followed by 10 min centrifugation at 12000 rpm, an aliquot of 900 μL supernatant was evaporated at 60°C in a vacuum centrifuge. The resulting dried extract was recovered with 500 μL of initial mobile phase, and 10 μL was injected into the LC-MS/MS system. Calibration ranges, as well as chromatographic and mass spectrometric conditions, were the same as applied to DBS samples.

2.7. Comparison between concentrations measured in DBS and plasma samples

Estimated plasma concentrations (EPC) were calculated by using the equation:

$$\text{EPC} = (\text{DBS}/[1-(\text{Hct}/100)]) \times f_p$$

where DBSconc is the concentration measured in DBS, Hct is the individual hematocrit of patient and f_p is the fraction of the drug in plasma, according to (Antunes et al. 2015a). The f_p value was adjusted to obtain a mean ratio between the measured EFV and ATV plasma concentrations and EPC of 1, using the above equation.

EPC was also calculated using a correction factor based on the mean ratio of EFV and ATV plasma to DBS concentrations, without considering the individual Hct nor f_p (EPC_{correction factor}) (Antunes et al. 2015b).

2.8. Patients and data collection

We conducted a cross-sectional study from October 2016 to November 2017 in which HIV-infected patients taking efavirenz (600 mg once-daily) and/or atazanavir (400 mg once-daily or 300 mg boosted with ritonavir) for at least 12 months, were consecutively recruited during routine visits to the HIV/AIDS Ambulatory Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (southern Brazil), national reference center for HIV care. All subjects were more than 18 years old, had undetectable viral load (<50 copies/mL) in two samplings with interval of 6 months between each one, CD4 T cell count >200 cells/mm³. Pregnant women and patients with neurological disease were excluded from the study. An interview was performed and a questionnaire was used to obtain demographic and lifestyle information. Details of HIV infection (time from diagnosis as well as current and prior antiretroviral medicines) and laboratorial exams were obtained from medical records. The patient's ethnicity was phenotypically defined by the interviewer as white and non-white individuals, as discussed in previous works by our group (Castilhos et al. 2015). The protocol was approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre and Universidade Feevale Ethics Committees. Informed consent was obtained from all study participants.

2.9. Samples

The individuals eligible for the study provided two blood samples: 1) blood collected by venipuncture into tube containing EDTA as anticoagulant and 2) DBS samples, which were obtained quickly after phlebotomy by trained professionals. Plasma and DBS samples were taken at varied and random times after last dose reported by patients. Plasma samples were obtained after centrifugation and stored at -20°C until analysis.

The selected and recruited patients who accepted to participate in the study allowed the collection of blood droplets by perforation fingertip using a disposable and automatic Haemolance plus® lancets (Medlance Plus® yellow

0.8 mm of blade and 2.0 mm of perforation; Haemedic, Munka Ljungby, Sweden) after local asepsis. The first drop of blood formed was scorned. The following fourth were dripped by their own weight into the area marked on Whatman 309® filter card (Whatman Nederland B.V., Den Bosch, The Netherlands) and kept at room temperature for two hours. Additionally, for comparison with DBS, a 5 mL whole blood (phlebotomy) sample in anticoagulant tube (EDTA) was obtained by a nurse using all personal protective equipment. DBS cards and EDTA tubes were rightly identified with a code for each patient, date and time of collection and drug in use (EFV or ATV). We developed a support to hold the card with the samples horizontally until the sample is completely dry. The cards were stored in plastic bags with desiccant on refrigerator at the Molecular Biology Laboratory of UFCSPA. In the same laboratory, the EDTA tubes were centrifuged to obtain plasma aliquots that were stored in microcentrifuge tubes and frozen until both materials were transported to the Toxicology Laboratory of FEEVALE University for drug measurements.

2.10. Statistical analyses

Agreement between methods was evaluated using Passing-Bablok regression and Bland-Altman plots with Medcalc version 12.3 (Ostend, Belgium) in addition to the criteria based on the guideline on Bioanalytical Method Validation of the European Medicine Agency (EMA), in which the difference in concentrations should be within $\pm 20\%$ of their mean for at least 67% of the samples (EMA, 2012).

3 RESULTS

One hundred and thirty-three HIV-infected individuals using EFV and/or ATV were enrolled in this study. Mean age was 46.0 and median time on therapy was 86.0 months. Men represented 53.1% of the sample. Mean of Hct% was 40.3 (range 29.4 to 50.0). Of the total, five patients taking ATV had levels below the

detection limit and were excluded of analyses. Thus, the sample consisted in 128 individuals (63 taking EFV and 65 taking ATV or ATV/r).

Sample collection was not performed at Ctrough conditions for patients in order to obtain a large range of variation in concentrations. EFV and ATV concentrations in capillary DBS sample from fingerpricks showed high correlations with plasma obtained from venous blood by phlebotomy ($r_{\text{Spearman}} = 0.945$, $P < 0.001$ and $r_{\text{Spearman}} = 0.946$, $P < 0.001$, respectively).

The predicted EFV and ATV plasma concentration obtained from DBS were compared using two different approaches: EPC using individual Hct and EPC using the correction factor. Both had similar accuracy.

Bland-Altman plot was used to evaluate the agreement between plasma and DBS measurement of EFV (Figure 1) and ATV (Figure 2). The mean difference of the EFV concentration in plasma and DBS was 594.3 ng ml^{-1} , with two values outside the $\pm 1.96 \text{ SD}$ range. The mean difference of the EFV concentration in plasma and estimated in DBS using individual Hct was -3.7 ng ml^{-1} , with three values were outside the $\pm 1.96 \text{ SD}$ range. When we used correction factor approach, the average difference was $0.0005 \text{ ng ml}^{-1}$ (three values were outside the $\pm 1.96 \text{ SD}$ range).

When analyzing ATV concentrations, the mean difference was 297.1 ng ml^{-1} . When ATV concentrations were estimated with individual Hct concentrations, the average difference was 23.6 ng ml^{-1} , with five values outside the $\pm 1.96 \text{ SD}$ range. When we used correction factor approach, the average difference was $-0.00062 \text{ ng ml}^{-1}$ (two values outside the $\pm 1.96 \text{ SD}$ range).

Through the Passing-Bablok regressions, we observed no significant deviation from linearity between EFV DBS-predicted and plasma values ($P = 0.24$, intercept A (y) = 158.315 98% CI 95.4056 to 249.9418, slope (x) = 0.366, 95% CI 0.3054 to 0.4742, n = 63); EFV using individual Hct ($P = 0.39$, intercept A (y) = 258.000, 95% CI 88.9673 to 398.2271, slope (x) = 0.729, 95% CI 0.6009 to 1.0075, n = 63) and using correction factor ($P = 0.39$, intercept A (y) = 254.435,

95% CI 140.0599 to 405.2732, slope (x) = 0.735, 95% CI 0.5987 to 0.9939, n = 63) (Figure 3) There was no significant deviation from linearity between ATV DBS-predicted and plasma values ($P = 0.81$, intercept A (y) = -15.131, 95% CI -65.2921 to 23.5788, slope (x) = 0.837, 95% CI 0.7451 to 0.9082, n = 65); ATV using individual Hct ($P = 0.81$, intercept A (y) = -14.777, 95% CI -99.0162 to 24.9879, slope (x) = 1.048, 95% CI 0.9481 to 1.1512, n = 65) and using correction factor ($P = 0.61$, intercept A (y) = -26.990, 95% CI -92.1134 to 30.0621, slope (x) = 1.081, 95% CI 0.9610 to 1.1691, n = 65) (Figure 4).

4 DISCUSSION

Our data are in agreement with other researches showing a high correlation between EFV and ATV antiretroviral drugs measurements in plasma and DBS ($r_{\text{Spearman}} = 0.945$ and $r_{\text{Spearman}} = 0.946$, respectively). Thus, DBS technique using LC-MS/MS can be a useful tool to monitor EFV and ATV levels and optimize HIV treatment in PLHIV, since showed comparable results to those obtained in blood plasma. The easiness of collection allows patients to collect blood samples at their home without the need to move to laboratory, at appropriated time to obtain trough samples, stored at room temperature and shipped by conventional mail.

Plasma levels of drugs of the NNRTI and PI classes have been related with virological response and therapeutic success (Bazzoli et al. 2010, Zehnacker et al. 2014). Several studies have already validated the ARVs TDM in DBS, particularly EFV and ATV (Koal et al. 2005, Ter Heine 2007, ter Heine et al. 2008, D'Avolio et al. 2010, Hoffman & Rossi 2013, Watanabe et al. 2014, Amara et al. 2015). Others compared ARVs concentration between DBS and plasma sampling using previously validated methods for those matrices (Van Schooneveld et al. 2010, ter Heine et al. 2011, Kromdijk et al. 2012, Calcagno et al. 2015, Amara et al. 2017).

Unfortunately, TDM is not a clinical routine and are unavailable in many countries, like in Brazil, due to expenditure and logistic difficulties (Calcagno et al. 2015) that include, specially, measurements of C_{trough} levels in HIV-infected

individuals under dosing regimens taken twice daily (Kromdijk et al. 2012). Thus, the use of simpler and lower cost techniques as DBS, are a necessity in order to facilitate the monitoring of ARVs plasma levels with the goal to ensure that they remain within the therapeutic range (Kang & Lee 2009), to ensure viral suppression, immune reconstitution (Kredo et al. 2009) (Kredo T et al., 2009) and limit toxicity (Punyawudho et al. 2016).

In addition, TDM facilitates the early identification of patients infected with resistant strains treated with default antiretroviral regimens without taking this information into account (Liu et al. 2010, Walker & Gibb 2011). Nevertheless, the monitoring of plasma levels of ARV drugs is of particular importance for special groups such as children, pregnant women and the elderly (Rhee & Greenblatt 2008, Roustit et al. 2008, Klotz 2009, Lu & Rosenbaum 2014, AIDSinfo 2018).

In the view of the advantages of dry blood spot on filter paper, the recommendation of therapeutic regimens similar to all individuals diagnosed with HIV and the chronic use of ARVs drugs without considering the level of exposure to these drugs, we attempted to implement the use of DBS methodology in PLHIV in southern Brazil.

We proposed a two-step design: the first, a pilot phase, consisted of the determination of circulating levels of EFV and ATV drugs through the DBS technique associated with UHPLC-MS/MS compared to traditional venipuncture methodology. To do so, it was necessary at least 50 individuals on HAART at least one year, using EFV or ATV (selection criteria are described in the Methodology section). Before starting the project, the researchers were properly trained to perform digital puncture and blood drop collection. The research was carried out in the Infectious Disease Service of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre, a national reference in the care of PLHIV.

During stage 1, we faced some obstacles until the sample size was reached. First, it was difficult to find for suppliers of the appropriate automatic lancets, and thus they lack of prevision of the importation of these products. We tried to use other brands and types, but it directly impacted the formation of the

blood drop and prevented the correct collection. In this way, the project delayed starting and we had to borrow some units of lancet with a researcher until we could import them. Second, the Infectious Disease Service ambulatory was far from the collection local of biological samples (the hospital Research Unit). For that, it was necessary to move from one point to the other, in many cases facing inclement weather. Hence, we had several negative responses to the invitation to participate in the research. Third, the divergence in the time of medical care of the patients with that of the local of collection the samples prevented that we had able time between the selection of the patient, locomotion with them to the place of collection and the collection itself.

Once the results of the high correlation between the dosage of the EFV and ATV drugs between the DBS and the plasma were obtained, step 1 was concluded and the second phase of the project was started, with the goal of performing the collection of the DBS samples by the patient himself in the C_{trough} period (about 30 minutes before the next dose of the drug. Before starting the new selection and recruitment of patients, the team of researchers developed a folder (Figure 5 and 6) with instructions for DBS collection and a kit containing a plastic bag, desiccant, two automatic lancets, a 70% isopropyl alcohol wiper, one curative sticker for small injuries, a DBS card and sealed and addressed envelope for sending of the samples to the laboratory.

The researchers went back to the Infectious Disease Service of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre to perform a new selection and recruitment of the patients (criteria described in the Methodology section). This new stage was explained to each of the individuals and, when accepting to participate of this research, a demonstration of procedures for DBS collection was performed: hand hygiene, asepsis, lancet opening, fingerprick, collection of blood drops, curative, drying and storage. It was emphasized the importance of performing the collection 30 minutes before taking the next dose of the drug. Together with the home collection kit, we deliver the folder with the same explanation spoken personally to each patient and an envelope sealed by mail. The DBS card was identified with the patient's name in the selection appointment. The date and time of the collection was prompted to write to the DBS card. With the consent of the

patient, we combine to send a message on the cell phone reminding him to perform the collection.

Initially, what seemed simple became complex. Initially, we needed to sign an agreement as a legal entity with a post office unit so that we could receive the DBS cards from the patients in the envelope previously delivered to them. In the first contact with a post office to explain the research, they were not unaware of transport of dry blood specimens collected and applied in absorbent material were free of biological risk and, therefore, the envelope did not require label with symbol of biological risk can be transported by the conventional mail. It was necessary to send the RDC 20/2014 and the Manual de vigilância sanitária sobre o transporte de material biológico humano para fins de diagnóstico clínico, both from Anvisa. Having overcome this situation, a long period of bureaucratic process was inevitable until contractual formalization, that took about 3 months.

The acceptance to participate in the survey was higher than expected, however, we did not receive the return of the envelopes by mail in the same proportion as the acceptance. Only nine cards DBS were recovered in during 5 months. We proposed to send a text message to the patient's cell phone as a reminder to performed DBS collection, but most of the patients refused this contact, because his family did not know about HIV infection. In view of all these setbacks and the expenditure of financial resources, we stopped the research.

In the pilot phase we detect five patients with sub therapeutic drug concentrations. the ways to measure HAART compliance are variable and subjective, often based on pill counts and patient reports, representing a challenge in the care of patients with HIV. This represents a higher risk to resistant strains selection. Thus, monitoring antiretroviral therapy is a direct and objective measure of adherence whose aim is to evaluated the real adherence to the pharmacological regimen and early detection of virological failure, which is relevant in order to avoid opportunistic diseases and Aids establishment.

Even with all the aforementioned inconvenience, we are optimistic on transformation of this context in Brazil in the near future. We believe that the DBS technique opens new strategic possibilities for care and attention to HIV patients similar what occurs in developed countries. Advances in the area of diagnosis and treatment for HIV infection have evolved remarkably in recent years. However, it is still a serious global health problem, with alarming mortality rates worldwide. Although HAART plays a key role in controlling transmission, prolongation and quality of life in PLHIV, the pharmacokinetics of ARVs drugs are individually variable and can, therefore, act significantly in therapeutic success.

Acknowledgment

The tireless effort of all the researchers was fundamental for the results presentation obtained until now. In addition, the collaboration of Dr. Eduardo Sprinz, chief of the Infectious Diseases Department of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre, together with medical residents, was indispensable during the development of the project. In addition, the active participation of PLHIV in this research, conscious and engaged to the scientific and medical development of the country, was the most relevant outcome of this work. We are very grateful to them all.

Author's contribution:

C. F. S. T. <recruited patients, genotyped the patients, performed the experiments and wrote the manuscript >, E. Z. A., V. S. V., A. E. S., C. N. O., G. M. V., P. B. S., C. A. B. <performed laboratory experiments>, R. L., M. V. A., N. B. A. <assistance of analytical experiments>, R. K. L., R. K. N. <sample collection and nutritional evaluation>, E. S. <clinical assistance and manuscript writing>, V. S. M. <conceived and designed the study>. All co-authors read and approved the final version.

REFERENCES

- AIDSinfo 2018. Adults and Adolescents Living with HIV Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents Living with HIV Developed by the DHHS Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults. *Dep. Heal. Hum. Serv.:* 298.
- Amara AB, Else LJ, Carey D, Khoo S, Back DJ, Amin J, Emery S, Puls RL 2017. A comparison of dried blood spots versus conventional plasma collection for the characterisation of efavirenz pharmacokinetics in a large-scale global clinical trial - The ENCORE1 study. *Ther. Drug Monit.:* 1.
- Amara AB, Else LJ, Tjia J, Olagunju A, Puls RL, Khoo S, Back DJ 2015. A validated method for quantification of efavirenz in dried blood spots using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 37: 1.
- Andriguetti NB, Hahn RZ, Lizot LF, Raymundo S, Costa JL, Cunha KF da, Vilela RMM, Kluck HM, Schwartzmann G, Antunes M V., Linden R 2018. Analytical and clinical validation of a dried blood spot assay for the determination of paclitaxel using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 54: 123–130.
- Antunes MV, Charão MF, Linden R 2016. Dried blood spots analysis with mass spectrometry: Potentials and pitfalls in therapeutic drug monitoring. *Clin. Biochem.*
- Antunes MV, Raymundo S, Oliveira V De, Staudt DE, Gössling G, Peteffi GP, Biazús JV, Cavalheiro JA, Tre-Hardy M, Capron A, Haufroid V, Wallemacq P, Schwartzmann G, Linden R 2015a. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the determination of tamoxifen, N-desmethyltamoxifen, 4-hydroxytamoxifen and endoxifen in dried blood spots - Development, validation and clinical application during breast . *Talanta* 132: 775–784.
- Antunes MV, Raymundo S, Sandrine, Wagner C, Mattevi VS, Vieira N, Leite R, Reginato F, Capra MZ, Fogliatto L, Linden R 2015b. DBS sampling in imatinib therapeutic drug monitoring : from method development to clinical application. 7: 2105–2117.
- Antunes M V, Ribeiro JP, Sprinz E, Linden R 2011. Ultra-Performance Liquid

- Chromatographic Method for Simultaneous Quantification of HIV Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors and Protease Inhibitors in Human Plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22: 134–141.
- Bazzoli C, Jullien V, Tiec C Le, Rey E, Taburet A 2010. Intracellular Pharmacokinetics of Antiretroviral Drugs in HIV-Infected Patients, and their Correlation with Drug Action. *Clin. Pharmacokinet.* 49: 17–45.
- Boyd MA, Cooper DA 2007. Second-line combination antiretroviral therapy in resource-limited settings: Facing the challenges through clinical research. *Aids* 21: 55–63.
- Calcagno A, Motta I, Milia MG, Rostagno R, Simiele M, Libanore V, Fontana S, D'Avolio A, Ghisetti V, Perri G Di, Bonora S 2015. Dried plasma/blood spots for monitoring antiretroviral treatment efficacy and pharmacokinetics: A cross-sectional study in rural Burundi. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 79: 801–808.
- Castilhos JK, Sprinz E, Lazzaretti RK, Kuhmmer R, Mattevi VS 2015. Polymorphisms in adiponectin receptor genes are associated with lipodystrophy-related phenotypes in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *HIV Med.* 16: 494–501.
- D'Avolio A, Simiele M, Siccardi M, Baietto L, Sciandra M, Bonora S, Perri G Di 2010. HPLC-MS method for the quantification of nine anti-HIV drugs from dry plasma spot on glass filter and their long term stability in different conditions. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52: 774–780.
- Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S 2015. HIV infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 1: 1–22.
- Edelbroek PM, Heijden J Van Der, Stolk LML 2009. Dried Blood Spot Methods in Therapeutic Drug Monitoring : Methods , Assays , and Pitfalls. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31: 327–336.
- Enderle Y, Foerster K, Burhenne J 2016. Clinical feasibility of dried blood spots: Analytics, validation, and applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 130: 231–243.
- Hawkins T 2010. Understanding and managing the adverse effects of antiretroviral therapy. *Antiviral Res.* 85: 201–209.
- Heine R et al. Ter 2007. Fast and simultaneous determination of darunavir and eleven other antiretroviral drugs for therapeutic drug monitoring: method

