

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS



INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES APOC3, CETP, ECA, ACTN3
NO SUCESSO DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL HIPOLIPEMIANTE EM
PACIENTES HIV POSITIVO

LAURA CARNEIRO DA ROSA ARANALDE

Pelotas, 2015

LAURA CARNEIRO DA ROSA ARANALDE

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES APOC3, CETP, ECA, ACTN3
NO SUCESSO DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL HIPOLIPEMIANTE EM
PACIENTES HIV POSITIVO**

Dissertação apresentada como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição. Universidade Federal de Pelotas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Castilhos de Barros

Co-Orientador: Prof. Dr. Augusto Schneider

Pelotas, 2015

Data da Defesa: 27 de março de 2015.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Castilho de Barros (Presidente)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Mogi das Cruzes.

Prof. Dr. Rafael Bueno Orcy (Titular)
Doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof^a. Dr Francisco Augusto Burkert Del Pino (Titular)
Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof^a. Dr^a Renata Torres Abib (Suplente)
Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Cada uno da lo que recibe
Y luego recibe
lo que da
Nada es más simple
No hay otra norma
Nada se pierde
Todo se transforma

Jorge Drexter

AGRADECIMENTO.

A Deus por ter me dado força, foco, fé e por ter colocado pessoas tão maravilhosas no meu caminho. *O Senhor é meu pastor e nada me faltará.*

Aos meus pais pelo amor, educação e princípios que fizeram de mim uma pessoa tão forte e determinada em busca dos meus sonhos.

Ao meu orientador Carlos Castilhos de Barros, pelos ensinamentos, paciência, amizade e pelos momentos de descontração junto aos amigos mestrando a beira do São Gonçalo. Realmente fostes e és incrível, espero que essa parceria segua por muitos bons anos.

Ao meu co-orientador Augusto Schneider pela calma e serenidade em momentos de dúvidas e estresse, por fazer parte do grupo de amigos nos momentos de descontração.

Aos meus colegas de mestrado, Rogerio, Julia, Fernanda, Katharine, Thais e Suely pela amizade, pelos bons momentos, pela grande parceria e risadas na “Gonçalves” e não esqueçam a promessa da Copa do Mundo de 2018

À Bruna Pederzoli pela amizade, pela ajuda, pela paciência, pela dedicação, sem você realmente teria sido muito mais difícil.

Ao laboratório de Nutrifisiogenômica que permitiu a realização desse experimento e a todos que fazem parte dele, que sempre me ajudaram quando solicitei.

Ao Hospital Dia/Furg por possibilitar a minha coleta de dados e por ter me dado a oportunidade de atender pessoas tão frágeis e tão fortes ao mesmo tempo e poder transmitir a elas uma melhor ideia de qualidade de vida.

A toda a equipe do Hospital Dia/Furg pelo acolhimento, amizade e carinho, em especial a enfermeira Maiba Mikael Nader pela disponibilidade e ajuda nas coletas.

As minhas colegas nutricionistas do HU/FURG, Aline, Grace, Cintia e Juliana e a nossa secretária Fabiana, pela coopreensão da minha ausencia e meu estresse, pela amizade e companherismo.

A todos os professores, funcionarios e colegas do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Univerisidade Federal de Pelotas.

RESUMO

Este estudo avaliou a influência de polimorfismos em 4 genes relacionados com dislipidemia e alterações metabólicas (APOC3, CEPT, ECA e ACTN3), sobre a intervenção nutricional em pacientes dislipidêmicos infectados pelo HIV em terapia antirretroviral (TARV). Amostras de saliva foram coletadas de 65 pacientes em um serviço de referência na cidade de Rio Grande, no Sul do Brasil. A genotipagem foi realizada através da reação em cadeia da polimerase e técnica de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição. A prevalência de mulheres foi de 69,2% vs 30,7% dos homens, observou-se que entre sexo feminino 77% delas faz uso de IP na TARV contra apenas 33,3% nos homens. A intervenção nutricional melhorou os parâmetros antropométricos como massa corpórea, IMC e circunferência abdominal em quase todos os genótipos, sendo o genótipo II do gene da ECA obteve uma melhor resposta. Em relação ao perfil lipídico, não houve diferença significativa entre os genótipos estudados, com exceção do polimorfismo da ACTN3, onde os indivíduos do genótipo RR apresentaram glicemia mais baixa (RR – $95,4 \pm 6,5$; RX – $102,6 \pm 10,6$; XX – $110,1 \pm 16,3$), uma tendência de menores valores para TG (RR – $156,6 \pm 78,1$; RX – $173,5 \pm 78,3$; XX – $181,6 \pm 94,0$) e uma redução do LDL quando comparados a coleta do terceiro momento em relação a primeira coleta (RR – $-23,7 \pm 74,3$; RX $1,32 \pm 28,6$; XX $30,21 \pm 54,6$). Concluindo, nossos resultados mostram que o polimorfismo R577X da ACTN3 pode influenciar tanto o perfil lipídico de pacientes HIV+, como determinar o prognóstico da intervenção nutricional quanto à redução de LDL. Além disso, mostramos uma maior prevalência de mulheres infectadas procurando orientação nutricional, e que estas tendem a fazer maior uso de IP junto a TARV. Adicionalmente, pacientes usando IP respondem melhor a intervenção nutricional com relação à perda de peso, mas pior quanto à melhora do perfil lipídico, sugerindo a necessidade do uso de hipolipemiantes orais neste grupo de pacientes.

Palavras-Chave: HIV positivo, polimorfismos, genes, intervenção nutricional, terapia antirretroviral, dislipidemia.

ABSTRACT

This study evaluated the influence of polymorphisms in four genes related to dyslipidemia and metabolic changes (APOC3, CEPT, ACE and ACTN3) on the nutritional intervention in dyslipidemic HIV-infected patients on antiretroviral therapy (ART). Saliva samples were collected from 65 patients in a reference center in the city of Rio Grande, in southern Brazil. Genotyping was performed by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism technique. The prevalence of women was 69.2% vs. 30.7% of men, it was observed that among women 77% of them make use of PI on ART compared to only 33,3% in men. Nutritional intervention improved anthropometric parameters as body-weight, BMI and abdominal circumference in almost all genotypes, but the II genotype of ACE gene got a better response for relative body weight. Regarding the lipid profile, there was no significant difference between the genotypes studied, with the exception of polymorphism ACTN3, where individuals of the RR genotype had lower blood glucose (RR - 95.4 ± 6.5 ; RX - 102.6 ± 10.6 ; XX - 110.1 ± 16.3), a tendency to lower values for TG (RR - 156.6 ± 78.1 ; RX - 173.5 ± 78.3 ; XX - 181.6 ± 94 ,) and a reduction in LDL compared the collection of the third moment about the first collection (RR - 23.7 ± 74.3 ; RX 1.32 ± 28.6 ; XX 30.21 ± 54.6). In conclusion, our results show that the R577X polymorphism ACTN3 can influence both the lipid profile of HIV+ patients, how to determine the prognosis of nutritional intervention in reducing LDL. In addition, we show a higher prevalence of infected women looking for nutritional guidance, and these tend to make greater use of PI with ART. Additionally, patients using PI respond better nutritional intervention with respect to weight loss, but worse on the improvement of the lipid profile, suggesting the need for the use of lipid-lowering in these patients.

Keywords: HIV positive, polymorphisms, genes, nutrition intervention, antirretroviral therapy, dyslipidemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo da Replicação Viral	17
Figura 2.	Graficos mostrando a distribuição dos polimorfismos em desequilibrio segundo Hardy-Weinberg nos pacientes HIV positivo e suas referências mundias.....	38

TABELAS

Tabela 1 – Classes de Medicamentos antirretrovirais.....	19
Tabela 2 – Primers utilizados na genotipagem do polimorfismo R577X do gene da ACTN3	36
Tabela 3 – Características amostral de gênero e genótipo	39
Tabela 4 – Medidas antropométricas e a relação com o genótipo.....	42
Tabela 5 – Medidas bioquímicas e a relação com o genótipo	43
Tabela 6 – Resultados da Intervenção nutricional e a relação com o genótipo.....	44
Tabela 7 - Resultados da intervenção nutricional e a relação com o tipo de TARV...	45

LISTA DE ABREVIATURA

Actn 3 - Proteína actinina 3

ACTN3 - Gene da actinina 3

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

APOC3 - Apolipoproteína C3

APOE - Apolipoproteína E

AZT - Zidovudina

CA - Circunferência Abdominal

CCR5 - Receptores químicos tipo 5

CD4 - Glicoproteína Imunológica

CEPT - Proteína Transferidora de Estéres de Colesterol

COL - Colesterol

CRABP-1 Proteína Citoplasmática Tipo 1 Ligadora do Ácido Retinóico

CXCR4 - Receptores químicos tipo 4

DNA - Ácido desoxirribonucleico

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HVE - Hipertrofia Ventricular Esquerda

IC - Insuficiência Cardíaca

IMC - Índice de Massa Corporal

IP - Inibidores da Protease

IR – 24h - Recordatório Alimentar de 24 horas

IRE - Insulin Response Element

ITRN - Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa

ITRNN - Inibidores Não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LH - Lipase Hepática

LPL - Lipase Lipoproteica

NCEP - National Cholesterol Education Program

RASS - Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

SNPS - Polimorfismo de nucleotídeo único

SREBPS - Proteínas de Ligação a Elemento Regulador de Esterol

TARV - Terapia antirretroviral

TG - Triglicerídeos

UNAIDS - Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 O Vírus Da Imunodeficiência Humana.....	16
2.2 A Terapia Antirretroviral (TARV)	18
2.3 A Influência Genética no Perfil Lipídico e em Alterações Metabólicas.	21
2.3.1 Apolipoproteína C3 (APOC3)	23
2.3.2 Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP).....	24
2.3.3 Enzima Conversora da Angiotensina I (ECA):.....	25
2.3.4 Actinina – 3 (ACTN3).	26
3 HIPÓTESES	29
4 OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo Geral.....	30
4.2 Objetivos Específicos	30
5 MÉTODOS	31
5.1 Amostra.....	31
5.2 Critérios de Inclusão	31
5.3 Critérios de Exclusão	31
5.4 Coleta de Dados	32
5.5 Avaliação Antropométrica.....	32
5.6 Avaliação Bioquímica	33
5.7 Avaliação Dietética	33
5.8 Coleta de material biológico para a extração do DNA genômico.....	34
5.9 Extração do DNA genômico	34
5.9.1 Amplificação do DNA	35
5.9.1.1 Genotipagem Apolipoproteína C3 (APOC3).....	35
5.9.1.2 Genotipagem da Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP)	35
5.9.1.3 Genotipagem da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA).....	36
5.9.1.4 Genotipagem da ACTN3	36
5.10 Análise estatística.....	37
6 RESULTADOS	38
6.1 Pacientes do sexo feminino usam mais IP:	38
6.2 Intervenção nutricional melhora peso, IMC e CA:	41
6.3 Análise do efeito do genótipo e da intervenção nutricional no perfil lipídico e glicêmico ...	41
6.4 Indivíduos RR do gene ATCN3 reduziram LDL com intervenção nutricional.....	41

6.5 Uso de IP na TARV.	42
7 DISCUSSÃO	47
8 REFERÊNCIAS	50
9 ANEXOS.....	60
Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	60
Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética, Faculdade de Medicina UFPEL.	62
Anexo 3: Autorização da Direção do Hospital Universitário.	65
Anexo 4: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa na área da Saúde- FURG.....	66
ARTIGO	67
Abstract	68
Methods:	70
Results:	72
Discussion:	74
List of Tables And Figures	78
References:	81

1 INTRODUÇÃO.

A epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) continua a ser um dos grandes desafios para a saúde global. Aproximadamente 33 milhões de pessoas vivem com o vírus da Imunodeficiência humana (HIV) em todo o mundo (UNAIDS, 2015). Após a identificação do HIV como o vírus causador da AIDS, vários avanços têm ocorrido no desenvolvimento de drogas efetivas para o tratamento desse vírus. A Terapia antirretroviral (TARV) tem aumentado a expectativa de vida desses pacientes, porém tem trazido alterações metabólicas como hipercolesterolemia, hipertriglicemia e diabetes, o que tem contribuindo para o aumento do risco de doenças cardiovasculares.

Nos últimos anos tem sido observado uma série de anormalidades na distribuição da gordura corporal desse pacientes em uso de TARV (principalmente causada pelos inibidores da protease), chamada de lipodistrofia. A lipodistrofia é caracterizada pelo acúmulo de gordura na região dorso cervical, aumento da circunferência abdominal e do tamanho das mamas e pela redução da gordura em face, glúteos e membros (FOCCACCIA, 2010). Os mecanismos exatos pelos quais os inibidores da protease provocam alterações metabólicas ainda não são completamente esclarecidos. Sabe-se que este efeito se deve a inibição inespecífica de algumas proteases do hospedeiro, uma vez que a família das proteases é muito numerosa, e encontrar um inibidor que atue somente na protease viral é muito difícil. Algumas evidências demonstram que esta inibição indesejável das proteases do paciente causa toxicidade mitocondrial e alterações como aumento da apoptose e diferenciação celular, principalmente no tecido adiposo, tendo um papel importante nas alterações desses indivíduos.

A identificação dos componentes genéticos que podem influenciar nessas mudanças no metabolismo tem sido investigada nos últimos anos. Esses estudos ainda não descrevem quais são os polimorfismos ligados à resposta dos indivíduos ao tratamento dietético. Desta forma, verificar a associação dos polimorfismos genes APOC3, CETP, ECA e ACTN3 com alterações no perfil lipídico e alterações

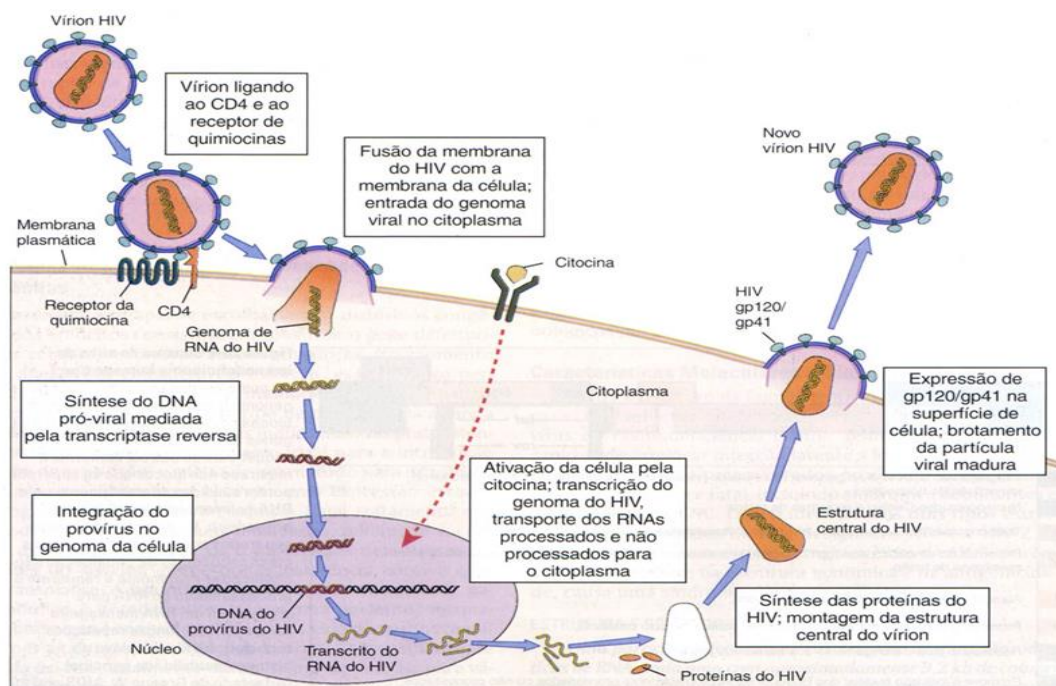
metabólicas em pacientes infectados pelo HIV/AIDS em uso de terapia antirretroviral, submetidos a intervenção nutricional em um referência em HIV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Vírus Da Imunodeficiência Humana

A AIDS foi reconhecida em meados de 1981, nos EUA, a partir da identificação de um número elevado de pacientes adultos do sexo masculino, homossexuais que apresentavam sarcoma de Kaposi, pneumonia por *Pneumocystis carinii* e comprometimento do sistema imune. Todos estes fatos convergiram para a conclusão de que se tratava de uma nova doença, ainda não classificada, de etiologia provavelmente infecciosa e transmissível (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1981). Em 1983 o agente etimológico foi identificado: tratava-se de um retrovírus humano, atualmente denominado HIV. Este pertence ao grupo dos retrovírus citopáticos e não-oncogênicos, os quais necessitam para multiplicar-se de uma enzima denominada transcriptase reversa, responsável pela transcrição do RNA viral para um fragmento de DNA. A integração deste DNA ao genoma do hospedeiro é feita pela ação de outra enzima viral conhecida como integrase. Embora não se saiba ao certo qual a origem do HIV, sabe-se que uma grande família de retrovírus relacionados a eles está presente em primatas não humanos, na África (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1981).

A infecção pelo HIV inicia-se com a entrada do vírus na célula através da ligação dupla com uma proteína de superfície denominada CD4 e mais outros correceptor do sistema imune (FIGURA 1). CD4 é uma glicoproteína imunológica, que se expressa na superfície de algumas células, como os linfócitos T *auxiliares*, macrófagos, monócitos e células dendríticas. A maior parte da replicação pelo HIV ocorre em linfócitos contendo a molécula de CD4, essas são células de defesa humana, e a sua diminuição, devido à infecção com o HIV, torna o paciente susceptível a infecções oportunistas (FOCACCIA, 2010). Porém com o passar do tempo, ficou claro que a molécula de CD4, não poderia ser o único ligante do HIV, pois haviam outras células susceptíveis a infecção viral que não apresentavam a molécula de CD4 em sua superfície. Posteriormente foi descoberto que as moléculas CXCR4 e CCR5, também eram correceptoras do HIV (ALKHATIB, 1996). CXCR4 e CCR5 são receptores de quimiotaxinas que funcionam como ligantes para o HIV (FOCACCIA, 2010).



Fonte: The Biology Project, 2000.

Figura 1. Ciclo de replicação viral.

A epidemia de infecção pelo HIV é hoje um fenômeno de grande extensão no Brasil. O primeiro caso de AIDS foi notificado retrospectivamente na cidade de São Paulo, em 1980 (BRASIL, 2014). Desde o início da epidemia até julho de 2014, segundo o último boletim epidemiológico, foram registrados no país 757.042 casos de AIDS e a taxa de incidência no Brasil foi de 20,5 casos por 100 mil habitantes. A distribuição proporcional dos casos de AIDS no Brasil, segundo região, mostra uma concentração dos casos nas regiões Sudeste e Sul, correspondendo a 54,4% e 20,0% do total de casos identificados de 1980 até junho de 2014; as regiões Nordeste, Centro-Oeste e Norte correspondem a 14,3%, 5,8% e 5,4% do total dos casos, respectivamente (BRASIL 2014). Em 2013, o ranking da taxa de detecção de AIDS entre as Unidades da Federação indica que os estados do Rio Grande do Sul e Amazonas apresentam as maiores taxas, com valores de 41,3 e 37,4 casos para cada 100 mil habitantes. Além disso, observa-se que, entre os estados, quinze apresentam taxa inferior à média nacional, possuindo o Acre a menor taxa, 8,6 casos para cada 100 mil habitantes. Por outro lado, entre as capitais, apenas duas apresentam valor inferior à média nacional, João Pessoa e Rio Branco, com taxas de

17,2 e 13,2 casos para cada 100 mil habitantes, respectivamente. Porto Alegre é a capital com a maior taxa registrada em 2013, mais que o dobro da taxa do estado e quase cinco vezes a taxa do Brasil (96,2 casos para cada 100 mil habitantes) (BRASIL 2015).

