

Neyla Maria Pereira Alves

Influência de polimorfismos de base única (SNPs) no gene do receptor de vitamina D (VDR) na resposta à Terapia Antirretroviral (TARV) de pessoas vivendo com Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1).

Recife

2015

Neyla Maria Pereira Alves

Influência de polimorfismos de base única (SNPs) no gene do receptor de vitamina D (VDR) na resposta à Terapia Antirretroviral (TARV) de pessoas vivendo com Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia

Orientador: Lucas André Cavalcanti Brandão

Coorientadora: Jaqueline de Azevêdo Silva

Recife

2015

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

A474i

Alves, Neyla Maria Pereira.

Influência de polimorfismos de base única (SNPs) no gene do receptor de vitamina D (VDR) na resposta à Terapia Antirretroviral (TARV) de pessoas vivendo com Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1) / Neyla Maria Pereira Alves. – Recife: O autor, 2015. 56 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Lucas André Cavalcanti Brandão.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2015. Inclui referências e anexo.

1. HIV. 2. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. 3. Terapia Antirretroviral de Alta Atividade . I. Brandão, Lucas André Cavalcanti (Orientador). II. Título.

616.07

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2015-173)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.ppgpatologiaufpe.com>

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

AUTORA: NEYLA MARIA PEREIRA ALVES

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

NOME DA DISSERTAÇÃO: "INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMO DE BASE ÚNICA (SNPS) NO GENE DO RECEPTOR DE VITAMINA D(VDR) NA RESPOSTA À TERAPIA ANTIRRETROVIRAL (TARV) DE PESSOAS VIVENDO COM VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1(HIV-1)."

ORIENTADOR: PROF. DR. LUCAS ANDRE CAVALCANTI BRANDÃO

DATA DA DEFESA: 02 DE MARÇO DE 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo Júnior

Profª. Drª. Paula Sandrin Garcia

Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães

À minha família por todo apoio e carinho dedicados.

Agradecimentos

A Deus, por me conceder sabedoria para discernir o melhor caminho a seguir e por me guiar nas escolhas que me levaram a conquistar amigos verdadeiros e felicidade.

À minha mãe, Eliane, em quem me espelho, por toda garra, paciência, dedicação, orientação, amor, incentivo e apoio.

À minha família, que direta e indiretamente acreditou, incentivou e participou das minhas escolhas.

Ao meu irmão, Tarcísio, pelo amor, incentivo e participação em todos os aspectos da minha vida.

Aos professores Alex e Roberto, que me incentivaram e guiaram a minha caminhada acadêmica e profissional.

À minha primeira família acadêmica: Luis, Keicy, Karla, Amanda, Taciana, Lívia, Jana, Divar, Andrezza, Flávia, e Larissa, que muito me ensinaram e junto comigo cantaram e dançaram, riram muito, choraram nas defesas e despedidas; aos demais componentes da Biocel e à Regina, que me permitiu participar desse grupo tão cativante, foram muitos aprendizados.

À minha tia de criação e do coração, Maria José (Zezé), por todo o tempo dedicado ao meu crescimento.

Aos meus amigos Emanuel, Tereza, Tiago, Hygda, Tatiana, Neuta, Leylianne e Carol por todo apoio, amizade e felicidade compartilhada.

A Heitor, pelo companheirismo, carinho, alegria, paciência e incentivo em todas as decisões e caminhadas juntos.

Ao meu grupo de estudo e convívio do Mestrado, Almerinda, Zilma, Mirella, Lianne, Priscila, Klewdma, Ana Paula, Anderson e Glauber, que serviu de apoio, amizade, companheirismo, alegria e se tornou uma família. Obrigada pelo convívio.

Ao meu orientador, Lucas, que me acolheu em um momento crucial do Mestrado e partilhou do seu tempo, ensinamento e paciência.

Ao grupo Patgen, em especial a Jaqueline, pela coorientação, ajuda e ensinamento durante o Mestrado.

Aos funcionários do IMIP que muito ajudaram nas coletas.

Ao meu pai, Paulo, que por estar distante me serviu de incentivo pela busca de crescimento pessoal e profissional.

À Margarete Valdevino, secretária da PPGPAT, pela paciência e ajuda durante o período do Mestrado.

Aos professores atuantes do PPGPAT que fizeram diferença na minha caminhada e aprendizado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração desse trabalho.

À Capes, pelo apoio financeiro.

“Tente
E não diga que a vitória está perdida
Se é de batalhas que se vive a vida
Tente outra vez...”

Raul Seixas

Resumo

HIV/aids (Vírus da Imunodeficiência Humana/aids) é considerado uma pandemia, envolvendo mais de 70 milhões de infecções e 35 milhões de mortes desde o primeiro relato na década de 80. O HIV tipo 1 (HIV-1) infecta principalmente linfócitos T CD4+ e linhagens de macrófagos, tendo sua patogenicidade definida pela depleção de LT CD4+. Além disso, a condição de infecção por HIV-1 é bastante complexa e dependente de diversos fatores relacionados à variabilidade dos indivíduos no que diz respeito à suscetibilidade à infecção e à progressão para a aids, sendo observada a ativação imunológica generalizada. Envolvida na modulação das respostas imunes inata e adaptativa encontra-se a vitamina D, que desempenha papel no metabolismo mineral e apresenta efeito pleiotrópico no crescimento e diferenciação celulares. Seus efeitos imunológicos são dados a partir da ligação com o receptor de vitamina D (VDR) de diversas células, regulando a liberação de citocinas, a função e proliferação de linfócitos T e a produção de peptídeos antimicrobianos como a catelicidina. O VDR atua modulando a ação dessa vitamina induzindo a resposta imune local e variações genéticas presentes no gene codificador do VDR podem levar à diminuição de sua atividade e, conseqüentemente, ao prejuízo para o papel da vitamina D. Nos indivíduos infectados pelo HIV, os níveis de deficiência dessa vitamina são altos e fatores como raça, insuficiência renal, pouca exposição à luz ultravioleta e exposição as drogas anti-HIV, como o Efavirenz, estão associados a essa deficiência, respectivamente, sendo determinantes para a susceptibilidade à infecção pelo HIV e a predição da progressão da doença. Sendo assim, neste trabalho foram estudados seis polimorfismos de base única (SNPs) (rs3890733, rs476048, rs1540339, rs2248098, rs2228570 e rs11568820) presentes no gene do receptor de vitamina D (VDR) e sua influência na resposta dos pacientes à Terapia Antirretroviral (TARV). Foram recrutados 107 pacientes acompanhados e tratados no Hospital Dia do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), subdivididos em quatro grupos: I- Sucesso Terapêutico, II- Falha Terapêutica, III- Sucesso Imunológico, IV- Falha Imunológica, e analisadas variáveis clínicas e epidemiológicas, como gênero, idade, peso e etnia. Não foram observadas associações estatísticas nas análises isoladas entre os polimorfismos dos genes do VDR com a falha virológica ou a resposta imunológica. Porém, nas análises multivariadas, o genótipo C/C do rs1540339 mostrou-se associado com o gênero no sucesso virológico (OR=0,08, $p=0,04$). Em adição, a análise envolvendo peso, etnia e gênero e o rs3890733 mostrou associação com a resposta imunológica para os genótipos C/C e T/T no modelo sobredominante (OR=0,21, $p=0,024$). Os resultados indicam a importância do receptor de vitamina D em infecções por HIV-1 e poderão contribuir para o entendimento da variabilidade das respostas dos pacientes à TARV.