- development and validation for the determination of all currently approved HIV protease inhibitors and non-nucleoside reverse tr. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22: 2161–2175.
- Heine R ter, Mulder JW, Gorp EC van, Wagenaar JF, Beijnen JH, Huitema AD 2011. Clinical evaluation of the determination of plasma concentrations of darunavir, etravirine, raltegravir and ritonavir in dried blood spot samples. *Bioanalysis* 3: 1093–1097.
- Heine R ter, Rosing H, Gorp ECM van, Mulder JW, Steeg W a. van der, Beijnen JH, Huitema a. DR 2008. Quantification of protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in dried blood spots by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 867: 205–212.
- Hoagland B, Moreira RI, Boni RB De, Kallas EG, Madruga JV, Vasconcelos R, Goulart S, Torres TS, Marins LMS, Anderson PL, Luz PM, Costa Leite I Da, Liu AY, Veloso VG, Grinsztejn B 2017. High pre-exposure prophylaxis uptake and early adherence among men who have sex with men and transgender women at risk for HIV Infection: The PrEP Brasil demonstration project. *J. Int. AIDS Soc.* 20: 1–14.
- Hoffman J, Rossi S 2013. Determination of Efavirenz in Human Dried Blood Spots by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography with UV Detection. *Ther. drug ...* 35: 1–13.
- Joint United Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) 2017a. Region - Latin America and the Caribbean.
- Joint United Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) 2017b. Country factsheets Brazil.
- Kang J-S, Lee M-H 2009. Overview of Therapeutic Drug Monitoring. *Korean J. Intern. Med.* 24: 1.
- Klotz U 2009. Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly. *Drug Metab. Rev.* 41: 67–76.
- Koal T, Burhenne H, Römling R, Svoboda M, Resch K, Kaefer V 2005. Quantification of antiretroviral drugs in dried blood spot samples by means of liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19: 2995–3001.
- Kredo T, Walt J-S Van der, Siegfried N, Cohen K 2009. Therapeutic drug

- monitoring of antiretrovirals for people with HIV. *Cochrane Database Syst. Rev.*
- Kromdijk W, Mulder JW, Rosing H, Smit PM, Beijnen JH, Huitema ADR 2012. Use of dried blood spots for the determination of plasma concentrations of nevirapine and efavirenz. *J. Antimicrob. Chemother.* 67: 1211–1216.
- Li W, Tse FLS 2010. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomed. Chromatogr.* 24: 49–65.
- Liu X, Ma Q, Zhang F 2010. Therapeutic drug monitoring in highly active antiretroviral therapy. *Expert Opin. Drug Saf.* 9: 743–758.
- Lu H, Rosenbaum S 2014. Developmental pharmacokinetics in pediatric populations. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* 19: 262–276.
- Mbuagbaw LC, Irlam JH, Spaulding A, Rutherford GW, Siegfried N 2010. Efavirenz or nevirapine in three-drug combination therapy with two nucleoside-reverse transcriptase inhibitors for initial treatment of HIV infection in antiretroviral-naïve individuals. *Cochrane Database Syst. Rev.*
- Nováková L, Pavlík J, Chrenková L, Martinec O, Červený L 2018. Current antiviral drugs and their analysis in biological materials – Part II: Antivirals against hepatitis and HIV viruses. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147: 378–399.
- Pham MD, Romero L, Parnell B, Anderson DA, Crowe SM, Luchters S, Punyawudho B, Singkham N, Thammajaruk N, Dalodom T, Kerr SJ, Burger DM, Ruxrungtham K 2017. Feasibility of antiretroviral treatment monitoring in the era of decentralized HIV care: A systematic review. *AIDS Res. Ther.* 14: 1583–1595.
- Punyawudho B, Singkham N, Thammajaruk N, Dalodom T, Kerr SJ, Burger DM, Ruxrungtham K 2016. Therapeutic drug monitoring of antiretroviral drugs in HIV-infected patients. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 9: 1583–1595.
- Rhee MS, Greenblatt DJ 2008. Therapeutic review: Pharmacologic consideration for the use of antiretroviral agents in the elderly. *J. Clin. Pharmacol.* 48: 1212–1225.
- Roustit M, Jlaïel M, Leclercq P, Stanke-Labesque F 2008. Pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of antiretrovirals in pregnant women. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 66.
- Schooneveld T Van, Swindells S, Nelson SR, Robbins BL, Moore R, Fletcher C

- V 2010. Clinical evaluation of a dried blood spot assay for atazanavir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 4124–4128.
- SECRETARIA VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE 2018. Boletim Epidemiológico HIV AIDS Brasil.
- Tozzi V 2010. Pharmacogenetics of antiretrovirals. *Antiviral Res.* 85: 190–200.
- Velghe S, Troyer R De, Stove C 2018. Dried blood spots in therapeutic drug monitoring and toxicology Dried blood spots in therapeutic drug monitoring and toxicology. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 14: 1–3.
- Walker AS, Gibb DM 2011. Monitoring of highly active antiretroviral therapy in HIV infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24: 27–33.
- Watanabe K, Varesio E, Hopfgartner G 2014. Parallel ultra high pressure liquid chromatography-mass spectrometry for the quantification of HIV protease inhibitors using dried spot sample collection format. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 965: 244–253.
- Wilhelm AJ, Burger JCG den, Swart EL 2014. Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot: Progress to Date and Future Directions. *Clin. Pharmacokinet.* 53: 961–973.
- Zehnacker L, Abe E, Mathez D, Alvarez J-C, Leibowitch J, Azoulay S 2014. Plasma and Intracellular Antiretroviral Concentrations in HIV-Infected Patients under Short Cycles of Antiretroviral Therapy. *AIDS Res. Treat.*: 1–4.

Figure 1. Bland-Altman plot comparing EFV concentration in DBS with paired plasma, EFV DBS considering individual Hct and EFV DBS using correction factor.

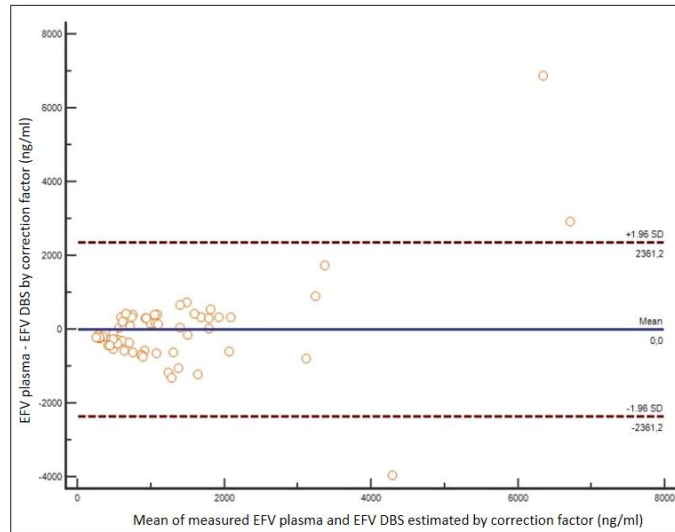
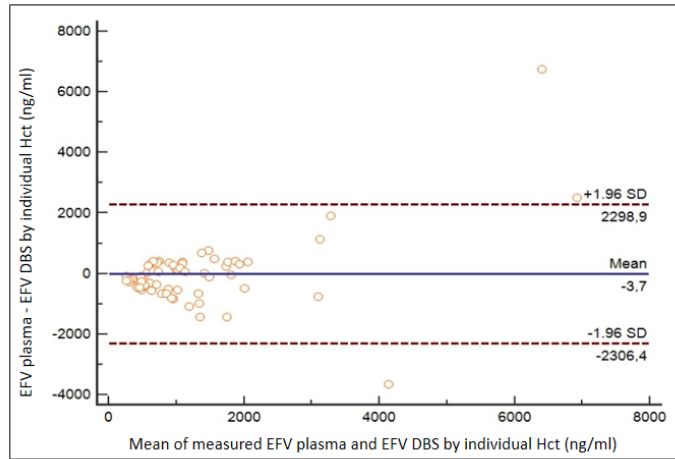
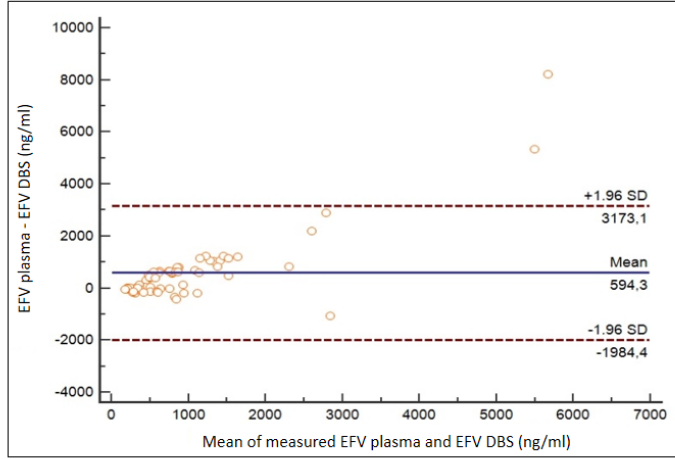


Figure 2. Bland-Altman plot comparing ATV concentration in DBS with paired plasma, ATV DBS considering individual Hct and ATV DBS using correction factor.

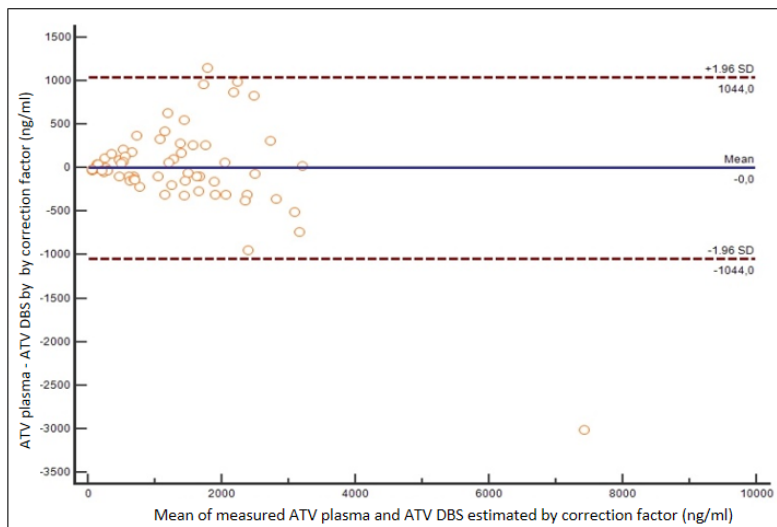
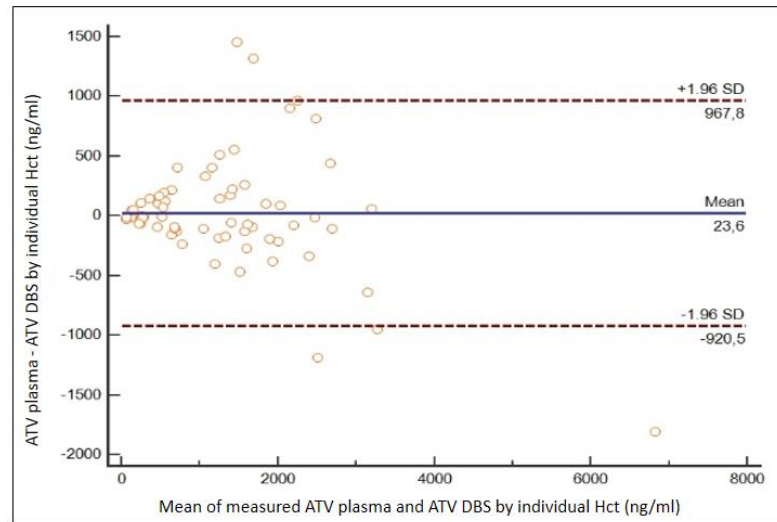
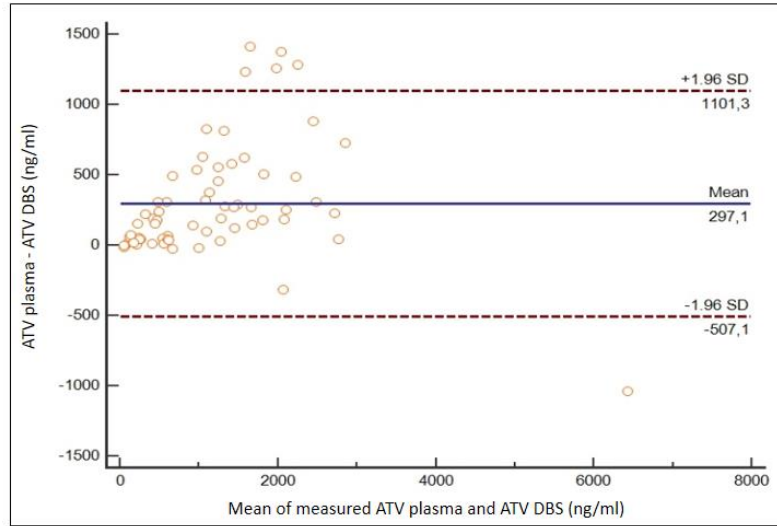


Figure 3. Passing-Bablok regression comparison of DBS measurement for EFV and plasma values, EFV DBS considering individual Hct and EFV DBS using correction factor.

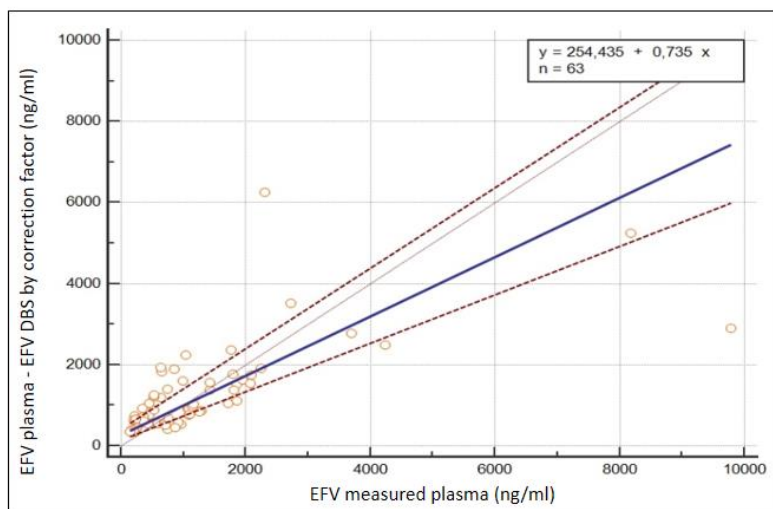
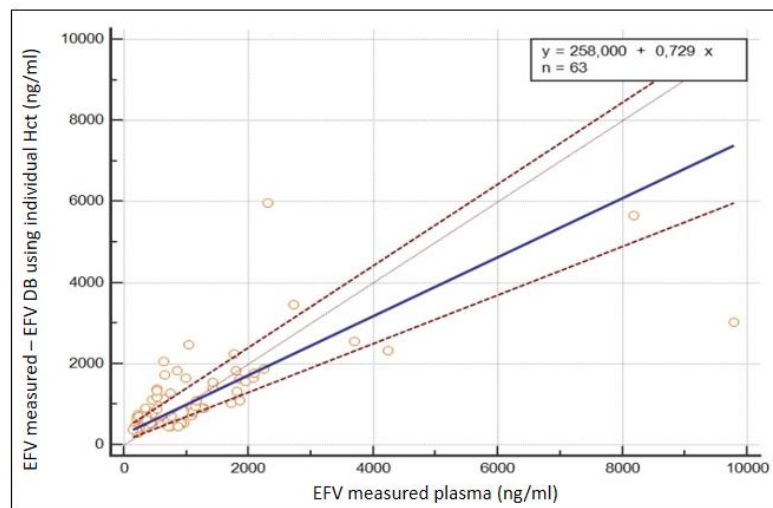
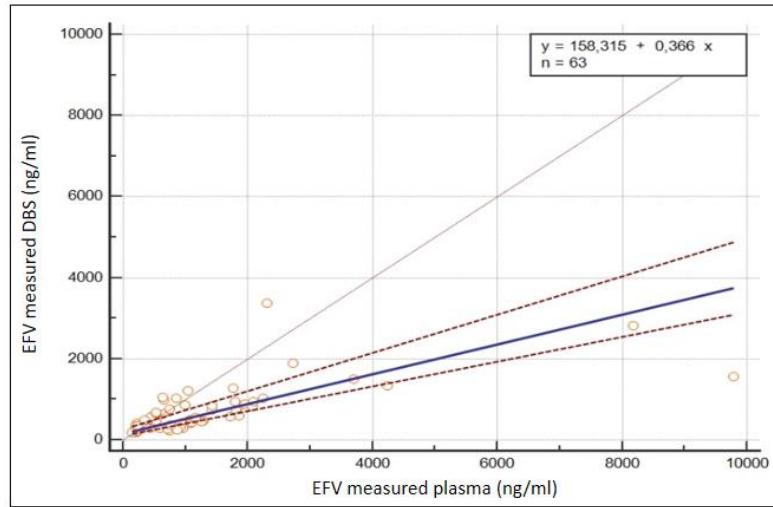


Figure 4. Passing-Bablok regression comparison of DBS measurement for ATV and plasma values, ATV DBS considering individual Hct and ATV DBS using correction factor.