2.2 A Terapia Antirretroviral (TARV)

A terapia antirretroviral (TARV) causou um profundo impacto na história da infecção pelo HIV, sendo uma tentativa de eliminação deste do organismo. Basicamente essa nomenclatura é utilizada para descrever o tratamento contra o HIV e pode ser acompanhada por outras terapias de suporte, caso haja necessidade de se combater sintomas da doença. (CURTI; ALMEIDA; JAIME 2010).

A zidovudina (AZT) foi à primeira droga antirretroviral a ser liberada para o uso clínico. No período de 1987 a 1994, somente os inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (ITRN) encontravam-se disponíveis para o uso clínico. Em 1996, foram introduzidos os inibidores de protease (IPs), compondo assim um coquetel de medicação muito mais eficiente pela combinação de drogas de diferentes mecanismos de ação. No final da década de 90 surgiram o inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (ITRNN), e em 2003 a primeira droga da nova classe de inibidores de fusão (FOCACCIA, 2010). No ano de 2007 foi marcado pela liberação de drogas de duas classes diferentes, o inibidor da integrase e o inibidor de co-receptor R5. Hoje em dia são seis classes de antirretrovirais e mais de 21 medicações (Tabela 1). Em dezembro de 2013, o Brasil deu outro passo inovador e de vanguarda para a resposta à epidemia de HIV/aids: tornou-se o primeiro país em desenvolvimento e o terceiro do mundo a recomendar o início imediato da TARV para todas as pessoas que vivem com o vírus, independentemente da contagem de CD4, considerando a motivação do paciente, estima-se que trezentos e cinquenta e cinco mil indivíduos fizeram o uso TARV, em 2013, (BRASIL, 2014).

Tabela 1. Classes de medicamentos antirretrovirais

Classes de drogas	Mecanismo de ação	Produtos
Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa	Atuam na enzima transcriptase reversa, incorporando-se à cadeia de DNA que o vírus cria. Tornam essa cadeia defeituosa, impedindo que o vírus se reproduza.	Abacavir, Didanosina, Estavudina, Lamivudina, Tenofovir, Zidovudina e a combinação Lamivudina/Zidovudina
Inibidores não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa	Bloqueiam diretamente da ação enzima na multiplicação do vírus.	Efavirenz, Nevirapina e Etravirina.
Inibidores Protease (IPs)	Atuam na enzima protease, bloqueando sua ação e impedindo a produção de novas cópias de células infectadas com HIV.	Atazanavir, Darunavir, Fosamprenavir, Indinavir, Lopinavir/r, Nelfinavir, Ritonavir, Saquinavir e Tipranavir.
Inibidores de fusão	Impedem a entrada do vírus na célula e, por isso, ele não pode se reproduzir.	Enfuvirtida.
Inibidores da Integrase	Bloqueiam a atividade da enzima integrase, responsável pela inserção do DNA do HIV ao DNA humano (código genético da célula). Assim, inibe a replicação do vírus e sua capacidade de infectar novas células.	Raltegravir
Inibidor de Correceptor R5	Impede a ligação do vírus com aos correceptores CCR5.	Maraviroque

Fonte: Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.

Uma complexa interação medicamentosa, envolvendo efeitos dos IPs, causa uma série de distúrbios metabólicos conhecidos como síndrome da lipodistrofia, cuja importância clínica é relacionada também ao aumento de doenças cardiovasculares em indivíduos HIV positivos (TERSHAKOVEE; FRANK; RADER 2004). As dislipidemias são observadas na grande maioria dos pacientes com AIDS em TARV, incluindo baixo nível de lipoproteína de alta densidade (HDL) e moderado aumento dos níveis plasmáticos de triglicerídeos (TG) e lipoproteína de baixa densidade (LDL). De acordo com Dube *et al.*, (2003), a elevação dos níveis séricos de colesterol e TG variam de 28% a 80% nos pacientes com AIDS. Analisando mais especificamente os mecanismos moleculares envolvidos no efeito da TARV no

desenvolvimento dos distúrbios metabólicos descrito anteriormente, algumas hipóteses foram pontuadas. Carr *et al.*, (1998) descreve uma hipótese de que os IPs são designados para atingir o sítio catalítico da protease do HIV, essa região é homóloga as regiões de duas proteínas humanas que regulam o metabolismo lipídico: proteína citoplasmática tipo 1 ligadora do ácido retinóico (CRABP-1) e a proteína relacionada ao receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL), o que poderiam, justificar alterações metabólicas e somáticas que se desenvolve com pacientes tratados com os inibidores da protease. Segundo Focaccia (2010), a hipótese é que os IPs inibam a CRABP-1, aumentando a taxa de apoptose dos adipócitos, diminuindo o armazenamento dos TG, liberando maior concentração de lipídeos no sangue. Já a ligação dos IPs à LDL, poderia prejudicar a captação de quilomícron pelo fígado e a remoção de TG, resultando em hiperlipidemia e contribuindo para a redistribuição morfológica de gordura característica de pacientes com AIDS em uso de TARV. Flint *et al* (2009) em uma revisão, também descreveu algumas hipóteses observadas *in vitro* ou *in vivo* para as complicações metabólicas associadas com a infecção e tratamento contra o HIV. De acordo com a revisão, o sinal é desencadeado por uma indução ao estresse que envia uma resposta específica para as células, com a inibição da captação da glicose em adipócitos, inibição da liberação de insulina pelas células B pancreáticas e a desregulação da atividade das proteínas ligantes de elemento regulador de esteróis (SREBP). A hipótese seria de que os IPs tem efeito ativador sobre a produção da SREBP, lipoproteína que regula a produção de esteróis, quando os níveis intracelular lipídicos diminui, essa proteína regula os genes envolvidos na síntese de colesterol. A consequência da ativação de SREBP é o acúmulo excessivo de colesterol intracelular.

A inibição da captação da glicose no adipócito, acontece devido ao efeito inibitório dos IPs em relação ao GLUT 4, transportador de glicose presente no tecido adiposo, deixando de fornecer energia para a formação dos TGs, ocorrendo então ao aumento dos ácidos graxos livres, lipodistrofia e hiperglicemia. Os IPs ainda inibem a secreção de insulina nas células B pancreáticas pelo fechamento dos canais de potássio alterando o potencial de membrana das células .

Ainda existe muita dúvida sobre a TARV, a dislipidemia e o risco cardiovascular, visto que variações na concentração de lipídios e lipoproteínas

plasmáticas são influenciadas por uma ampla variabilidade de genes em uma população sadia. A identificação de aspectos genéticos dos indivíduos com AIDS pode auxiliar no entendimento das diferenças observadas no perfil lipídico dessa população (ANDRADE; HUTZ; 2002).

2.3 A Influência Genética no Perfil Lipídico e em Alterações Metabólicas.

As variações no DNA entre indivíduos são chamadas polimorfismos genéticos. A base genética para estas variações pode vir de uma troca de bases no DNA, uma duplicação ou deleção de um ou vários pares de bases, ou até de regiões extensas. Estimativas mostram que variações no DNA de uma única base (Single Nucleotide Polymorphisms, ou SNPs) constituem a forma mais frequente de mutação, e geram 1,4 milhões polimorfismos em nosso genoma (INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2001). Dentro deste panorama, desde 1982 mais de 20 genes codificantes para proteínas envolvidas no transporte de lipídeos foram identificados e tiveram suas sequências de DNA caracterizadas (DARMMERMAN; BRESLOW, 1995), sendo de suma importância o estudo dos polimorfismos destes genes.

Um estudo realizado por Arnedo *et al.* (2007), com 438 pacientes com AIDS, usuários da TARV, mostrou que alguns polimorfismos dos genes ABCBA1, APOA5, APOC3, APOE e CETP contribuíram efetivamente para o aumento dos níveis de TG séricos. Os polimorfismos C3238G dos genes da apolipoproteína C3 (APOC3) e os polimorfismo *TaqIB* da proteína transferidora de ésteres de colesterol (*CETP*), provocam modificações na composição plasmática de lipídios em pacientes não infectados pelo HIV (PARZIANELLO *et al.*, 2008; SHANKER *et al.*, 2008; MAHUNG *et al.*, 2009) e poderiam estar associados a alterações em pacientes com AIDS. Já existe uma associação do polimorfismo C3238C do gene APOC3 e as variações nos níveis de TG, do mesmo modo a deficiência da proteína CETP humana, através do polimorfismo *TaqIB*, está claramente associada com níveis elevados de HDL. Sabendo-se que o aumento do TG relaciona-se com o risco, e que o aumento do HDL tem um efeito protetor para doenças cardiovasculares, além de que indivíduos

HIV positivo em TARV tendem a dislipidemia, faz-se necessário correlacionar essa alteração nessa população

Além da dislipidemia, outro sistema constitui-se um fator de risco para eventos cardiovasculares, a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), esse sistema é responsável na regulação da pressão arterial (PA) e no balanço hidroeletrólítico (SAYED-TABATABAEI, 2006). Modificações no gene da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) está relacionado com alterações desse sistema.

Cambien *et al.* (1992), em um estudo multicêntrico, realizado para se identificar possíveis fatores genéticos para o infarto do miocárdio, encontraram que os indivíduos com a deleção dos 287pb no gene da ECA apresentavam, significativamente, mais infartos que os outros genótipos. A associação com o polimorfismo da ECA foi significativa, principalmente, em um grupo considerado de baixo risco, isto é, sem hipertensão e dislipidemia; nesse grupo, o risco relativo foi de 35% para aqueles com genótipo susceptível, expressivamente maior que o risco de 8% para o grupo todo. Sendo assim, torna-se necessário avaliar essa alteração genética em um grupo de alto risco como pacientes HIV positivo em uso de TARV.

Outro polimorfismo que está ligado com alterações fisiológicas é o R577X do gene da Actinina 3 (ACTN3), além de seu papel estrutural, essa proteína parece exercer um importante papel em processos metabólicos e de sinalização intracelular (MACARTHUR, 2007 e NORTH, 2004). Nas últimas duas décadas, inúmeros relatos sobre o polimorfismo ACTN3 R577X mostra alterações energéticas em atletas profissionais, idosos, crianças e soldados (DELMONICO *et al.*, 2008 ; CHAN *et al.*, 2011; SHANG *et al.*, 2012; AHMENTOV *et al.*, 2013),

Pereira *et al.*, (2014) em um estudo de coorte com 463 pacientes com Insuficiência Cardíaca (IC), investigou a possível associação do gene ACTN3 com o prognóstico da doença. Resultados sugerem que pacientes com insuficiência cardíaca que transportam alelo X do polimorfismo ACTN3 R577X tiveram significativamente menor tempo de sobrevivência em comparação com pacientes com genótipo RR e a presença do alelo X conferiu um pior prognóstico. Como o risco cardíaco está presente em pacientes HIV positivo, o estudo da correlação desse polimorfismo torna-se interessante.

2.3.1 Apolipoproteína C3 (APOC3)

As apolipoproteínas (APOs) desempenham algumas funções no metabolismo lipídico: proporcionam estabilidade estrutural das lipoproteínas, solubilizam os lipídios, servem como ligantes para receptores celulares e agem como cofatores para enzimas envolvidas no metabolismo de lipoproteínas. A APOC3 é a apolipoproteína C mais abundante em humanos. (GANGABADAGE *et al.*, 2008).

Em condições normais, os níveis plasmáticos de TG pós-prandiais e a conversão das partículas de VLDL em LDL são controlados por um processo metabólico envolvendo as enzimas lipase lipoproteica (LPL) e lipase hepática (LH). A enzima LPL hidrolisa os TG das lipoproteínas em ácidos graxos livres (AGL), permitindo o suprimento para os tecidos periféricos. A enzima LH, por sua vez, remove TG e fosfolipídios dos quilomícrons e VLDL remanescentes. Trabalhos relacionados ao estudo da modulação da atividade da LPL demonstraram que a APOC3 possui atividade inibitória sobre essa enzima, atuando como um inibidor não competitivo (WANG *et al.*, 1985).

O polimorfismo mais estudado no gene da APOC3 é o rs5128, mais conhecido pelos autores como C3238G, que cria um sítio de restrição para endonuclease SmaI, devido a uma substituição de um alelo C por um G, na posição do nucleotídeo 3238, na região 3' não traduzida do gene. Esta substituição gera dois alelos: C e G. O genótipo mais comum é CC, sendo considerados incomuns os genótipos CG e GG (TALMUD *et al.*, 1997; PARZIANELLO *et al.*, 2008). Alguns estudos relacionam a presença do alelo G com alteração nos níveis de TG. Acredita-se que esse polimorfismo possa estar em desequilíbrio de ligação com outros sítios polimórficos na região promotora do gene. Uma região polimórfica candidata é a do IRE (insulin response element), situada na região 5' do gene para APOC3. O IRE é responsável pela regulação da transcrição do gene da APOC3, esse desequilíbrio poderia eliminar o elemento inibitório da insulina sobre a transcrição deste gene, o que levaria a uma expressão contínua de APOC3, diminuindo a degradação do TG, consequentemente levando a uma hipertrigliceridemia (NARVÁEZ *et al.*, 2008).

Estudos do perfil genético de pacientes com AIDS nos permitirão avaliar a associação entre o polimorfismo C3238G e a hipertrigliceridemia nessa população,

visto que os sistemas responsáveis pelo transporte de TG são determinados pela concentração de APOC3.

2.3.2 Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP)

A CETP é a proteína que promove a troca de lipídeos entre as lipoproteínas. Ela transfere os ésteres de colesterol das HDLs para outras, as LDLs e VLDLs, aumentando assim o conteúdo de colesterol dessas lipoproteínas, tornando-as mais aterogênicas. O HDL é uma lipoproteína que carrega o colesterol depositado nas artérias para o fígado onde será metabolizado e eliminado. Sugere-se então que a CETP exerça um papel importante no desenvolvimento de doença cardiovascular, pois diminui a molécula de HDL, diminuindo consequentemente a eliminação sérica de CT. (SORLI et al., 2006).

Observa-se que a deficiência da proteína CETP humana está ligada a níveis elevados de HDL, podendo então ser considerada como fator de proteção para a doença cardiovascular (BROSSEAU *et al.*, 2002;). Vários estudos, em diferentes populações têm demonstrado que variantes genéticas no gene CETP podem influenciar as concentrações de HDL, (LIU *et al.*, 2002; BARTER *et al.*, 2003; HUMPHRIES; MORGAN, 2004; MILTIADOUS *et al.*, 2005; SORLI *et al.*, 2006; DANESHPOUR; HEDAYATI; AZIZI, 2007).

O gene CETP é considerado altamente polimórfico, porém dos vários polimorfismos estudados no gene CETP humano, um se destaca, o rs708272, mais conhecido como TaqIB, pois cria um sítio de restrição para a enzima TaqI, devido a uma substituição de uma base A por uma G, na posição 277 da sequência de nucleotídeos, localizada no primeiro íntron do gene (CALRQUIST *et al.*, 2003). Segundo Boekholdt et al., 2003, o alelo G (denominado por vários autores como alelo B1) está associado ao aumento da atividade da proteína e consequentemente diminuição do HDL. Ou seja, indivíduos B1B1 estão mais suscetíveis a doenças cardiovasculares do que indivíduos B2B2 ou B1B2. O polimorfismo TaqIB é uma mutação silenciosa, e os mecanismos pelos quais essa variação genética pode influenciar a atividade da CETP ainda são desconhecidos. O fato dessa alteração estar em um íntron, não descarta a hipótese de que este polimorfismo está em

desequilíbrio de ligação com uma mutação funcional da região reguladora do gene CETP, (DANESHPOUR; HEDAYATI; AZIZI, 2007). Polimorfismos no gene CETP constituem, portanto, um marcador essencial da relação entre a genética, o metabolismo lipídico e as características clínicas do risco de doenças cardiovasculares (LI et al, 2007; HUMPHRIES; MORGAN, 2004; CORELLA; ORDOVAS, 2005).

Assim como ocorrem interações entre genes e ambiente, já se observa também a ação conjunta de diferentes polimorfismos e o uso de alguns medicamentos. O polimorfismo TaqIB do gene da CETP vem sendo investigado com relação à resposta a diferentes tratamentos (ANDRADE; HUTZ, 2002). Nesse sentido, faz-se necessário a correlação genética, juntamente com a intervenção dietética para a prevenção e controle da hipertrigliceridemia o risco cardiovascular relacionado com a diminuição do HDL nos pacientes infectados pelo HIV em uso de TARV.

2.3.3 Enzima Conversora da Angiotensina I (ECA):

A enzima conversora da angiotensina (ECA) converte a angiotensina I em angiotensina II, sendo esse peptídeo responsável pela vasoconstrição aumentando a pressão arterial (BREWSTER, 2004). Hilbert *et al.*(1991) foram os primeiros a estudar os mecanismos genéticos do RAAS na doenças cardiovasculares, demonstrando uma associação entre a hipertensão arterial e o gene da ECA.

O gene da ECA caracteriza-se por apresentar 24 regiões intrônicas que se intercalam com as regiões exônicas. Na região intrônica 16, alguns indivíduos possuem uma deleção (D) ou inserção (I) de 287 pares de bases, resultando em três possíveis genótipos, DD, ID, II. Estudos mostram que este polimorfismo influencia na concentração sérica da ECA, sendo mais elevada em indivíduos que apresentam o genótipo DD e menores no genótipo II. Os indivíduos com ID apresentam concentrações intermediárias (RIGAT, 1990), sendo assim o genótipo DD tem maior risco cardiovascular.

Shunkert et al, relacionaram um forte preditor da morbidade e mortalidade cardiovasculares, a hipertrofia ventricular esquerda (HVE), as alterações genéticas. Os autores analisaram a presença de HVE eletrocardiograficamente em relação ao polimorfismo (inserção/deleção) do gene da ECA, em uma população de caucasianos. Em uma primeira análise, os autores encontraram que somente os homens, e não as mulheres, com genótipo DD tinham mais HVE que os ID e II. Posteriormente, e mais importante, os autores encontraram que as mais fortes associações do genótipo DD e a HVE se davam quando os níveis de pressão arterial eram normais. Iwai *et al.* estudando uma população bastante semelhante, e analisando a HVE pela ecocardiografia, demonstraram uma forte associação entre o genótipo DD e a hipertrofia cardíaca, em ambos os sexos e, principalmente, naqueles sintomáticos.

Dessa maneira, é de extrema importância conhecermos mecanismos moleculares dos genes que compõe o RAAS, para que possamos identificar os genótipos susceptíveis e afim de uma maior intervenção dietética, principalmente em pacientes em uso de medicações consideradas metabolicamente de alto risco cardiovascular, como a TARV.

2.3.4 Actinina – 3 (ACTN3).

Alpha-actinina-3 (actn3) é uma proteína expressada quase que exclusivamente nas fibras musculares esqueléticas de contração rápida (NORTH, BEGGS, 1996). No músculo as α -actininas são as principais proteínas estruturais que estabilizam a linha Z, ligando os filamentos finos e estabilizando a estrutura do sarcômero (SQUIRE, 1997). As fibras musculares de contração rápida (tipo II) tem seu sistema de energia anaeróbico, alta capacidade de contrair-se rapidamente e capacidade glicolítica (utiliza a fosfocreatina e glicose como energia). Já as fibras musculares de contração lenta (tipo I) têm seu sistema de energia aeróbico, capacidade de contração muscular lenta, capacidade oxidativa (utiliza oxigênio, aumentado número de mitocôndrias com participação de enzimas oxidativas para geração de energia) (SQUIRE, 1997).