Palavras-chave: 1.Vírus da Imunodeficiência Humana. 2.SNPs. 3.VDR. 4.Terapia Antirretroviral.

Abstract

HIV/aids (Human Immunodeficiency Virus/aids) is considered a pandemic, involving more than 70 million infections and 35 million deaths since the first report in the 80's. HIV type 1 (HIV-1) infects mainly T lymphocytes CD4 + and macrophage lineages, and their pathogenicity is defined by the depletion of CD4 +. Furthermore, the condition of HIV- 1 infection is very complex and dependent on many factors related to the individual variability, regarding the susceptibility to infection and progression to AIDS, generalized immune activation being observed. Involved in the modulation of innate and adaptive immune responses is vitamin D, which plays a role in mineral metabolism and has pleiotropic effects on cell growth and differentiation. Their immune effects are data from binding to the vitamin D receptor (VDR) in various cells, regulating the release of cytokines, the function and proliferation of T lymphocytes and the production of antimicrobial peptides as cathelicidin. The VDR acts modulating the action of vitamin D by inducing local immune responses and genetic variations present in the VDR encoding gene can lead to reduction of its activity and consequently, disfunction in the role of vitamin D. In HIV-infected individuals, this vitamin deficiency levels are high and factors such as race, kidney failure, lower exposure to ultraviolet light and exposure to anti- HIV drugs, such as Efavirenz, are associated with this deficiency, being determinants on the susceptibility to HIV infection as well as prediction of disease progression. Therefore, in this work we studied six single nucleotide polymorphisms (SNPs) (rs3890733, rs476048, rs1540339, rs2248098, rs2228570 and rs11568820) present in the D vitamin receptor gene (VDR) and its influence on patients' response to Antiretroviral Therapy (ART). We recruited 107 patients followed from the Hospital Day Integrative Medicine Institute Professor Fernando Figueira (IMIP), subdivided into four groups: I. Therapeutic Success, II. Therapeutic Failure, III. Immune Success, IV. Immune Failure, and analyzed clinical and epidemiological variables, such as gender, age, weight and ethnicity. No statistically significant associations were observed in the isolated analyzes between polymorphisms of the VDR gene with therapeutic failure or immune response. However, in multivariate analyzes, the rs1540339 C/C genotype was associated with gender in therapeutic success (OR = 0.08, p = 0.04). In addition, analysis involving weight, ethnicity and gender and the rs3890733 showed association with the immune response to the C/C genotype and T/T in overdominant model (OR = 0.21, p = 0.024). The results indicate the importance of vitamin D receptor in HIV- 1 infections and may contribute to the understanding of variability of patient's various responses to ART.

Keywords: 1. Human Immunodeficiency Virus. 2. SNPs. 3. VDR. 4. Antiretroviral Therapy.

Lista de ilustrações

Figura 1. Grupos populacionais em situação de maior vulnerabilidade. Taxas de prevalência de HIV encontradas em estudos realizados pelo Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais (2008/2009) e parceria entre Ministério da Justiça e o Ministério da Saúde/Fiocruz (2013). Na população de 15 a 49 anos, a prevalência é de 0,6%, sendo 0,7% homens e 0,4% mulheres. Em jovens entre 17 e 21 anos essa taxa é de 0,1% (A). Taxas de prevalência de HIV em grupos populacionais de maior vulnerabilidade: HSH (homens que fazem sexo com homens), PS (profissionais do sexo), PUD (pessoas usuárias de drogas) e usuários de crack (B).
.....18

Figura 2. Descrição dos fatores de regulação de Env fusogênica levando à apoptose de células adjacentes. O potencial fusogênico da glicoproteína Env viral é determinado não apenas pelo subtipo do HIV, mas também pelo estágio da doença, pelos níveis de expressão do correceptor do HIV nas células T CD4⁺ de indivíduos infectados e pelo uso de drogas que tem como alvo o envelope viral. O processo de morte das células T em infecções por HIV é iniciado por interações entre o receptor da glicoproteína Env nas células infectadas e o correceptor nas células vizinhas. Essa interação leva à total fusão entre as duas células formando sincícios ou uma fusão abortiva levando à hemi-fusão. Ambos os processos levam à morte celular por apoptose.23

Figura 3. Vias de sinalização genômicas e não genômicas do VDR na inibição da transcrição do gene CYP7A1 nos hepatócitos humanos. Ligantes do VDR, 1 α , 25 (OH) 2-D₃, ou LCA estimulam a translocação intracelular de VDR para a membrana plasmática. Tais ligantes induzem a fosforilação da tirosina (Y) e ativam c-Src. VDR interage com c-Src na membrana plasmática. A sinalização do VDR na membrana ativa c-Raf que então ativa a via do MEK1 / 2 / ERK1 / 2 MAPK. O VDR também é translocado para o núcleo independente da via de tirosina quinase. ERK1 / 2 é translocado para o núcleo e posteriormente fosforila a serina / treonina (S / T) sobre os resíduos nucleares de VDR, RXRa, e HNF4 α . VDR / RXRa recruta corressor NcoR-1 ou SMRT para o BARE deslocar o complexo HNF4 α / VDR / PGC-1 α ou complexo SRC-1 resultando na inativação do gene CYP7A1. VDR interage com HNF4 α e impede a dimerização e ligação de HNF4 α ao BARE.
.....26

Figura 4. Estrutura do gene VDR e a localização dos polimorfismos mais estudados.28

Figura 5. Estrutura do gene VDR e distribuição e área de cobertura dos Tag SNPs e SNPs funcionais (Cdx2 e FokI) testados ao longo do gene.29