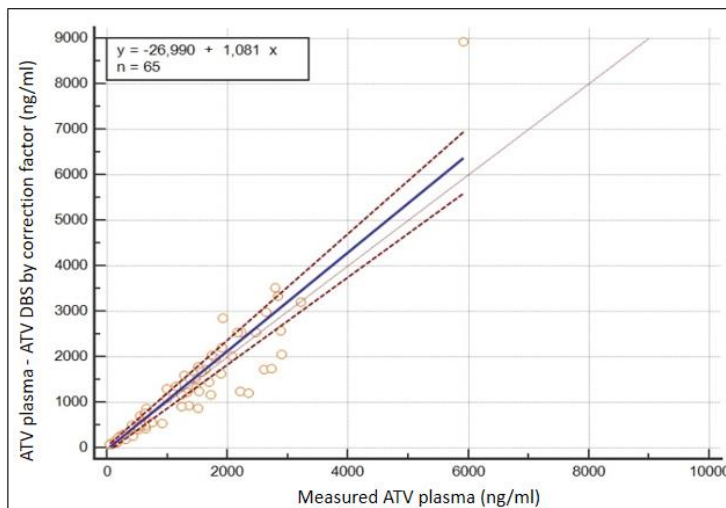
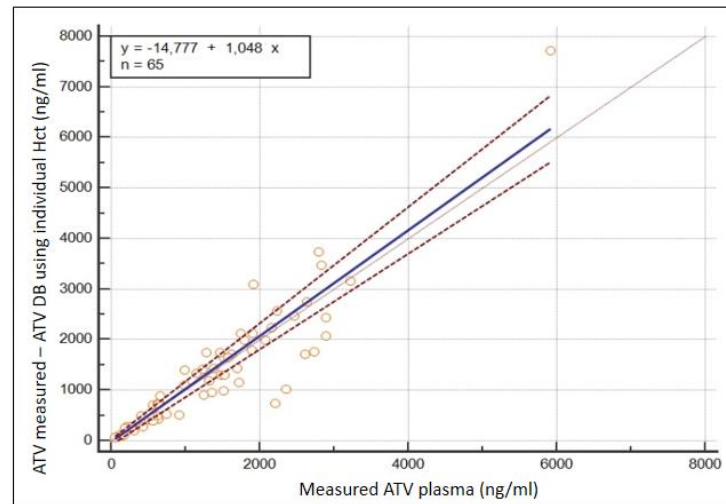
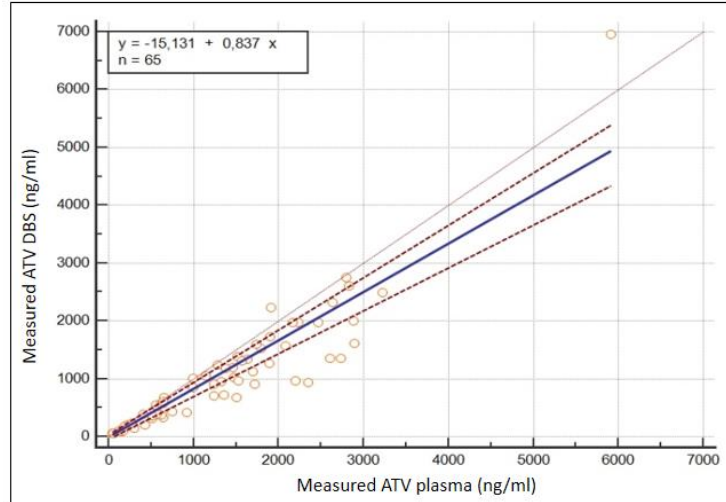


Figure 5. Folder with DBS home collection instructions.

Orientações gerais

Prezado paciente, obrigada por participar desta pesquisa! Você recebeu este conjunto de materiais para coletar em casa uma gota de sangue da ponta do seu dedo. Neste conjunto você encontrará os seguintes materiais:



- 1- Duas lancetas amarelas;
- 2- Um cartão DBS;
- 3- Um lenço de álcool;
- 4- Dois sachês antimifo;
- 5- Um curativo;
- 6- Um saco plástico.

Cuidado ao manusear o cartão DBS!

Na **Figura A** está mostrada a maneira correta de segurar o cartão DBS.
Na **Figura B** está mostrada a maneira que você não deve segurar o cartão DBS.



Figura A



Figura B

Preencha a parte da frente do cartão DBS com a data e hora da coleta.



Essas informações são muito importantes para a pesquisa! Por isso, pedimos, por favor, que você anote a data e hora antes de começar dos demais procedimentos.

Material elaborado pelo grupo de pesquisa em farmacogenômica de antirretrovirais do Laboratório de Biologia Molecular, na UFCSPA.

A comercialização e divulgação sem os devidos créditos deste material é vetada.



INSTRUÇÕES PARA COLETA DBS


Junto com o conjunto de materiais para a coleta da gota de sangue, você recebeu um envelope branco com selo dos correios e com o endereço do laboratório onde serão feitas as análises da gota de sangue que você coletar. Você precisa apenas realizar a coleta da gota de sangue conforme as instruções, esperar secar em temperatura ambiente por 2 horas, colocar dentro do envelope e enviar pelo correio mais próximo da sua casa.

Obrigada pela sua participação!


Figure 6. Folder with DBS home collection instructions (cont.).

Procedimentos

1 *Higienização das mãos.*




2 *Abertura da lanceta.*




Basta girar a haste mais fina para soltar da haste mais grossa.

3 *Limpeza do dedo*



Limpe o dedo médio com o álcool em gel.


4 *Movimento de sangue para ponta do dedo*



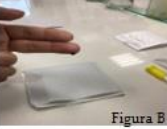
- 1- Esfregar a palma das mãos em ritmo acelerado até que estejam quentes.
- 2- Pressionar a ponta do dedo médio até que esteja avermelhado.

5


Perfurar o dedo



Furar a ponta do dedo com a lanceta conforme Figura A.




A primeira gota de sangue que se formar (Figura B), deve ser descartada num papel limpo (guardanapo) (Figura C).



6

Coleta das gotas de sangue




Aguarde que a segunda gota de sangue seja formada. Quando esta gota de sangue estiver grande, ela deve ser pingada no círculo indicado no cartão DBS.

Importante! Você não deve encostar o dedo no cartão DBS. A gota de sangue deve cair sozinha e preencher todo o círculo indicado.

7


Curativo



Limpe o dedo num papel limpo (guardanapo) e coloque o curativo sobre o lugar onde o dedo foi furado.


Informações importantes

1 *Tempo que as gotas de sangue estejam secas: 2 horas*



Você deve manter o cartão DBS com as gotas de sangue em local seco e arejado por 2 horas, para que as gotas de sangue fiquem completamente secas. Importante que o cartão DBS com as gotas de sangue não seja tocado durante este tempo.


2 *Erros que devem ser evitados:*



Durante a coleta, evitar :

- 1- Pingar uma gota de sangue muito pequena;
- 2- Pingar uma gota de sangue sobre outra já coletada;
- 3- Pingar gotas de sangue fora do círculo indicado (em outras partes do cartão);
- 4- Encostar o dedo no cartão;

3 *Armazenamento e envio*



Depois de esperar por 2 horas para que as gotas de sangue fiquem secas, você deve fechar o cartão DBS, verificar se escreveu a data e a hora que coletou as gotas de sangue e colocar dentro do saco plástico com os 2 sachês antimofa. Feito isso, você deve colocar o saco plástico dentro do envelope branco, fechar o envelope e levar até o correio mais próximo da sua casa.

13 CONCLUSÃO

As toxicidades metabólicas decorrentes da TARV diminuíram com o desenvolvimento e disponibilidade de fármacos com mínimos efeitos deletérios na homeostase da glicose, adipogênese e lipogênese. No entanto, o HIV por si só e o uso crônico dos medicamentos para o tratamento da infecção pelo HIV produzem efeitos inexoráveis no risco para LD, dislipidemia e DM2, fatores que, associados, aumentam as chances de SM e DCV.

Visto que, geralmente, mais da metade das PVHIV em TARV desenvolvem alterações na distribuição da gordura corporal e distúrbios nos parâmetros lipídicos, este trabalho investigou a participação de SNPs em genes da adipogênese na ocorrência de lipodistrofia e síndrome metabólica. Nossos resultados mostraram que o polimorfismo rs9939609 (T>A) no gene *FTO* e a variante rs2297508 (C>G) no gene *SREBF1* foram preditivos para a ocorrência de LD, mas não de SM. Os portadores do alelo de A para a variante rs9939609 apresentaram maior prevalência de LA e LH; enquanto que os portadores de G para o polimorfismo rs2297508 foram mais prevalentes para LH.

Os SNPs nos genes *TNF*, *PPARG* e *SIRT1* não foram significativamente associados com o desenvolvimento de LD e seus subtipos ou com SM em PVHIV. Como previamente explanado, a LD e SM são patologias de etiologia complexa e multifatorial. A prevalência altamente variável entre diferentes populações se deve ao delineamento do estudo, critério de diagnóstico, sexo, etnia, diferentes padrões de desequilíbrio de ligação entre as variantes genéticas investigadas, tempo de infecção pelo HIV, uso crônico de determinados ARVs e inflamação persistente. Por isso, a generalização dos dados deve ser cautelosa.

A técnica DBS é uma excelente estratégia para o MTF. Contudo, a implementação na rotina de atendimento e cuidado as PVHIV na região Sul do Brasil precisam superar inúmeros empecilhos burocráticas.

14 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ujvari SC. A história da humanidade contada pelos vírus. 2nd ed. São Paulo: Contexto; 2015. 202 p.
2. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. 2015;
3. Centers for Disease Control (CDC). Pneumocystis pneumonia-Los Angeles. MMWR - Morb Mortal Wkly Rep. 1981;30:50–2.
4. Centers for Disease Control (CDC). Unexplained immunodeficiency and opportunistic infections in infants--New York, New Jersey, California. MMWR - Morb Mortal Wkly Rep [Internet]. 1982;31(49):665–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6819445>
5. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Rev Investig Clin. 1983;56(2):126–9.
6. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J PM. Isolation of Human T-Cell Leukemia Virus in Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). Science (80-). 1983;20(220):865–7.
7. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J SB. Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS. Science (80-). 1984;224(38):500–3.
8. Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, et al. What to call the AIDS virus? Nature. 1986;321(6065):10.
9. Levy JA, Castelli JC. HIV (Human Immunodeficiency Virus). In: Encyclopedia of Cancer (Third edition) [Internet]. 3rd ed. Elsevier Inc.; 2019. p. 218–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11085-2>
10. Gurtler L, Aepfelbacher M, Blümel J, Burger R, Gärtner B, Gröner A, et al. Human immunodeficiency virus (HIV). Transfus Med Hemotherapy. 2016;43:203–22.
11. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. Trends Mol Med. 2012;18(3):182–92.
12. Peeters M, Jung M, Ayoub A. The origin and molecular epidemiology of HIV. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013;11(9):885–96.
13. Plantier J-C, Marie Leoz, Jonathan E Dickerson, Fabienne De Oliveira, François Cordonnier, Véronique Lemée, Florence Damond, David L Robertson FS. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. Nat Med. 2009;15(8):871–2.
14. Vallari A, Vera Holzmayer, Barbara Harris, Julie Yamaguchi, Charlotte Ngansop, Florence Makamche, Dora Mbanya, Lazare Kaptué, Nicaise Ndembi, Lutz Gutler, Sushil Devare CAB. Confirmation of Putative HIV-1 Group P in Cameroon. J Virol. 2010;85(3):1403–7.
15. Li G, Piampongsant S, Faria RN, Voet A, Pineda-Peña AC, Khouri R, et al. An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective. Retrovirology. 2015;12(1):12-18.
16. Joris Hemelaar, Ramyadarsini Elangovan, Jason Yun, Leslie Dickson-Tetteh, Isabella Fleminger, Shona Kirtley, Brian Williams, Eleanor Gouws-Williams PDG. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. Lancet Infect Dis. 2018;19(2):143–55.
17. Bello G, Guimarães ML, Morgado MG. Evolutionary history of HIV-1 subtype B and F infections in Brazil. Aids. 2006;20(5):763–8.

18. Bello G, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Guimarães ML, Chequer-Fernandez SL, Teixeira SLM, et al. Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil. *Infect Genet Evol.* 2007;7(2):263–70.
19. Gräf T, Pinto AR. The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent. *Virology.* 2013;435:170–8.
20. Bello G, de Zanotto PMA, Iamarino A, Gräf T, Pinto AR, Couto-Fernandez JC, et al. Phylogeographic analysis of HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *PLoS One.* 2012;7(4):1–7.
21. Gräf T, Machado Fritsch H, Pinto AR, Esteves de Matos Almeida S, de Medeiros RM, Maletich Junqueira D. Comprehensive Characterization of HIV-1 Molecular Epidemiology and Demographic History in the Brazilian Region Most Heavily Affected by AIDS. *J Virol.* 2016;90(18):8160–8.
22. Fritsch HM, Almeida SEM, Pinto AR, Gräf T. Spatiotemporal and demographic history of the HIV-1 circulating recombinant form CRF31_BC in Brazil. *Infect Genet Evol* 2018;61:113–8.
23. Passaes CPB, Lorete RS, Junqueira DM, Matos Almeida SE, Bello G, Veloso VG, et al. Genetic characterization of HIV-1 BC recombinants and evolutionary history of the CRF31_BC in Southern Brazil. *Infect Genet Evol.* 2009;9(4):474–82.
24. Silveira J, Santos AF, Martínez AMB, Góes LR, Mendoza-Sassi R, Muniz CP, et al. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in southern Brazil. *J Clin Virol [Internet].* 2012;54(1):36–41.
25. Joint United Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Ending the AIDS epidemic by 2030. 2018. Available from: <https://www.unaids.org/en>
26. World Health Organization (WHO). Guidelines and policy briefs on HIV. 2018. Available from: <https://www.who.int/hiv/pub/guidelines/en/>
27. Joint United Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Region - Latin America and the Caribbean. 2017. Available from: <https://www.unaids.org/en/regionscountries/latinamerica>
28. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico HIV-Aids Brasil. 2018.
29. Joint United Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Country factsheets Brazil. 2017. Available from: <https://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/brazil>
30. MINISTERIO DA SAUDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. 2013.
31. SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE DO RIO GRANDE DO SUL. Boletim Epidemiológico HIV-Aids Rio Grande do Sul. 2018.
32. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em adultos. 2018.
33. Wing EJ. HIV and aging. *Int J Infect Dis.* 2016;53:61–8.
34. Lewthwaite P, Wilkins E. Natural history of HIV/AIDS. *Medicine (Baltimore).* 2009;37(7):333–7.
35. Librelotto CS, Graf T, Simon D, de Almeida SEM, Lunge VR. HIV-1 epidemiology and circulating subtypes in the countryside of South Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(3):249–57.
36. Shaw GM, Hunter E. HIV transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(11):1–23.
37. Galetto R, Negroni M. Mechanistic Features of Recombination in HIV. *AIDS Rev.* 2005;7:92–102.
38. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol.* 2005;34(4):233–44.

39. de Goede AL, Vulto AG, Osterhaus ADME, Gruters RA. Understanding HIV infection for the design of a therapeutic vaccine. Part I: Epidemiology and pathogenesis of HIV infection. *Ann Pharm Fr [Internet]*. 2015;73(2):87–99.
40. Harris RS, Dudley JP. APOBECs and virus restriction. *Virology*. 2015;479–480:131–45.
41. Seissler T, Marquet R, Paillart JC. Hijacking of the ubiquitin/proteasome pathway by the hiv auxiliary proteins. *Viruses*. 2017;9(11):1–21.
42. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;1(1):1–22.
43. Kirchhoff F. HIV Life Cycle: Overview. *Encycl AIDS*. 2013;1–9.
44. Vanessa S Mattevi, Carmela FS Tagliari. Pharmacogenetic considerations in the treatment of HIV. *Pharmacogenomics*. 2017;85–98.
45. Gorry PR, Ancuta P. Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2011;8(1):45–53.
46. Henn A, Fleteau C, Gallien S. Primary HIV Infection: Clinical Presentation, Testing, and Treatment. *Curr Infect Dis Rep*. 2017;19(10):37.
47. Sabin CA, Lundgren JD. The natural history of HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*. 2013;8(4):311–7.
48. MacNeal RJ, Dinulos JGH. Acute Retroviral Syndrome. *Dermatol Clin*. 2006;24(4):431–8.
49. Crowell TA, Colby DJ, Pinyakorn S, Fletcher JLK, Kroon E, Schuetz A, et al. Acute Retroviral Syndrome Is Associated With High Viral Burden, CD4 Depletion, and Immune Activation in Systemic and Tissue Compartments. *Clin Infect Dis*. 2017;66(10):1540–9.
50. Rodriguez C V., Horberg MA. HIV testing, staging, and evaluation. *Infect Dis Clin North Am*. 2014;28(3):339–53.
51. Parekh BS, Ou C, Fonjungo PN, Kalou MB, Rottinghaus E, Puren A, et al. Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(1):1–55.
52. World Health Organization (WHO). HIV Testing Services: Consolidated Guidelines on HIV testing services. 5Cs: consent, confidentiality, counselling, correct results and connection. 2015. p. 188.
53. MINISTÉRIO DA SAUDE. Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças. 2018;
54. MINISTERIO DA SAUDE. Portaria 29/2013 Aprova o Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV em Adultos e Crianças. 2013.
55. MINISTÉRIO DA SAUDE. Portaria 158/2016 Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. 2016.
56. Clercq E de, E. DC. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(3):695–747.
57. Saag MS, Benson CA, Gandhi RT, Hoy JF, Landovitz RJ, Mugavero MJ, et al. Antiretroviral drugs for treatment and prevention of HIV infection in adults: 2018 recommendations of the international antiviral society-USA panel. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2018;320(4):379–96.
58. Susan J. Little, Sarah Holte, Jean-Pierre Routy, Eric S. Daar, Marty Markowitz et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med*. 2002;347(6):385–94.
59. MINISTÉRIO DA SAUDE. Lei 9.313/1996 - Distribuição gratuita de medicamentos aos portadores do HIV e doentes de Aids. 1996.

60. SAÚDE SDVE. Portaria 151/2009 - Etapas sequenciais e fluxograma para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV. 2015.
61. MINISTERIO DA SAUDE. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para profilaxia pré-exposição (PrEP) de risco à infecção pelo HIV [Internet]. 2017. Available from: <http://www.aids.gov.br/publicacao/2017/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-profilaxia-pre-exposicao-prep-de-ri>
62. MINISTERIO DA SAUDE. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para profilaxia pós-exposição (PEP) de risco à infecção pelo HIV, IST e Hepatites Virais. 2017.
63. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection [Internet]. 2018. Available from: <https://www.fda.gov/patients/hiv-treatment/antiretroviral-drugs-used-treatment-hiv-infection>
64. Nováková L, Pavlík J, Chrenková L, Martinec O, Červený L. Current antiviral drugs and their analysis in biological materials – Part II: Antivirals against hepatitis and HIV viruses. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;147:378–99.
65. MINISTERIO DA SAUDE. Nota Informativa no 096/2016 - Atualização dos esquemas antirretrovirais para pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) e indicações de uso ampliado de dolutegravir (DTG) e darunavir (DRV) para composição de esquemas. 2016.
66. MINISTERIO DA SAUDE. Nota informativa no 059/2017 - Substituição Kaletra. 2017.
67. Ruelas DS, Greene WC. An integrated overview of HIV-1 latency. *Cell.* 2013;155(3):519–29.
68. Deeks SG. Shock and kill. *Nature.* 2012;487:439–40.
69. Kim Y, Anderson JL, Lewin SR. Getting the “Kill” into “Shock and Kill”: Strategies to Eliminate Latent HIV. *Cell Host Microbe.* 2018;23(1):14–26.
70. de Goede AL, Vulto AG, Osterhaus ADME, Gruters RA. Understanding HIV infection for the design of a therapeutic vaccine: Part II: Vaccination strategies for HIV. *Ann Pharm Fr.* 2015;73(3):169–79.
71. Hawkins T. Understanding and managing the adverse effects of antiretroviral therapy. *Antiviral Res.* 2010;85(1):201–9.
72. Margolis AM, Heverling H, Pham PA, Stolbach A. A Review of the Toxicity of HIV Medications. *J Med Toxicol.* 2014;10(1):26–39.
73. Hemkens LG, Bucher HC. HIV infection and cardiovascular disease. *European Heart Journal.* 2014.
74. Koethe JR. Adipose tissue in HIV infection. *Compr Physiol.* 2017;7(4):1339–57.
75. Carr A, Samaras K, Burton S, Law M, Freund J, Chisholm DJ, et al. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *Aids.* 1998;12(7):51–8.
76. Guaraldi G, Stentarelli C, Zona S, Santoro A. HIV-associated lipodystrophy: Impact of antiretroviral therapy. *Drugs.* 2013;73(13):1431–50.
77. Baril JG, Junod P, LeBlanc R, Dion H, Therrien R, Laplante F, et al. HIV-associated lipodystrophy syndrome: A review of clinical aspects. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2005;16(4):233–43.
78. Alves MD, Brites C, Sprinz E. HIV -associated lipodystrophy: A review from a Brazilian perspective. *Ther Clin Risk Manag.* 2014;10(1):559–66.
79. Brown TT, Glesby MJ. Management of the metabolic effects of HIV and HIV drugs. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(1):11–21.