Foi identificada no gene ACTN3 a troca de nucleotídeo C → T na posição 1.747 do éxon 16, resultando na conversão do aminoácido arginina num código de parada no codon 577 (R577X) (NORTH *et al.*, 1999). Esta variação cria duas versões (ou alelos) diferentes do gene ACTN3, a R a qual é a versão funcional e o alelo X que contém a alteração, que transcreve uma versão não funcional da proteína actn3. Já que todo ser humano herda duas cópias do gene existem 3 possíveis genótipos (RR, RX ou XX), sendo que a variante XX resulta em completa deficiência na produção de actn3 no músculo esquelético (MACARTHUR e NORTH, 2011).

Yang *et al.*, (2003) demonstraram haver associação entre os diferentes genótipos do gene ACTN3 e a performance em atletas de elite. Se a actn3 desempenha importante função em fibras musculares de contração rápida, seria razoável prever diferenças na função muscular esquelética entre indivíduos com diferentes genótipos para ACTN3. Para alguns indivíduos que expressam o gene ACTN3 (genótipos RR ou RX) podem apresentar vantagem em modalidades que exigem explosão e força muscular quando comparados com indivíduos com genótipo XX.

Por outro lado, evidências mais recentes, obtidas de com a utilização de um modelo animal, têm proposto uma associação entre o alelo X do gene da ACTN3 e alterações metabólicas. Ao utilizarem camundongos nocaute para a actn3, os quais reproduzem o genótipo XX em humanos, MacArthur *et al* (2007) e Quinlan *et al* (2010), observaram uma maior atividade de enzimas oxidativas e menor atividade de enzimas glicolíticas nos camundongos nocaute comparados aos animais que expressam a proteína. Como consequência, esses camundongos diminuíram a utilização de glicogênio durante o exercício e foram capazes de percorrer uma distância 33% maior. Em humanos, Vicente *et al* (2007) foram os únicos a observar uma proporção significativa menor de fibras de contração rápida em indivíduos com o genótipo XX em comparação com aos RR.

Varios estudos não foram sempre coerente e deram origem a especulações sobre o envolvimento do polimorfismo R577X nos processos gerais da função muscular, o envelhecimento e metabolismo (MacArthur e do Norte, 2007; MacArthur *et al*, 2007;. Moran *et al.* , 2007; Hölterhoff *et al*, 2009; Quinlan *et al*, 2010;. Chan *et*

al, 2011), mas sabe-se que alterações no tipo de fibra muscular pode estar relacionado com alterações metabólicas. Sendo assim, é de maior importância o melhor aprofundamento dessa alteração genética e sua relação com as alterações bioquímicas e corporais.

A Organização Mundial de Saúde preconiza que as intervenções nutricionais façam parte de todos os programas de controle e tratamento da AIDS (WHO, 2003), já que as drogas hipolipemiantes e a TARV tem um forte potencial de interação medicamentosa, toxicidade e abandono do tratamento devido ao uso de múltiplos fármacos (NCEP, 2001).

O aumento da eficiência da intervenção dietética pelo conhecimento das diferenças genéticas entre os indivíduos infectados poderá melhorar a qualidade de vida destes pacientes.

3 HIPÓTESES

Os polimorfismos nos genes APOC3, CETP, ECA e ACTN3 podem ser usados como indicadores de prognóstico para a intervenção dietética no tratamento dos distúrbios metabólicos ligados à TARV.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Verificar a associação dos polimorfismos C3238G, TaqIB, I/D e R577X dos genes APOC3, CETP, ECA e ACTN3 com alterações no perfil lipídico e alterações metabólicas em pacientes infectados pelo HIV/AIDS em uso de terapia antirretroviral, submetidos a intervenção nutricional em um Hospital Dia referência em HIV, na cidade de Rio Grande, Rio Grande do Sul.

4.2 Objetivos Específicos

- Verificar se há relação entre o sucesso da intervenção nutricional e os polimorfismos estudados.
- Avaliar a influência dos polimorfismos C3238G, TaqIB, I/D e R577X no perfil lipídico de indivíduos com AIDS, submetidos a intervenção nutricional;
- Avaliar os níveis de CT, HDL, LDL e TG de pacientes com AIDS antes e após a intervenção nutricional;
- Avaliar o efeito da intervenção nutricional no perfil antropométrico e no risco para doenças cardiovascular associado aos valores em relação circunferência abdominal;

5 MÉTODOS

5.1 Amostra

Foram 65 pacientes HIV positivo, sendo 45 do sexo feminino e 20 do sexo masculino, em acompanhamento regular em uso de TARV, com dislipidemia sem o uso de medicação hipolipemiante, atendidos no Hospital Dia do Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Correa Jr, centro de referência no tratamento dos portadores do vírus HIV no Estado do Rio Grande do Sul, onde atualmente atende indivíduos soropositivos locais e provenientes de 27 Municípios da zona sul do Estado.

5.2 Critérios de Inclusão

- Pacientes adultos maiores de 18 anos, de ambos os sexos;
- Portadores do vírus do HIV positivo em uso de TARV;
- Presença de dislipidemia sem o uso de medicação hipolipemiantes;
- Assinatura do Termo de Consentimento Informado.

5.3 Critérios de Exclusão

- Gestantes;
- Pacientes com doenças oportunistas ativas;
- Deficiência mental;
- Uso de hipolipemiantes orais;

5.4 Coleta de Dados

Os pacientes em TARV diagnosticados com dislipidemia, sem necessidade imediata de uso de hipolipemiantes, foram encaminhados para o ambulatório de nutrição. O atendimento aos pacientes foi realizado de acordo com o seguinte esquema:

- 1) Foi informado sobre o projeto e solicitado a assinatura o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 1);
- 2) Antropometria: realização de medidas de peso, altura e circunferência abdominal;
- 3) Solicitação de exames bioquímicos de perfil lipídico;
- 4) Orientação nutricional para uma reeducação alimentar, enfocando as dislipidemias, baseada no National Cholesterol Education Program (NCEP);
- 5) Acompanhamento em duas consultas nutricionais de retorno.
 - Primeiro retorno: 1 mês após a primeira consulta.
 - Segundo retorno: 3 meses após o primeiro retorno.

5.5 Avaliação Antropométrica

As medidas de peso e altura foram realizadas com os pacientes vestidos, descalços e em balança antropométrica (Filizola). Estas medidas foram calculadas de acordo com a seguinte fórmula do índice de massa corpórea (IMC): $\text{peso (kg)} / \text{altura}^2 \text{ (cm)}$. A interpretação para IMC é normalmente: baixo peso (IMC < 18,5); eutrófico (IMC 18,5-24,99); sobrepeso (IMC 25-29,99) e obesidade (IMC \geq 30,00) (WHO, 1998).

A medida da circunferência abdominal (CA) foi realizada na menor curvatura localizada entre as costelas e a crista ilíaca com fita métrica flexível e inelástica sem comprimir os tecidos. Quando não foi possível identificar a menor curvatura, foi

avaliada a medida dois centímetros acima da cicatriz umbilical. Os pontos de corte adotados para CA foram preconizados de acordo com o grau de risco para doenças cardiovasculares: risco aumentado para mulheres (CA > 80 cm) e para homens (CA > 94 cm), e risco muito aumentado para mulheres (CA > 88 cm) e para homens (CA > 102 cm) (LEAN,1995).

5.6 Avaliação Bioquímica

O perfil lipídico foi avaliado de acordo com os níveis plasmáticos de CT, HDL, TG e LDL após jejum de 12 horas. A dislipidemia foi definida por níveis plasmáticos de TG em jejum ≥ 150 mg/dl e/ou de CT em jejum ≥ 200 mg/dl e/ou de LDL ≥ 130 mg/dl, HDL abaixo do valor normal ≤ 40 mg/dl, alteração glicêmica com, glicemia ≥ 100 mg/dl. (SBC, 2007).

5.7 Avaliação Dietética

Os esquemas alimentares foram planejados individualmente considerando as necessidades nutricionais, a situação socioeconômica e os hábitos alimentares de cada indivíduo. As informações sobre consumo alimentar foram obtidas através do método, inquérito alimentar de 24 horas (IR-24h), nos quais os pacientes relataram detalhadamente os alimentos e bebidas consumidos nas 24 horas anteriores à entrevista.

A necessidade energética foi determinada através do cálculo da recomendação, 25-30 kcal/Kg de peso atual (POLACOW *et al*, 2004). A ingestão de proteínas foi em torno de 0,8-1,0 g/Kg/dia quando não existiu necessidade de ganho de peso, e quando houve necessidade, foi oferecido 1-1,2 g/Kg/dia (CUPARI, 2002).

O consumo de gorduras foi orientado da mesma maneira que para uma pessoa saudável não infectada, ou seja: 30-35% das necessidades totais de energia (OMS, 2003).

Os pacientes receberam instruções sobre seleção, quantidade e técnicas de preparo dos alimentos. As orientações foram feitas após anamnese alimentar e consistiu basicamente no ajuste do consumo de gorduras totais, na redução de gorduras saturadas, CT, dos ácidos graxos trans e do aumento de fibras, principalmente, as solúveis.

5.8 Coleta de material biológico para a extração do DNA genômico

A extração de DNA foi feita através de amostras de esfregaço de mucosa bucal e amostra de saliva. Num primeiro momento, o paciente foi instruído a beber água para minimizar a presença de outros contaminantes. Em seguida com um swab estéril, foi raspado o lado direito da bochecha do voluntário por trinta segundos e após o lado esquerdo, guardando-o posteriormente no tubo estéril para a extração do DNA. O conteúdo coletado foi levado ao laboratório para a extração do DNA genômico.

5.9 Extração do DNA genômico

Quinhentos microlitros de saliva ou swab foram digeridos com 600 uL de tampão de lise (Solução de Lise Celular, QIAGEN, cat. 158908) e proteinase K (Invitrogen, cat. 25530-015) a 55°C durante 4 horas. Precipitação das proteínas foi realizada por adição de 200 uL de solução *Protein Precipitation* (QIAGEN, cat. 158912) e nova centrifugação a 16000 g durante 10 min. O DNA genômico (DNAg) foi precipitado a partir do sobrenadante por adição de isopropanol (1:1) e centrifugação (16.000 g durante 10 min). Antes da secagem, o sedimento foi lavado com etanol a 70%. O gDNA foi hidratado com 100 mL de água isenta de nucleases.

5.9.1 Amplificação do DNA

As análises de polimorfismos são baseadas na amplificação do fragmento de DNA a ser estudado. Para esta amplificação é usada a reação em cadeia da DNAPolimerase (PCR). Para esta reação são usados kits contendo todos os reagentes básicos, como os nucleotídeos trifosfatados, magnésio como catalizador, a enzima DNAPolimerase extraída de bactérias termófilas, e o tampão para estabilidade do pH. Junto a estes reagentes foram adicionados oligonucleotídeos (primers) específicos para cada região de interesse e gDNA dos pacientes extraídos como descrito anteriormente. Os primers e as condições de temperatura são diferentes para cada região amplificada estando descritos abaixo.

5.9.1.1 Genotipagem Apolipoproteína C3 (APOC3)

Para a genotipagem foi amplificada uma sequência de 254pb do gene APOC3 por PCR, pela utilização dos *primers* sense 5'-AAG GAC AAG TTC TCT GAG TTC T-3' e anti-sense 5'-GCA GCT TCT TGT AGT TCT-3'.

O produto de PCR do APOC3 foi submetido à digestão enzimática com 10 unidades da enzima de restrição *SacI* por, aproximadamente, 24 horas a 37°C. Os fragmentos gerados foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 2% no tampão de corrida TBE. A visualização do padrão de bandas resultante foram realizada em transiluminador com luz UV após a coloração com Syber Safe (Invitrogen).

A digestão com *SacI* gera dois fragmentos de 144pb e 110pb para o genótipo GG, um fragmento de 254pb para o genótipo CC e três fragmentos de 254pb, 144pb e 110pb para o genótipo CG.

5.9.1.2 Genotipagem da Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP)

Para a genotipagem foi utilizado a sequência de 535pb do gene CETP e que foi amplificada pela PCR, através da utilização dos *primers* sense 5'- CACT AGC CCA GAG AGA GG AGT GCC-3' e anti-sense 5'-CTG AGC CCA GCC GCA CA-3'.

O produto da PCR da CETP foi submetido à digestão enzimática com 10 unidades da enzima de restrição *TaqIB*, por, aproximadamente, 24 horas a 64°C. Os fragmentos gerados foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose conforme descrito acima.

A digestão com *TaqIB* deveria gerar dois fragmentos de 361pb e 174pb para o genótipo B1B1, um fragmento de 565 pb para o genótipo B2B2 e três fragmentos de 565 pb, 361 pb e 174 pb para o genótipo B1B2.

5.9.1.3 Genotipagem da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA)

Para a genotipagem foi amplificado uma sequência de 490pb (para o alelo I) e 190pb (para o alelo D) do gene ECA pela reação em cadeia da polimerase (PCR), através dos *primers* sense 5'-CTGGAGACCACTCCC ATC CTTTCT-3' e anti-sense 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTAGA-3' (CIESZCZYK et al., 2010).

O produto de PCR da ECA foi separado por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% no tampão de corrida TBE e a visualização do padrão de bandas resultante foram analisadas em transiluminador com luz UV após a coloração com Syber Safe (*Invitrogen*®).

5.9.1.4 Genotipagem da ACTN3

Os quatro primers utilizados estão descritos na Tabela 2. As concentrações finais utilizadas foram de 0,5 uM para os primers externos (hACTN3f e hACTN3r) e 0,125 e 0,25 uM de primers internos (hACTN3Tif e hACTN3Cir, respectivamente). Na prática, os primers em 5 uM foram misturados num tubo por adição de 4 volumes de cada primer externo (hACTN3f e hACTN3r), um volume do primer interno sense (hACTN3Tif) e 2 volumes do primer interno anti-sense (hACTN3Cir). Um volume de 5 mL da mistura de primers foi adicionado a 10 ul de 2x GoTaq® Master Mix (PROMEGA, cat. M7122) e 5 uL da amostra de DNA, obtendo-se um volume de reação de 20 uL. As amostras foram submetidas às seguintes condições de PCR: 95°C por 2 min; 35 ciclos a 95°C por 10 s, 68°C por 10 s, 72°C 45 s; e uma etapa

final de 72°C durante 2 min num termociclador (AmpliTherm Thermal Cycler, Mod. TX25, Madison, WI, EUA). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 2% com 1: 10.000 SYBR SAFE (Invitrogen, EUA) e comparados com um marcador comprimento de 100 pb (DNA Ladder 100 pb, Invitrogen, EUA).

Tabela 2: Primers utilizados na genotipagem do polimorfismo R577x do gene da ACTN3.

Name	Sequence	Product size
hACTN3f	5' - CGCCCTTCAACAACACTGGCTGGA -3'	690 bp with hACTN3r
hACTN3r	5' - GATGAGCCCGAGACAGGCAAGG -3'	690 bp with hACTN3f
hACTN3Tif	5' - CAACACTGCCCGAGGCTGACTG -3'	318 bp with hACTN3r
hACTN3Cir	5' - CATGATGGCACCTCGCTCTCGG -3'	413 bp with hACTN3f

5.10 Análise estatística

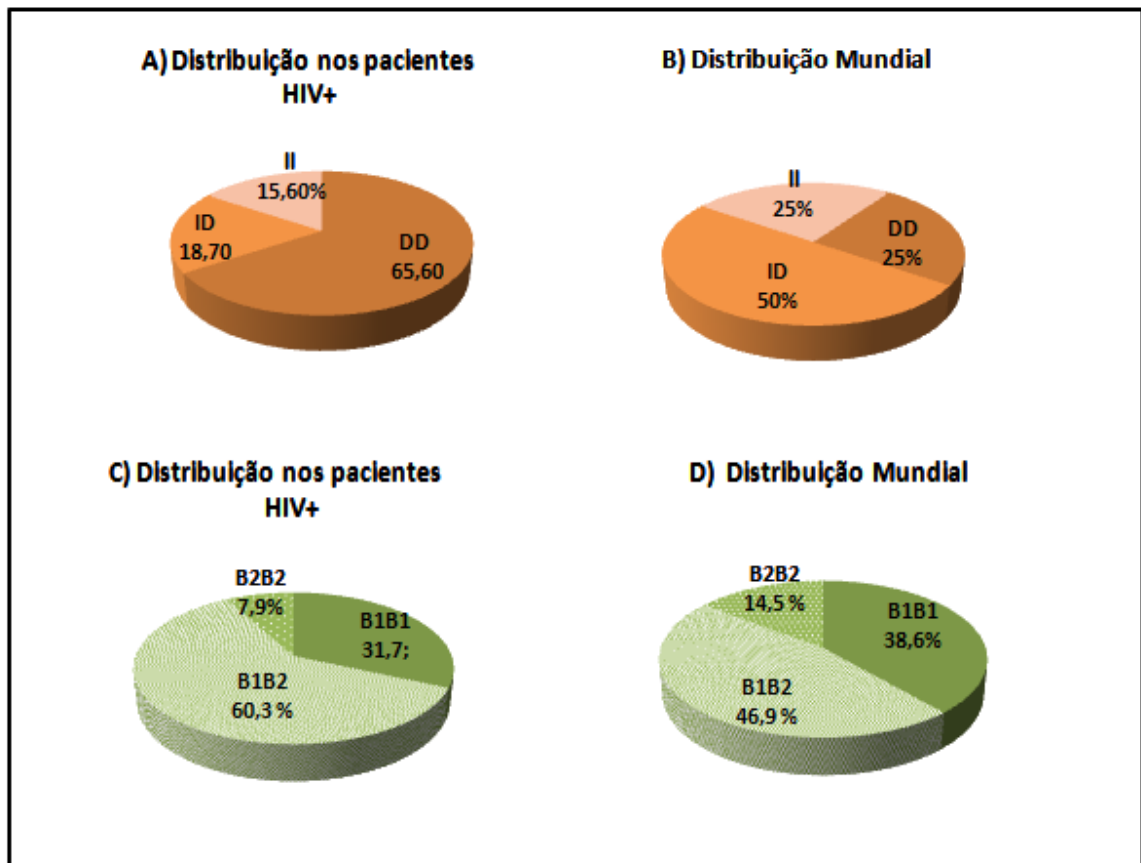
Os resultados são apresentados como médias \pm desvio padrão da média. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). As análises que envolvem medidas repetidas ao longo do tempo foram comparadas por análise de variância para medições repetidas, utilizando o procedimento MIXED para avaliar as variáveis nos três momentos das coletas (LITTELL, 1996). Um valor de probabilidade de $p < 0,05$ foi considerado significativo e probabilidade entre 0,05 e 0,10 como uma tendência.

6 RESULTADOS

6.1 Pacientes do sexo feminino usam mais IP:

Foi observado que a maior parte dos pacientes em acompanhamento nutricional eram mulheres (45 vs. 20; Tabela 3). Isso pode ser reflexo do fato das mulheres se preocuparem mais com a saúde e alimentação, em comparação com os homens. Coerentemente com isso, notou-se que 77% delas fazem uso de IP na TARV, contra 33% dos homens, o que favorece maior incidência de lipodistrofia naquele subgrupo.