Lista de tabelas

Tabela 1. Ações biológicas da vitamina D/VDR e doenças relacionadas	27
--	----

Lista de abreviaturas e siglas

Item	Definição em Português	Definição em Inglês
aids	Síndrome da imunodeficiência adquirida	
AZT	Azidotimidina ou zidovudina	
CYP27B1	Citocromo P450, família 27, subfamília B, polipeptídio 1	Cytochrome P450, Family 27, subfamily B, polypeptide 1
D3	Vitamina D3 cholecalciferol	
D2	Vitamina D2 ergocalciferol	
DHCR7	7-deidrocolesterol redutase	7-dehydrocholesterol reductase
DM1	Diabetes mellitus tipo 1	
DNA	Ácido desoxirribonucleico	
DST	Doenças sexualmente transmissíveis	
Env	Proteína do envelope viral	
HIV	Vírus da imunodeficiência humana	
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1	
ICAM	Molécula de adesão intercelular	
IFN- γ	Interferon γ	
IL-2	Interleucina 2	
IL-4	Interleucina 4	
IL-5	Interleucina 5	
IL-12	Interleucina 12	
LES	Lúpus eritematoso sistêmico	
IMIP	Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira	
MAF	Frequência do alelo minoritário	
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno	Mitogen-activated protein kinases
MS	Ministério da Saúde	

Nef	Proteína viral Nef	
NFkB	Fator nuclear kappa B	
OMS	Organização Mundial de Saúde	
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PI	Inibidor de protease	
PVHA	Pessoas vivendo com HIV/aids	
RXR	Receptor de ácido retinóico	
Siclom	Sistema de controle logística de medicamentos	
SNPs	Polimorfismos de base única	
TARV	Terapia antirretroviral	
TasP	Tratamento como prevenção	Treatment as Prevention
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido	
TGF-β1	Fator de crescimento tecidual β1	
TLR	Receptor do tipo Toll	
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa	
UBS	Unidade básica de saúde	
UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS	
UTR	Região Não Traduzida	
VDBP	Proteína ligadora de vitamina D	Vitamin-D-binding protein
VDER	Elemento de resposta a vitamina D	
VDR	Receptor de vitamina D	
Vpr	Proteína viral R	
VS	Sinapses virológicas	

Sumário

1. Apresentação	15
2. Revisão da Literatura.....	18
2.1 Epidemiologia do HIV/aids no Brasil.....	18
2.2 Diagnóstico e Tratamento	19
2.3 Patogênese da aids	21
2.4 Vitamina D e VDR.....	24
2.4.1 Influência genética de SNPs no gene VDR na infecção por HIV-1	29
3. Objetivos	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4. Métodos	32
4.1 Grupo de estudo	32
4.2 Extração de DNA genômico	32
4.3 Seleção dos polimorfismos de base única.....	33
4.4 Genotipagem dos indivíduos.....	33
4.5 Métodos estatísticos	33
4.5.1 Variáveis clínicas e epidemiológicas	33
4.5.2 Análises estatísticas.....	33
5. O Papel de Polimorfismos no Gene VDR na Resposta à Terapia Antirretroviral (TARV) em Infecção por HIV-1 na População do Nordeste Brasileiro	35
6. Conclusões	47
Referências	48
Anexo A- Formulário A1 – Recrutamento: Coleta de dados clínicos	53

1. Apresentação

HIV/aids consiste em uma pandemia que, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), é responsável por mais de 70 milhões de infecções e 35 milhões de mortes decorrentes dessas infecções (MONROE et al., 2014). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (MS) (2013), existem cerca de 686.478 casos de aids (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e, no ano de 2012, foram notificados 39.185 casos com 11.896 mortes declaradas. Ainda de acordo com o MS, foi observada a concentração da epidemia brasileira de HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) em populações que apresentam situação de maior risco e vulnerabilidade com relação à população em geral.

O Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1) é capaz de se multiplicar de forma mais eficiente em linfócitos T CD4+, embora também infecte linhagens de monócitos/macrófagos, e a principal característica da patogenicidade decorrente desse tipo de infecção consiste na depleção das células T CD4+, que se tornam mais sensíveis à morte celular programada por apoptose e piroptose (HEGEDUS et al., 2014; LAFORGE et al., 2011; DOITSH et al., 2010).

A condição para que ocorra infecção por HIV é bastante complexa e dependente de diversos fatores podendo ser influenciada pela variabilidade dos indivíduos no que diz respeito à suscetibilidade à infecção e à progressão para a aids (NASI et al., 2013). Sua disseminação ocorre principalmente entre células T suscetíveis através de dois processos: 1- infecção de célula livre pelo próprio vírus ou 2- propagação direta célula-célula através de sinapses virológicas (VS), onde o vírus tem preferência para egresso devido ao acúmulo de proteínas dessas sinapses além de moléculas de adesão (ICAM) e receptores de entrada (GROPPELLI; STARLING; JOLLY, 2015; HERBEIN et al., 2010). Embora haja essa preferência para egresso, o HIV também apresenta capacidade de infectar células latentes e provocar efeitos citopáticos em curto prazo (ABBAS et al., 2011).

A vitamina D é um hormônio produzido pela pele e metabolizado na sua forma ativa pelos rins (DE AZEVÊDO SILVA et al., 2013). Seu papel em infecções por HIV-1 está envolvido na síntese de peptídeos antimicrobianos contra a entrada do vírus ou na diminuição da ativação imunológica na fase aguda e na indução de ferramentas para uma resposta mediada por linfócitos T helper menos efetiva contra essas infecções na fase crônica da infecção (LAPLANA et al., 2014).

Esse hormônio está tradicionalmente associado à homeostase de cálcio e mineralização óssea, mas na última década, evidências experimentais envolvendo o papel fundamental da vitamina D no controle das respostas imunes inata e adaptativa têm sido crescentes. Além de seu papel no metabolismo mineral, também apresenta efeito pleiotrópico no controle do crescimento e diferenciação celulares e modulação da resposta imune. Seus efeitos imunológicos são mediados pela ligação da vitamina D biologicamente ativa com o receptor de vitamina D de macrófagos, células dendríticas, linfócitos B, neutrófilos e linfócitos T ativados. Esse complexo atua regulando a liberação de citocinas, a função e a proliferação de linfócitos T e a produção de peptídeos antimicrobianos (MOODLEY et al., 2013).

O gene receptor de vitamina D (VDR) atua como mediador da resposta imune modulando a ação desta vitamina que está envolvida na indução a resposta imune local, principalmente após infecção bacteriana, produzindo peptídeos antimicrobianos e induzindo a resposta imune. Variações nos genes relacionados às vias de resposta imunológica podem apresentar influência na interação entre o vírus e o hospedeiro (COELHO et al., 2013). Polimorfismos de base única (SNPs) no gene VDR podem levar à diminuição da atividade do receptor e ao consequente prejuízo para o papel da vitamina D (D3). Tais polimorfismos são considerados como a maior fonte de variações genéticas interindividuais, podendo ser utilizados para identificação da predisposição genética a diversas doenças multifatoriais, sendo assim uma importante ferramenta no reconhecimento e análise de marcadores genéticos principalmente por sua abundância no genoma (DE AZEVEDO SILVA, 2012).