80. Mohr R, Boesecke C, Dold L, Schierwagen R, Schwarze-Zander C, Wasmuth JC, et al. Return-to-health effect of modern combined antiretroviral therapy potentially predisposes HIV patients to hepatic steatosis. *Med (United States)*. 2018;97(17).
81. Kotler D, Singhanian R. Lipodystrophy in HIV patients: its challenges and management approaches. *HIV/AIDS - Res Palliat Care*. 2011;135.
82. Tien PC, Benson C, Zolopa AR, Sidney S, Osmond D, Grunfeld C. The Study of Fat Redistribution and Metabolic Change in HIV Infection (FRAM): Methods, design, and sample characteristics. *Am J Epidemiol*. 2006;163(9):860–9.
83. Worm SW, Lundgren JD. The metabolic syndrome in HIV. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25(3):479–86.
84. Fiorenza CG, Chou SH, Mantzoros CS. Lipodystrophy: Pathophysiology and advances in treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(3):137–50.
85. Carr A. Lipodystrophy Associated with an HIV-Protease Inhibitor. 1998;2118.
86. Carr A, Samaras K, Chisholm DJ, Cooper DA. Pathogenesis of HIV-1-protease inhibitor-associated peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia, and insulin resistance. *Lancet*. 1998;351(9119):1881–3.
87. Cunha J da., Maselli LMF, Stern ACB, Spada C, Bydlowski SP. Impact of antiretroviral therapy on lipid metabolism of human immunodeficiency virus-infected patients: Old and new drugs. *World J Virol*. 2015;4(2):56–77.
88. Non LR, Escota G V., Powderly WG. HIV and its relationship to insulin resistance and lipid abnormalities. *Transl Res*. 2017;183:41–56.
89. Quercia R, Roberts J, Martin-Carpenter L, Zala C. Comparative Changes of Lipid Levels in Treatment-Naive, HIV-1-Infected Adults Treated with Dolutegravir vs. Efavirenz, Raltegravir, and Ritonavir-Boosted Darunavir-Based Regimens Over 48 Weeks. *Clin Drug Investig*. 2015;35(3):211–9.
90. Jamison Norwood, Megan Turner, Carmen Bofill, Peter Rebeiro, Bryan Shepherd, Sally Bebawy, Todd Hulgán, Stephen Raffanti, David W. Haas, Timothy R. Sterling and JRK. Weight Gain in Persons with HIV Switched from Efavirenz-based to Integrase Strand Transfer Inhibitor-based Regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2017;76(5):527–31.
91. Taramasso L, Ricci E, Menzaghi B, Orofino G, Passerini S, Madeddu G, et al. Weight gain: A possible side effect of all antiretrovirals. *Open Forum Infect Dis*. 2017;4(4):1–3.
92. Hill A, Waters L, Pozniak A. Are new antiretroviral treatments increasing the risks of clinical obesity? *J virus Erad*. 2019;5(1):41–3.
93. Lennox JL, Dejesus E, Berger DS, Lazzarin A, Pollard RB et al. Raltegravir versus efavirenz regimens in treatment-naive HIV-1-infected patients: 96-week efficacy, durability, subgroup, safety, and metabolic analyses. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;55(1):39–48.
94. Minami R, Yamamoto M, Takahama S, Ando H, Miyamura T, Suematsu E. Comparison of the influence of four classes of HIV antiretrovirals on adipogenic differentiation: The minimal effect of raltegravir and atazanavir. *J Infect Chemother*. 2011;17(2):183–8.
95. Pérez-Matute P, Pérez-Martínez L, Blanco JR, Oteo JA. Neutral actions of Raltegravir on adipogenesis, glucose metabolism and lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Curr HIV Res*. 2011;9(3):174–9.
96. Zash R, Jacobson DL, Diseko M, Mayondi G, Mmalane M, Essex M, et al. Comparative safety of dolutegravir-based or efavirenz-based antiretroviral treatment started during pregnancy in Botswana: an observational study. *Lancet Glob Heal*. 2018;6(7):e804–10.

97. World Health Organization (WHO). Potential safety issue affecting women living with HIV using dolutegravir at the time of conception. 2018.
98. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota informativa no 10/2018 - Recomendações sobre o uso do dolutegravir. 2018.
99. Guzman N, Aboud AK Al. HIV-associated Lipodystrophy. 2018. 1–5 p.
100. Alencastro PR, Barcellos NT, Wolff FH, Ikeda MLR, Schuelter-Trevisol F, Brandão ABM, et al. People living with HIV on ART have accurate perception of lipodystrophy signs: A cross-sectional study. *BMC Res Notes*. 2017;10(1):1–8.
101. Lunara Basqueroto Della Justina, Magali Chaves Luiz RM and FS-T. Prevalence and factors associated with lipodystrophy in AIDS patients. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(1):30–7.
102. World Health Organization (WHO). Global recommendations on physical activity for health [Internet]. 2010. Available from: <https://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/9789241599979/en/>
103. Martin K, Naclerio F, Karsten B, Vera JH. Physical activity and quality of life in people living with HIV. *AIDS Care - Psychol Socio-Medical Asp AIDS/HIV*. 2019;31(5):589–98.
104. Palmer BF, Clegg DJ. The sexual dimorphism of obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;402:113–9.
105. Heitmann BL, Lissner L. Hip Hip Hurray! Hip size inversely related to heart disease and total mortality. *Obes Rev*. 2011: 478-81.
106. Galli M, Veglia F, Angarano G, Santambrogio S, Meneghini E, Gritti F, et al. Gender Differences in Antiretroviral Drug-Related Adipose Tissue Alterations. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003;34(1):58–61.
107. Bacchetti P, Gripshover B, Grunfeld C, Heymsfield S, McCreath H, Osmond D, et al. Fat distribution in men with HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;40(2):121–31.
108. Bacchetti P, Cofrancesco J, Steven Heymsfield, Cora E. Lewis, Rebecca Scherzer MS, Tien PC. Fat Distribution in Women With HIV Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006 Aug;42(5):562–71.
109. 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;26(1):19–26.
110. Andany N, Raboud JM, Walmsley S, Diong C, Rourke SB, Rueda S, et al. Ethnicity and Gender Differences in Lipodystrophy of HIV-Positive Individuals Taking Antiretroviral Therapy in Ontario, Canada. *HIV Clin Trials*. 2011;12(2):89–103.
111. Suarez-Kurtz G, Pena SDJ, Struchiner CJ, Hutz MH. Pharmacogenomic diversity among Brazilians: Influence of ancestry, self-reported color, and geographical origin. *Front Pharmacol*. 2012;(3):1–7.
112. Sérgio D. J. Pena, Giuliano Di Pietro, Mateus Fuchshuber-Moraes, Julia Pasqualini Genro, Mara H. Hutz, Fernanda de Souza Gomes Kehdy, Fabiana Kohlrausch, Luiz Alexandre Viana Magno, Raquel Carvalho Montenegro, Manoel Odorico Moraes, Maria Elisabete Amaral GS-K. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. *PLoS One*. 2011;6(2):e17063.
113. Srinivasa S, Grinspoon SK. Metabolic and body composition effects of newer antiretrovirals in HIV-infected patients. *Eur J Endocrinol*. 2014;170(5):R185–R202.
114. Van Der Klaauw AA, Farooqi IS. The hunger genes: Pathways to obesity. *Cell*. 2015;161(1):119–32.

115. Bonnet E, Genoux A, Bernard J, Fauvel J, Massip P, Perret B. Impact of genetic polymorphisms on the risk of lipid disorders in patients on anti-HIV therapy. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(7):815–21.
116. Lazzaretti RK, Gasparotto AS, Sassi MGD, Polanczyk CA, Kuhmmer R, Silveira JM, et al. Genetic markers associated to dyslipidemia in HIV-infected individuals on HAART. *Sci World J*. 2013;2013.
117. Finkelstein JL, Gala P, Rochford R, Glesby MJ, Mehta S. HIV / AIDS and lipodystrophy: Implications for clinical management in resource-limited settings. *J Int AIDS Soc*. 2015;18(1):19033.
118. Santos AP, Navarro AM, Schwingel A, Alves TC, Abdalla PP, Venturini ACR, et al. Lipodystrophy diagnosis in people living with HIV / AIDS : prediction and validation of sex-specific anthropometric models. *BMC Public Health*. 2018;18(806):1–14.
119. Oette M, Juretzko P, Kroidl A, Sagir A, Wettstein M, Siegrist J, et al. Lipodystrophy Syndrome and Self-Assessment of Well-Being and Physical Appearance in HIV-Positive Patients. *AIDS Patient Care STDS*. 2002;16(9):413–7.
120. MINISTÉRIO DA SAUDE. Portaria no 2.582/2004 - Cirurgias reparadoras para pacientes portadores de Aids e e usuários de anti-retrovirais na Tabela do Sistema de Informações Hospitalares do SUS – SIH/SUS, e dá outras providências. 2004.
121. MINISTÉRIO DA SAUDE. Portaria no 01/2009 - Define a Unidade de Assistência em Alta Complexidade no Tratamento Reparador da Lipodistrofia do Portador de HIV/Aids. 2009.
122. Pushpakom SP, Castro H, Back DJ, Dunn DT, Pirmohamed M, Owen A. Adipogenic gene variants in patients with HIV-associated lipodystrophy. *Pharmacogenet Genomics*. 2010;21(2):76–83.
123. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2548–56.
124. Goossens GH. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obes Facts*. 2017;10(3):207–15.
125. Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *N Engl J Med*. 2017;376(3):254–66.
126. Russo L, Lumeng CN. Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. *Immunology*. 2018;155(4):407–17.
127. McBride JA, Striker R. Imbalance in the game of T cells: What can the CD4/CD8 T-cell ratio tell us about HIV and health? *PLOS Pathog*. 2017;13(11):e1006624.
128. Carr A. HIV lipodystrophy: Risk factors, pathogenesis, diagnosis and management. *Aids*. 2003;17(SUPPL1):S141–8.
129. Wang Q, Wu H. T Cells in Adipose Tissue: Critical Players in Immunometabolism. *Front Immunol*. 2018;9(October):2509.
130. Brehm MA, Daniels KA, Welsh RM. Rapid Production of TNF- following TCR Engagement of Naive CD8 T Cells. *J Immunol*. 2005;175:5043–9.
131. Tzanavari T, Giannogonas P, Karalis KP. TNF- α and Obesity. *Curr Dir Autoimmun*. 2010;11:145–56.
132. Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN Inflamm*. 2013;2013:1–12.
133. Kusminski CM, Bickel PE, Scherer PE. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(9):639–60.
134. Johnson JA, Albu JB, Engelson ES, Fried SK, Inada Y, Ionescu G, et al. Increased systemic and adipose tissue cytokines in patients with HIV-associated lipodystrophy. *Am J Physiol Metab*. 2004;286(2):E261–71.

135. Domingo P, Vidal F, Domingo JC, Veloso S, Sambat MA, Torres F, et al. Tumour necrosis factor alpha in fat redistribution syndromes associated with combination antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients: Potential role in subcutaneous adipocyte apoptosis. *Eur J Clin Invest*. 2005;35(12):771–80.
136. Mondal D, Larussa VF, Agrawal KC. Synergistic Antiadipogenic Effects of HIV Type 1 Protease Inhibitors with Tumor Necrosis Factor α : Suppression of Extracellular Insulin Action Mediated by Extracellular Matrix-Degrading Proteases . *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002;17(17):1569–84.
137. Freitas P, Carvalho D, Santos AC, Madureira AJ, Martinez E, Pereira J, et al. Adipokines, hormones related to body composition, and insulin resistance in HIV fat redistribution syndrome. *BMC Infect Dis*. 2014;14(1):1–13.
138. Hajeer ALIH, Hutchinson IAN V. TNF- α gene polymorphism Clinical and biological implications. *Microsc Res Tech*. 2000;50:216–28.
139. Maher B, Alfirevic A, Vilar FJ, Wilkins EG, Park BK, Pirmohamed M. TNF-alpha promoter region gene polymorphisms in HIV-positive patients with lipodystrophy. *Aids*. 2002;16(15):2013–8.
140. David Nolan, Corey Moore, Alison Castley, David Sayer, Cyril Mamotte, Mina John, Ian James SM. Tumour necrosis factor-alpha gene -238G/A promoter polymorphism associated with a more rapid onset of lipodystrophy. *Aids*. 2003;17(1):121–31.
141. Tarr P, Telenti A. Toxicogenetics of antiretroviral therapy: genetic factors that contribute to metabolic complications. *Antivir Ther*. 2007;12:999–1013.
142. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. 2002;53:409–35.
143. Felix JF, Bradfield JP, Monnereau C, Van Der Valk RJP, Stergiakouli E, Chesi A, et al. Genome-wide association analysis identifies three new susceptibility loci for childhood body mass index. *Hum Mol Genet*. 2016;25(2):389–403.
144. Rosen ED, Spiegelman BM. PPAR γ : A Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth. *J Biol Chem*. 2001;276(41):37731–4.
145. Kroker AJ, Bruning JB. Review of the structural and dynamic mechanisms of PPAR γ partial agonism. *PPAR Res*. 2015;2015.
146. Lehmann J, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA, Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, KS. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*. 1995;270(22):12953–6.
147. Gouda HN, Sagoo GS, Harding AH, Yates J, Sandhu MS, Higgins JPT. The association between the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 (PPARG2) Pro12Ala gene variant and type 2 diabetes mellitus: A HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2010;171(6):645–55.
148. Galbete C, Toledo E, Martínez-González MA, Martínez JA, Guillén-Grima F, Martí A. Pro12Ala variant of the PPARG2 gene increases body mass index: An updated meta-analysis encompassing 49,092 subjects. *Obesity*. 2013;21(7):1486–95.
149. Lapice E, Vaccaro O. Interaction Between Pro12Ala Polymorphism of PPAR γ 2 and Diet on Adiposity Phenotypes. *Curr Atheroscler Rep*. 2014;16(12):1–11.
150. Kruzliak P, Haley AP, Starcevic JN, Gaspar L, Petrovic D. Polymorphisms of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (rs1801282) and its coactivator-1 (rs8192673) are associated with obesity indexes in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2015;14(1):1–7.

151. Yao Y shui, Li J, Jin Y long, Chen Y, He L ping. Association between PPAR- γ 2 Pro12Ala polymorphism and obesity: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2015;42(6):1029–38.
152. Saumoy M, Veloso S, Alonso-Villaverde C, Domingo P, Chacón MR, Miranda M, Aragonès G, Gutiérrez MM, Viladés C, Peraire J, Sirvent JJ, López-Dupla M, Aguilar C, Richart C VF. PPAR γ Pro12Ala polymorphism in HIV-1-infected patients with HAART-related lipodystrophy. *Curr HIV Res.* 2008;7(5):533–40.
153. Garcia-Broncano P, Berenguer J, Fernández-Rodríguez A, Pineda-Tenor D, Jiménez-Sousa MT, García-Alvarez M, et al. PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphism was associated with favorable cardiometabolic risk profile in HIV/HCV coinfecting patients: A cross-sectional study. *J Transl Med.* 2014;12(1):1–9.
154. Nazih H, Raffi F, Taïeb A, Reynes J, Choutet P, Cassuto J-P, et al. Peroxisome Proliferator Activating Receptor Alpha and Gamma Polymorphisms and Metabolic Abnormalities in HIV-Infected Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy: The ANRS CO8 APROCO-COPILOTE Study. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2012;28(4):393–9.
155. Hung YP, Lee NY, Lin SH, Chang HC, Wu CJ, Chang CM, et al. Effects of PPAR γ and RBP4 Gene Variants on Metabolic Syndrome in HIV-Infected Patients with Anti-Retroviral Therapy. *PLoS One.* 2012;7(11):1–9.
156. Rui L. Energy Metabolism in the Liver. *Compr Physiol.* 2014;4(1):177–97.
157. Park HY, Kang HS, Im S. Recent Insight into the Correlation of SREBP-Mediated Lipid Metabolism and Innate Immune Response. *J Mol Endocrinol.* 2018;1–26.
158. Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F. SREBP transcription factors: Master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* 2004;86(11):839–48.
159. Xu X, So JS, Park JG, Lee AH. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Semin Liver Dis.* 2013;33(4):301–11.
160. Grarup N, Stender-Petersen KL, Andersson EA, Jørgensen T, Borch-Johnsen K, Sandbæk A, et al. Association of variants in the sterol regulatory element-binding factor 1 (SREBF1) gene with type 2 diabetes, glycemia, and insulin resistance A study of 15,734 danish subjects. *Diabetes.* 2008;57(4):1136–42.
161. Díaz-Delfín J, del Mar Gutiérrez M, Gallego-Escuredo JM, Domingo JC, Gracia Mateo M, Villarroya F, et al. Effects of nevirapine and efavirenz on human adipocyte differentiation, gene expression, and release of adipokines and cytokines. *Antiviral Res.* 2011;91(2):112–9.
162. Bastard JP, Caron M, Vidal H, Jan V, Auclair M, Vigouroux C, et al. Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipoatrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance. *Lancet.* 2002;359(9311):1026–31.
163. Laaksonen R, Thelen KM, Päivä H, Matinheikki J, Vesalainen R, Janatuinen T, et al. Genetic variant of the SREBF-1 gene is significantly related to cholesterol synthesis in man. *Atherosclerosis.* 2006;185(1):206–9.
164. Miserez AR, Muller PY, Barella L, Schwieter M, Erb P, Vernazza PL BM. A single-nucleotide polymorphism in the sterol-regulatory element-binding protein 1c gene is predictive of HIV-related hyperlipoproteinaemia. *AIDS.* 2001;15(15):2045–9.
165. Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, Jacobson P, et al. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet.* 2007;39(6):724–6.

166. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JRB, et al. A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science* (80-). 2007;316(5826):889–94.
167. Larder R, Cheung MKM, Tung YCL, Yeo GSH, Coll AP. Where to go with FTO? *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22(2):53–9.
168. Speakman JR. The “Fat Mass and Obesity Related” (FTO) gene: Mechanisms of Impact on Obesity and Energy Balance. *Curr Obes Rep.* 2015;4(1):73–91.
169. Qi Q, Kilpeläinen TO, Downer MK, Tanaka T, Smith CE, Sluijs I, et al. FTO genetic variants, dietary intake and body mass index: insights from 177,330 individuals. *Hum Mol Genet.* 2014;23(25):6961–72.
170. Livingstone KM, Celis-Morales C, Navas-Carretero S, San-Cristobal R, Forster H, O’Donovan CB, et al. Fat mass-and obesity-associated genotype, dietary intakes and anthropometric measures in European adults the Food4Me study. *Br J Nutr.* 2015;115(3):440–8.
171. Harbron J, Van der Merwe L, Zaahl MG, Kotze MJ, Senekal M. Fat mass and obesity-associated (FTO) gene polymorphisms are associated with physical activity, food intake, eating behaviors, psychological health, and modeled change in body mass index in overweight/obese caucasian adults. *Nutrients.* 2014;6(8):3130–52.
172. Celis-Morales C, Marsaux CFM, Livingstone KM, Navas-Carretero S, San-Cristobal R, O’Donovan CB, et al. Physical activity attenuates the effect of the FTO genotype on obesity traits in European adults: The Food4Me study. *Obesity.* 2016;24(4):962–9.
173. Xiang L, Wu H, Pan A, Patel B, Xiang G, Qi L, et al. FTO genotype and weight loss in diet and lifestyle interventions: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2016;103:1162–70.
174. Silva CF da, Zandoná MR, Vitolo MR, Dal P, Campagnolo B, Rotta LN, et al. Association between a frequent variant of the FTO gene and anthropometric phenotypes in Brazilian children. *BMC Med Genet.* 2013;14:1.
175. Yang M, Xu Y, Liang L, Fu J, Xiong F, Liu G, et al. The effects of genetic variation in FTO rs9939609 on obesity and dietary preferences in Chinese Han children and adolescents. *PLoS One.* 2014;9(8):1–9.
176. Zhang M, Zhao X, Cheng H, Wang L, Xi B, Shen Y, et al. Age- and sex-dependent association between FTO rs9939609 and obesity-related traits in Chinese children and adolescents. *PLoS One.* 2014;9(5):1–7.
177. Qi Q, Downer MK, Kilpelainen TO, Taal HR, Barton SJ, Ntalla I, et al. Dietary Intake, FTO genetic variants, and adiposity: A combined analysis of over 16,000 children and adolescents. *Diabetes.* 2015;64(7):2467–76.
178. Gerken T, Girard CA, Tung YL, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS, et al. The Obesity-Associated FTO Gene Encodes a 2-Oxoglutarate – Dependent Nucleic Acid Demethylase. *Science* (80-). 2007;318(li):1469–72.
179. Wu Q, Saunders RA, Szkudlarek-Mikho M, Serna I de la, Chin KV. The obesity-associated Fto gene is a transcriptional coactivator. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;401(3):390–5.
180. Merkestein M, Laber S, McMurray F, Andrew D, Sachse G, Sanderson J, et al. FTO influences adipogenesis by regulating mitotic clonal expansion. *Nat Commun.* 2015;6:1–9.
181. Chen A, Chen X, Cheng S, Shu L, Yan M, Yao L, et al. FTO promotes SREBP1c maturation and enhances CIDEC transcription during lipid accumulation in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2018;1863(5):538–48. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.02.003>

182. Pineda-Tenor D, Berenguer J, Jiménez-Sousa MA, García-Alvarez M, Aldámiz-Echevarria T, Carrero A, et al. FTO rs9939609 polymorphism is associated with metabolic disturbances and response to HCV therapy in HIV/HCV-coinfected patients. *BMC Med.* 2014;12(198):1–11.
183. Núñez-Torres R, Macías J, Rivero-Juarez A, Neukam K, Merino D, Téllez F, et al. Fat mass and obesity-associated gene variations are related to fatty liver disease in HIV-infected patients. *HIV.* 2017;18(8):546–54.
184. Smemo S, Tena JJ, Kim KH, Gamazon ER, Sakabe NJ, Gómez-Marín C, et al. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature.* 2014;507(7492):371–5.
185. Melina Claussnitzer, Simon N. Dankel, Kyoung-Han Kim, Gerald Quon, WouterMeuleman, Christine Haugen, Viktoria Glunk, Isabel S. Sousa, Jacqueline L. Beaudry, Vijitha Puvindran, Nezar A. Abdennur JL, Per-Arne Svensson, Yi-Hsiang Hsu, Daniel J. Drucker, Gunnar Mellgren, Chi-Chung Hui, Hans Hauner MK. FTO obesity variant circuitry and adipocyte browning in humans. *N Engl J Med.* 2015;373(10):895–907.
186. Yang Q, Xiao T, Guo J, Su Z. Complex Relationship between Obesity and the Fat Mass and Obesity Locus. *Int J Biol Sci.* 2017;13(5):615–29.
187. Chen D, Guarente L. SIR2: a potential target for calorie restriction mimetics. *Trends Mol Med.* 2007;13(2):64–71.
188. Kitada M, Kume S, Takeda-Watanabe A, Tsuda SI, Kanasaki K, Koya D. Calorie restriction in overweight males ameliorates obesity-related metabolic alterations and cellular adaptations through anti-aging effects, possibly including AMPK and SIRT1 activation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2013;1830(10):4820–7.
189. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J.* 2007;404(1):1–13.
190. Dali-Youcef N, Lagouge M, Froelich S, Koehl C, Schoonjans K, Auwerx J. Sirtuins: the “magnificent seven”, function, metabolism and longevity. *Ann Med.* 2007;39(5):335–45.
191. Morris BJ. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radic Biol Med.* 2013;56:133–71.
192. Kupis W, Palyga J, Tomal E, Niewiadomska E. The role of sirtuins in cellular homeostasis. *J Physiol Biochem.* 2016;72(3):371–80.
193. Chaudhary N, Pfluger PT. Metabolic benefits from Sirt1 and Sirt1 activators. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2009;12(4):431–7.
194. Lomb DJ, Laurent G, Haigis MC. Sirtuins regulate key aspects of lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2010;1804(8):1652–7.
195. Konrad T, Howitz, Kevin J. Bitterman, Haim Y. Cohen, Dudley W. Lamming, Siva Lavu, Jason G. Wood, Robert E. Zipkin, Phuong Chung, Anne Kisielewski, Li-Li Zhang BS& DAS. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 2003;19(3):191–6.
196. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;13(4):225–38.
197. Yang H, Zhang W, Pan H, Feldser HG, Lainez E, Miller C, et al. SIRT1 Activators Suppress Inflammatory Responses through Promotion of p65 Deacetylation and Inhibition of NF-κB Activity. *PLoS One.* 2012;7(9):1–11.
198. Mattagajasingh I, Kim C-S, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA, Jung S-B, et al. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(37):14855–60.

199. Cohen HY. Calorie Restriction Promotes Mammalian Cell Survival by Inducing the SIRT1 Deacetylase. *Science*. 2004;305(5682):390–2.
200. Camins A, Sureda FX, Junyent F, Verdaguer E, Folch J, Pelegri C, et al. Sirtuin activators: Designing molecules to extend life span. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2010;1799(10–12):740–9.
201. Higashibata T, Wakai K, Naito M, Morita E, Hishida A, Hamajima N, et al. Effects of self-reported calorie restriction on correlations between SIRT1 polymorphisms and body mass index and long-term weight change. *Gene*. 2016;594(1):16–22.
202. Xin Ye, Meiting Li, Tianyun Hou, Tian Gao, Wei-guo Zhu YY. Sirtuins in glucose and lipid metabolism. *Oncotarget*. 2017;8(1):1845–59.
203. Tilstra JS, Clauson CL, Niedernhofer LJ, Robbins PD. NF-kappaB in Aging and Disease. *Aging Dis*. 2011;2(6):449–65.
204. Kilic U, Gok O, Bacaksiz A, Izmirlı M, Elıbol-Can B, Uysal O. SIRT1 gene polymorphisms affect the protein expression in cardiovascular diseases. *PLoS One*. 2014;9(2):1–9.
205. Chen S, Li Z, Li W, Shan Z, Zhu W. Resveratrol inhibits cell differentiation in 3T3-L1 adipocytes via activation of AMPK. *Can J Physiol Pharmacol*. 2011;89(11):793–9.
206. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009;458(7241):1056–60.
207. Budayeva HG, Rowland EA, Cristea IM. The intricate roles of mammalian sirtuins in defense against viral pathogens. *J Virol*. 2015;242.
208. Pagans S, Pedal A, North BJ, Kaehlcke K, Marshall BL, Dorr A, et al. SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation. *PLoS Biol*. 2005;3(2):0210–20.
209. Pinzone MR, Cacopardo B, Condorelli F, Rosa M Di, Nunnari G. Sirtuin-1 and HIV-1: An Overview. *Curr Drug Targets*. 2013;14(6):648–52.
210. Zhang HS, Wu MR. SIRT1 regulates Tat-induced HIV-1 transactivation through activating AMP-activated protein kinase. *Virus Res*. 2009;146(1–2):51–7.
211. Zhang HS, Zhou Y, Wu MR, Zhou H Sen, Xu F. Resveratrol inhibited Tat-induced HIV-1 LTR transactivation via NAD⁺-dependent SIRT1 activity. *Life Sci*. 2009;85(13–14):484–9.
212. Alberdi G, Rodríguez VM, Miranda J, Teresa Macarulla M, Churruca I, Portillo MP. Thermogenesis is involved in the body-fat lowering effects of resveratrol in rats. *Food Chem*. 2013;141(2):1530–5.
213. Dal-Pan A, Blanc S, Aujard F. Resveratrol suppresses body mass gain in a seasonal non-human primate model of obesity. *BMC Physiol*. 2010;10(1).
214. Mercken EM, Hu J, Krzysik-Walker S, Wei M, Li Y, Mcburney MW, et al. SIRT1 but not its increased expression is essential for lifespan extension in caloric-restricted mice. *Aging Cell*. 2014;13(1):193–6.
215. Kim S, Jin Y, Choi Y, Park T. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochem Pharmacol*. 2011;81(11):1343–51.
216. Ran G, Ying L, Li L, Yan Q, Yi W, Ying C, et al. Resveratrol ameliorates diet-induced dysregulation of lipid metabolism in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One*. 2017;12(7):1–15.
217. Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, De T Van. Europe PMC Funders Group Calorie restriction-like effects of 30 days of Resveratrol (resVidaTM) supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. 2011;14(5).

218. Poulsen MM, Jørgensen JOL, Jessen N, Richelsen B, Pedersen SB. Resveratrol in metabolic health: An overview of the current evidence and perspectives. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1290(1):74–82.
219. Konings E, Timmers S, Boekschoten M V., Goossens GH, Jocken JW, Afman LA, et al. The effects of 30 days resveratrol supplementation on adipose tissue morphology and gene expression patterns in obese men. *Int J Obes.* 2014;38(3):470–3.
220. Arzola-Paniagua MA, García-Salgado López ER, Calvo-Vargas CG, Guevara-Cruz M. Efficacy of an orlistat-resveratrol combination for weight loss in subjects with obesity: A randomized controlled trial. *Obesity.* 2016;24(7):1454–63.
221. Kjær TN, Ornstrup MJ, Poulsen MM, Stødkilde-Jørgensen H, Jessen N, Jørgensen JOL, et al. No Beneficial Effects of Resveratrol on the Metabolic Syndrome: A Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(5):1642–51.
222. Yoshino J, Conte C, Fontana L, Mittendorfer B, Schechtman KB, Gu C, et al. Resveratrol supplementation does not improve metabolic function in non-obese women with normal glucose tolerance. *Natl Institutes Heal.* 2013;16(5):658–64.
223. Mansur AP, Roggerio A, Goes MFS, Avakian SD, Leal DP, Maranhão RC, et al. Serum concentrations and gene expression of sirtuin 1 in healthy and slightly overweight subjects after caloric restriction or resveratrol supplementation: A randomized trial. *Int J Cardiol.* 2017;227:788–94.
224. Most J, Timmers S, Warnke I, Jocken JWE, Boekschoten M V, Groot P De, et al. Combined epigallocatechin-3-gallate and resveratrol supplementation for 12 wk increases mitochondrial capacity and fat oxidation, but not insulin sensitivity, in obese humans: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2015.
225. Huang H, Chen G, Liao D, Zhu Y, Pu R, Xue X. The effects of resveratrol intervention on risk markers of cardiovascular health in overweight and obese subjects: a pooled analysis of randomized controlled trials. *Obes Rev.* 2016;17(12):1329–40.
226. Kurylowicz A. In search of new therapeutic targets in obesity treatment: Sirtuins. *Int J Mol Sci.* 2016;17(572):1–26.
227. Van Den Berg SW, Dollé MET, Imholz S, Van Der A DL, Van T Slot R, Wijmenga C, et al. Genetic variations in regulatory pathways of fatty acid and glucose metabolism are associated with obesity phenotypes: A population-based cohort study. *Int J Obes.* 2009;33:1143–52.
228. Shimoyama Y, Suzuki K, Hamajima N, Niwa T. Sirtuin 1 gene polymorphisms are associated with body fat and blood pressure in Japanese. *Transl Res.* 2011;157(6):339–47.
229. Weyrich P, Machicao F, Reinhardt J, Machann J, Schick F, Tschritter O, et al. SIRT1 genetic variants associate with the metabolic response of Caucasians to a controlled lifestyle intervention - The TULIP Study. *BMC Med Genet.* 2008;9(100):1–7.
230. Meneguette MV de O, Oliveira CA de, Lima, Melo MH de, Pina, Nicole K, et al. Polymorphism in the SIRT1 gene and parameters of metabolic syndrome in a sample of the adult Brazilian population. *Rev Nutr.* 2016;29(1):1–10.
231. Liguori R, Labruna G, Alfieri A, Martone D, Farinano E, Contaldo F, et al. The FTO gene polymorphism (rs9939609) is associated with metabolic syndrome in morbidly obese subjects from southern Italy. *Mol Cell Probes.* 2014;28(4):195–9.
232. Dong Y, Guo T, Traurig M, Mason CC, Kobes S, Perez J, et al. SIRT1 is associated with a decrease in acute insulin secretion and a sex specific increase in risk for type 2 diabetes in Pima Indians. *Mol Genet Metab.* 2011;104(4):661–5.

233. Clark SJ, Falchi M, Olsson B, Jacobson P, Cauchi S, Balkau B, et al. Association of sirtuin 1 (SIRT1) gene SNPs and transcript expression levels with severe obesity. *Obesity*. 2012;20(1):178–85.
234. Zarrabeitia MT, Valero C, Martín-Escudero JC, Olmos JM, Bolado-Carrancio A, de Sande-Nacarino EL, et al. Association Study of Sirtuin 1 Polymorphisms with Bone Mineral Density and Body Mass Index. *Arch Med Res*. 2012;43(5):363–8.
235. Zillikens MC, Van Meurs JBJ, Rivadeneira F, Amin N, Hofman A, Oostra BA, et al. SIRT1 genetic variation is related to BMI and risk of obesity. *Diabetes*. 2009;58(12):2828–34.
236. Kredt T, Van der Walt J-S, Siegfried N, Cohen K. Therapeutic drug monitoring of antiretrovirals for people with HIV. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(3).
237. Kang J-S, Lee M-H. Overview of Therapeutic Drug Monitoring. *Korean J Intern Med*. 2009;24(1):1.
238. Bazzoli C, Jullien V, Tiec C Le, Rey E, Taburet A, Bazzoli C, et al. Intracellular Pharmacokinetics of Antiretroviral Drugs in HIV-Infected Patients and their Correlation with Drug Action. 2010.
239. Zehnacker L, Abe E, Mathez D, Alvarez J-C, Leibowitch J, Azoulay S. Plasma and Intracellular Antiretroviral Concentrations in HIV-Infected Patients under Short Cycles of Antiretroviral Therapy. *AIDS Res Treat*. 2014;1–4.
240. Punyawudho B, Singkham N, Thammajaruk N, Dalodom T, Kerr SJ, Burger DM, et al. Therapeutic drug monitoring of antiretroviral drugs in HIV-infected patients. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2016;9(12):1583–95.
241. Poeta J, Linden R, Antunes MV, Real L, Menezes AM, Ribeiro JP, et al. Plasma concentrations of efavirenz are associated with body weight in HIV-positive individuals. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(11):2601–4.
242. Ma Q, Zingman BS, Luque A, Fischl MA, Venuto C, Difrancesco R, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Protease Inhibitors and Efavirenz in HIV-Infected Individuals With Active. 2012;33(3):309–14.
243. Duval Xavier, Mentré F, Rey E, Auleley S, Peytavin G, Biour M, Métro A, Goujard C, Taburet AM, Lascoux C, Panhard X, Tréluyer JM S-CDC 2 SG. Benefit of therapeutic drug monitoring of protease inhibitors in HIV-infected patients depends on PI used in HAART regimen - 11 trial. *Fundam Clin Pharmacol*. 2009;23(4):491–500.
244. Van Heeswijk RP. Critical issues in therapeutic drug monitoring of antiretroviral drugs. *Ther Drug Monit*. 2002;24(3):323–31.
245. Tozzi V. Pharmacogenetics of antiretrovirals. *Antiviral Res*. 2010;85(1):190–200.
246. Mbuagbaw LC, Irlam JH, Spaulding A, Rutherford GW, Siegfried N. Efavirenz or nevirapine in three-drug combination therapy with two nucleoside-reverse transcriptase inhibitors for initial treatment of HIV infection in antiretroviral-naïve individuals. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;(12).
247. Leth F Van, Kappelhoff BS, Johnson D, Losso MH, Boron-Kaczmarek A, Saag MS, et al. Pharmacokinetic Parameters of Nevirapine and Efavirenz in Relation to Antiretroviral Efficacy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006;22(3):232–9.
248. Colombo S, Buclin T, Cavassini M, Décosterd LA, Telenti A, Biollaz J, et al. Population pharmacokinetics of atazanavir in patients with human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(11):3801–8.
249. Vrouwenraets SM, Wit FW, Tongeren J van, Lange JM. Efavirenz: a review. *Expert Opin Pharmacother*. 2007;8(6):851–71.