A distribuição genotípica dos quatro polimorfismos estudados também encontra-se representada na Tabela 3. Foi observado um grande número de pacientes com o genótipo DD para o polimorfismo I/D da ECA, muito diferente da distribuição esperada, quando comparamos estes pacientes de AIDS com a população mundial conforme mostra a figura 2 (65,6% - DD; 18,7% - ID; 15,6% - II vs. 25%; 50%; e 25% respectivamente na população mundial; 1000 GENOME). Também está fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg o resultado para o polimorfismo TaqIB da CEPT, onde vimos uma frequência aumentada do genótipo B1B1 nos pacientes (B1B1 31,7%; B1B2 60,3%; B2B2 7,9% vs. 38,6%; 46,9%; 14,5% na população mundial). Os outros polimorfismos estão de acordo com as distribuições descritas na literatura.



Fonte: 1000 Genomes. A Deep Catalog of Human Genetic Variation

Figura 2: Gráficos mostrando a distribuição dos polimorfismos em desequilíbrio segundo Hardy-Weinberg nos pacientes HIV+ e suas referencias mundiais. A e B) polimorfismo I/D da ECA; C e D) polimorfismo TaqIB da CEPT. $p < 0,05$.

Tabela 3: Característica amostral de gênero e genótipo

	Indivuos (n)	Idade (meses)	Temp TARV (meses)	Uso de IP % (n)	Polimorfismos			
					CEPT -TaqIB % (n)	APOC3 -C3238G % (n)	ATCN - R577X % (n)	ECA - I/D % (n)
Feminino	45	506,66 ± 128,88	68,06 ± 60,31	não 22,2 (10)	B1B1 27,3 (12)	CC 73,0 (27)	RR 44,2 (19)	DD 62,2 (28)
				sim 77,7 (35)	B1B2 65,9(29)	CG 27,0 (10)	RX 48,8 (21)	ID 22,2 (10)
					B2B2 6,8 (3)	GG 0 (0)	XX 7,0 (3)	II 15,6 (7)
				Análise de equilíbrio Hardy-Weinberg	p=0, 0122	p=0, 3418	p=0, 3805	p=0, 0037
Masculino	20	579,60 ± 139,94	66,15 ± 57,17	não 66,7 (15)	B1B1 42,1 (8)	CC 58,8 (10)	RR 29,4 (5)	DD 73,7 (14)
				sim 33,3 (5)	B1B2 47,4 (9)	CG 41,2 (7)	RX 58, 8 (10)	ID 4,1 (2)
					B2B2 10,5 (2)	GG 0 (0)	XX 11,8 (2)	II 15, 8 (3)
				Análise de equilíbrio Hardy-Weinberg	p=0, 8196	p=0, 2850	p=0, 3769	p=0, 0028
TOTAL	65	529, 1 ± 135,59	67,47 ± 58,93	não 38,5 (25)	B1B1 31,7(20)	CC 68,5 (37)	RR 40,0 (24)	DD 65,6 (42)
				sim 61,5 (40)	B1B2 60,3 (38)	CG 31,5 (17)	RX 51,7 (31)	ID 18,7 (12)
					B2B2 7,9 (5)	GG 0 (0)	XX 8,3 (5)	II 15,6 (10)
				Análise de equilíbrio Hardy-Weinberg	p=0, 0268	p=0, 1698	p=0, 2500	p=0,00006

6.2 Intervenção nutricional melhora peso, IMC e CA:

A intervenção nutricional melhorou os parâmetros antropométricos dos pacientes HIV+ em quase todos os genótipos como observado quanto ao peso, IMC e CA. Esse efeito ocorreu no primeiro mês de intervenção nutricional, ocorrendo uma tendência de retorno das medidas antropométricas aos valores anteriores da intervenção, devido provavelmente ao relaxamento dos hábitos alimentares (Tabela 4). Além disso, os pacientes com genótipo II para o polimorfismo I/D da ECA apresentaram redução nos pesos relativos após a intervenção nutricional (DD - $99\% \pm 4,29$; ID - $97,33\% \pm 5,38$; II - $96,32\% \pm 2,61$), não havendo resposta semelhante no grupo DD com relação a este parâmetro (Tabela 4).

6.3 Análise do efeito do genótipo e da intervenção nutricional no perfil lipídico e glicêmico.

Foi analisado o perfil lipídico e glicêmico em 3 momentos diferentes, ocorrendo algumas variações, porém devido ao reduzido número de indivíduos na amostra, não houve diferença significativa entre os genótipos estudados, com exceção da glicemia quanto ao polimorfismo da ACTN3, onde os indivíduos do genótipo RR apresentaram glicemia mais baixa (RR - $95,4 \pm 6,5$; RX - $102,6 \pm 10,6$; XX - $110,1 \pm 16,3$). Também observamos uma tendência de menores valores para TG nos pacientes com genótipo RR do mesmo polimorfismo (RR - $156,6 \pm 78,1$; RX - $173,5 \pm 78,3$; XX - $181,6 \pm 94,3$; Tabela 5).

6.4 Indivíduos RR do gene ATCN3 reduziram LDL com intervenção nutricional.

Indivíduos que não tem a proteína actn3 (genótipo XX), tiveram um aumento de LDL após intervenção nutricional. Homozigotos para a produção da actn3 apresentaram uma melhora na resposta dietética com a redução do LDL quando comparados a coleta do terceiro momento em relação a primeira coleta (RR - $23,7 \pm 74,3$; RX $1,32 \pm 28,6$; XX $30,21 \pm 54,6$; tabela 6).

Também foi observado curiosamente que os indivíduos heterozigotos para o polimorfismo da ECA apresentaram uma redução da glicemia mais acentuada que

os indivíduos homozigotos, nas diferenças das coletas do momento 2 e momento 3 quando comparadas com a coleta do momento 1.

6.5 Uso de IP na TARV.

Paciente que fazem o uso de IP na TARV tiveram uma tendência a melhor resposta ao tratamento dietético quando analisado medidas de CA (CA3/CA1, $-1,70 \pm 4,37$ com uso de IP; $-0,45 \pm 4,31$ sem uso de IP). Paradoxicalmente, também apresentaram uma resposta negativa quanto aos valores de HDL (HDL2/1, $-2,4 \pm 10,78$ com uso de IP; $2,56 \pm 8,02$ sem uso de IP) e VLDL (VLDL3/1, $0,84 \pm 17,32$ com uso de IP; $-5,46 \pm 16,88$ sem uso de IP). Tabela 7.

Tabela 4: Medidas antropométricas e a relação com genótipo

Polimorfismo	Altura (m)	Peso 1 (kg)	Peso 2 (kg)	Peso 3 (kg)	P.relat 1 (%)	P. relat 2 (%)	P. relat 3 (%)	IMC 1 (kg/m ²)	IMC 2 (kg/m ²)	IMC 3 (kg/m ²)	CA 1 (cm)	CA 2 (cm)	CA 3 (cm)	CA relat 1 (%)	CA relat 2 (%)	CA relat 3 (%)
CEPT - TaqI ^B (rs 708272)																
B1B1	1,58 ± 0,09	69,36 ± 15,63	68,71 ± 16,53	70,33 ± 17,48	100 ± 0,00	98,60 ± 3,47	100,51 ± 3,88	27,79 ± 6,26	27,67 ± 6,45	28,24 ± 6,73	91,74 ± 15,63	90,56 ± 15,17	91,88 ± 16,49	100 ± 0,00	98,1 ± 2,26	99,54 ± 3,05
B1B2	1,61 ± 0,09	73,18 ± 15,41	70,64 ± 14,00	71,23 ± 15,40	100 ± 0,00	97,75 ± 5,44	98,14 ± 5,35	28,42 ± 6,09	27,53 ± 5,76	27,59 ± 6,45	94,89 ± 13,94	92,15 ± 13,94	91,87 ± 15,35	100 ± 0,00	98,03 ± 4,44	98,06 ± 5,55
B2B2	1,60 ± 0,10	82,44 ± 20,50	75,50 ± 16,07	71,00 ± 5,28	100 ± 0,00	97,86 ± 1,55	96,71 ± 3,77	32,06 ± 7,50	30,29 ± 7,37	27,80 ± 3,50	100,29 ± 8,48	100,29 ± 8,48	95,75 ± 6,60	100 ± 0,00	98,54 ± 1,25	96,62 ± 4,10
Comparações		entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos:entre coletas	gen. vs. col.		entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.
Valor de p		0,7444	0,0466	0,6410	0,5671	0,0299	0,7015	0,9475	0,0345	0,6796	0,6432	0,0079	0,4952	0,8557	0,0061	0,6539
APOC3 - C3238G (rs 5128)																
CC	1,61 ± 0,09	72,51 ± 15,31	71,42 ± 14,07	72,20 ± 14,49	100 ± 0,00	98,85 ± 4,82	99,89 ± 5,23	28,33 ± 6,62	27,92 ± 6,30	28,21 ± 6,43	94,92 ± 14,91	93,24 ± 13,94	94,05 ± 14,27	100 ± 0,00	98,40 ± 3,87	99,25 ± 4,46
G	1,59 ± 0,10	69,18 ± 18,16	65,35 ± 15,59	65,33 ± 16,23	100 ± 0,00	97,38 ± 4,18	99,05 ± 5,06	27,22 ± 5,37	25,96 ± 5,06	26,63 ± 5,30	88,82 ± 12,87	85,87 ± 11,70	85,25 ± 12,29	100 ± 0,00	97,82 ± 2,76	98,33 ± 4,58
Comparações		entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos:entre coletas	gen. vs. col.		entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.
Valor de p		0,4228	0,1119	0,8546	0,3616	0,0029	0,4342	0,4821	0,0086	0,8277	0,1001	0,0003	0,7302	0,4585	0,0003	0,5901
ACTN - 577XX (rs)																
RR	1,58 ± 0,08	73,53 ± 18,20	71,80 ± 16,15	69,87 ± 15,84	100 ± 0,00	97,37 ± 4,61	99,37 ± 5,05	29,34 ± 7,01	28,62 ± 6,48	26,80 ± 8,60	93,68 ± 15,02	92,29 ± 13,93	91,21 ± 15,52	100 ± 0,00	98,38 ± 3,40	99,47 ± 4,57
RX	1,61 ± 0,09	72,89 ± 13,98	71,66 ± 14,42	72,15 ± 14,34	100 ± 0,00	98,60 ± 4,21	99,08 ± 5,29	28,41 ± 5,85	27,93 ± 5,94	28,06 ± 5,97	95,00 ± 14,00	92,80 ± 13,27	93,07 ± 13,55	100 ± 0,00	97,98 ± 3,57	98,28 ± 4,65
XX	1,63 ± 0,11	70,91 ± 17,89	64,96 ± 10,23	66,11 ± 10,13	100 ± 0,00	99,85 ± 5,95	101,65 ± 5,60	26,71 ± 5,61	25,05 ± 4,59	25,54 ± 4,86	91,22 ± 10,29	88,86 ± 11,39	89,14 ± 11,74	100 ± 0,00	99,42 ± 2,72	99,71 ± 2,87
Comparações		entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos:entre coletas	gen. vs. col.		entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.
Valor de p		0,5335	0,0568	0,178	0,2321	0,0294	0,1812	0,5775	0,0537	0,1615	0,9159	0,0349	0,6669	0,3575	0,0621	0,4045
ECA - I/D (rs)																
DD	1,61 ± 0,09	71,94 ± 15,88	70,92 ± 15,60	71,05 ± 15,48	100 ± 0,00	99,00 ± 4,29	98,07 ± 16,52	27,79 ± 6,87	26,99 ± 6,28	27,37 ± 6,52	92,67 ± 15,02	91,08 ± 14,35	92,06 ± 15,13	100 ± 0,00	98,58 ± 3,74	97,08 ± 16,74
ID	1,58 ± 0,08	78,28 ± 12,81	77,69 ± 9,63	75,70 ± 8,20	100 ± 0,00	97,33 ± 5,88	97,94 ± 6,97	31,09 ± 3,54	30,75 ± 3,02	30,78 ± 2,58	100,25 ± 9,01	99,09 ± 6,96	98,44 ± 6,55	100 ± 0,00	97,71 ± 2,78	97,80 ± 3,78
II	1,55 ± 0,06	66,15 ± 11,53	63,65 ± 10,76	63,48 ± 10,31	100 ± 0,00	96,32 ± 2,61	96,23 ± 3,54	27,56 ± 4,01	26,52 ± 3,72	26,48 ± 3,70	90,80 ± 10,11	88,80 ± 9,88	86,89 ± 9,69	100 ± 0,00	97,82 ± 1,99	96,22 ± 3,91
Comparações		entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos:entre coletas	gen. vs. col.		entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.
Valor de p		0,1601	0,0007	0,2157	0,044	0,0002	0,0563	0,3001	0,0005	0,2282	0,2216	0,0001	0,0659	0,2056	0,0011	0,0609

Tabela 5: Medidas bioquímicas e a relação com o genótipo

Polimorfismo	Col 1 (mg/dl)	Col 2 (mg/dl)	Col 3 (mg/dl)	HDL 1 (mg/dl)	HDL 2 (mg/dl)	HDL 3 (mg/dl)	VLDL 1 (mg/dl)	VLDL 2 (mg/dl)	VLDL 3 (mg/dl)	LDL 1 (mg/dl)	LDL 2 (mg/dl)	LDL 3 (mg/dl)	TG 1 (mg/dl)	TG 2 (mg/dl)	TG 3 (mg/dl)	GLIC 1 (mg/dl)	GLIC 2 (mg/dl)	GLIC 3 (mg/dl)
CEPT - TaqIB (rs 708272)																		
B1B1	217,32 ± 60,97	204,58 ± 39,05	213,00 ± 44,07	47,16 ± 14,91	43,58 ± 12,82	43,53 ± 13,56	40,07 ± 22,63	37,57 ± 16,86	39,53 ± 16,15	129,97 ± 49,51	123,56 ± 35,12	128,33 ± 38,27	186,18 ± 56,90	183,35 ± 70,33	185,36 ± 77,05	99,00 ± 10,31	99,83 ± 12,83	100,21 ± 12,34
B1B2	200,33 ± 34,58	212,09 ± 43,69	222,27 ± 54,73	51,19 ± 13,08	53,03 ± 17,26	49,15 ± 16,44	38,35 ± 15,78	32,35 ± 14,90	38,67 ± 19,69	135,71 ± 44,31	126,41 ± 39,46	135,48 ± 47,40	187,78 ± 83,24	159,96 ± 74,35	176,72 ± 72,92	104,78 ± 11,35	103,00 ± 11,73	102,92 ± 10,79
B2B2	226,08 ± 47,15	226,83 ± 78,84	209,20 ± 45,45	55,67 ± 14,08	56,17 ± 21,90	47,60 ± 15,74	30,19 ± 23,88	29,35 ± 19,75	40,81 ± 33,58	113,44 ± 23,42	141,19 ± 74,12	148,72 ± 66,32	155,50 ± 118,49	146,67 ± 101,55	196,60 ± 150,69	100,17 ± 6,43	100,17 ± 3,54	98,60 ± 16,77
Comparações	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.
Valor de p	0,5823	0,5950	0,1174	0,4416	0,4483	0,9124	0,9909	0,2572	0,3784	0,7305	0,4220	0,1519	0,8434	0,4817	0,1442	0,6900	0,5194	0,3749
APOC3 - C3238G (rs 5128)																		
CC	219,97 ± 46,89	211,03 ± 48,36	219,07 ± 51,45	50,59 ± 12,32	50,41 ± 65,65	46,60 ± 16,02	37,43 ± 21,44	33,08 ± 16,44	39,68 ± 23,02	130,20 ± 43,77	127,21 ± 46,07	137,45 ± 50,40	190,03 ± 105,99	166,16 ± 82,36	197,10 ± 111,28	101,97 ± 8,49	101,44 ± 10,93	101,41 ± 12,30
CG	222,56 ± 41,47	210,93 ± 36,00	212,10 ± 45,00	51,56 ± 16,97	51,50 ± 20,12	50,10 ± 17,58	43,10 ± 10,85	37,49 ± 15,18	37,82 ± 11,04	129,94 ± 37,20	121,89 ± 32,46	121,24 ± 31,91	205,81 ± 63,91	187,36 ± 76,07	184,10 ± 53,63	102,19 ± 12,76	101,93 ± 13,21	101,70 ± 11,26
Comparações	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.
Valor de p	0,6447	0,2654	0,7154	0,6369	0,8509	0,1265	0,7185	0,1113	0,2374	0,4948	0,8167	0,7978	0,9850	0,1286	0,1070	0,4927	0,6737	0,8114
ACTN - 577XX (rs)																		
RR	228,50 ± 55,60	223,95 ± 54,46	219,69 ± 54,24	53,08 ± 12,40	55,77 ± 20,24	49,38 ± 19,23	34,72 ± 21,65	31,86 ± 15,65	34,43 ± 22,44	138,36 ± 52,45	136,01 ± 49,90	134,67 ± 53,17	173,50 ± 108,70	156,58 ± 78,06	170,06 ± 107,14	101,71 ± 9,09	102,86 ± 12,54	95,40 ± 6,50
RX	212,42 ± 52,06	196,03 ± 41,31	205,43 ± 54,11	49,39 ± 15,30	47,83 ± 15,55	44,30 ± 12,94	38,83 ± 15,59	34,12 ± 15,81	38,06 ± 14,54	124,91 ± 39,78	114,08 ± 36,78	123,16 ± 42,32	194,40 ± 81,12	173,52 ± 78,31	190,13 ± 73,38	102,40 ± 10,49	99,45 ± 8,73	102,65 ± 10,64
XX	218,56 ± 36,08	225,25 ± 24,54	238,00 ± 26,66	46,67 ± 10,68	47,25 ± 7,96	51,50 ± 12,01	41,24 ± 21,28	36,11 ± 18,66	45,32 ± 27,15	130,17 ± 42,66	141,10 ± 34,75	158,23 ± 44,89	208,67 ± 104,00	181,63 ± 94,39	222,63 ± 124,27	106,11 ± 15,38	106,00 ± 16,12	110,13 ± 16,33
Comparações	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.
Valor de p	0,3957	0,8816	0,2545	0,3277	0,7735	0,3559	0,2279	0,0982	0,7680	0,38454	0,3713	0,1729	0,0981	0,0728	0,6855	0,0861	0,8867	0,0304
ECA - I/D (rs)																		
DD	223,15 ± 51,32	217,98 ± 48,61	223,19 ± 53,99	53,07 ± 12,89	53,80 ± 17,28	49,16 ± 16,70	35,12 ± 19,45	31,33 ± 15,63	37,52 ± 18,24	133,37 ± 45,13	132,78 ± 44,66	136,10 ± 48,78	178,98 ± 98,72	156,89 ± 77,79	186,03 ± 89,55	102,50 ± 11,19	103,33 ± 12,10	102,53 ± 11,51
ID	204,83 ± 38,95	186,00 ± 36,88	200,88 ± 45,40	42,58 ± 11,07	42,00 ± 9,21	42,88 ± 13,20	44,58 ± 15,68	41,32 ± 14,57	40,73 ± 17,89	117,81 ± 29,77	102,29 ± 32,84	117,30 ± 29,90	222,75 ± 78,16	207,10 ± 72,62	203,50 ± 89,65	105,17 ± 10,63	96,10 ± 8,97	99,25 ± 10,73
II	221,10 ± 60,80	203,10 ± 33,26	202,25 ± 32,35	49,90 ± 16,98	46,80 ± 16,98	44,25 ± 5,87	40,29 ± 16,40	34,71 ± 14,95	37,88 ± 24,69	133,50 ± 55,65	120,91 ± 31,60	137,16 ± 49,39	188,40 ± 88,03	174,00 ± 76,23	185,00 ± 110,99	100,00 ± 7,68	100,04 ± 7,94	100,38 ± 12,02
Comparações	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.	entre genótipos	entre coletas	gen. vs. col.
Valor de p	0,4779	0,1026	0,5620	0,1221	0,5740	0,3291	0,7084	0,1734	0,9696	0,5546	0,4229	0,7347	0,4758	0,1195	0,9638	0,7019	0,3829	0,1490

Tabela 6 : Resultados da intervenção nutricional e a relação com genótipo.