Estudos prévios demonstraram associação entre variações genéticas (*e.g.* Bsm-I, DHCR7, FokI) no receptor de vitamina D e infecções por HIV-1. Foi observado que o alelo A do Bsm-I e que o alelo G do DHCR7 estavam associado com a progressão mais rápida da doença, e que o risco de progressão para aids também foi atribuído aos heterozigotos do rs2228570 (FokI) e aos homozigotos S/S do rs17878969 devido à grande representação nos indivíduos progressores (MOODLEY et al., 2013; LAPLANA et al., 2014).

Atualmente, o controle da epidemia de HIV/aids no Brasil é baseado no diagnóstico precoce, em intervenções de prevenção combinada, no tratamento que envolve o diagnóstico oportuno da infecção e no investimento na melhoria do cuidado contínuo dos indivíduos infectados. A administração da Terapia Antirretroviral (TARV) visa diminuir a probabilidade de adoecimento e morte dessas pessoas que vivem com HIV/aids, controlar a doença e diminuir a transmissão do vírus através da diminuição da carga viral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Embora a TARV tenha como objetivo diminuir a carga viral, alguns pacientes, mesmo apresentando boa adesão ao tratamento, não recuperam os níveis de CD4+ satisfatoriamente. Além disso, em infecções por HIV, observa-se uma alta prevalência de deficiência de vitamina D em todas as faixas etárias. Estudos europeus e norte-americanos envolvendo adultos infectados por HIV-1 mostraram que esses baixos níveis foram encontrados em 89% e 70,3% dos pacientes, respectivamente, e que fatores como raça, exposição a drogas anti-HIV como o Efavirenz e insuficiência renal estão também associados a estágios clínicos avançados de infecção pelo HIV-1, diminuição das contagens de LT CD4+ e aumento da mortalidade (MOODLEY et al., 2013).

Dessa forma, sabendo-se que os mecanismos que envolvem o HIV/aids são complexos e que o receptor de vitamina D desempenha um importante papel na modulação do sistema imune, acredita-se que o VDR pode atuar como marcador de infecção por HIV-1 e progressão para aids se tornando um possível alvo para intervenções terapêuticas.

Com isso, esse trabalho objetivou avaliar a influência de SNPs nas sequências do gene do VDR em relação à resposta dos pacientes à TARV.

2. Revisão da Literatura

2.1 Epidemiologia do HIV/aids no Brasil

De acordo com o Ministério da Saúde (2013), estima-se que aproximadamente 718 mil pessoas vivam com HIV/aids, com tendência de aumento da infecção na população jovem.

Atualmente, no Brasil, a epidemia de HIV/aids é considerada estável, sendo a prevalência das taxas de HIV em populações homossexuais e entre homens que fazem sexo com homens (HSH) com cerca de 10,5%. Em relação às pessoas que fazem uso de drogas esse percentual é em torno de 5% e entre profissionais do sexo, 4,9% (Figura 1). Tal distribuição se apresenta de forma contrastante entre as regiões do país e por isso estratégias focadas nos “hotspots” (regiões com risco elevado para novas infecções ou com elevadas taxas de HIV/aids) são adotadas no intuito de melhorar a resposta a essa epidemia (UNAIDS, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

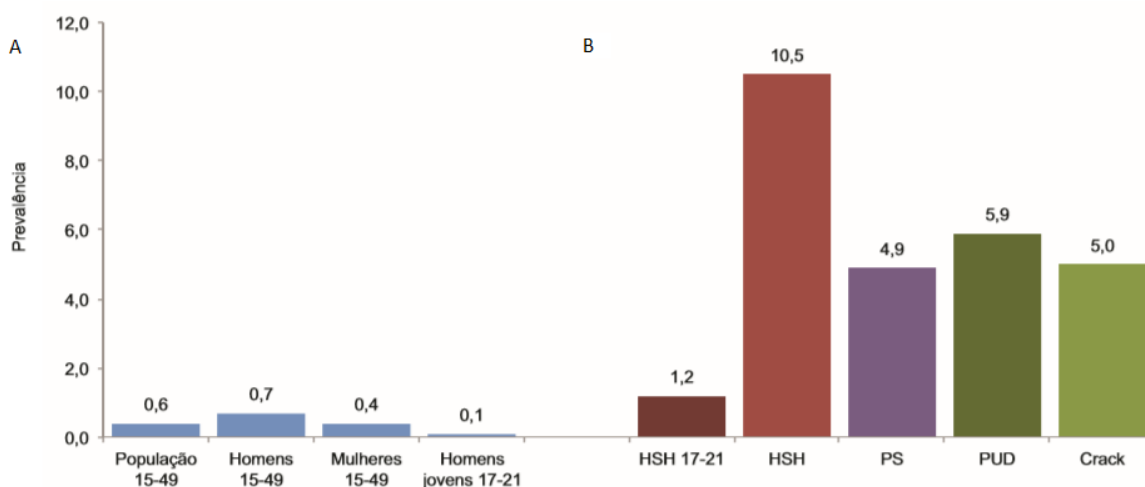


Figura 1 – Grupos populacionais em situação de maior vulnerabilidade. Taxas de prevalência de HIV encontradas em estudos realizados pelo Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais (2008/2009) e parceria entre Ministério da Justiça e o Ministério da Saúde/Fiocruz (2013). Na população de 15 a 49 anos, a prevalência é de 0,6%, sendo 0,7% homens e 0,4% mulheres. Em jovens entre 17 e 21 anos essa taxa é de 0,1% (A). Taxas de prevalência de HIV em grupos populacionais de maior vulnerabilidade: HSH (homens que fazem sexo com homens), PS (profissionais do sexo), PUD (pessoas usuárias de drogas) e usuários de crack (B).

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2014.

De acordo com os dados validados pelo Siclom (Sistema de Controle Logística de Medicamentos), 72,5% dos casos de aids foram registrados do ano 2000 até meados de 2013. Desses, 64,9% foram do sexo masculino e 35,1%, do sexo feminino. Entre as regiões do país, os registros ocorreram com uma prevalência de 74% na região Sul, seguida por 73,5% no Centro-Oeste, 66% no Nordeste, 59,9% no Sudeste e 55,5% ocorreram na região Norte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Do início da epidemia (1980) até o ano de 2013, 278.306 óbitos foram registrados, com prevalência maior na região Sudeste (61,8%) e menor na Norte (4%), segundo o Ministério da Saúde (2014).