250. Boffito M, Else L, Back D, Taylor J, Khoo S, Sousa M, et al. Pharmacokinetics of atazanavir/ritonavir once daily and lopinavir/ritonavir twice and once daily over 72 h following drug cessation. *Antivir Ther*. 2011;13(7):901–7.
251. Gervasoni C, Meraviglia P, Minisci D, Ferraris L, Riva A, Landonio S, et al. Metabolic and kidney disorders correlate with high atazanavir concentrations in HIV-infected patients: Is it time to revise atazanavir dosages? *PLoS One*. 2015;10(4):1–12.
252. Asensi V. Can antiretroviral therapy be tailored to each human immunodeficiency virus-infected individual? Role of pharmacogenomics. *World J Virol*. 2015;4(3):169.
253. Liu X, Ma Q, Zhang F. Therapeutic drug monitoring in highly active antiretroviral therapy. *Expert Opin Drug Saf*. 2010;9(5):743–58.
254. Walker AS, Gibb DM. Monitoring of highly active antiretroviral therapy in HIV infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2011;24(1):27–33.
255. Roustit M, Jlaiel M, Leclercq P, Stanke-Labesque F. Pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of antiretrovirals in pregnant women. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;66(2).
256. Lu H, Rosenbaum S. Developmental pharmacokinetics in pediatric populations. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2014;19(4):262–76.
257. AIDSinfo | Information on HIV/AIDS Treatment P and R. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents [Internet]. 2018. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00013-X%5Chttp://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.040](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00013-X%5Chttp://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.040)
258. L’homme R, Warris A, Gibb D, Burger D. Children with HIV are not small adults: What is different in pharmacology? *Curr Opin HIV AIDS*. 2007;2(5):405–9.
259. Klotz U. Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly. *Drug Metab Rev*. 2009;41(2):67–76.
260. Rhee MS, Greenblatt DJ. Therapeutic review: Pharmacologic consideration for the use of antiretroviral agents in the elderly. *J Clin Pharmacol*. 2008;48(10):1212–25.
261. Johannessen A. Dried blood spots in HIV monitoring: applications in resource-limited settings. *Bioanalysis*. 2010;2:1893–908.
262. Pham MD, Romero L, Parnell B, Anderson DA, Crowe SM, Luchters S. Feasibility of antiretroviral treatment monitoring in the era of decentralized HIV care: A systematic review. *AIDS Res Ther*. 2017;14(1).
263. World Health Organization (WHO). Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents. 2010. Available from: <https://www.who.int/hiv/pub/arv/adult2010/en/>
264. Calcagno A, Motta I, Milia MG, Rostagno R, Simiele M, Libanore V, et al. Dried plasma/blood spots for monitoring antiretroviral treatment efficacy and pharmacokinetics: A cross-sectional study in rural Burundi. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;79(5):801–8.
265. Duthaler U, Berger B, Erb S, Battegay M, Letang E, Gaugler S, et al. Using dried blood spots to facilitate therapeutic drug monitoring of antiretroviral drugs in resource-poor regions. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(10):2729–37.
266. Antunes M V, Ribeiro JP, Sprinz E, Linden R. Ultra-Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Quantification of HIV Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors and Protease Inhibitors in Human Plasma. 2011;22(1):134–41.
267. Archibald TL, Murrell DE, Brown SD. Chromatographic methods in HIV medicine: Application to therapeutic drug monitoring. *Biomed Chromatogr*. 2018;32(2).

268. Taylor PJ, Tai C-H, Franklin ME, Pillans PI. The current role of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in therapeutic drug monitoring of immunosuppressant and antiretroviral drugs. *Clin Biochem*. 2011;44(1):14–20.
269. Yong Huang, Monica Gandhi, Ruth M. Greenblatt, Winnie Gee ETL and NM. Sensitive analysis of anti-HIV drugs, efavirenz, lopinavir and ritonavir, in human hair by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2008;22:3401–9.
270. Gandhi M, Ameli N, Bacchetti P, Anastos K, Gange SJ, Minkoff H, et al. Atazanavir concentration in hair is the strongest predictor of outcomes on antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2011;52(10):1267–75.
271. Gras A, Schneider S, Karasi J-C, Ternes A-M, Sauvageot N, Karasi-Omes C, et al. Evaluation of saliva as an alternative matrix for monitoring plasma Zidovudine, Lamivudine and nevirapine concentrations in Rwanda. *Curr HIV Res*. 2011;9(4):223–8.
272. Malamud D. Saliva as a Diagnostic Fluid. *Dent Clin North Am*. 2011;55(1):159–78.
273. Edelbroek PM, Heijden J Van Der, Stolk LML. Dried Blood Spot Methods in Therapeutic Drug Monitoring : Methods , Assays , and Pitfalls. 2009;31(3):327–36.
274. Demirev P a. Dried blood spots: Analysis and applications. *Anal Chem*. 2013;85(2):779–89.
275. Wilhelm AJ, den Burger JCG, Swart EL. Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot: Progress to Date and Future Directions. *Clin Pharmacokinet*. 2014;53(11):961–73.
276. Kromdijk W, Mulder JW, Smit PM, Ter Heine R, Beijnen JH, Huitema AD. Therapeutic drug monitoring of antiretroviral drugs at home using dried blood spots: a proof-of-concept study. *Antivir Ther*. 2013;18(6):821–5.
277. Kromdijk W, Mulder JW, Rosing H, Smit PM, Beijnen JH, Huitema ADR. Use of dried blood spots for the determination of plasma concentrations of nevirapine and efavirenz. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:1211–6.
278. Koal T, Burhenne H, Römling R, Svoboda M, Resch K, Kaefer V. Quantification of antiretroviral drugs in dried blood spot samples by means of liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19(21):2995–3001.
279. Amara AB, Else LJ, Tjia J, Olagunju A, Puls RL, Khoo S, et al. A validated method for quantification of efavirenz in dried blood spots using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ther Drug Monit*. 2015;37(2):1.
280. Schauer AP, Sykes C, Cottrell ML, Prince H, Kashuba ADM. Validation of an LC–MS/MS assay to simultaneously monitor the intracellular active metabolites of tenofovir, emtricitabine, and lamivudine in dried blood spots. *J Pharm Biomed Anal*. 2018;149:40–5.
281. ter Heine R, Rosing H, van Gorp ECM, Mulder JW, van der Steeg W a., Beijnen JH, et al. Quantification of protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in dried blood spots by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2008;867:205–12.
282. Van Schooneveld T, Swindells S, Nelson SR, Robbins BL, Moore R, Fletcher C V. Clinical evaluation of a dried blood spot assay for atazanavir. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(10):4124–8.
283. Zheng JH, Guida L a., Rower C, Castillo-Mancilla J, Meditz A, Klein B, et al. Quantitation of tenofovir and emtricitabine in dried blood spots (DBS) with LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;88(2014):144–51.

284. Martial LC, Aarnoutse RE, Schreuder MF, Henriët SS, Brüggemann RJM, Joor MA. Cost evaluation of dried blood spot home sampling as compared to conventional sampling for therapeutic drug monitoring in children. *PLoS One*. 2016;11(12).
285. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Manual de vigilância sanitária sobre o transporte de material biológico humano para fins de diagnóstico clínico. 2015.
286. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. 1963;32(3):338–43.
287. Stove CP, Ingels A-SME, De Kesel PMM, Lambert WE. Dried blood spots in toxicology: from the cradle to the grave? *Crit Rev Toxicol*. 2012;42(3):230–43.
288. Antunes MV, Charão MF, Linden R. Dried blood spots analysis with mass spectrometry: Potentials and pitfalls in therapeutic drug monitoring. *Clin Biochem*. 2016; 49(13-14):1035-46.
289. Timmerman P, White S, Globig S, Lüdtké S, Brunet L, Smeraglia J. EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots. *Bioanalysis*. 2011;3(14):1567–75.
290. Capião S, Stove V V., Lambert WE, Stove CP. Prediction of the hematocrit of dried blood spots via potassium measurement on a routine clinical chemistry analyzer. *Anal Chem*. 2013;85(1):404–10.
291. Kesel PM De, Sadones N, Capião S, Lambert WE, Stove CP. Hemato-critical issues in quantitative analysis of dried blood spots challenges and solutions. *Bioanalysis*. 2013;5(16):2023–41.
292. Enderle Y, Foerster K, Burhenne J. Clinical feasibility of dried blood spots: Analytics, validation, and applications. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;130:231–43.
293. Antunes MV, Raymundo S, De Oliveira V, Staudt DE, Gössling G, Peteffi GP, et al. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the determination of tamoxifen, N-desmethyltamoxifen, 4-hydroxytamoxifen and endoxifen in dried blood spots - Development, validation and clinical application during breast . *Talanta*. 2015;132:775–84.
294. Antunes MV, Raymundo S, Sandrine, Wagner C, Mattevi VS, Vieira N, et al. DBS sampling in imatinib therapeutic drug monitoring : from method development to clinical application. 2015;7:2105–17.
295. Amara AB, Else LJ, Carey D, Khoo S, Back DJ, Amin J, et al. A comparison of dried blood spots versus conventional plasma collection for the characterisation of efavirenz pharmacokinetics in a large-scale global clinical trial - The ENCORE1 study. *Ther Drug Monit*. 2017;1.

15 ANEXOS

ANEXO A – Parecer Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de polimorfismos em genes associados ao metabolismo e transporte de fármacos antirretrovirais e implementação da técnica DBS para monitoramento terapêutico em pacientes com HIV/AIDS

Pesquisador: Vanessa Sufê Mattevi

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 50465215.2.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.423.667

Apresentação do Projeto:

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) infecta as células de defesa T CD4+ causando o enfraquecimento do sistema imunológico e favorecendo o aparecimento de doenças oportunistas. Na ocorrência dessa situação, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) se desenvolve. A prevalência de indivíduos vivendo com HIV/AIDS continua a crescer mundialmente, mas incidência de novas infecções cresce de forma particular em

determinadas regiões do mundo. Com a introdução da terapia antirretroviral (TARV) foi proporcionada a melhoria no prognóstico, na qualidade e na expectativa de vida dos portadores do HIV. Porém, fatores como resistência viral, toxicidade dos fármacos e reações adversas permanecem como empecilhos no sucesso do tratamento. Além disso, o estilo de vida e os fatores farmacogenéticos do hospedeiro contribuem para diferenças no metabolismo, transporte e sensibilidade aos medicamentos. Indivíduos sob TARV requerem o monitoramento da carga viral e, também, o acompanhamento dos níveis de fármacos circulantes para assegurar o sucesso terapêutico e evitar níveis sub-terapêuticos da TARV, o que aumenta o risco de falha virológica. Uma alternativa minimamente invasiva para dosagem plasmática dos fármacos é a técnica de

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Continuação do Parecer: 1.423.667

mancha de sangue seco em papel (MSS). Esta técnica possui inúmeras vantagens em relação aos procedimentos padrões, uma vez que apresenta facilidade na coleta, transporte, armazenamento e, principalmente, a acessibilidade ao monitoramento da TARV em regiões remotas. Desta forma, o objetivo do estudo é implementar a metodologia de MSS para o monitoramento dos níveis plasmáticos dos medicamentos antirretrovirais e analisar a influência da variabilidade em genes candidatos associados ao metabolismo e transporte de fármacos utilizados na TARV sobre os seus níveis plasmáticos e efeitos adversos. Através destas estratégias, busca-se maximizar o sucesso terapêutico e melhorar a qualidade de vida em pacientes infectados pelo HIV sob TARV.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o papel de polimorfismos nos genes que codificam enzimas metabolizadoras e proteínas transportadoras dos fármacos antirretrovirais na determinação dos níveis plasmáticos destes fármacos e implementar a metodologia de sangue impregnado em papel como alternativa para monitoramento da terapia antirretroviral em pacientes infectados pelo HIV.

Objetivo Secundário:

1. Dosar os níveis plasmáticos dos principais fármacos das classes dos ITRNNs e IPs utilizados no esquema terapêutico do HIV, sendo eles: EFV, NVP, LPV/r, ATV;
2. Genotipar polimorfismos funcionais nos genes que codificam as principais isoenzimas metabolizadoras de fármacos da família CYP450 (CYP2B6, CYP3A4, CYP3A5) e nos genes da família P-gp de transportadores de fármacos; além de outras variantes associadas à variabilidade genética na resposta ao tratamento do HIV e correlacioná-los com os níveis plasmáticos dos ARVs;
3. Associar polimorfismos nos genes citados acima com a ocorrência de efeitos adversos da TARV;
4. Avaliar a eficácia da técnica de DBS em relação aos testes padrão para o monitoramento terapêutico da TARV.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Desconforto resultante da coleta de sangue por punção na veia antecubital ou na polpa do dedo

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 91.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: oep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 1.423.887

médio.

Benefícios:

Aqueles decorrentes dos avanços no conhecimento trazidos pelo projeto. Os resultados deste estudo poderão ser utilizados, no futuro, para definir a dose do medicamento e o melhor tratamento para cada paciente, evitando, assim, o uso desnecessário de medicamentos que causam vários efeitos colaterais, o que poderá levar a uma menor desistência do tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todas as solicitações e esclarecimentos foram realizados de maneira satisfatória. Aprovar projeto sem modificações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Aprovar projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

-

Considerações Finais a critério do CEP:

Todas as solicitações e esclarecimentos foram realizados de maneira satisfatória. Aprovar projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_603964.pdf	12/02/2016 11:58:16		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	cartaCEPUFC-SPAversao3.pdf	12/02/2016 11:45:54	Vanessa Suñe Mattevi	Aceito
Outros	cartaCEPUFC-SPAversao2.pdf	07/12/2015 15:23:29	Vanessa Suñe Mattevi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEgenotipagemv2.pdf	07/12/2015 15:22:47	Vanessa Suñe Mattevi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEpilotov2.pdf	07/12/2015 15:22:31	Vanessa Suñe Mattevi	Aceito

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 1.423.667

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_HIV_DBSversao2.pdf	07/12/2015 15:19:00	Vanessa Sufê Mattevi	Aceito
Outros	Ficha_coleta_Dados.pdf	15/10/2015 14:44:38	Carmela Farias da Silva Tagliari	Aceito
Outros	Termo_relatorio_sem_fin_UFCSPA.pdf	15/10/2015 14:37:00	Carmela Farias da Silva Tagliari	Aceito
Outros	Formulario_enc_CEP_FEEVALE.pdf	15/10/2015 14:36:32	Carmela Farias da Silva Tagliari	Aceito
Outros	Delegacao_funcoes_HCPA.pdf	15/10/2015 14:35:50	Carmela Farias da Silva Tagliari	Aceito
Outros	Anuencia_UFCSPA.pdf	15/10/2015 14:34:38	Carmela Farias da Silva Tagliari	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TCUD_inst_HCPA.pdf	15/10/2015 14:34:08	Carmela Farias da Silva Tagliari	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TCUD_HCPA.pdf	15/10/2015 14:33:45	Carmela Farias da Silva Tagliari	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TCUD_FEEVALE.pdf	15/10/2015 14:33:24	Carmela Farias da Silva Tagliari	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TCU_mat_blo_HCPA.pdf	15/10/2015 14:32:38	Carmela Farias da Silva Tagliari	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Pesq_responsavel_FEEVALE.pdf	15/10/2015 14:32:10	Carmela Farias da Silva Tagliari	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	IES_Co_HCPA.PDF	15/10/2015 14:31:35	Carmela Farias da Silva Tagliari	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	IES_Co_FEEVALE.pdf	15/10/2015 14:31:11	Carmela Farias da Silva Tagliari	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	15/10/2015 14:29:28	Carmela Farias da Silva Tagliari	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 1.423.667

PORTO ALEGRE, 25 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Julia Fernanda Semmelmann Perelra Lima
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 91.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

ANEXO B – Ficha coleta de dados

FICHA COLETA DE DADOS

1. Dados de identificação:

Prontuário (número):	Já participou do estudo? () Sim () Não
Nome:	
Data primeira consulta:	
Sexo:	() masculino () feminino
Data nascimento:	
Idade:	
Profissão:	
Estado civil:	
Escolaridade:	

2. Cor ou raça (formato censo IBGE):

- () branca
() preta
() amarela
() parda
() indígena

3. Data contaminação pelo vírus HIV:

4. Hora que tomou o último comprimido:

5. Informações medicamentos antirretrovirais (ARTs):

ART em uso	Data de início

5.1. ARTs já utilizados:

Nome ART	Data de início e tempo uso	Motivo troca

6. Informações sobre coinfeções e infecções oportunistas:

	OBSERVAÇÕES (medicamentos em uso, sorologia, etc)	
HCV	() sim () não	
HBV	() sim () não	
TB (ex: isoniazida, rifampicina)	() sim () não	
Outra coinfeção? (ex.: sífilis, doença de Chagas, leishmaniose)	() sim () não	
Infecção oportunista ativa? (ex.: candidíase)	() sim () não	
VACINAS	() sim () não	() HBV () Pmn23 () Influenza () F. Amarela () dT

7. Efeitos adversos medicamentos ART:

Lipodistrofia	() sim () não
Lipoatrofia	() sim () não
Lipohipertrofia	() sim () não
Padrão misto	() sim () não
Ocorrência exantemas pele	() sim () não
Tonturas, dores de cabeça	() sim () não

Outras queixas relatadas: (azia, enjoou, tremores nas mãos...)	

8. Dados antropométricos:

Peso atual (kg)	
Altura (m)	

	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Média aritmética	Soma das dobras
Circunferência da cintura (cm)					
Circunferência do quadril (cm)					
Circunferência do braço (cm)					
Circunferência do pescoço (cm)					
Dobra Cutânea Tríceps (mm)					
Dobra Cutânea Bíceps (mm)					
Dobra Cutânea Subescapular (mm)					
Dobra Cutânea Axilar média (mm)					
Dobra Cutânea Supraíliaca (mm)					
Dobra Cutânea Abdominal (mm)					
Dobra Cutânea Panturrilha Medial (mm)					
Dobra Polegar (mm)					
CBM (cm)					
RCQ (cm)					

9. Fatores de risco para doença cardiovascular (DCV):

Pratica atividade física?	() sim () não
Qual?	
Quantas vezes na semana?	
Por quanto tempo (min)?	
É fumante?	() sim () não
Possui Diabetes <i>Mellitus</i> ?	() sim () não
Pressão arterial	

10. Faz uso de estatinas?

() sim () não

Qual?

- () sinvastatina
 () atorvastatina
 () lovastatina
 () pravastatina
 () rosuvastatina
 () _____

11. Exames:

Exames laboratoriais	Resultados	Exames laboratoriais	Resultados
Hematócrito (Ht)		Ureia (U)	
Eritrócitos (RBC)		Glicose (Gli)	
Hemoglobina (Hb)		TGP (ALT – alanina)	
Hemoglobina glicada (HbA1C)		TGO (AST - aspartato)	
Colesterol total (CT)		Leucócitos (Leu)	
Colesterol HDL (HDLc)		Potássio (K)	
Colesterol LDL (LDLc)		CD4	
Triglicerídeos (TG)		CD8	
Bilirrubinas totais (BT)		CD4/CD8	
Bilirrubina direta (BD)		CV_1	
Bilirrubina indireta (BI)		CV_2	
Creatinina (C)			

12. Outros fármacos utilizados pelo paciente:

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – etapa 1

ETAPA 1 - Piloto

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto “Avaliação de polimorfismos em genes associados ao metabolismo e transporte de fármacos antirretrovirais e implementação da técnica DBS para monitoramento terapêutico em pacientes com HIV/AIDS”.