Polimorfismo	P2/P1 (kg)	P3/P1 (kg)	P rel. 2/P rel.1 (%)	P rel.3/P rel.t1 (%)	IMC2/IMC1 (kg/m ²)	IMC3/IMC1 (kg/m ²)	CA2/CA1 (cm)	CA3/CA1 (cm)	CA rel.2/CA rel.1 (%)	CA rel.3/CA rel.t1 (%)	COL 2/COL1 (mg/dl)	COL3/COL1 (mg/dl)	HDL2/HDL1 (mg/dl)	HDL3/HDL1 (mg/dl)	VLDL2/VLDL1 (mg/dl)	VLDL3/VLDL1 (mg/dl)	LDL2/LDL1 (mg/dl)	LDL3/LDL1 (mg/dl)	TG2/TG1 (mg/dl)	TG3/TG1 (mg/dl)	GLUC2/GLUC1 (mg/dl)	GLUC3/GLUC1 (mg/dl)
CEPT-TaqlB (rs 708272)																						
B1B1	-0,90 ± 2,85	0,48 ± 3,11	-1,37 ± 3,48	0,51 ± 3,88	-0,6 ± 1,09	0,16 ± 1,19	-1,83 ± 2,23	-0,41 ± 2,83	-1,90 ± 2,26	-0,46 ± 3,05	-12,74 ± 37,03	-6,40 ± 38,76	-3,58 ± 8,63	-1,40 ± 7,84	-2,50 ± 15,21	-5,35 ± 19,83	-6,41 ± 29,77	1,89 ± 34,97	-2,82 ± 61,64	-13,29 ± 75,66	0,83 ± 7,94	4,64 ± 7,77
B1B2	-1,98 ± 4,51	-1,68 ± 4,36	-2,25 ± 5,44	-1,86 ± 5,35	-0,77 ± 1,72	-0,68 ± 1,62	-2,07 ± 4,64	-2,09 ± 5,51	-1,97 ± 4,44	-1,94 ± 5,55	-13,62 ± 31,52	-3,46 ± 41,95	1,03 ± 10,58	-2,19 ± 10,09	-5,64 ± 9,70	1,98 ± 20,29	-7,82 ± 30,95	2,64 ± 38,03	-28,45 ± 47,85	-18,44 ± 65,20	-1,50 ± 11,80	-2,69 ± 10,95
B2B2	-1,68 ± 1,18	-2,60 ± 3,07	-2,14 ± 1,55	-3,29 ± 3,77	-0,69 ± 0,50	-0,97 ± 1,21	-1,50 ± 1,38	-3,50 ± 4,51	-1,46 ± 1,25	-3,38 ± 4,10	26,50 ± 75,02	11,00 ± 28,92	0,50 ± 9,40	-3,80 ± 15,17	-0,85 ± 4,45	7,51 ± 10,39	27,75 ± 70,73	36,43 ± 66,54	-8,83 ± 20,86	8,33 ± 56,26	0,00 ± 5,44	-2,40 ± 17,53
Valor de p	0,6244	0,4215	0,2040	0,7040	0,6398	0,4528	0,8765	0,3150	0,8846	0,6629	0,0858	0,7637	0,3044	0,9363	0,5192	0,3417	0,0808	0,1636	0,5920	0,5378	0,7418	0,1564
APOC3 - C3238G (rs 5128)																						
CC	-1,09 ± 14,07	-0,31 ± 4,19	-1,15 ± 4,82	-0,11 ± 5,23	-0,41 ± 1,57	-0,11 ± 1,56	-1,68 ± 4,05	-0,86 ± 4,47	-1,60 ± 3,87	-0,75 ± 4,46	-8,95 ± 43,33	-1,03 ± 32,45	-0,19 ± 9,44	-3,03 ± 10,16	-4,35 ± 12,87	-1,01 ± 19,65	-2,99 ± 40,02	9,87 ± 39,81	-23,87 ± 64,11	-8,45 ± 96,37	-0,53 ± 7,70	0,34 ± 10,96
G	-1,63 ± 3,26	-0,55 ± 3,76	-2,62 ± 4,18	-0,95 ± 5,06	-0,66 ± 1,22	-0,25 ± 1,48	-2,07 ± 12,29	-1,50 ± 4,08	-2,33 ± 4,58	-1,67 ± 4,58	-10,36 ± 32,75	-7,30 ± 32,98	-1,14 ± 11,43	-1,40 ± 8,77	-4,91 ± 10,81	-5,12 ± 8,55	-5,03 ± 30,43	0,77 ± 32,31	-21,86 ± 52,87	-27,00 ± 40,31	-0,50 ± 11,82	-0,80 ± 10,25
Valor de p	0,6587	0,9798	0,2091	0,5838	0,5902	0,9305	0,6837	0,9449	0,4527	0,5060	0,9408	0,6305	0,9216	0,6671	0,8811	0,2387	0,8789	0,4898	0,9027	0,6066	0,9645	0,7245
ACTN - 577XX (rs)																						
RR	-2,40 ± 4,27	-0,83 ± 3,95	-2,63 ± 4,61	-0,63 ± 5,05	-0,91 ± 1,63	-1,73 ± 6,72	-1,71 ± 3,92	-0,63 ± 4,74	-1,62 ± 3,40	-0,53 ± 4,57	-4,95 ± 54,11	-9,56 ± 48,63	1,82 ± 11,91	-3,44 ± 10,74	-3,06 ± 12,67	-2,31 ± 21,93	-1,46 ± 48,82	-23,77 ± 74,38	-17,97 ± 64,56	-13,63 ± 104,58	1,18 ± 10,72	-4,20 ± 9,80
RX	-0,98 ± 3,23	-0,74 ± 4,27	-1,40 ± 4,21	-0,92 ± 5,29	-0,41 ± 1,20	-0,32 ± 1,55	-2,07 ± 3,35	-1,83 ± 4,42	-2,02 ± 3,57	-1,72 ± 4,65	-15,37 ± 29,70	-5,70 ± 31,89	-1,90 ± 9,10	-3,61 ± 9,48	-3,22 ± 11,49	-3,02 ± 15,01	-9,64 ± 27,12	1,32 ± 28,61	-20,07 ± 55,64	-19,71 ± 81,24	-2,34 ± 10,78	0,57 ± 10,76
XX	0,00 ± 4,08	1,16 ± 3,85	-0,15 ± 5,95	1,65 ± 5,60	0,00 ± 1,71	0,49 ± 1,57	-0,43 ± 2,57	-0,14 ± 2,67	-0,58 ± 2,72	-0,29 ± 2,87	6,63 ± 25,51	19,38 ± 31,27	-0,38 ± 6,50	3,88 ± 6,66	-6,32 ± 10,09	2,89 ± 14,50	13,08 ± 25,36	30,21 ± 54,65	-33,38 ± 48,01	7,63 ± 67,40	-0,13 ± 3,76	4,00 ± 13,33
Valor de p	0,2095	0,2875	0,2799	0,2600	0,2327	0,2538	0,4360	0,5819	0,4463	0,4002	0,2070	0,0625	0,2246	0,1578	0,7506	0,8423	0,1795	0,0154	0,7930	0,8924	0,5120	0,1421
ECA - I/D (rs)																						
DD	-2,54 ± 11,21	0,37 ± 3,45	-1,00 ± 4,29	0,63 ± 4,46	-0,33 ± 1,41	0,13 ± 1,29	-1,49 ± 3,92	-0,33 ± 4,25	-1,47 ± 3,82	-0,22 ± 4,29	-4,68 ± 42,27	-0,55 ± 32,73	0,38 ± 10,75	-3,32 ± 10,44	-3,55 ± 12,25	-0,54 ± 18,04	0,09 ± 37,98	-11,16 ± 59,06	-21,08 ± 62,22	-4,90 ± 91,33	1,25 ± 7,89	1,13 ± 9,20
ID	-2,48 ± 4,65	-2,12 ± 5,74	-2,45 ± 5,68	-2,06 ± 6,97	-0,90 ± 1,85	-0,75 ± 2,21	-2,45 ± 2,90	-2,44 ± 4,00	-2,29 ± 2,78	-2,20 ± 3,78	-15,00 ± 26,58	4,25 ± 32,05	-0,40 ± 8,25	1,63 ± 7,14	-7,35 ± 10,28	-5,87 ± 18,04	-9,42 ± 28,89	8,46 ± 28,36	-27,80 ± 46,56	-29,50 ± 91,62	-9,70 ± 12,57	-8,63 ± 10,86
II	-2,50 ± 1,80	-2,74 ± 2,83	-3,68 ± 2,61	-3,77 ± 3,54	-1,04 ± 0,73	-1,11 ± 1,10	-2,00 ± 1,79	-3,56 ± 3,86	-2,18 ± 1,99	-3,78 ± 3,91	-18,00 ± 38,33	-18,25 ± 56,63	-3,10 ± 6,70	-2,13 ± 7,44	-1,55 ± 10,19	-2,21 ± 10,16	-12,59 ± 34,00	3,31 ± 70,15	-14,40 ± 42,71	-16,00 ± 38,61	0,40 ± 9,39	2,13 ± 13,13
Valor de p	0,3381	0,1225	0,7546	0,1111	0,3054	0,1148	0,8623	0,2842	0,8945	0,2657	0,4537	0,3667	0,9477	0,3460	0,5831	0,4424	0,3309	0,8723	0,9094	0,5246	0,0030	0,0509

Tabela 7 : Resultados da intervenção nutricional e a relação com o tipo de TARV.

Tipo de TARV	P2/P1	P3/P1	P rel.2./P rel.1	P rel.3/P rel.1	IMC2/IMC1	IMC3/IMC1	CA2/CA1	CA3/CA1	CA rel.2/Ca rel.1	CA rel.3/CA rel.1		
Uso de IP	(kg)	(kg)	(%)	(%)	(kg/m ²)	(kg/m ²)	(cm)	(cm)				
sim	-1,54 ± 4,27	-0,78 ± 4,30	-1,83 ± 4,88	-0,84 ± 5,26	-0,58 ± 1,63	-1,13 ± 5,33	-2,19 ± 3,78	-1,70 ± 4,37	-2,14 ± 3,49	-1,66 ± 4,31		
não	-1,26 ± 3,00	-0,15 ± 4,15	-1,61 ± 4,15	0,04 ± 5,21	-0,53 ± 1,15	-0,12 ± 1,41	-1,04 ± 2,96	-0,45 ± 4,31	-1,02 ± 3,20	-0,33 ± 4,55		
Valor de p	0,7049	0,3059	0,8235	0,3645	0,8005	0,4365	0,1977	0,0566	0,187	0,1309		
	COL 2/COL1	COL3/COL1	HDL2/HDL1	HDL3/HDL1	VLDL2/VLDL1	VLDL3/VLDL1	LDL2/LDL1	LDL3/LDL1	TG2/TG1	TG3/TG1	GLIC2/GLIC1	GLIC3/GLIC1
	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
sim	-10,86 ± 32,29	-4,82 ± 40,95	-2,40 ± 10,78	-3,32 ± 8,48	-3,89 ± 11,06	0,84 ± 17,32	-3,19 ± 30,03	2,35 ± 49,44	-21,19 ± 54,03	1,79 ± 83,64	0,09 ± 9,08	-0,36 ± 11,06
não	-5,48 ± 49,69	0,32 ± 36,49	2,56 ± 8,02	-0,74 ± 11,47	-3,14 ± 12,61	-5,46 ± 16,88	-4,20 ± 45,01	-10,56 ± 64,03	-20,96 ± 63,06	-34,00 ± 88,35	-1,84 ± 11,46	-0,44 ± 11,44
Valor de p	0,6879	0,7196	0,0289	0,3785	0,7239	0,0346	0,8684	0,6342	0,9591	0,0529	0,4102	0,886

7 DISCUSSÃO

Pacientes HIV positivo em tratamento com drogas antirretrovirais apresentam frequentemente distúrbios metabólicos como dislipidemia e lipodistrofia, principalmente quando o uso de IP está incluído no coquetel medicamentoso. Por isso muitos são encaminhados para orientação nutricional a fim de se tentar equilibrar estes distúrbios pela dieta adequada. Neste universo, as diferenças genéticas podem influenciar tanto na gravidade dos distúrbios metabólicos, como na resposta à intervenção nutricional. Tivemos acesso a dezenas de pacientes HIV+ fazendo uso de TARV encaminhados por médicos para orientação nutricional. Este estudo aborda a contribuição de quatro importantes polimorfismos conhecidos por interferirem no metabolismo energético, tendo como resultados principais a influência do polimorfismo R577X do gene ACTN3 sobre a glicemia e os triglicerídeos plasmáticos, além de mostrar que pacientes HIV+, com o genótipo RR para o polimorfismo da ACTN3, respondem melhor a intervenção nutricional com relação a redução de LDL. Também importante ver que pacientes que fazem uso de IP na TARV apresentam melhor resposta à intervenção nutricional quanto à redução de peso e CA, e apresentam paradoxalmente piora nos parâmetros de HDL e VLDL.

Esta influência do polimorfismo R577X da ACTN3 no metabolismo já vem sendo sugerida por diversos autores (MacArthur and North, 2007; MacArthur et al., 2007; Moran et al., 2007; Holterhoff et al., 2009; Quinlan et al., 2010; Chan et al., 2011). Este polimorfismo é muito conhecido por influenciar na performance atlética em competidores de alto nível, sendo os genótipos RR e RX favoráveis para provas de força e velocidade, e o genótipo XX favorável para provas de resistência como as maratonas ((Yang et al., 2003; Papadimitriou et al., 2008; Santiago et al., 2008; Eynon et al., 2009; Chiu et al., 2011; Erskine et al., 2013; Pimenta et al., 2013; Mikami et al., 2014). Lembrando que o alelo X determina um código de parada na síntese da proteína actn3, os indivíduos com genótipo XX não possuem esta proteína que tem seu papel específico na estabilização do sarcômero nas fibras tipo IIb do músculo esquelético (SJOBLÖM, 2008). Nos indivíduos XX, deficientes para a proteína actn3, esta estabilização é feita pela proteína actn2, a qual tem o mesmo papel nos outros tipos de fibras musculares (MILLS 2011). Vários fatos vem indicando que este polimorfismo está também ligado ao metabolismo: camundongos

nocautes para a proteína *actn3* apresentam maior quantidade de fibras do tipo I no músculo esquelético do que seus controles (MACARTHUR, 2007), a prevalência da mutação X é muito maior nos indivíduos descendentes da migração dos antepassados africanos para os outros continentes, indicando uma pressão de seleção durante uma viagem de milhares de quilômetros feita predominantemente a pé (AMORIM, 2015). Neste trabalho mostramos pela primeira vez que este polimorfismo influencia o prognóstico da intervenção nutricional em pacientes HIV+.

Observa-se também que a procura pelo atendimento nutricional é maior entre as mulheres, 69,3% contra 30,7% dos homens. Além disso, as mulheres fazem uso de IP mais frequentemente que os homens, (77,7% vs. 33,3%), isso pode ser um dos fatores que fez com que as mulheres buscassem mais tratamento nutricional, pois já é sabido a relação dos IP na TARV com o aumento da lipodistrofia, mas também pode ser resultado da maior preocupação do sexo feminino com a imagem corporal e cuidados com a saúde (SEIDL, 2008). As estimativas de prevalência da síndrome lipodistrófica do HIV são pouco precisas, porém estudos no sexo feminino mostraram alta prevalência da mudança corporal. Dragović et al. (2014) em um estudo com 840 paciente HIV positivo em uso TARV, mostrou uma prevalência de lipodistrofia de 69,2% e entre os fatores de risco está o sexo feminino e o uso de IP.

Muito importante notar que as frequências alélicas dos polimorfismos R577X da *ACTN3* e C3238G da *APOC3* foram semelhantes aos descritos anteriormente em populações da mesma região geográfica, ou etnia, (Amorim, 2014; Lazzaretti, 2013) e estão em equilíbrio Hardy-Weinberg ($p=0,2500$; $p=0,1698$, respectivamente), mas nos polimorfismos TaqIB da *CEPT* e I/D da *ECA*, as frequências genotípicas não foram distribuídos de acordo com o que era esperado sob Hardy-Weinberg (tabela 3). No gene da *CEPT*, esse desvio foi maior em relação ao número de heterozitos, B1B2 do que o esperado. Já no gene da *ECA* há um grande desvio aparecendo um grande número de pacientes DD, muito acima do esperado pela comparação com a distribuição mundial deste polimorfismo (figura 2). Isso é indício muito forte de que possa haver uma maior susceptibilidade dos indivíduos de genótipo DD à infecção, ou maior tendência destes indivíduos em apresentarem distúrbios metabólicos, uma vez que na amostra estudada havia somente pacientes com dislipidemia indicados para a consulta nutricional. Entretanto, estas hipóteses precisam de estudos

específicos abrangendo um número maior pacientes HIV+, com e sem dislipidemia, e também um grupo controle de pessoas não infectadas na mesma população.

Nota-se que a intervenção nutricional se mostra efetiva no primeiro mês em relação ao perfil antropométrico, ou seja, há efeito no peso, IMC, e CA na coleta 2 quando comparada a coleta 1. Isso mostra o comprometimento dos pacientes com a mudanças de hábitos alimentares no primeiro momento e a efetividade da prescrição nutricional, porém essas medidas voltam a aumentar na terceira coleta. Esta tendência de perda de efeito da intervenção nutricional já é bem conhecida e confirma dados da literatura, onde ocorre abandono de tratamento nutricional com o passar do tempo. Isso ocorre especificamente em pacientes HIV+, onde a curva de perda e ganho de peso é mais acentuada devido o medo do emagrecimento nessa população. Cianflone (2010) realizou um estudo prospectivo para avaliar as tendências de peso durante a epidemia e os fatores associados às alterações de peso entre pacientes durante a infecção pelo HIV, este demonstrou que a maioria dos pacientes infectados pelo HIV ganham peso durante a sua infecção, em vez de perderem peso ou ficarem abaixo do peso normal; menor IMC no diagnóstico do que após alguns anos; e maior ganho de peso. A explicação possível é que os pacientes infectados pelo HIV, e que percebem estar abaixo do peso, tentam esconder sua condição de portador, uma vez que a infecção estava associado ao baixo peso e desnutrição, num passado ainda próximo.

Concluindo, nossos resultados mostram que o polimorfismo R577X da ACTN3 pode influenciar tanto o perfil lipídico de pacientes HIV+, como determinar o prognóstico da intervenção nutricional quanto à redução de LDL. Além disso, mostramos uma maior prevalência de mulheres infectadas procurando orientação nutricional, e que estas tendem a fazer maior uso de IP junto a TARV. Adicionalmente, pacientes usando IP respondem melhor a intervenção nutricional com relação à perda de peso, mas pior quanto à melhora do perfil lipídico, sugerindo a necessidade do uso de hipolipemiantes orais neste grupo de pacientes.

8 REFERÊNCIAS

1000 GENOME, **A Depp Catalog of Human Genetic Variation**, Disponível em: < <http://www.1000genome.org> > Acesso em: 04 de março de 2015.

AHMETOV, I. I. et al. The association of ACE, ACTN3 and PPARA gene variants with strength phenotypes in middle school-age children. **Journal of Physiological Sciences**, **63**(1):79-85. 2013.