Baseado nos dados epidemiológicos, o Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais (DDAHV) do Ministério da Saúde aposta em iniciativas que visem intensificar as ações de diagnóstico e acesso ao teste de HIV para que sejam administradas precocemente as TARVs e assim haja melhoria da qualidade de vida e redução da transmissão do HIV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

2.2 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico de infecção por HIV pode ser feito tanto por testes biológicos que detectem a presença de anticorpos anti-HIV como também a partir do aparecimento de infecções oportunistas que caracterizam um sinal evidente dessa doença. Os testes mais amplamente utilizados para detecção da presença do HIV são os testes sorológicos como o ELISA (do inglês “Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay), testes moleculares e o teste rápido (JAMISON et al., 2006).

No Brasil, o diagnóstico por esse tipo de infecção é regulamentado pela Portaria 29, de 17 de dezembro de 2013, e realizado em laboratórios a partir de testes sorológicos e moleculares ou ainda por testes rápidos durante o acompanhamento médico ou domiciliar ou em centros de testagem e aconselhamento. A partir da confirmação, o indivíduo é direcionado a uma Unidade Básica de Saúde (UBS) do Sistema Único de Saúde (SUS) ou a um serviço especializado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

De acordo com o Ministério da Saúde (2013), os esforços têm se concentrado em uma combinação de fatores incluindo diagnóstico precoce, tratamento e intervenções de prevenção combinada como a melhoria do cuidado contínuo dos indivíduos. Tendo em vista que para se obter uma resposta efetiva no controle a epidemias é necessário que haja a priorização de estratégias de prevenção, a identificação do perfil epidemiológico se torna um pré-requisito

para alcançar tal objetivo (JAMISON et al., 2006). O Ministério da Saúde preconiza em seu protocolo clínico que a abordagem inicial seja um passo importante para que a relação estabelecida entre médico e paciente seja sólida e, dessa forma, fundamental para a adesão ao tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A partir de dezembro de 2013, o Brasil foi o primeiro país em desenvolvimento a adotar uma medida que prevê o tratamento como prevenção (do inglês *Treatment as Prevention* – TasP), de forma que o tratamento pode ser iniciado imediatamente após o diagnóstico do HIV-1 confirmado, independente da contagem de CD4, tudo isso como tentativa de melhoria da qualidade de vida das pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) e também para redução da transmissão do vírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Atualmente, o tratamento para infecções por HIV-1 consiste na Terapia antirretroviral altamente efetiva (do inglês *highly active antirretroviral therapy* – HAART) que atua no intuito de promover a supressão da replicação viral (COELHO et al, 2013). Inicialmente, baseava-se na monoterapia, com o uso do primeiro medicamento anti-HIV, a azidotimidina (AZT) (VELLA et al., 2012), mas mais adiante essa terapia se mostrou ineficaz quanto à promoção da supressão da replicação viral devido à resistência adquirida decorrente das altas taxas de mutações no genoma do HIV-1 (TANG; SHAFER, 2012), dessa forma passou-se a utilizar a combinação de drogas antirretrovirais diminuindo assim as chances de resistência simultânea do vírus (CRESSEY; LALLEMANT, 2007). Ainda assim, a resposta à HAART é bastante complexa e também limitada devido à toxicidade (a curto ou longo prazo) e à resistência aos medicamentos, e a eficácia da terapia depende da sensibilidade do vírus a determinada droga. Essa variabilidade pode ser influenciada tanto por fatores que regulam a disponibilidade de medicamentos (farmacocinética), como por efeitos no hospedeiro e farmacodinâmica do vírus (MICHAUD et al., 2012).

No Brasil, o acesso a esse tratamento para HIV/aids é universal, gratuito e garantido por lei. O uso dos medicamentos deve ser realizado com pelo menos três antirretrovirais combinados, sendo dois deles de classes diferentes, podendo ser combinados em um único comprimido. Atualmente, as terapias de primeira linha compreendem os seguintes regimes/classes (COELHO et al., 2013; CRESSEY; LALLEMANT, 2007; MICHAUD et al., 2012):

- Inibidores Análogos a Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (do inglês *nucleoside reverse transcriptase inhibitors* – NRTIs), que são análogos de nucleosídeos ou nucleotídeos que se incorporam ao DNA do vírus e interrompem a síntese do seu

material genético (Abacavir, Didanosina, Estavudina, Lamivudina, Tenofovir, Zidovudina, e combinação Lamivudina/Zidovudina);

- Inibidores não-análogos a Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (do inglês *non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors* – NNRTIs), que impedem a síntese do material genético do vírus por se ligarem a sítios alostéricos da transcriptase reversa inibindo sua atividade (Efavirenz, Nevirapina e Etravirina);
- Inibidores de Protease (PI), que interagem com a protease viral impedindo o processamento correto das proteínas, abolindo sua infectividade, mas seu efeito antirretroviral é também dependente da sua farmacocinética (Atazanavir, Darunavir, Fosamprenavir, Indinavir, Lopinavir/r, Nelfinavir, Ritonavir, Saquinavir e Tipranavir);
- Inibidor de Integrase, que bloqueia a atividade da integrase inibindo a replicação do vírus e a capacidade de infectar novas células, como o Raltegravir que apresenta características físico-químicas favoráveis à inibição da integrase (sendo a integração uma etapa única e essencial para a replicação do vírus) e tem uma barreira genética menor do que os inibidores de protease e os NRTIs; e
- Inibidor de Entrada ou de Fusão, como os antagonistas de receptores CCR5 (Enfuvirtida), que impede a entrada de partículas virais na célula alvo por bloquear a utilização desse correceptor, embora não tenha capacidade de inibir a entrada de partículas virais que não tenham tropismo para o CCR5.

Após a implementação da terapia antirretroviral a aids é considerada uma doença crônica, sendo, portanto, possível haver diminuição da probabilidade de adoecimento e morte além de melhorar a qualidade de vida e diminuir a transmissão do vírus, levando em consideração o tratamento adequado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

2.3 Patogênese da aids

Infecções por HIV-1 são caracterizadas por haver ativação contínua do sistema imunológico. Macrófagos e outros tipos celulares são permissivos à infecção por esse tipo viral o que pode levar à modulação das vias de sinalização e modulação dos mecanismos apoptóticos próprios do hospedeiro (HERBEIN et al., 2010; MBITA; HULL; DLAMINI, 2014). A determinação da patogênese pela infecção por HIV-1 envolve a depleção dos linfócitos T que leva à imunodeficiência e a presença de células latentes que servem como reservatórios virais,

tais como os macrófagos associados ao intestino que, possivelmente, sofrem regulação negativa dos receptores CD4 e CCR5 induzida pelo estroma intestinal, que também diminui a ativação do fator nuclear kappa B (NFkB), que funciona como fator de transcrição, nesses macrófagos (KUMAR; ABBAS; HERBEIN, 2014).