As pessoas que utilizam as medicações para o tratamento do HIV/AIDS convivem com trocas frequentes de medicamentos causadas por efeitos indesejados ou pela falta de efetividade de alguns deles, o que varia de pessoa para pessoa. Por este motivo, estamos realizando esta pesquisa, que tem como objetivo identificar as várias formas dos genes que cada pessoa possui que podem determinar o sucesso do tratamento com os medicamentos usados para o HIV/AIDS. Os resultados deste estudo poderão ser utilizados, no futuro, para definir a dose do medicamento e o melhor tratamento para cada paciente, evitando, assim, o uso desnecessário de medicamentos que causam vários efeitos colaterais, o que poderá levar a uma menor desistência do tratamento.

Concordando em participar do estudo, você será submetido a duas coletas de sangue: uma através da picada com agulha, que poderá deixar o local um pouco roxo; e outra coleta que será feita por um furo na extremidade do dedo médio com uma pequena agulha. Além disso, você responderá a algumas perguntas e serão realizadas medidas de peso, altura e dobras da pele. As coletas serão realizadas por pessoas habilitadas e com materiais descartáveis. Estas etapas demorarão cerca de 15 minutos.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que autorizo a minha participação neste projeto de pesquisa, pois fui informado de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e/ou coerção, a respeito dos objetivos, da justificativa e dos procedimentos aos quais serei submetido. Também fui informado dos riscos, desconfortos e benefícios da minha participação, todos acima listados.

Fui igualmente informado:

- da garantia de receber respostas ou esclarecimento sobre qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e outros detalhes relacionados com a pesquisa;
- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuação do meu tratamento;

- da garantia que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações obtidas serão utilizadas apenas para fins científicos vinculados ao presente projeto de pesquisa;

- do compromisso por parte dos pesquisadores de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que possa afetar a minha vontade em continuar participando;
- da disponibilidade de tratamento médico e indenizado, conforme estabelecido em legislação, caso existam danos a minha saúde diretamente causados por esta pesquisa;
- de que se existirem gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.
- de ser informado sobre os resultados e de suas implicações clínicas após o término do estudo;
- de que o material biológico que será coletado será armazenado, podendo ser utilizado para posteriores estudos;
- da utilização do material armazenado, que só ocorrerá mediante aprovação do novo projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa;

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto de Pesquisa são o Prof. Dr. Eduardo Sprinz (Fone: 3359-8152) e a Profª Drª Vanessa Suñé Mattevi (Fone: 3303-8763), tendo este documento sido revisado em seus aspectos éticos e metodológicos e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Em caso de dúvidas, posso contatar os pesquisadores responsáveis ou o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP/UFCSPA) no endereço Rua Sarmento Leite, 245, Porto Alegre/RS, telefone (51) 3303-8804 ou o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, localizado na Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre/RS, 2º andar, sala 2227A, telefone (51) 3359-7640). Ambos os contatos podem ser feitos diariamente entre 9 e 17h.

Eu, _____,
atesto o recebimento de uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme recomendações da Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP) e concordo em participar voluntariamente desta pesquisa.

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

Assinatura do participante

Assinatura da pesquisadora responsável

Concordo em deixar a minha amostra armazenada

ANEXO D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – etapa 2

Etapa 2 - Genotipagem

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto Avaliação de polimorfismos em genes associados ao metabolismo e transporte de fármacos antirretrovirais e implementação da técnica DBS para monitoramento terapêutico em pacientes com HIV/AIDS”.

As pessoas que utilizam as medicações para o tratamento do HIV/AIDS convivem com trocas frequentes de medicamentos causadas por efeitos indesejados ou pela falta de efetividade de alguns deles, o que varia de pessoa para pessoa. Por este motivo, estamos realizando esta pesquisa, que tem como objetivo identificar as várias formas dos genes que cada pessoa possui que podem determinar o sucesso do tratamento com os medicamentos usados para o HIV/AIDS. Os resultados deste estudo poderão ser utilizados, no futuro, para definir a dose do medicamento e o melhor tratamento para cada paciente, evitando, assim, o uso desnecessário de medicamentos que causam vários efeitos colaterais, o que poderá levar a uma menor desistência do tratamento.

Concordando em participar do estudo, você receberá um kit com instruções para a realização de uma coleta de sangue em sua casa, fazendo um furo na extremidade do dedo médio com uma pequena agulha e encostando em um papel. Este papel será colocado em um envelope selado que lhe será entregue juntamente com o kit de coleta e será enviado pelo correio para os pesquisadores responsáveis, sem nenhum custo para você. Além disso, você fornecerá uma amostra de saliva responderá a algumas perguntas e serão realizadas medidas de peso, altura e dobras da pele. As coletas serão realizadas por pessoas habilitadas e com materiais descartáveis. Estas etapas demorarão cerca de 15 minutos.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que autorizo a minha participação neste projeto de pesquisa, pois fui informado de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e/ou coerção, a respeito dos objetivos, da justificativa e dos procedimentos aos quais serei submetido. Também fui informado dos riscos, desconfortos e benefícios da minha participação, todos acima listados.

Fui igualmente informado:

- da garantia de receber respostas ou esclarecimento sobre qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e outros detalhes relacionados com a pesquisa;
- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuação do meu tratamento;
- da garantia que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações obtidas serão utilizadas apenas para fins científicos vinculados ao presente projeto de pesquisa;

- do compromisso por parte dos pesquisadores de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que possa afetar a minha vontade em continuar participando;
- da disponibilidade de tratamento médico e indenizado, conforme estabelecido em legislação, caso existam danos a minha saúde diretamente causados por esta pesquisa;
- de que se existirem gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.
- de ser informado sobre os resultados e de suas implicações clínicas após o término do estudo;
- de que o material biológico que será coletado será armazenado, podendo ser utilizado para posteriores estudos;
- da utilização do material armazenado, que só ocorrerá mediante aprovação do novo projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa;

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto de Pesquisa são o Prof. Dr. Eduardo Sprinz (Fone: 3359-8152) e a Profª Drª Vanessa Suñé Mattevi (Fone: 3303-8763), tendo este documento sido revisado em seus aspectos éticos e metodológicos e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Em caso de dúvidas, posso contatar os pesquisadores responsáveis ou o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP/UFCSPA) no endereço Rua Sarmento Leite, 245, Porto Alegre/RS, telefone (51) 3303-8804 ou o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, localizado na Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre/RS, 2º andar, sala 2227A, telefone (51) 3359-7640). Ambos os contatos podem ser feitos diariamente entre 9 e 17h.

Eu, _____, atesto o recebimento de uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme recomendações da Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP) e concordo em participar voluntariamente desta pesquisa.

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

Assinatura do participante

Assinatura da pesquisadora responsável

Concordo em deixar a minha amostra armazenada

16 CURRÍCULO LATTES



Carmela Farias da Silva Tagliari

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0607873371814784>
Última atualização do currículo em 08/01/2019

Doutoranda em Biociências (UFCSA) desenvolvendo um projeto de pesquisa com HIV na rede pública de saúde, especificamente na área de farmacogenômica, validação de metodologia analítica para monitoramento de fármacos antirretrovirais e investigação de variantes genéticas associadas ao desenvolvimento de lipodistrofia. É mestre em Patologia (UFCSA) com ênfase em genética experimental de doenças multifatoriais; especialista em Diagnóstico Genético e Molecular (ULBRA); especialista em Nutracêuticos, Nutricosméticos e Alimentos Funcionais (IPGS) e licenciada em Ciências Biológicas (UNISINOS). Ampla atuação em projetos de pesquisa (redação de projetos, delineamento de estudos, execução, construção de banco de dados, análise estatística (software SPSS) e redação científica), monitoria, orientações e treinamento de alunos de iniciação científica; elaboração de material didático para prática docente. Ainda, possui conhecimento em pesquisa clínica (GCP, CNS 466/2012, protocolos clínicos, ficha clínica e etc). Foi pesquisadora em diversos laboratórios de Biologia Molecular de Universidades no Rio Grande do Sul (UNISINOS, ULBRA, PUCRS, UFCSA), nas áreas de genética, biologia molecular e doenças complexas. Possui experiência profissional como coordenadora técnica licenciamento e fiscalização ambiental; supervisora acadêmica de pós-graduação stricto sensu, participação da construção de estratégias organizacionais e membro da comissão organizadora da Mostra de Iniciação Científica e Tecnológica; analista laboratorial. É atuante como pesquisadora e colaboradora de projetos de pesquisa com os seguintes temas: HIV, lipodistrofia, farmacogenômica, nutrigenômica, polimorfismos genéticos e biologia molecular. (Texto informado pelo autor)


Identificação

Nome	Carmela Farias da Silva Tagliari
Nome em citações bibliográficas	SILVA;Carmela Farias da;DA SILVA, CARMELA FARIAS;TAGLIARI-SILVA, C. F. da;TAGLIARI-SILVA, Carmela Farias da;TAGLIARI-SILVA, CF;CARMELA FS TAGLIARI;Tagliari CF;TAGLIARI, CARMELA FS

Endereço

Endereço Profissional	Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Laboratório de Biologia Molecular. Rua Sarmento Leite Centro Histórico 90050170 - Porto Alegre, RS - Brasil Telefone: (51) 35911122 Ramal: 3226 URL da Homepage: http://www.ufcsa.edu.br/
------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Formação acadêmica/titulação

2015	Doutorado em andamento em Biociências. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSA, Brasil. Orientador:  Vanessa Suñé Mattevi. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: Genética do HIV; Lipodistrofia; Farmacogenética; Nutrigenética. Grande área: Ciências Biológicas Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Doença crônica.
2012 interrompida	Doutorado interrompido em 2012 em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 6). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil. Título: Identificação de ligantes de CDK2 através de um estudo computacional. Orientador: Walter F. de Azevedo Jr. Ano de interrupção: 2012

2010 - 2012	<p>Palavras-chave: proteína quinase; regulação ciclo celular; mutação; neoplasia; docking molecular; bioinformática.</p> <p>Mestrado em Patologia (Conceito CAPES 5).</p> <p>Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.</p> <p>Título: Associação entre um polimorfismo no gene FTO e a obesidade infantil, Ano de Obtenção: 2012.</p> <p>Orientador: Vanessa Suñé Mattevi.</p> <p>Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.</p>
2017 - 2018	<p>Grande área: Ciências Biológicas</p> <p>Especialização em Nutracêuticos, nutricosméticos e alimentos funcionais. (Carga Horária: 432h).</p> <p>Instituto de Pesquisas Ensino e Gestão em Saúde - ENSINO, IPGS, Brasil.</p> <p>Título: Revisão do papel do resveratrol como indutor de histonas desacetilases (SIRT1) na obesidade.</p>
2009 - 2009	<p>Especialização em Diagnóstico Genético-Molecular.</p> <p>Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.</p> <p>Título: Avaliação dos Métodos de Diagnóstico do <i>Helicobacter pylori</i>.</p> <p>Orientador: Daniel Simon.</p>
2005 - 2008	<p>Graduação em Ciências Biológicas Licenciatura.</p> <p>Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, Brasil.</p> <p>Título: Esclerose Lateral Amiotrófica: uma revisão.</p> <p>Orientador: Ângelo Cássio Magalhães Horn.</p>

Formação Complementar

2009	<p>Patologia da Mama. (Carga horária: 14h).</p> <p>Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.</p>
2008	<p>Extensão universitária em Patologia e Imunologia. (Carga horária: 60h).</p> <p>Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, Brasil.</p>
2018 - 2018	<p>Educação Continuada em Pesquisa Clínica. (Carga horária: 21h).</p> <p>Unidade de Pesquisa Clínica Dr. Carlos Isaia Filho, UPC, Brasil.</p>
2017 - 2017	<p>Extensão universitária em Saúde intestinal, intolerâncias alimentares e FODMAPs. (Carga horária: 80h).</p> <p>Instituto de Pesquisas Ensino e Gestão em Saúde - ENSINO, IPGS, Brasil.</p>
2017 - 2017	<p>Extensão universitária em Oncologia: evidências e manejo nutricional. (Carga horária: 80h).</p> <p>Instituto de Pesquisas Ensino e Gestão em Saúde - ENSINO, IPGS, Brasil.</p>
2017 - 2017	<p>Extensão universitária em Elaboração do Manual de Boas Práticas Para Serviços de Alimentação. (Carga horária: 16h).</p> <p>Feevale, FEEVALE, Brasil.</p>
2017 - 2017	<p>Extensão universitária em Interpretação de testes em nutrigenômica. (Carga horária: 80h).</p> <p>Instituto de Pesquisas Ensino e Gestão em Saúde - ENSINO, IPGS, Brasil.</p>
2017 - 2017	<p>Validação de métodos bioanalíticos e equipamentos. (Carga horária: 4h).</p> <p>IX Congresso Internacional de Bioanálises, CIB, Brasil.</p>
2017 - 2017	<p>Boas práticas para serviços de alimentação. (Carga horária: 16h).</p> <p>Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial - RS, SENAC/RS, Brasil.</p>
2016 - 2016	<p>Extensão universitária em INTERAÇÕES MEDICAMENTOS-NUTRIENTES: UMA ABORDAGEM CLÍNICA. (Carga horária: 8h).</p> <p>Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.</p>
2016 - 2016	<p>Bioinformática. (Carga horária: 3h).</p> <p>Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.</p>
2016 - 2016	<p>Pesquisa Clínica. (Carga horária: 4h).</p> <p>Hospital do Câncer Mãe de Deus, HCMD, Brasil.</p>
2015 - 2015	<p>Toxicologia: Aspectos clínicos e laboratoriais. (Carga horária: 6h).</p> <p>Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.</p>
2014 - 2014	<p>Genética, Obesidade, Exercício Físico e Nutrição. (Carga horária: 7h).</p> <p>Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.</p>
2012 - 2012	<p>MLPA: FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE DOENÇAS GENÉTICAS. (Carga horária: 3h).</p> <p>Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.</p>
2012 - 2012	<p>Fiscal. Ambiental.: inovações da LC 140/11. (Carga horária: 14h).</p> <p>Federação das Associações de Municípios do Rio Grande do Sul, FAMURS, Brasil.</p>
2012 - 2012	<p>Bioinformática. (Carga horária: 32h).</p> <p>Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.</p>
2011 - 2012	<p>Espanhol. (Carga horária: 4h).</p> <p>Instituto Cervantes, IC, Brasil.</p>
2011 - 2011	<p>Extensão universitária em Excel Básico. (Carga horária: 15h).</p> <p>Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.</p>
2011 - 2011	<p>Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.</p>

	Genômica das doenças infecciosas. (Carga horária: 8h). Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.
2011 - 2011	Operação do Espectrofotômetro BioSpec Nano. (Carga horária: 4h). Instrumentação Científica LTDA, SINC, Brasil.
2011 - 2011	Espectrofotômetro BioSpec Nano. (Carga horária: 4h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2011 - 2011	IV Simpósio de Doenças Neurodegenerativas. (Carga horária: 27h). Sociedade de Neurologia e Neurocirurgia do Rio Grande do Sul, SNNRS, Brasil.
2010 - 2010	Extensão universitária em Conhecendo o EndNote: pesquisa e gerenciamento. (Carga horária: 4h). Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.
2010 - 2010	Extensão universitária em Metodologias Aplicadas ao Estudo da Cicatrização. (Carga horária: 3h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2010 - 2010	Curso introdutório ao SPSS. (Carga horária: 15h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.
2010 - 2010	IV Curso em Ciências Farmacêuticas. (Carga horária: 16h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.
2009 - 2009	Extensão universitária em Novas Tecnologias em Bio Molecular: Microarrays. (Carga horária: 1h). Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.
2009 - 2009	Extensão universitária em A Biologia Molecular na Identificação Humana. (Carga horária: 1h). Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.
2009 - 2009	Extensão universitária em Vírus respiratório sincicial e metapneumovírus. (Carga horária: 1h). Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.
2009 - 2009	Extensão universitária em Nutrigenética. (Carga horária: 1h). Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.
2009 - 2009	Extensão universitária em Atividade Antioxidante de Derivados de uva. (Carga horária: 1h). Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.
2009 - 2009	Extensão universitária em Citometria de Fluxo: transplante e reprodução. (Carga horária: 1h). Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.
2009 - 2009	Extensão universitária em Imuno Celular e Molecular no câncer. (Carga horária: 2009h). Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.
2009 - 2009	Extensão universitária em Resveratrol: Droga antienvhecimento. (Carga horária: 1h). Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.
2009 - 2009	Extensão universitária em Vírus respiratório: Influenza. (Carga horária: 1h). Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.
2009 - 2009	Extensão universitária em II Congresso Internacional de Bioanálises. (Carga horária: 15h). Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.
2009 - 2009	Como Solicitar e Analisar Exames Laboratoriais. (Carga horária: 8h). Instituto de Pesquisas Ensino e Gestão em Saúde - FENSINO. IPGS. Brasil.
2009 - 2009	A influência da genética nas doenças humanas. (Carga horária: 5h). II Congresso Internacional de Bioanálises, II CIB, Brasil.
2009 - 2009	Análise Morf. de Sangue Periférico e Coagulado. (Carga horária: 16h). Bressel Biologics, BRESSEL BIOLOGIC, Brasil.
2009 - 2009	II Ciclo de Palestras em Imunologia. (Carga horária: 9h). Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, IC/FUC, Brasil.
2008 - 2008	Extensão universitária em Radiologia Básica. (Carga horária: 16h). Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, Brasil.
2008 - 2008	Revisão de Conteúdos e perspectivas da Biologia. (Carga horária: 40h). Colégio Dom Feliciano, COLEGIO DOM FELI, Brasil.
2008 - 2008	Proposta prática em biologia. (Carga horária: 3h). Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, Brasil.
2008 - 2008	Plano de gerenciamento de resíduos sólidos (PGRS). (Carga horária: 3h). Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, Brasil.
2007 - 2007	Extensão universitária em Aplicação da microbiologia no meio ambiente. (Carga horária: 6h). Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, Brasil.
2006 - 2006	Expr.Gênica:Novas formas de análise e abordagem. (Carga horária: 3h). 52º Congresso Brasileiro de Genética, SBG, Brasil.
2006 - 2006	Genômica Funcional: métodos e aplicações. (Carga horária: 3h). 52º Congresso Brasileiro de Genética, SBG, Brasil.

Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, Brasil.

Vínculo institucional 2012 - 2015	Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Analista Acadêmica, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.
Vínculo institucional 2008 - 2008	Vínculo: Monitoria, Enquadramento Funcional: Monitoria, Carga horária: 12
Outras informações	Atuação como monitorea das disciplinas de Morfologia e Fisiologia Animal II e III (atividade comparada entre animais e humanos).
Vínculo institucional 2006 - 2007	Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estágio, Carga horária: 16
Outras informações Atividades 2/2006 - 9/2006	Linhagens de Spodoptera frugiperda, peixe dourado e Coleognathus Estágios , Centro de Ciências da Saúde, Área de Conhecimento e Aplicação de Biologia. Estágio realizado PCR, extração de DNA, gel de agarose.