ALKHATIB, G. et al CC CKR5: A RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β Receptor, as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. **Science** **272**: 1955-1958. 1996.

AMORIM, C. E. G. et al. "Differing Evolutionary Histories of the ACTN3*R577X Polymorphism among the Major Human Geographic Groups." Ed. **Francesc Calafell. PLoS ONE** **10.2**: e0115449. PMC. Web. 17 Mar. 2015.

ANDRADE, F. M.; HUTZ, M. H. O componente genético da determinação dos lipídios séricos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. **7**, n. **1**, p. 175-182. 2002.

ARNEDO, M. et al. Contribution of 20 single nucleotide polymorphisms of 13 genes to dyslipidemia associated with antiretroviral therapy. **Pharmacogenet Genomics**, v. **17**, p. 755- 764. 2007.

BARTER, P.J. et al. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. **23**, p. 160-167, 2003.

BEGGS. A. H. et al. Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. **Journal of Biological Chemistry**; **267**(13):9281-9288.1992.

BOEKHOLDT SM, THOMPSON JF. Natural genetic variation as a tool in understanding the role of *CETP* in lipid levels and disease. **J Lipid Res.**;44(6):1080-93. 2003

BRASIL, Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - **Programa Nacional de DST e Aids. Boletim Epidemiológico AIDS ano III**, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portal sobre aids, doenças sexualmente transmissíveis e hepatites virais, 2011.** Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/aids-no-brasil>>. Acessado em 04 mar. 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Recomendações para terapia antirretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV 2014.** Disponível em <<http://www.aids.gov.br/pagina/quais-sao-os-antirretrovirais>>. Acessado em 04 mar 2015.

BREWSTER, U.C., Perazella, M.A. The renin- angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. **American Journal of Medicine**, **116**, 263-272. 2004

BROUSSEAU, M.E et al.. Cholesteryl ester transfer protein TaqI B2B2 genotypes is associated with higher HDL cholesterol levels and lower risk of coronary heart disease end points in men with HDL deficiency. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** ., v. **22**, p. 1148-1154, 2002.

CAMBIEN F, Poirier O, Lecerf L et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction **Nature**; **359**: 641-4.1992.

CARLQUIST, J.F et al..; The cholesteryl ester transfer protein Taq IB gene polymorphis predicts clinical benefit of statin therapy in patients with significant coronary artery disease. **Am Heart J** , v. **146**, p. 1007-1014, 2003.

CARR A. et al. Pathogenesis of HIV-1 protease inhibitor-associated peripheral lipodystrophy, hyper-lipidaemia, and insulin resistance. **Lancet**; **351**:1881–3.1998.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men. **New York City and California. Morbil. Mortal. Wkly. Rep. v. 25**, p. 305-8.1981.

CHAN H.S. et al Properties of extensor digitorum longus muscle and skinned fibers from adult and aged male and female Actn3 knockout mice. **Muscle Nerve**, **43(1)**:37-48. 2011.

CORELLA, D.; ORDOVAS, J.M. Single nucleotide polymorphisms that influence lipid metabolism: interaction with dietary factors. **Annual Rev Nutrit** , **v. 25**, P. 341-390, 2005.

CUPARI, L. **Nutrição Clínica no Adulto. 1º ed.** Tamboré, ed. Manole, 2002.

CURTI MLR, ALMEIDA LB, JAIME PC. Evolução de parâmetros antropométricos em portadores do vírus da Imunodeficiência Humana ou com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida: um estudo prospectivo. **Rev Nutr Campinas. v. 23(1)**, p. 57-64, 2010.

DAMMERMAN M, BRESLOW JL. Genetic basis of lipoprotein disorders. **Circulation** **91**:505-512. 1995.

DANESHPOUR, M.; HEDAYATI, M.; AZIZI, F. TaqI B1/B2 and -629A/C cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene polymorphisms and their association with CETP activity and high-density lipoprotein cholesterol levels in a Tehranian population. Part of the Tehran lipid and glucose study (TLGS). **Genet Mol Biol** , **v. 30**, p. 1039-1046, 2007.

DELMONICO M.J. et al. Association of the ACTN3 genotype and physical functioning with age in older adults. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** **63**:1227-1234, 2008.

DRAGOVIĆ. G. et al. "Lipodystrophy induced by combination antiretroviral therapy in HIV/AIDS patients: A Belgrade cohort study." **Vojnosanitetski preglod** **71.8** : 746-750.2008.

DUBE, M.P.; et al. Guidelines for the evaluation and management of dyslipidemia in human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults receiving antiretroviral therapy: recommendations of the HIV. **Medical Association of the Infectious Disease Society of America and the Adult AIDS Clinical Trials Group. Clin Infect Dis.v. 37**, p. 613-27, 2003.

ERSKINE R.M. et al. The individual and combined influence of ACE and ACTN3 genotypes on muscle phenotypes before and after strength training. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**. 2013.

EYNON N. et al. ACTN3 R577X polymorphism and Israeli top-level athletes. **International Journal of Sports Medicine**. **30**(9):695-698.2009.

FLING, O. P. et al. The Role of Protease Inhibitors in the Pathogenesis of HIVAssociated Lipodystrophy: Cellular Mechanisms and Clinical Implications, **Toxicol Pathol**, v **37**, p. 65-77. 2009.

FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**, 4 edição revista e atualizada, 2010.

GANGABADAGE, C. S. et al. Structure and Dynamics of Human Apolipoprotein C3. **The Journal of Biological Chemistry**, v. **283**, n. 25, p. 17416-17427. 2008.

HILBERT P, Lindpainter K, Beckmann JS et al. Chromosomal mapping of two loci associated with blood pressure regulation in hereditary hypertensive rats. **Nature**; **353**: 521-9. 1991.

HOLTERHOFF C.K. et al. Sequence and expression of the zebrafish alpha-actinin gene family reveals conservation and diversification among vertebrates. **Developmental Dynamics**. **238**(11):2936-2947.2009.

HUMPHRIES, S.E.; MORGAN, L. Genetics risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches. **Lancet Neurol** , v. **4**, p. 227-235, 2004.

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature** **409**:860-921, 2001.

IWAI N. et al. DD genotype of the angiotensin converting enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy. **Circulation**; **90**: 2622-8. 1994

Lazzaretti R.K. et al. Genetic markers associated to dyslipidemia in HIV-infected individuals on HAART. **Scientific World Journal**:608415.2013.

LEAN, M.E.J.; HAN, T.S.; MORRISON, C.E. .Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. **BMJ**. v. **311**, p. 158-61, 1995.

LI, T.L. et al. Interaction between dietary fat intake and the cholesterol ester transfer protein TaqIB polymorphism in relation to HDL-cholesterol concentrations among US diabetic men. **Am J Clin Nutr** , v. **86**, p. 1524-1529, 2007.

LITTELL, R.C. et al. SAS system for mixed models. **Cary: Statistical**, **633**. 1996.

LIU, S. et al.. A prospective study of TaqIB polymorphism in the gene coding for cholesteryl ester transfer protein and risk of myocardial infarction in middle-aged men. **Atherosclerosis** , v. **161**, p. 469-474, 2002.

MacArthur D. G. et al. Loss of ACTN3 gene function alters mouse muscle metabolism and shows evidence of positive selection in humans. **Nature Genetics**. **39**(10):1261-1265.2007

MACARTHUR D.G, NORTH K.N. ACTN3: A genetic influence on muscle function and athletic performance. **Exercise and Sports Sciences Reviews**; **35**(1):30-34.2007.

MACARTHUR D.G. et al. Loss of ACTN3 gene function alters mouse muscle metabolism and shows evidence of positive selection in humans. **Nature Genetics**; **39**(10):1261-1265. 2007.

MAHUNGU, T. W. et al. The Relationships of ABCB1 3435C>T and CYP2B6 516G>T With High-Density Lipoprotein Cholesterol in HIV-Infected Patients Receiving Efavirenz. **Clinical Pharmacolgy and Therapeutics**, v. **86**, p. 204-211. 2009.

MIKAMI E. ACTN3 R577X genotype is associated with sprinting in elite Japanese athletes. **International Journal of Sports Medicine**; **35**(2):172-177. 2014

MILLS, M et al. Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. **Hum Mol Genet**; **10**:1335-46. 2001.

MILTADOUS, G.et al. Gene polymorphisms affecting HDL- cholesterol levels in the normolipidemic population. **Nutr Metab Cardiovasc Dis** , v. **15**, p. 219–224, 2005.

MORAN C.N. et al. Association analysis of the ACTN3 R577X polymorphism and complex quantitative body composition and performance phenotypes in adolescent Greeks. **European Journal of Human Genetics**; **15**(1):88-93. 2007.

NARVÁEZ, E. A. R. et al. Abdominal obesity and hyperglycemia mask the effect of a common APOC3 haplotype on the risk of myocardial infarction. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. **87**, n. 6, p. 1932-1938. 2008.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. Third report of the NCEP Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults – executive summary, **National Institutes of Health Publication. v.01**, 2001.

NORTH K.N. et al. A common nonsense mutation results in alpha-actinin-3 deficiency in the general population. **Nat Genet. 21**:353-4 10. 1999.

NORTH K.N; BEGGS A.H. Deficiency of a skeletal muscle isoform of alpha-actinin (alpha-actinin-3) in merosin-positive congenital muscular dystrophy. **Neuromuscul Disord. 6**:229-35. 1996.

OMS, FAO. **Manual sobre cuidados e apoio nutricionais aos enfermos de HIV / AIDS**, 2003.

PAPADIMITRIOU I.D. et al. The ACTN3 gene in elite Greek track and field athletes. **International Journal of Sports Medicine.**; **29**(4):352-355. 2008.

PARZIANELLO, L. et al. Apolipoprotein C3 polymorphism and triglyceride levels of Japanese population living in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 41**, p. 462-467. 2008.

PEREIRA, S. B. et al. ACTN3 R577X polymorphism and long-term survival in patients with chronic heart failure, **BMC Cardiovasc Disord. Jul 24**;14:90. 2014.

PIMENTA E. M. et al. Effect of ACTN3 gene on strength and endurance in soccer players. **Journal of Strength & Conditioning Research. 27**(12):3286-3292. 2013.

POLACOW, V. O. et al. Alterações do estado nutricional e dietoterapia na infecção por HIV. **Ver. Bras. Nut. Clín. v. 19**, p. 79-85, 2004.

QUINLAN K. G, et al. Alpha-actinin-3 deficiency results in reduced glycogen phosphorylase activity and altered calcium handling in skeletal muscle. **Human Molecular Genetics**.**19**(7):1335-1346. 2010.

RIGAT, B. et al. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. **J. Clin Invest**; **86**: 1343-6. 1990.

SANTIAGO C. et al. ACTN3 genotype in professional soccer players. **British Journal of Sports Medicine**. **42**(1):71-73.2008.

SAYED-TABATABAEI FA, et al. ACE polymorphisms. **Circulation Research**. **98**:1123–1133. 2006.

SBC, Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Departamento de Aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**. v. **88**(Supl I), p.2-19, 2007.

SEIDL, E.M, MACHADO, A. C. Psychological well-being, coping and lipodystrophy in HIV/AIDS people. **Psicol Estud** **13**:239-47. 2008.

SHANG X, et al. ACTN3 R577X polymorphism and performance phenotypes in young Chinese male soldiers. **Journal of Sports Science**. 30(3):255-260.2012.

SHANKER, J. et al. Genetic studies on the APOAI-C3-A5 gene cluster in Asian Indians with premature coronary artery disease. **Lipids in Health and Disease**, v. **7**, p. 33. 2008.

SHUNNKERT H. et al. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin- converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy. **N Engl J Med** **330**: 1634-8. 1994.

SJOBLOM, B.; SALMAZO A.; DJINOVIC-CARUGO K. a- -Actinin structure and regulation. **Cell Mol Life Sci** **65**(17):2688-701.2008.

SORLI, J.V.et al.. The effect of the APOE polymorphisms on HDL-C concentration depends on the cholesterol ester transfer protein gene variation in a Southern European population. **Clin Chim Act**, v. **366**, p. 196-203, 2006.

STAN C. A. et al. Effect of Gene Polymorphisms onLipoprotein Levels in Patients with Dyslipidemia of Metabolic Syndrome. **Physiol Res** , v. **55**, p. 483-490, 2006.

TALMUD, P. J. et al. Apolipoprotein C3 gene variation ans dyslipidaemia. **Current Opinion in Lipidology**, v. **8**, p. 154-158. 1997.

TERSHAKOVEE, A.M.; FRANK, I.; RADER, D., HIV-related lipodystrophy and relaed factor atherosclerosis. v.174(1), p.1-10, May – 2004.

THE BIOLOGY PROJECT. **The Replication Cycle of HIV, 2000**. Disponível em: < <http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/AIDS/treatment.html>> Acesso em: 11 de Julho de 2014.

UNAIDS – **Programa Conjunto das nações Unidas sobre HIV/AIDS**. Disponível em:< http://www.unaids.org.br/sobre_aids/sobre_aids.asp> Acesso em: 04 de março de 2015.

WANG CS et al.Modulation of lipoprotein activity by apolipoproteins. Effect of apolipoproteina C-III. **J Clin Invest** ,**75**:384-90. 1985

WHO, Word Health Organization. Nutrient requirements for people living with HIV/AIDS . **Reports of a technical consultation**. Genebra, 2003.

WHO, Word Health Organization. OBESITY: Preventing and managing the global epidemic. **Report of a WHO consultation on obesity, Geneve**, 1998.

VINCENT B. et al. ACTN3 (R577X) genotype is associated with fiber type distribution. **Physiological Genomics**.**38**: 58-63. 2007.

YANG N. et al. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. **Am J Hum Genet**. **73**:627-31.2003.

9 ANEXOS

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estamos realizando o estudo “*Influência dos polimorfismos nos genes APOC3 e CETP no sucesso de intervenção nutricional hipolipemiante em pacientes HIV+*”. Esta pesquisa pretende verificar a associação de alguns dos genes com alterações no perfil lipídico dos pacientes com AIDS em uso de terapia antirretroviral, submetidos à intervenção nutricional.

A introdução da terapia antirretroviral potente, no controle do HIV +, na década de 90, está associada a uma grande redução de taxas de infecções e de mortes. Apesar do sucesso, a essa terapia também está associada ao aumento dos níveis de colesterol e triglicerídeos, estas complicações são fatores de risco para doenças do coração, acreditamos que através de análises de sangue e de DNA, e o acompanhamento nutricional poderemos minimizar o desenvolvimento destes fatores de risco nesses pacientes.

O estudo será realizado através de acompanhamento do paciente atendido no Hospital Dia da Universidade Federal de Rio Grande, em consulta nutricional, monitoramento de exames de sangue, avaliando o colesterol, triglicerídeos e a coleta de genética será realizada através do esfregaço de bochecha, onde observaremos quais são as variantes genéticas de cada indivíduo.

Ao participar do projeto os riscos serão mínimos, podendo haver formação de um hematoma no braço em função da coleta de sangue. O seu custo neste estudo será o seu deslocamento até o Hospital Dia da FURG para as consultas nutricionais e para a coleta de uma amostra de sangue a cada 3 meses, sendo os mesmos parte da rotina do tratamento dos pacientes com HIV.

Embora esta pesquisa não possa gerar nenhum benefício imediato aos participantes, este estudo poderá trazer vários benefícios em longo prazo. Espera-se que ao final deste estudo seja possível contribuir para o entendimento de quais pessoas tem maior risco de desenvolver problemas do coração relacionados ao uso dos medicamentos antirretrovirais. Assim, poderemos determinar com maior precisão qual o tipo de terapia mais indicada para cada paciente.

É importante esclarecer que, caso você decida não participar, você continuará sendo atendido pela nutricionista através do ambulatório do Hospital Dia.

Durante todo o período da pesquisa você tem o direito de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento, bastando para isso entrar em contato, com algum dos pesquisadores ou com o Conselho de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário/ FURG.

Você tem garantido o seu direito de não aceitar participar ou de retirar sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ou retaliação, pela sua decisão.

As informações desta pesquisa serão confidenciais, e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos

voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação.

Autorização:

Eu, _____, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto expresso minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.

Assinatura do voluntário ou de seu representante legal

Em caso de dúvidas ou para obter mais informações sobre esse estudo, poderá entrar em contato com:

Prof. Carlos Castilhos de Barros

Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas - Fone (53) 3921.1309

ou Mestranda Laura C R Aranalde - Celular (53) 8114.7928

Prof. Carlos Castilhos de Barros
Orientador

Laura C R Aranalde
Mestranda

Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética, Faculdade de Medicina UFPEL.

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PELOTAS

**PARECER DO COLEGIADO****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES APOC3 E CETP NO SUCESSO DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL HIPOLIPEMIANTE EM PACIENTES HIV

Pesquisador: Laura Carneiro da Rosa Aranalde

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 26782314.3.0000.5317

Instituição Proponente: Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Rio Grande - FURG

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 546.009

Data da Relatoria: 27/02/2014

Apresentação do Projeto:

A epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) continua a ser um dos grandes desafios para a saúde global. Aproximadamente 33 milhões de pessoas vivem com HIV em todo o mundo. (UNAIDS, 2013). Após a identificação do HIV como o vírus causador da AIDS, vários avanços têm ocorrido no desenvolvimento de drogas efetivas para o tratamento desse vírus. A Terapia antirretroviral (TARV) tem aumentado a expectativa de vida desses pacientes, porém tem trazido alterações metabólicas que resultam em aumento dos triglicerídeos, aumento da resistência à insulina, e diabetes mellitus, contribuindo para o aumento do risco de doenças cardiovasculares. Nos últimos anos tem sido observada uma série de anormalidades na distribuição da gordura corporal desses pacientes em uso de TARV (principalmente causada pelos inibidores da protease), chamada de lipodistrofia. A lipodistrofia é caracterizada pelo acúmulo de gordura na região dorso cervical, aumento da circunferência abdominal e do tamanho das mamas e pela redução da gordura em face, glúteos e membros (FOCCACCIA, 2010). Os mecanismos exatos pelos quais os inibidores da protease provocam alterações metabólicas ainda não são completamente esclarecidos. Sabe-se que este efeito se deve a inibição inespecífica de algumas proteases do hospedeiro, uma vez que a família das proteases é muito numerosa e encontrar um

Endereço: Rua Prof Araujo, 465 sala 301

Bairro: Centro

CEP: 96.020-360

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PELOTAS



Continuação do Parecer: 546.009

inibidor que atue somente na protease viral é muito difícil. Algumas evidências demonstram que esta inibição indesejável das proteases do paciente causa toxicidade mitocondrial e alterações principalmente, no tecido adiposo, como aumento da apoptose e diferenciação celular, e tem um papel importante nas alterações desses indivíduos. A identificação dos componentes genéticos que podem influenciar nessas mudanças no metabolismo tem sido intensamente investigada nos últimos anos. Esses estudos ainda não descrevem quais são os polimorfismos ligados à resposta dos indivíduos ao tratamento dietético. Desta forma, a identificação destes polimorfismos genéticos poderá possibilitar o tratamento individualizado de pacientes sobre TARV, no que diz respeito à intervenção dietética ou introdução de terapia medicamentosa preventiva para dislipidemia.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Verificar a associação dos polimorfismos C3238G e TaqIB, dos genes APOC3 e CETP, com alterações no perfil lipídico dos pacientes infectados pelo HIV/AIDS em uso de terapia antirretroviral, submetidos a intervenção nutricional em um Hospital Dia referência em HIV, na cidade de Rio Grande, Rio Grande do Sul.