De acordo com Garg e colaboradores (2012), diversas proteínas virais têm sido descritas no envolvimento com esse processo, mas a interação entre a glicoproteína viral Env expressa nas células infectadas e os receptores das células adjacentes é abordado como um mecanismo bastante importante haja vista que o receptor CD4 é primeiramente utilizado pelo HIV-1 para entrar na célula. Seus estudos mostraram que Env medeia a fusão entre as membranas viral e celular permitindo a entrada do vírus, o que é possível pela atuação das glicoproteínas virais gp120, que se liga ao CD4, e gp41, que se liga ao correceptor de quimiocina mediando a fusão. Dessa forma, essas proteínas são reconhecidas pelos receptores e correceptores presentes nas células linfoides ocorrendo a penetração do capsídeo no meio intracelular (FANALES-BELASIO et al., 2010). A partir de então, a interação entre proteínas e receptores induz a formação de sincícios que eventualmente levam à apoptose, assim como a infecção abortiva por HIV pode levar à apoptose de células adjacentes (Figura 2) (GARG et al., 2012; DOITSH et al., 2010).

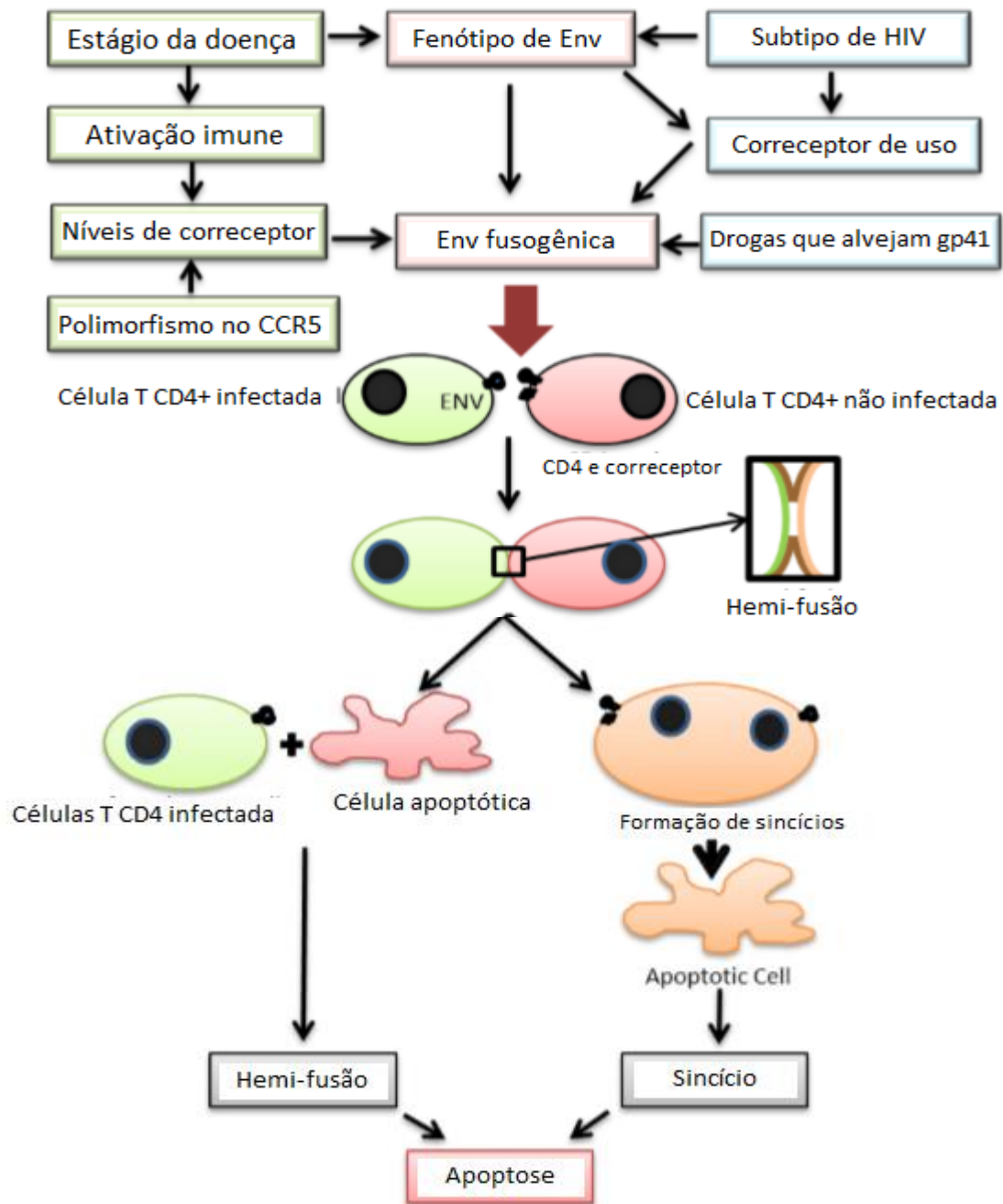


Figura 2 – Descrição dos fatores de regulação de Env fusogênica levando à apoptose de células adjacentes. O potencial fusogênico da glicoproteína Env viral é determinado não apenas pelo subtipo do HIV, mas também pelo estágio da doença, pelos níveis de expressão do correceptor do HIV nas células T CD4+ de indivíduos infectados e pelo uso de drogas que tem como alvo o envelope viral. O processo de morte das células T em infecções por HIV é iniciado por interações entre o receptor da glicoproteína Env nas células infectadas e o correceptor nas células vizinhas. Essa interação leva à total fusão entre as duas células formando sincícios ou uma fusão abortiva levando à hemi-fusão. Ambos os processos levam à morte celular por apoptose.

Fonte: Adaptado de Garg et al., 2012.

Enquanto ocorre o declínio do percentual de linfócitos, o número de macrófagos permanece constante contribuindo para a replicação viral. Tal declínio é consequência da atuação dos linfócitos T CD8⁺ que matam os LT CD4⁺ infectados de forma que o hospedeiro se torna imuno-comprometido e suscetível a novas infecções oportunistas e novas patologias. A morte celular por apoptose decorrente da infecção por HIV envolve componentes tanto da via extrínseca como da via intrínseca incluindo MAPK, caspases 8 e 9, destruição de proteínas estruturais, regulação de Bcl-2, liberação de citocromo c mitocondrial, encurtamento dos telômeros e ativação e transcrição do NFkB. Proteínas virais como a Vpr podem induzir apoptose de células CD4⁺ infectadas através da via mitocondrial, enquanto que a Nef induz a morte dessas células pela via ativada a partir dos receptores de morte (MBITA; HULL; DLAMINI, 2014).