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Vínculo institucional 2015 - Atual	Vínculo: Aluna Doutorado, Enquadramento Funcional: Aluna Doutorado
Vínculo institucional 2009 - 2012	Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estágio voluntário, Carga horária: 16
Atividades 07/2015 - Atual	Pesquisa e desenvolvimento , Laboratório de Biologia Molecular, , Linhas de pesquisa HIV e desenvolvimento lipodistrofia Polimorfismos genéticos em genes do metabolismo lipídico e metabólico Validação metodologia analítica para monitoramento de fármacos antirretrovirais Avaliação método diagnóstico lipodistrofia Polimorfismos genéticos em genes do metabolismo de fármacos antirretrovirais
04/2009 - Atual	Pesquisa e desenvolvimento , Laboratório de Biologia Molecular, , Linhas de pesquisa Obesidade Infantil

Fundação Municipal do Meio Ambiente, FMMA, Brasil.

Vínculo institucional 2012 - 2012	Vínculo: CC, Enquadramento Funcional: Diretora-técnica, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.
Outras informações	Atuação em Licenciamento Ambiental.

Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.

Vínculo institucional 2009 - 2009	Vínculo: Estágio Voluntário, Enquadramento Funcional: Esatagiária, Carga horária: 12
Atividades 04/2009 - 12/2009	Pesquisa e desenvolvimento , Laboratório de Biologia Molecular, , Linhas de pesquisa Dispepsia Funcional

Clínica de Medicina Preventiva e Estética, ZAFFY, Brasil.

Vínculo institucional 2009 - 2010	Vínculo: Prestação de Serviços, Enquadramento Funcional: Bióloga, Carga horária: 30
Outras informações	Atuação como Bióloga na análise celular - nutricional de sangue periférico e coagulado. Colaboração com médicas e nutricionistas para terapia ortomolecular.

Linhas de pesquisa

1.	Obesidade Infantil Objetivo: Associação entre o SNP rs9939609 do gene FTO e fenótipos relacionados ao ganho de peso em crianças e adolescentes. Grande área: Ciências Biológicas
2.	Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Biologia Molecular.
3.	HIV e desenvolvimento lipodistrofia
4.	Polimorfismos genéticos em genes do metabolismo lipídico e metabólico
5.	Validação metodologia analítica para monitoramento de fármacos antirretrovirais
6.	Avaliação método diagnóstico lipodistrofia
7.	Polimorfismos genéticos em genes do metabolismo de fármacos antirretrovirais Dispepsia Funcional

Objetivo: Analisar os métodos de diagnóstico para identificação do H. pylori em pacientes dispepticos no Brasil..

Grande área: Ciências Biológicas

Palavras-chave: H. pylori, fatores de virulência, métodos diag.

Projetos de pesquisa

2015 - Atual

Implementação da técnica DBS para monitoramento terapêutico de fármacos antiretrovirais (ARVs) e avaliação de polimorfismos em genes associados ao metabolismo lipídico e glicídico em pessoas vivendo com HIV/AIDS

Descrição: O vírus da imunodeficiência humana (HIV) infecta as células de defesa T CD4+ causando o enfraquecimento do sistema imunológico e favorecendo o aparecimento de doenças oportunistas. Na ocorrência dessa situação, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) se desenvolve. A prevalência de indivíduos vivendo com HIV/AIDS continua a crescer mundialmente, mas incidência de novas infecções cresce de forma particular em determinadas regiões do mundo. Com a introdução da terapia antiretroviral (TARV) foi proporcionada a melhoria no prognóstico, na qualidade e na expectativa de vida dos portadores do HIV. Porém, fatores como resistência viral, toxicidade dos fármacos e reações adversas como a lipodistrofia permanecem como empecilhos no sucesso do tratamento. Além disso, o estilo de vida e os fatores farmacogenéticos do hospedeiro contribuem para diferenças no metabolismo, transporte e sensibilidade aos medicamentos. Indivíduos sob TARV requerem o monitoramento da carga viral e, também, o acompanhamento dos níveis de fármacos circulantes para assegurar o sucesso terapêutico e evitar níveis sub-terapêuticos da TARV, o que aumenta o risco de falha virológica. Uma alternativa minimamente invasiva para dosagem plasmática dos fármacos é a técnica de mancha de sangue seco em papel (MSS). Esta técnica possui inúmeras vantagens em relação aos procedimentos padrões, uma vez que apresenta facilidade na coleta, transporte, armazenamento e, principalmente, a acessibilidade ao monitoramento da TARV em regiões remotas. Desta forma, o objetivo do estudo é implementar a metodologia de MSS para o monitoramento dos níveis plasmáticos dos medicamentos antiretrovirais, analisar a influência da variabilidade em genes candidatos associados ao metabolismo e transporte de fármacos utilizados na TARV sobre os seus níveis plasmáticos e efeitos adversos e investigar polimorfismos em genes do metabolismo lipídico e metabólico na ocorrência de lipodistrofia. Através destas estratégias, busca-se maximizar o sucesso terapêutico e melhorar a qualidade de vida em pacientes infectados pelo HIV sob TARV..

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (5) / Mestrado acadêmico: (2) / Doutorado: (1) .

Integrantes: Carmela Farias da Silva Tagliari - Integrante / Vanessa Suñé Mattevi - Coordenador / Alice Eloisa Szlachta - Integrante / Rafael Linden - Integrante / Eduardo Sprinz - Integrante / Rosmeri Kuhmmer Lazzaretti - Integrante / Regina Kuhmmer Notti - Integrante / Greice Meyer Vogel - Integrante / Cären Nunes de Oliveira - Integrante / Patrícia Baptista da Silva - Integrante / Érica Zeferino de Aguiar - Integrante / Caroline de Araújo Baroco - Integrante / Letícia da Cunha Veber - Integrante.

2011 - 2014

Dislipidemia

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) Doutorado: (1) .

Integrantes: Carmela Farias da Silva Tagliari - Integrante / Vanessa Suñé Mattevi - Integrante / Marília Remuzzi Zandoná - Integrante / Liane Nanci Rotta - Integrante / Mária Regina Vitolo - Coordenador.

2009 - 2014

Obesidade Infantil

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Carmela Farias da Silva Tagliari - Integrante / Vanessa Suñé Mattevi - Coordenador.

2009 - 2009

Dispepsia Funcional

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Carmela Farias da Silva Tagliari - Coordenador / Daniel Simon - Integrante. Esclerose Lateral Amiotrófica: uma revisão

2008 - 2008

Descrição: Produção de monografia a respeito da patologia Esclerose Lateral Amiotrófica. O objetivo deste trabalho foi revisar os diferentes aspectos da esclerose lateral amiotrófica (ELA) como: suas características, sua incidência, suas causas prováveis e os tratamentos adotados após seu diagnóstico..

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Carmela Farias da Silva Tagliari - Coordenador.

2006 - 2007

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM INSETOS-PRAGA DO ARROZ IRRIGADO NO RS. Descrição: As atividades desenvolvidas têm por objetivo fornecer informações sobre a estrutura genética (níveis e distribuição geográfica da variabilidade genética) das

populações naturais de *Oryzophagus oryzae* e *Spodoptera frugiperda* como subsídio para programas de manejo e controle biológico. As atividades desenvolvidas serão Revisão bibliográfica, Extração de DNA, Seleção de primers, Amplificação de DNA, Preparação de DNA para sequenciamento, Análise de dados e Apresentação em Congressos. Num primeiro momento as atividades envolverão principalmente o processamento de amostras já existentes no laboratório, o que incluirá: extração de DNA, reação de amplificação das regiões COI e COII, purificação dos produtos de PCR e preparação e envio para sequenciamento..

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (0) / Especialização: (0) / Mestrado acadêmico: (0) /

Mestrado profissional: (0) / Doutorado: (0) .

Integrantes: Carmela Farias da Silva Tagliari - Coordenador / Milena Wunder - Integrante / Vanessa Dido Baldissera - Integrante / Pablo Gonçalves - Integrante.

Áreas de atuação

1.	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Infecção HIV.
2.	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Doenças crônicas.
3.	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Genética.
4.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Farmacogenética e nutrigenética.
5.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Biologia Molecular.
6.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Licenciamento Ambiental.

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
Português	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Espanhol	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

1. MATTEVI, VANESSA S ; TAGLIARI, CARMELA FS . Pharmacogenetic considerations in the treatment of HIV. *PHARMACOGENOMICS* **JCR**, v. 18, p. 85-98, 2017.
2. ★ DA SILVA, CARMELA FARIAS; ZANDONÁ, MARÍLIA REMUZZI ; VITOLO, MÁRCIA REGINA ; CAMPAGNOLO, PAULA DAL BÓ ; ROTTA, LIANE NANJI ; ALMEIDA, SILVANA ; MATTEVI, VANESSA SUÑÉ . Association between a frequent variant of the FTO gene and anthropometric phenotypes in Brazilian children. *BMC Medical Genetics (Online)* **JCR**, v. 14, p. 34-8, 2013.
Citações: **WEB OF SCIENCE** 7 | **SCOPUS** 11

Apresentações de Trabalho

1. ★ TAGLIARI, CARMELA FS; SZLACHTA, A. E. ; LINDEN, R. ; SPRINZ, E. ; NOTTI, R. K. ; LAZZARETTI, R. K. ; VASQUES, V. S. ; MATTEVI, VANESSA S . IMPLEMENTAÇÃO DA TÉCNICA DBS PARA MONITORAMENTO TERAPÊUTICO EM PACIENTES COM HIV/AIDS. 2017. (Apresentação de Trabalho/Outra).
2. TAGLIARI-SILVA, C. F. da; LINDEN, R. ; SPRINZ, E. ; LAZZARETTI, R. K. ; NOTTI, R. K. ; MATTEVI VS . Avaliação de SNPs em genes do metabolismo e transporte de fármacos ART e implementação da técnica DBS para monitoramento terapêutico em pacientes com HIV/AIDS. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Demais tipos de produção técnica

1. ★ SILVA. Revisão de conteúdos e perspectivas da Biologia. 2008. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

Bancas

Participação em bancas de trabalhos de conclusão

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. **SILVA; GASPAROTTO, A. S.**, Participação em banca de Vitória Rocha Foigt. Avaliação da Influência do Polimorfismo rs713041 no Gene GPX4 na Susceptibilidade ao Carcinoma Hepatocelular. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Participação em bancas de comissões julgadoras

Outras participações

1. **SILVA**, Perda da Expressão dos Genes GADD45y e MEG3 em Adenomas Hipofisários Esporádicos. 2011. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
2. **SILVA**, Análise da Degradação de Petróleo em Meio Aquoso a partir da Ação de Micro-organismos Isolados do Solo. 2011. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
3. **SILVA**, Avaliação da Biocompatibilidade de PLGA no Desenvolvimento de Polímero como Câmara de Regeneração de Nervos Periférico em Ratos. 2011. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
4. **SILVA**, Eutanásia em recém-nascidos. 2011. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
5. **SILVA**, Maternidade Responsável e Reprodução Assistida: Limites Bioéticos e Jurídicos dos Direitos Reprodutivos da Mulher. 2011. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
6. **SILVA**, A Influência da Expressão Gênica do Receptor de Estrogênio no Hipocampo de Ratas Wistar Lactantes no Comportamento Materna. 2010. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
7. **SILVA**, Anormalidades Citogenéticas em Pacientes com Fenótipo de Espectro Óculo-Aurículo-Vertebral Identificadas Através do Cariótipo de Alta Resolução e. 2010. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
8. **SILVA**, Análise da Expressão do Gene MEG3 em Adenomas Hipofisários Clinicamente Funcionantes e Não Funcionantes. 2010. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
9. **SILVA**, Avaliação da Influência dos Polimorfismos 5-HTTLPR e 5-HTTVNTR do Gene do Transportador de Serotonina (5-HTT) com Ingestão Alimentar e Parâmetros. 2010. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
10. **SILVA**, Caracterização Clínica e Citogenética de Pacientes com Diagnóstico de Síndrome de Down Atendidos no Serviço de Genética Clínica da UFCSPA/ CHSCPA. 2010. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. III Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão. Implementação da técnica DBS para o monitoramento terapêutico em pacientes com HIV/AIDS. 2017. (Feira).
2. IX Congresso Internacional de Bioanálises. 2017. (Congresso).
3. 3 Congresso Multidisciplinar em Oncologia do Hospital Mãe de Deus. 2016. (Congresso).
4. I Encontro PPG Biociências, XIX Encontro Geneticistas RS, E. Avaliação de SNPs em genes do metabolismo e transporte de fármacos ART e implementação da técnica DBS para o monitoramento terapêutico de fármacos em pacientes com HIV/AIDS. 2016. (Encontro).
5. Dia Mundial da Água. Dia Mundial da Água - Rio Gravataí. 2012. (Encontro).
6. XXIV Congresso Brasileiro de Genética Médica. Associação entre uma variante do gene FTO e fenótipos associados à obesidade em crianças brasileira. 2012. (Congresso).
7. XXIV Congresso Brasileiro de Genética Médica. 2012. (Congresso).
8. 6 Congresso Gaúcho de Neurologia e Neurocirurgia. 2011. (Congresso).
9. I Simpósio dos Programas de Pós-Graduação da UFCSPA. Metodologias Experimentais: Perspectivas de Inovação Tecnológica. 2010. (Simpósio).
10. RABU - Reunião Acadêmica da Biologia da Unisinos. Aplicação da microbiologia no meio ambiente. 2007. (Oficina).
11. 52º Congresso Brasileiro de Genética. Identificação das linhagens de arroz e milho de Spodoptera frugiperda através da técnica de PRC-RFLP no RS. 2006. (Congresso).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. ★ **SILVA**, Revisão de conteúdos e perspectivas da Biologia. 2008. (Outro).

Orientações

Orientações e supervisões em andamento

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. Greice Meyer Vogel. Avaliação do índice de adiposidade corporal (BAI) como diagnóstico de lipodistrofia em pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA). Início: 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. (Orientador).

Inovação

Projetos de pesquisa

2015 - Atual

Implementação da técnica DBS para monitoramento terapêutico de fármacos antirretrovirais (ARVs) e avaliação de polimorfismos em genes associados ao metabolismo lipídico e glicídico em pessoas vivendo com HIV/AIDS

Descrição: O vírus da imunodeficiência humana (HIV) infecta as células de defesa T CD4+ causando o enfraquecimento do sistema imunológico e favorecendo o aparecimento de doenças oportunistas. Na ocorrência dessa situação, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) se desenvolve. A prevalência de indivíduos vivendo com HIV/AIDS continua a crescer mundialmente, mas incidência de novas infecções cresce de forma particular em determinadas regiões do mundo. Com a introdução da terapia antirretroviral (TARV) foi proporcionada a melhoria no prognóstico, na qualidade e na expectativa de vida dos portadores do HIV. Porém, fatores como resistência viral, toxicidade dos fármacos e reações adversas como a lipodistrofia permanecem como empecilhos no sucesso do tratamento. Além disso, o estilo de vida e os fatores farmacogenéticos do hospedeiro contribuem para diferenças no metabolismo, transporte e sensibilidade aos medicamentos. Indivíduos sob TARV requerem o monitoramento da carga viral e, também, o acompanhamento dos níveis de fármacos circulantes para assegurar o sucesso terapêutico e evitar níveis sub-terapêuticos da TARV, o que aumenta o risco de falha virológica. Uma alternativa minimamente invasiva para dosagem plasmática dos fármacos é a técnica de mancha de sangue seco em papel (MSS). Esta técnica possui inúmeras vantagens em relação aos procedimentos padrões, uma vez que apresenta facilidade na coleta, transporte, armazenamento e, principalmente, a acessibilidade ao monitoramento da TARV em regiões remotas. Desta forma, o objetivo do estudo é implementar a metodologia de MSS para o monitoramento dos níveis plasmáticos dos medicamentos antirretrovirais, analisar a influência da variabilidade em genes candidatos associados ao metabolismo e transporte de fármacos utilizados na TARV sobre os seus níveis plasmáticos e efeitos adversos e investigar polimorfismos em genes do metabolismo lipídico e metabólico na ocorrência de lipodistrofia. Através destas estratégias, busca-se maximizar o sucesso terapêutico e melhora a da qualidade de vida em pacientes infectados pelo HIV sob TARV.. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (5) / Mestrado acadêmico: (2) / Doutorado: (1) .

Inovação

Projetos de pesquisa

2015 - Atual

Implementação da técnica DBS para monitoramento terapêutico de fármacos antirretrovirais (ARVs) e avaliação de polimorfismos em genes associados ao metabolismo lipídico e glicídico em pessoas vivendo com HIV/AIDS

Descrição: O vírus da imunodeficiência humana (HIV) infecta as células de defesa T CD4+ causando o enfraquecimento do sistema imunológico e favorecendo o aparecimento de doenças oportunistas. Na ocorrência dessa situação, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) se desenvolve. A prevalência de indivíduos vivendo com HIV/AIDS continua a crescer mundialmente, mas incidência de novas infecções cresce de forma particular em determinadas regiões do mundo. Com a introdução da terapia antirretroviral (TARV) foi proporcionada a melhoria no prognóstico, na qualidade e na expectativa de vida dos portadores do HIV. Porém, fatores como resistência viral, toxicidade dos fármacos e reações adversas como a lipodistrofia permanecem como empecilhos no sucesso do tratamento. Além disso, o estilo de vida e os fatores farmacogenéticos do hospedeiro contribuem para diferenças no metabolismo, transporte e sensibilidade aos medicamentos. Indivíduos sob TARV requerem o monitoramento da carga viral e, também, o acompanhamento dos níveis de fármacos circulantes para assegurar o sucesso terapêutico e evitar níveis sub-terapêuticos da TARV, o que aumenta o risco de falha virológica. Uma alternativa minimamente invasiva para dosagem plasmática dos fármacos é a técnica de mancha de sangue seco em papel (MSS). Esta técnica possui inúmeras vantagens em relação aos procedimentos padrões, uma vez que apresenta facilidade na coleta, transporte, armazenamento e, principalmente, a acessibilidade ao monitoramento da TARV em regiões remotas. Desta forma, o objetivo do estudo é implementar a metodologia de MSS para o monitoramento dos níveis plasmáticos dos medicamentos antirretrovirais, analisar a influência da variabilidade em genes candidatos associados ao metabolismo e transporte de fármacos utilizados na TARV sobre os seus níveis plasmáticos e efeitos adversos e investigar polimorfismos em genes do metabolismo lipídico e metabólico na ocorrência de lipodistrofia. Através destas estratégias, busca-se maximizar o sucesso terapêutico e melhorar a qualidade de vida em pacientes infectados pelo HIV sob TARV.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (5) / Mestrado acadêmico: (2) / Doutorado: (1) .

Educação e Popularização de C & T

Apresentações de Trabalho

1. **TAGLIARI-SILVA, C. F. da;** LINDEN, R. ; SPRINZ, E. ; LAZZARETTI, R. K. ; NOTTI, R. K. ; MATTEVI VS . Avaliação de SNPs em genes do metabolismo e transporte de fármacos ART e implementação da técnica DBS para monitoramento terapêutico em pacientes com HIV/AIDS. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 17/06/2019 às 23:35:46

[Imprimir currículo](#)