Objetivos Específicos

- Verificar se há relação entre o sucesso da intervenção nutricional e os polimorfismos estudados.
- Avaliar a influência dos polimorfismos C3238G e TaqIB no perfil lipídico de indivíduos com AIDS, submetidos a intervenção nutricional;
- Avaliar os níveis de CT, HDL, LDL e TG de pacientes com AIDS antes e após a intervenção nutricional;
- Avaliar o efeito da intervenção nutricional no perfil antropométrico e no risco para doenças cardiovasculares associado aos valores em relação à circunferência abdominal;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Ao participar do projeto os riscos serão mínimos, podendo haver formação de um hematoma no braço em função da coleta de sangue para avaliação do colesterol e triglicerídeos, a cada 3 meses, sendo os mesmos parte da rotina do tratamento dos pacientes com HIV no Hospital Dia. Não havendo nenhum outro risco ao paciente.

Benefícios:

Embora esta pesquisa não possa gerar nenhum benefício imediato aos participantes, este estudo

Endereço: Rua Prof Araujo, 465 sala 301
Bairro: Centro **CEP:** 96.020-360
UF: RS **Município:** PELOTAS
Telefone: (53)3284-4960 **Fax:** (53)3221-3554 **E-mail:** cep.famed@gmail.com

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PELOTAS



Continuação do Parecer: 546.009

poderá trazer vários benefícios em longo prazo. Espera-se que ao final deste estudo seja possível contribuir para o entendimento de quais pessoas tem maior risco de desenvolver doenças cardíacas relacionados ao uso dos medicamentos antirretrovirais. Assim, poderemos determinar com maior precisão qual o tipo de terapia mais indicada para cada paciente e qual a melhor intervenção nutricional.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pacientes HIV positivo em uso de TARV, com dislipidemia sem o uso de medicação hipolipemiante, atendidos no Hospital Dia do Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Correa Jr, centro de referência no tratamento dos portadores do vírus HIV no Estado do Rio Grande do Sul, quando diagnosticados com dislipidemia serão encaminhados para o ambulatório de nutrição. O atendimento nutricional aos pacientes será realizado de acordo com o seguinte esquema: 1) Será informado sobre o projeto e solicitado a assinatura o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; 2) Antropometria: realização de medidas de peso, altura e circunferência abdominal; 3) Solicitação de exames bioquímicos de perfil lipídico e coleta de saliva para extração do DNA genômico, através do esfregaço de mucosa bucal com um swab estéril; 4) Orientação nutricional para uma reeducação alimentar, enfocando as dislipidemias, baseada no National Cholesterol Education Program (NCEP); 5) Acompanhamento em duas consultas nutricionais de retorno. - Primeiro retorno: 1 mês após a primeira consulta. - Segundo retorno: 3 meses após o primeiro retorno.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Anexar autorização da direção do hospital, para a realização do estudo.

Recomendações:

Anexar autorização da direção do hospital, para a realização do estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Anexar autorização da direção do hospital, para a realização do estudo.

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Prof Araujo, 465 sala 301
Bairro: Centro CEP: 96.020-360
UF: RS Município: PELOTAS
Telefone: (53)3284-4960 Fax: (53)3221-3554 E-mail: cep.famed@gmail.com

Anexo 3: Autorização da Direção do Hospital Universitário.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS
(PPGNA)

Pelotas, 17 de março de 2014.

Ao

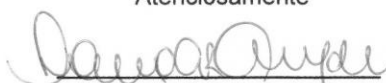
Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Corrêa Junior


Prezados Dra. Helena Heidtmann Vaghetti e Sra. Juliana Bezerra

Vimos por meio desta solicitar autorização para a realização de uma pesquisa intitulada: *Influência dos polimorfismos nos genes APOC3 e CETP no sucesso de intervenção nutricional hipolipemiante em pacientes HIV positivo*. Projeto de dissertação da mestranda Laura Carneiro da Rosa Aranalde, aluna do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas/RS e servidora técnico-administrativo da Universidade Federal de Rio Grande/RS, lotada neste mesmo hospital no cargo de nutricionista. A orientação desse projeto é feita pela Prof. Dr. Carlos Castilho de Barros e co-orientação Prof. Dr. Augusto Schneider. A referida pesquisa será financiada pelo Programa de Pós-Graduação.

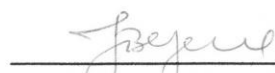
Certos de sua colaboração, desde já agradecemos o apoio.

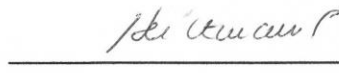
Atenciosamente

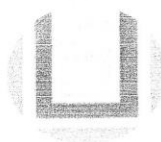

 Laura Carneiro da Rosa Aranalde
 Mestranda PPGNA


 Carlos Castilhos de Barros
 Orientador da pesquisa

Por meio deste instrumento autorizo a execução, neste hospital, do projeto de pesquisa mencionado acima.


 Nut. Juliana Bezerra
 Supervisora Serviço de Nutrição


 Dra. Helena Heidtmann Vaghetti
 Diretora HU-FURG

Anexo 4: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa na área da Saúde- FURG.

CEPAS/FURG
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA NA ÁREA DA SAÚDE
Universidade Federal do Rio Grande - FURG
www.cepas.furg.br

PARECER Nº 23/ 2014**CEPAS CP01/2014**

CAAE: 26782314.3.3001.5324

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES APOC3 E CETP NO SUCESSO DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL HIPOLIPEMIANTE EM PACIENTES HIV POSITIVO

Pesquisador: Laura Cameiro da Rosa Aranalde

PARECER DO CEPAS:

O Comitê, considerando tratar-se de um trabalho relevante, o que justifica seu desenvolvimento, emitiu o parecer de **APROVADO** para o projeto **"INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES APOC3 E CETP NO SUCESSO DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL HIPOLIPEMIANTE EM PACIENTES HIV POSITIVO"**.

Segundo normas da CONEP, deve ser enviado relatório semestral de acompanhamento ao Comitê de Ética em Pesquisa, conforme modelo disponível na página <http://www.cepas.furg.br>.

Data de envio do relatório final: 30/12/2014.

Rio Grande, RS, 10 de abril de 2014.

Eli Sinnott Silva
Profª. Eli Sinnott Silva

Coordenadora do CEPAS/FURG

Prognosis for lipid-lowering nutritional intervention and its association to the use of protease inhibitor and the polymorphisms in APOC3, CEPT, ACE and ACTN3 genes in HIV-positive patients

Laura C.R. Aranalde¹, Bruna S. Pederzoli¹, Thais Marten¹, Flavio C. Barros⁵; Rossana P. Basso², Jussara M. Silveira², Sandra C. Valle¹; Simone Pieniz¹, Ronaldo C. Araujo³; Edgar J. Paredes-Gamero⁴, Ines Schadock¹, Augusto Schneider¹, Carlos C. Barros¹.

1 - School of Nutrition - Federal University of Pelotas, R. Gomes Carneiro nº 01, Pelotas, Brazil

2 - University Hospital Dr. Miguel Riet Correa Jr. - Federal University of Rio Grande, Brazil

3 - Department of Biophysics - Federal University of São Paulo, R. Botucatu, 862, Sao Paulo, Brazil

4 - Department of Biochemistry - Federal University of São Paulo, R. Botucatu, 862- Sao Paulo, Brazil

5 - Paulista University, Sao Paulo, Brazil, Rua Luís Goes, 2211 - Mirandópolis - Sao Paulo, Brazil

Corresponding Author: Carlos Castilho de Barros

Universidade Federal de Pelotas -UFPeI

Laboratório de Nutrifisiogenômica e Metabologia

R. Gomes Carneiro nº 01, Sala 239 - Pelotas - RS

CEP 96010-610

Telefone: +55 53 3921-1270

e-mail: barros_cc@yahoo.com.br

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

ABSTRACT

Objective: Improve the outcome of nutritional interventions in patients positive for human immunodeficiency virus (HIV+ patients) on antiretroviral therapy (ART) and protease inhibitors (PI) by comparing selected polymorphisms in the genes APOC3, CEPT, ACE and ACTN3. *Methods:* Dyslipidemic HIV+ patients received nutritional intervention. Genetic material was collected and biochemical tests requested. Genotyping was performed using buccal cells. *Results:* Sixty-five patients were analyzed. The incorporation of PI was more frequent in women (77% vs. 33% in men). Nutritional intervention improved anthropometric parameters in all genotypes of all tested genes. Patients with RR genotype for the *ACTN3* R577X polymorphism had lower Glycemia (RR = 95.4 ± 6.5 ; RX = 102.6 ± 10.6 ; XX = 110.1 ± 16.3 mg/dL) and reduction of low-density-lipoprotein (LDL: RR = 23.7 ± 15.8 ; RX = 1.32 ± 5.13 ; XX = 30.21 ± 24.4 mg/dL). Patients using PI tended to respond best to dietary intervention when considering the effect on abdominal circumference (-1.70 ± 0.69 with-PI; -0.45 ± 0.86 cm without-PI) but showed a negative response regarding the levels of high-density-lipoprotein (HDL; -2.4 ± 1.70 with-PI, 2.56 ± 1.60 mg/dL without-PI), very-low-density-lipoprotein (VLDL; 0.84 ± 2.73 with-IP; -5.46 ± 3.37 mg/dL without-PI) and triglycerides (TG; 1.79 ± 13.22 with PI; -34.00 ± 17.67 mg/dL without PI). *Conclusion:* Our results show that the *ACTN3* R577X polymorphism appeared to be a good predictor of both the lipid profile and the prognosis of nutritional intervention in reducing LDL in HIV+ patients. Patients using PI responded better to nutritional intervention referring to decreased abdominal circumference, but presented impaired lipid profiles. To avoid these negative effects we suggest the co-application of oral lipid-lowering drugs in all HIV+ patients using PI.

Keywords. AIDS, metabolism, dyslipidemia, metabolic syndrome.

INTRODUCTION

AIDS is a pandemic disease that continues to increase its prevalence worldwide (UNAIDS 2015). Antiretroviral therapy (ART) is an attempt to eliminate the HIV virus from the body. Initial therapy should always include the combination of three antiretroviral agents, two nucleoside reverse-transcriptase inhibitors associated with a non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitor. When these drugs are unable to control the viremia, a protease inhibitor (PI) must be introduced into the therapeutic cocktail (Ministério_da_Saúde 2013). The PI also has effect on host proteases causing a number of metabolic disorders such as lipodystrophy, lipoatrophy and dyslipidemia (Tershakovec et al. 2004). Since variations in the concentration of lipids and lipoproteins are influenced by a wide range of genes in a healthy population, the identification of genetic polymorphisms in HIV+ patients can help to understand the observed differences in the lipid profile of patients under treatment (de Andrade et al. 2010).

Certain genetic polymorphisms are associated with dyslipidemia in the general population. Amongst them the polymorphisms of genes *APOC3*, *CEPT*, *ACE* and *ACTN3* have been extensively reported to influence metabolic homeostasis. Apolipoprotein-C3 (*APOC3*) has an inhibitory effect on the activity of lipoprotein lipase, an enzyme that breaks down triglycerides (TG) from lipoprotein releasing free fatty acids to the peripheral tissues (Wang et al. 1985). The polymorphism more frequently studied in the *APOC3* gene is called C3238G, which creates a restriction site for *SacI* endonuclease, due to a substitution of a cytosine (C) for a guanine (G) at nucleotide position 3238 in the 3' untranslated region of the gene. Some studies have associated the presence of the G allele with a change in TG levels (Brown et al. 2003). The transferring cholesterol esters protein (CETP) transfers cholesterol from the HDLs to other lipoproteins such as VLDLs and LDLs, thereby increasing the cholesterol content of lipoproteins and making them more atherogenic (Sorli et al. 2006). The polymorphism in this gene creates a restriction site for the enzyme *TaqI*, due to a substitution of the base adenosine (A) by a G at position 277 of the nucleotide sequence, located in the first intron of the gene (Carlquist et al. 2003). Studies have linked the G allele, called by many authors as B1 allele, with increased protein activity and consequently a decrease in HDL. The angiotensin converting enzyme (ACE) plays, among others, two functions in metabolism: it converts angiotensin I to the potent vasoconstrictor angiotensin II, thereby increasing blood

pressure (Brewster and Perazella 2004). Furthermore, ACE hydrolysis bradykinin, an inflammatory peptide mediator with vasodilator effect that has been attributed for changes in glucose homeostasis (Barros et al. 2012a; Barros et al. 2012b; Coates 2003). The polymorphism of this gene is characterized by a deletion (D) or insertion (I) of 287 pairs of bases in the intron region 16. Studies show that this polymorphism influences serum ACE levels, being higher in individuals with a deletion of these base pairs than those with insertion (Almeida et al. 2011). The alpha-actinin-3 (ACTN3) is a protein expressed almost exclusively in fast-twitch type 2b fibers in skeletal muscle (North and Beggs 1996). The polymorphism of this gene is characterized by a change of C → T nucleotide at position 1747 in exon 16, resulting in the conversion of arginine to a stop code at codon 577, the so called R577X polymorphism (North 1999). This variation creates two different versions (or alleles) from the ACTN3 gene, the R allele, which is the functional version, and the allele X transcribing a non-functional version of the protein ACTN3. The XX genotype results in a complete deficiency of ACTN3 protein resulting in decreased formation of fast-twitch muscle fibers and altering the metabolism and athletic performance (MacArthur and North 2007).

The World Health Organization recommends nutritional interventions as part of all AIDS control and treatment programs (WHO 2003). In our opinion, a better understanding of the genetic background of HIV+ patients and their certain treatments will help to improve the outcome of nutritional interventions and ameliorates the quality of life of these patients. Based on this and on the outlined above the aim of this study was to verify if the named polymorphisms influence the prognosis for lipid-lowering nutritional intervention in HIV+ patients on ART.

METHODS:

Participating Individuals: This study was carried out with 65 HIV+ patients on ART, with diagnosis of dyslipidemia and without the use of hypolipidemic drugs (45 women and 20 men). They all came from a referral center for HIV assistance in the city of Rio Grande, in southern Brazil.

Anthropometric Measurements: Weight and height measurements were performed with dressed patients, barefoot and using an anthropometric scale balance (Filizola, Brazil). Body Mass Index (BMI) was calculated by the following formula: $\text{weight(kg)/height}^2(\text{cm})$. The measurement of abdominal circumference (AC) was

held at the lesser curvature located between the ribs and the iliac crest with flexible and inelastic tape measure without compressing tissues. When it was not possible to identify the lesser curvature, the measure two centimeters above the umbilicus was evaluated. Relative weight and relative AC was calculated by normalizing body mass or AC measurement data from second and third moment of data collection (30 and 90 days after the first measurements) to the data from the first moment of data collection and presented as % of the first data.

Nutritional intervention: In the first nutritional interview information on anthropometric measurements (first collection) and dietary recall of the last 24 hours was collected. Based on this, a specific nutritional intervention program was recommended. The nutritional intervention was based on restricting total energy intake between 25 to 30 Kcal/Kg of body weight, 0.8 to 1.0 g protein/kg of body weight and fat consumption between 30 to 35% of total daily energy intake. In addition, patients received instructions on selection, quantity and food preparation techniques. Nutritional monitoring occurred in three nutritional interviews: the first appointment, a month after (second collection) and three months after the first return (third collection).

Data collection: The Ethics Committee from Federal University of Pelotas approved this study. All subjects gave written the informed consent. After informing about the study, a saliva sample for DNA extraction was collected, and biochemical routine tests carried out by a commercial laboratory.

Genotyping of APOC3: A 254bp sequence of APOC3 gene was amplified by PCR using the following primers: sense 5'-AAG GAC AAG TTC TTC TCT GAG T-3' and antisense 5'-TGT GCA GCT TCT AGT TCT-3'. The PCR product was subjected to enzymatic digestion with 10 units of *SacI* restriction enzyme for 24 hours at 37° C, generating two fragments of 144bp and 110bp if the G allele is present.

Genotyping of CETP: A 535bp sequence of CETP gene was amplified by PCR using the sense primer 5'-CACT AGC CCA GAG GCC AGT AGA GG-3' and antisense 5'-CCA CTG GCC AGC GCA CA-3'. The PCR product was subjected to enzymatic digestion with 10 units of restriction enzyme *TaqIB* for approximately 24 hours at 64° C, generating two fragments of 361bp and 174bp if the B1 allele is present.

Genotyping of ACE: A 490bp sequence (allele I) or and 190bp (allele D) were amplified from ACE gene by PCR using the sense primer 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT 3-' and antisense 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTA GA-3'.

Genotyping of ACTN3: It was done as described previously (Schadock et al. 2015). Briefly, four primers were used and are described in Table 1. The final concentrations used were 0.5 μ M for external primers (hACTN3f and hACTN3r) and 0.125 and 0.25 μ M for internal primers (hACTN3Tif and hACTN3Cir, respectively). In practice, 5 μ M primers were mixed in a tube by adding 4 volumes of each external primer (hACTN3f and hACTN3r), a volume of the inner sense primer (hACTN3Tif) and 2 volumes inner antisense primer (hACTN3Cir). Five μ L of the mixture of primers was added to 10 μ L of 2x GoTaq® Master Mix (Promega, Cat. M7122) and 5 μ L of the DNA sample to give a reaction volume of 20 μ L. The four primers reaction generates a 413bp product in the presence of the R allele and a 318bp product in the presence of the X allele.

All PCR products from each genotype were separated by horizontal agarose gel electrophoresis in a 1% TBE running buffer and the resulting bands pattern was analyzed under an UV light transilluminator after staining with Syber Safe (Invitrogen).

Statistical Analysis: The results are presented as means \pm standard deviation of the mean for direct measurements and means \pm standard error of the mean (SEM) for calculated differences between time points. All the statistical analyses were performed using SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Analyses involving repeated measures over time were compared by analysis of variance for repeated measures using the MIXED procedure to evaluate the main effects of time, genotype, and their interactions with weight, BMI, AC, cholesterol, HDL, VLDL, LDL, TG and Glycemia. In addition, the GLM procedure was used to test the linear and quadratic effects of having 0, 1 or 2 favorable alleles for each SNP evaluated for average weight, BMI, AC, cholesterol, HDL, VLDL, LDL, TG and Glycemia. A probability value of $p < 0.05$ was considered statistically significant and probability between 0.05 and 0.10 as a tendency.

RESULTS:

Female patients are more often subjected to PI: In total sixty-five patients were subjected to nutrition orientation clinic. We observed that most of them were women (69% women vs. 31% men; Table 2). It was noted that 77% of these women were submitted to use PI on ART, while only 33% of men got this prescription, which could promote a higher incidence of lipodystrophy in women (Tershakovec et al. 2004). The genotype distribution of the four polymorphisms studied is presented in Table 2. Strikingly, we found a high incidence of the ACE D/D genotype in the investigated cohort of patients (65.6% - DD; 18.7% - ID; 15.6%), which is in contrast to the distribution pattern of the world population (25%, 50% and 25%; GENOME 1000, Figure 1). Furthermore, the I/D distribution discovered is also out of Hardy-Weinberg equilibrium ($p = 0.0006$). The allelic frequencies of polymorphisms in genes *APOC3*, *CEPT* and *ATCN3* were similar to those described in populations from the same geographical region or ethnic group (Amorim et al. 2015; Lazzaretti et al. 2013).

Nutritional intervention was effective in reducing weight, BMI and AC: Nutritional intervention improved anthropometric parameters of HIV+ patients in all genotypes as noted by an overall reduction in weight, BMI and AC. This effect occurred specially in the first month of nutritional intervention, and trended to return to the previous basal values before intervention (Table 3 and 4).