Segundo Herbein e colaboradores (2010), é crucial entender as vias de sinalização envolvidas na ativação de macrófagos a partir de infecções por HIV-1 visto que essa abordagem pode levar ao desenvolvimento de novas terapias.

2.4 Vitamina D e VDR

A vitamina D se encontra representada sob duas formas principais que são a vitamina D3 (colecalciferol) e a vitamina D2 (ergocalciferol), ambas encontradas em alimentos e suplementos específicos, mas apenas a D3 é produzida pela pele (KAMEN; TANGPRICHA, 2010).

A partir da ativação dos seus precursores pela exposição à luz solar e transformação bioquímica no fígado, a vitamina D atinge sua forma biologicamente ativa pela conversão através da enzima CYP27B1 (25-hidroxivitamina-D₃ 1- α -hidroxilase) e seus metabólitos são transportados pela VDBP (proteína de ligação da vitamina D, do inglês vitamin-D-binding protein). Um potencial papel da vitamina D em infecções por HIV-1 tem sido considerado em dois processos com efeitos opostos que são: I- sua atuação benéfica a partir da síntese de peptídeos antimicrobianos contra a entrada do vírus evitando a infecção ou diminuindo a ativação imunológica na fase aguda, sendo esse último o principal mecanismo patogênico e, II- a indução de ferramentas para uma resposta mediada por linfócitos T helper menos efetiva contra essas infecções durante a fase crônica da infecção. Além disso, diferenças nos níveis de D3 circulante podem ser observadas em estágios diferentes de infecção por HIV e progressão

para a aids, sendo detectados níveis quase normais em pacientes que não apresentam eventos de aids descritos em contraste com níveis bastante reduzidos durante a progressão para essa doença (LAPLANA et al., 2014). Já a regulação de suas funções parácrinas e endócrinas é feita pelo sistema imune e dependente da pré-vitamina D, de forma que sua deficiência se torna crítica para o próprio sistema imune, e seu efeito parácrino/endócrino é dependente de suas concentrações (KAMEN; TANGPRICHA, 2010; AGUILAR-JIMÉNEZ et al., 2013).

A D3 entra na célula alvo através da circulação e se liga ao VDR. Esse receptor entra no núcleo e se heterodimeriza com o receptor de ácido retinóico (RXR). O heterodímero formado se liga a elementos de resposta a vitamina D (VDER) localizados no DNA, ativando por essa via a transcrição gênica (Figura 3) (DE AZEVEDO SILVA, 2012).

Hepatócito Humano

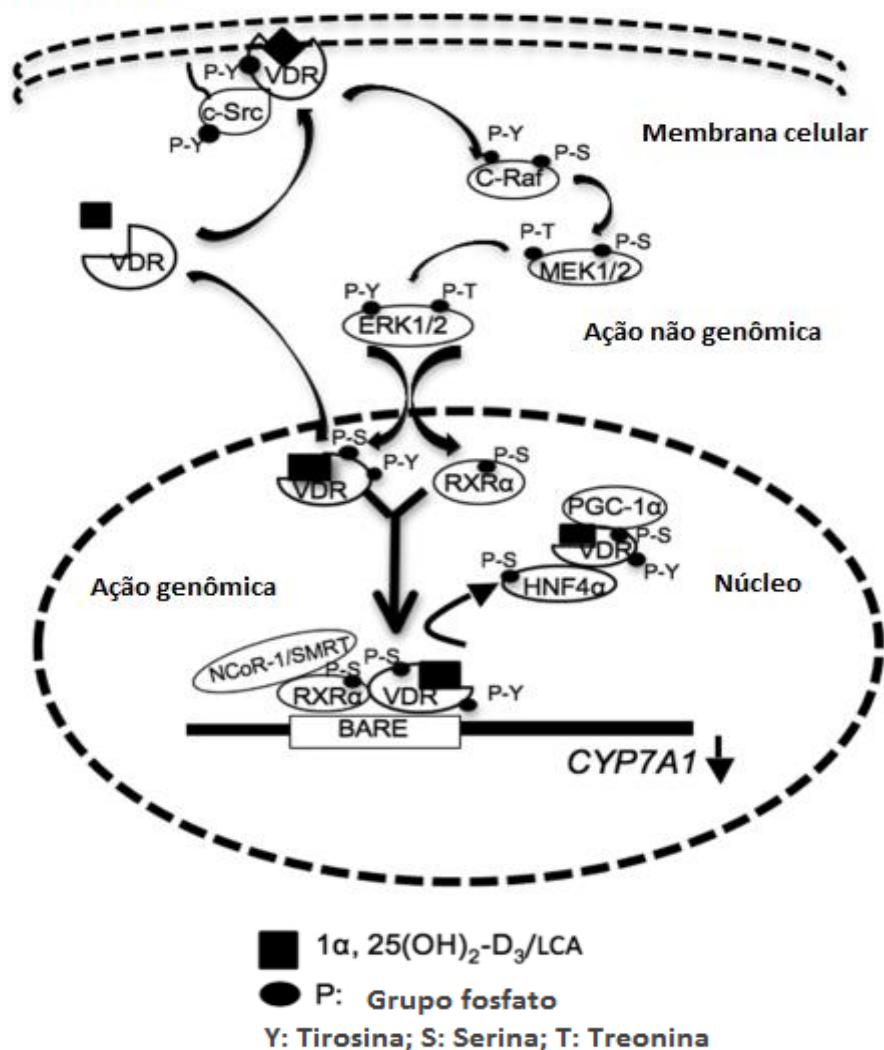


Figura 3 – Vias de sinalização genômicas e não genômicas do VDR na inibição da transcrição do gene CYP7A1 nos hepatócitos humanos. Ligantes do VDR, 1α, 25 (OH) 2-D3, ou LCA estimulam a translocação intracelular de VDR para a membrana plasmática. Tais ligantes induzem a fosforilação da tirosina (Y) e ativam c-Src. VDR interage com c-Src na membrana plasmática. A sinalização do VDR na membrana ativa c-Raf que então ativa a via do MEK1 / 2 / ERK1 / 2 MAPK. O VDR também é translocado para o núcleo independente da via de tirosina quinase. ERK1 / 2 é translocado para o núcleo e posteriormente fosforila a serina / treonina (S / T) sobre os resíduos nucleares de VDR, RXRα, e HNF4α. VDR / RXRα recruta correpresor NcoR-1 ou SMRT para o BARE deslocar o complexo HNF4α / VDR / PGC-1α ou complexo SRC-1 resultando na inativação do gene CYP7A1. VDR interage com HNF4α e impede a dimerização e ligação de HNF4α ao BARE.