Analysis of the effect of genotype and nutritional intervention on lipid and glucose profile: We analyzed the serum lipid and glycemic profile at 3 points of time and observed that patients with the ACTN3 RR genotype had lower blood glucose at the third collection (RR - 95.4 ± 6.5 mg/dL; RX - 102.6 ± 10.6 mg/dL; XX - 110.1 ± 16.3 mg/dL, Figure 2) showing the effect of nutritional intervention for this polymorphism ($p < 0.05$). In addition, a tendency for lower serum TG in patients with the ACTN3 RR genotypes was found independently of the nutrition intervention (RR - 156.6 ± 78.1 mg/dL; RX - 173.5 ± 78.3 mg/dL; XX - 181.6 ± 94.3 mg/dL; Figure 2; $p = 0.098$). We did not find significant differences related to the other studied polymorphisms (Table S1 and S2 in electronic supplementary material).

Patients with RR genotype for ATCN3 gene reduced LDL after nutritional intervention: We compared the differences of the subtractions of anthropometric and biochemical analysis, using time point 2 and 3 as subtrahends and time point 1 as minuend, in order to analyze the effect of the nutritional intervention on these parameters. ACTN3 RR patients showed an improvement in serum LDL profiles

compared to the other genotypes (RR -23.7 ± 15.18 mg/dL; RX 1.32 ± 5.13 mg/dL; 30.21 ± 24.44 XX mg/dL; Figure 3). Interestingly, individuals heterozygous for the ACE I/D polymorphism had a more pronounced reduction in blood glucose than homozygous individuals (Figure 3). The other results do not show differences and are plotted in table S3 and S4 in the electronic supplementary material.

PI use in ART and nutritional intervention. Patients undergoing PI treatment in addition to ART tended to respond better to dietary intervention when considering AC measures (-1.70 ± 0.69 cm with PI; -0.45 ± 0.86 cm without PI, $p=0.056$). Paradoxically, they also had a negative response regarding serum HDL levels (-2.4 ± 1.70 mg/dL with PI; 2.56 ± 1.60 mg/dL without PI), VLDL (0.84 ± 2.73 with PI mg/dL; -5.46 ± 3.37 without PI mg/dL) and TG (1.79 ± 13.22 with PI mg/dL; -34.00 ± 17.67 mg/dL without PI; Figure 4). The complete profile can be checked in the electronic supplementary material table S5.

DISCUSSION:

HIV+ patients under treatment with antiretroviral drugs often present metabolic disorders such as dyslipidemia and lipodystrophy, especially when subjected to PI use in the drug cocktail. For this reason, many are directed to a nutritional counseling clinic in order to balance these disorders by proper nutritional intervention. In this effect, genetic differences can influence the severity of metabolic disorders, as well as the success of the nutritional intervention. Therefore, the aim of this study was to address the contribution of four important genetic polymorphisms, linked to energy metabolism, metabolic and anthropometric profile of HIV positive patients.

As one main result we observed a correlation of the R577X polymorphism in *ACTN3* gene on blood glucose and plasma triglycerides levels. Furthermore, HIV+ patients with the RR genotype for this polymorphism respond better to nutritional intervention regarding LDL reduction. This influence of the *ACTN3* R577X polymorphism on metabolism has already been suggested by several authors (Chan et al. 2011; Holterhoff et al. 2009; MacArthur and North 2007; MacArthur et al. 2007; Moran et al. 2007; Quinlan et al. 2010). In contrast to *ACTN2*, which is expressed in both the slow and the fast twitching fibers of skeletal muscle, *ACTN3* is expressed exclusively in fast twitching fibers. Dozens of studies analyzing professional athletics suggest that the presence of the *ACTN3* protein in these fibers

is directly connected to sportive results. And this is reasonable, as fast twitching fibers are highly oxidative and glycolytic. Sprint athletes therefore present more of these fibers and were genotyped frequently to carry the RR or RX allele of the *ACTN3* gene. On the other hand the XX genotype is more frequent in endurance athletes (MacArthur et al. 2007; Quinlan et al. 2010). Even though our cohort does not present a collection of professional athletes we believe that a shift towards highly metabolic muscle fibers in dyslipidemic HIV+ patients could explain the better metabolic results in our patients carrying the RR genotype of *ACTN3*. We are aware of the fact that this theory needs to be proven by morphological and functional studies, but this could be the first hint that HIV+ patients with the *ACTN3* XX genotype need additional monitoring and nutritional advice to avoid the development of e.g. metabolic syndrome and/or diabetes.

A second major finding is the increased frequency of patients with the DD genotype of the ACE polymorphism, which was much higher than expected when comparing with the global distribution of this polymorphism (figure 1). Furthermore, this high occurrence of the DD genotype was not gender specific (table 2) and was not associated with changes in blood glucose levels or lipid profile in this group. However, the inconspicuous glucose values found could also be a result of the specific group of dyslipidemic patients we chose here. On the other hand, this also suggest a higher susceptibility of the DD genotype individuals to the HIV infection, or increased tendency of these individuals to present metabolic disorders, remembering that in the given group we had only patients with dyslipidemia indicated to nutritional care. However, these hypotheses need specific studies covering a greater number of HIV+ patients, with and without dyslipidemia, and also a control group of uninfected individuals from the same population.

Furthermore, patients receiving PI additional to ART revealed a better response to nutritional intervention by reducing weight and AC, but present paradoxically impaired parameters of HDL and VLDL. The last technical report from the WHO about nutrient requirements for people living with HIV/AIDS indicates several knowledge gaps and research needs, and one important question raised was about lifestyle changes, including dietary intake and physical activity (WHO 2003). This is an important question for managing metabolic complications of ART. Nutrition intervention is indicated for all patients in ART. The Guidelines for

the Evaluation and Management of Dyslipidemia in Human Immunodeficiency Virus (HIV)–Infected Adults Receiving Antiretroviral Therapy publish by the HIV Medicine Association of the Infectious Disease Society of America and the Adult AIDS Clinical Trials Group recommends that nutritional intervention must precede lipid-lowering drugs administration (Dube et al. 2003). Our results suggest that this recommendation needs to be reviewed at least if IP is included in ART, since the effect of nutritional intervention in these patients can bring undesired effect on lipid profile in this group. It is a new knowledge that provides a scientific evidence base to improve nutrition recommendations for HIV+ patients in ART, but long term trials are still necessary.

Overall, the nutritional intervention was effective in the first month concerning the anthropometric profile, with a positive effect on body weight, BMI and AC at the second point of sample collection compared to the first about 30 days before. This reflects well the commitment of patients to change eating habits at the first interview and the effectiveness of the nutritional intervention. However, this effect did not last until the third interview. This trend of losing effect after some months is well known and confirms the observed in the literature, which describes nutritional treatment dropout over time. This is especially true in HIV+ patients because of the fear of weight loss in this population. Cianflone *et al.* (2006) conducted a prospective study to evaluate the changes of weight in the HIV epidemic and the factors associated with these changes among patients with HIV infection (Cianflone et al. 2006). They showed that the majority of HIV+ patients tend to gain weight during their infection, rather than lose, that BMI at diagnosis are smaller than after a few years, and increased weight gain in these patients after some time. A possible explanation for the fear of weight loss is that HIV+ patients in their daily life try to hide their carrier status. Even though it was shown the opposite in science one of the most popular opinions remains in public which is this infection is accompanied with rapid weight loss and malnutrition.

In the given cohort women were more often subjected to additional PI treatment (69.3%) than men (30.7%) a result that goes along with a higher demand of nutritional care among women. Because of the well established relationship of increasing lipodystrophy while PI and ART administration this could explain why women request more nutritional treatment. However, this may also be the result of

general greater concern of women about body image and health care. Studies show a high prevalence of body change in HIV+ patients, especially among women (Dragovic et al. 2014).

We conclude that the ACTN3 R577X polymorphism is an useful predictor of both the development of lipid profile and the prognosis of nutritional intervention by lowering LDL in HIV+ patients on ART. In addition, we showed a higher prevalence of infected women seeking nutritional advice and being submitted more frequently to PI use on ART. Patients under PI treatment respond better to nutritional intervention in respect to weight loss, but present impaired lipid profiles. Therefore, we suggest the direct start of oral lipid-lowering drugs in all patients using PI, even when subjected to lipid-lowering nutritional intervention.

CONFLICT OF INTEREST

All the authors declare that they have no conflict of interest.

COMPLIANCE WITH ETHICS GUIDELINES

All procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national; Ethical Committee of Medicine School, Federal University of Pelotas, CAAE: 26782314.3.0000.5317, decision number 546.009 at 27.02.2014; Ethical Committee in Research in Health Area of Federal University of Rio Grande, CAAE: 26782314.3.3001.5324, decision number 23/2014 at 10.04.2014) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. Informed consent was obtained from all patients for being included in the study.

LIST OF TABLES AND FIGURES

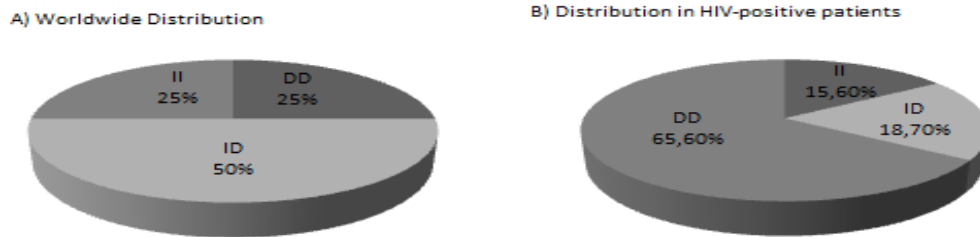


Figure 1: The ACE I/D polymorphism distribution is in imbalance of second Hardy-Weinberg: A) polymorphism distribution in the ACE gene found in the world's population; B) polymorphism distribution in the ACE gene found in HIV+ patients.

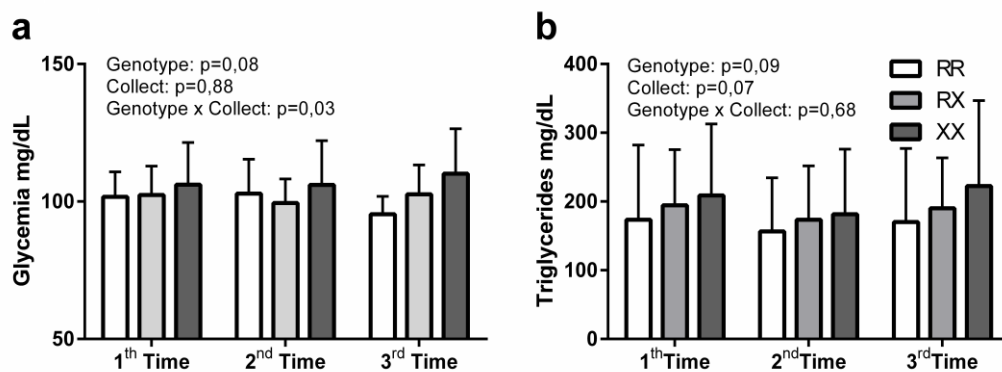


Figure 2: The ACTN3 R577X genotype effect and nutritional intervention on the biochemical profile: A) blood glucose evaluation in relation to nutritional intervention and ACTN3 genotype at three successive samplings. B) Evaluation of triglycerides compared to nutritional intervention and ACTN3 genotype at the three collection times: 1th time = first appointment, 2nd time = a month after, 3rd time = three months after the first return.

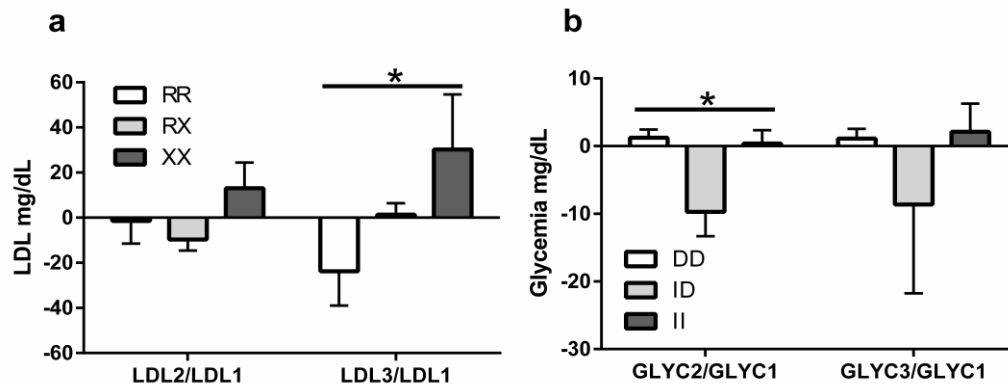


Figure 3: Nutritional intervention in comparison with genotypes and effects on LDL and glucose in blood: A) LDL assessment before and after nutritional intervention according to the ACTN3 genotypes. B) Blood glucose evaluation in relation to nutritional intervention according to the ACE genotype. Data is presented as average of the difference between second and third collections from the first collection + SEM. *, $p < 0.05$ for genotype effect.

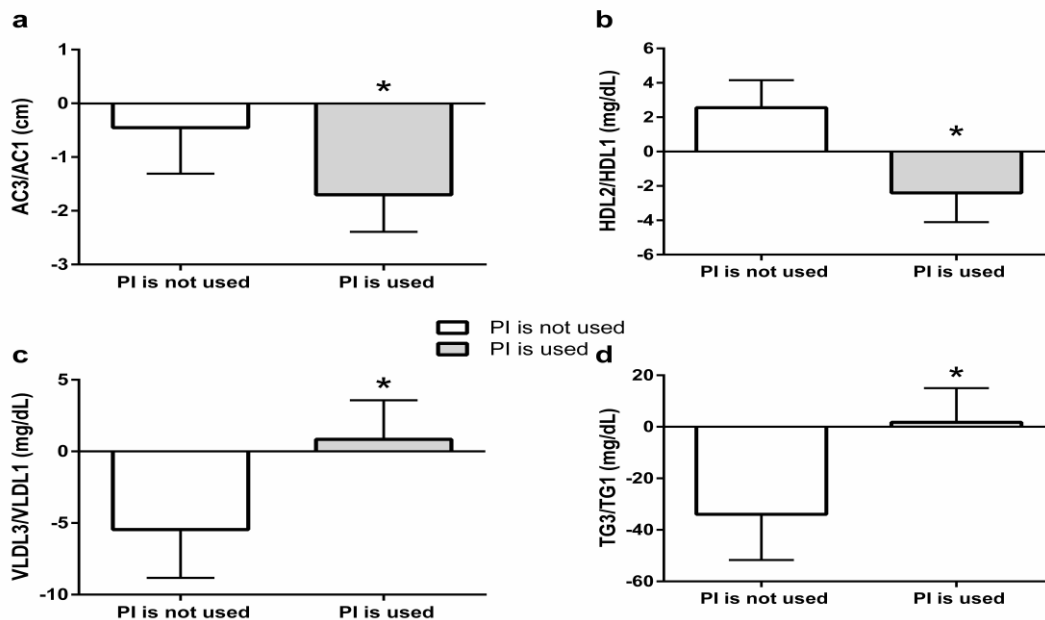


Figure 4: Effect of PI in abdominal circumference (AC) and lipid profile: A) Evaluation of AC averages comparing measurements before and after nutritional intervention. B-D) HDL, VLDL and TG evolution showing no effect of nutritional

intervention on patients using PI. *, $p < 0.05$ comparing with and without PI patients.
HDL - high density lipoprotein, VLDL - very low density lipoprotein, TG – triglyceride.

REFERENCES:

- Almeida WS et al. (2011) Assessment of aerobic capacity during swimming exercise in ob/ob mice *Cell biochemistry and function* 29:666-672 doi:10.1002/cbf.1803
- Brewster UC, Perazella MA (2004) The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease *The American journal of medicine* 116:263-272 doi:10.1016/j.amjmed.2003.09.034
- Brown S, Ordovas JM, Campos H (2003) Interaction between the APOC3 gene promoter polymorphisms, saturated fat intake and plasma lipoproteins *Atherosclerosis* 170:307-313
- Carlquist JF, Muhlestein JB, Horne BD, Hart NI, Bair TL, Molhuizen HO, Anderson JL (2003) The cholesteryl ester transfer protein Taq1B gene polymorphism predicts clinical benefit of statin therapy in patients with significant coronary artery disease *American heart journal* 146:1007-1014 doi:10.1016/S0002-8703(03)00501-5
- Cianflone K, Zakarian R, Stanculescu C, Germinario R (2006) Protease inhibitor effects on triglyceride synthesis and adipokine secretion in human omental and subcutaneous adipose tissue *Antiviral therapy* 11:681-691
- Coates D (2003) The angiotensin converting enzyme (ACE) *The international journal of biochemistry & cell biology* 35:769-773
- de Andrade FM et al. (2010) The influence of nutrigenetics on the lipid profile: interaction between genes and dietary habits *Biochemical genetics* 48:342-355 doi:10.1007/s10528-010-9331-6
- Dragovic G, Danilovic D, Dimic A, Jevtovic D (2014) Lipodystrophy induced by combination antiretroviral therapy in HIV/AIDS patients: a Belgrade cohort study *Vojnosanitetski pregled* 71:746-750
- Dube MP et al. (2003) Guidelines for the evaluation and management of dyslipidemia in human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults receiving antiretroviral therapy: recommendations of the HIV Medical Association of the Infectious Disease Society of America and the Adult AIDS Clinical Trials Group *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 37:613-627 doi:10.1086/378131
- Lazzaretti RK et al. (2013) Genetic markers associated to dyslipidemia in HIV-infected individuals on HAART *TheScientificWorldJournal* 2013:608415 doi:10.1155/2013/608415
- MacArthur DG, North KN (2007) ACTN3: A genetic influence on muscle function and athletic performance *Exercise and sport sciences reviews* 35:30-34 doi:10.1097/JES.0b013e31802d8874

MacArthur DG et al. (2007) Loss of ACTN3 gene function alters mouse muscle metabolism and shows evidence of positive selection in humans *Nature genetics* 39:1261-1265 doi:10.1038/ng2122

Ministério_da_Saúde (2013) Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos Departamento de DST Aids e Hepatites Virais:216

North DS (1999) Common questions about the newer fluoroquinolone antibiotics *The Nurse practitioner* 24:124-127

North KN, Beggs AH (1996) Deficiency of a skeletal muscle isoform of alpha-actinin (alpha-actinin-3) in merosin-positive congenital muscular dystrophy *Neuromuscular disorders* : NMD 6:229-235

Schadock I et al. (2015) Simple Method to Genotype the ACTN3 r577x Polymorphism Genetic testing and molecular biomarkers 19:253-257 doi:10.1089/gtmb.2014.0299

Sorli JV, Corella D, Frances F, Ramirez JB, Gonzalez JI, Guillen M, Portoles O (2006) The effect of the APOE polymorphism on HDL-C concentrations depends on the cholesterol ester transfer protein gene variation in a Southern European population *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 366:196-203 doi:10.1016/j.cca.2005.10.001

Tershakovec AM, Frank I, Rader D (2004) HIV-related lipodystrophy and related factors *Atherosclerosis* 174:1-10 doi:10.1016/S0021-9150(03)00246-6

UNAIDS (2015) GLOBAL AIDS RESPONSE PROGRESS REPORTING 2015

Wang CS, McConathy WJ, Kloer HU, Alaupovic P (1985) Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III *The Journal of clinical investigation* 75:384-390 doi:10.1172/JCI111711

WHO (2003) Nutrient requirements for people living with HIV/AIDS. <http://www.who.int/nutrition/publications/hiv aids/9241591196/en/>. Accessed 07 jul 2015