Fonte: adaptado de Han et al., 2010.

Estudos *in vitro* descritos por Moodley e colaboradores (2013) tratam da atuação dessa vitamina no aumento da autofagia induzida por concentrações fisiológicas de vitamina D biologicamente ativa em crianças e adultos infectados por HIV-1 de forma que essa condição inibe a replicação do HIV-1 em macrófagos infectados. Embora todas essas condições tenham sido descritas, as consequências da deficiência de vitamina D para os parâmetros imunológicos permanecem pouco caracterizados (FABRE-MERSSEMAN et al., 2014).

Seu envolvimento com o sistema imune ocorre através da promoção da diferenciação de monócitos, inibição da proliferação de células T e citocinas como a interleucina 2 (IL-2), interferon γ (IFN- γ) e interleucina 12 (IL-12) e aumento do fator de crescimento tecidual β 1 (TGF- β 1), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 10 (IL-10) (KAMEN; TANGPRICHA, 2010; MONTICIELO et al., 2012) (Tabela 1).

Tabela 1 – Ações biológicas da vitamina D/VDR e doenças relacionadas.

Classificação	Doenças Representativas	Efeitos Específicos
Sistema imune	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Aumento de catelecidina peptídeo antimicrobiano
	Psoríase	Aumento de peptídeos antimicrobianos (AMPs)
	Doença inflamatória do intestino	Diminuição de IFN γ e TNF α
	Doença periodontal	Aumento de catelecidina e diminuição de MMP9
	Artrite reumatoide	Diminuição de IL-17A e aumento de IL-4
	Nefrite	Diminuição de TNF α , IL-1 β , INF γ , MCP-1, ICAM-1 e VCAM-1
Sistema nervoso central	Esclerose múltipla	Diminuição de IL-17A
	Encefalomielite	Diminuição de IL-17 e CCR6
Sistema endócrino	Diabetes tipo 1	Secreção de insulina
	Diabetes tipo 2	Resistência a insulina
Câncer	Próstata	Diminuição de Bcl-2 e Apoptose
	Mama	Diminuição de crescimento tumoral e aumento de p21 e p27
	Colo	Diminuição de <i>c-fos</i> e <i>c-myc</i>

Fonte: Adaptado de Yang et al, 2012.

De acordo com Cozzolino e colaboradores (2003), o uso de inibidores de protease utilizados no tratamento anti-HIV interfere no metabolismo da D3 por inibir a atividade de 25-hidroxilase, 24-hidroxilase e 1 α -hidroxilase. Além disso, Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa utilizados na terapia antirretroviral como o Efavirenz, além de outros

fatores como raça, obesidade, insuficiência renal, pigmentação mais escura da pele e exposição à luz ultravioleta se encontram associados aos baixos níveis de vitamina D em pacientes infectados por HIV (MOODLEY et al., 2013).

O receptor de vitamina D (VDR) é um membro da família do receptor de hormônio nuclear que influencia a função de genes envolvidos na regulação celular, crescimento, e imunidade, atuando como modulador da resposta imune e se encontra presente em mais de 50 tipos celulares (WANG et al, 2012; RUAN et al, 2015). O gene VDR está localizado no cromossomo 12 (12q13-14) e inclui oito éxons codificadores de proteínas (2-9), seis éxons não traduzidos (1^a-1f) com splicing alternativo, oito íntrons e duas regiões promotoras. Os polimorfismos descritos no VDR estão presentes principalmente nas regiões promotoras próximas ao éxon 1, entre os éxons 2 e 9 e na região 3'UTR (DE AZEVEDO SILVA, 2012). Tais polimorfismos podem estar relacionados à modificação da função gênica ou ainda à modificação da função da vitamina D, tornando-a ineficiente (DE AZEVEDO SILVA et al., 2013). Dentre os SNPs mais descritos na literatura estão o Cdx2 (G>A), FokI (C>T), BsmI (A>G), EcoRV (G>A), ApaI (G>T) e TaqI (T>C) como mostra a figura 4 (UITTERLINDEN et al., 2004).

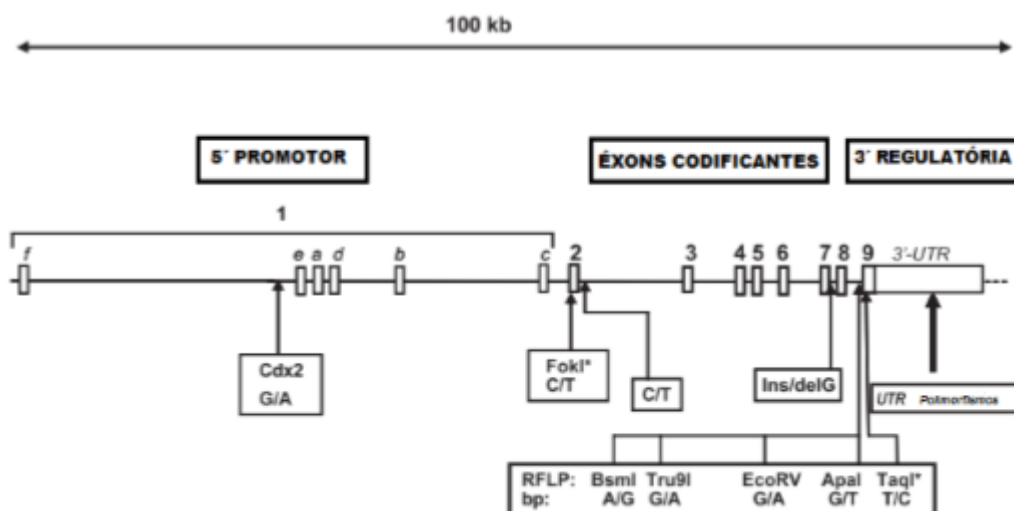


Figura 4 – Estrutura do gene VDR e a localização dos SNPs mais estudados.

Fonte: Adaptado de de Azevedo Silva, 2012.

2.4.1 Influência genética de SNPs no gene VDR na infecção por HIV-1

Polimorfismos de base única (SNPs) são fonte de variabilidade genética interindividual, estão presentes na sequência de bases e podem não ter consequências patológicas diretas, embora diversos estudos tenham mostrado associações entre SNPs com a progressão da doença em pacientes infectados por HIV-1. Grupos de polimorfismos podem ser representados por Tag SNPs, que se localizam em uma região do genoma com forte desequilíbrio de ligação. Neste trabalho, destacam-se os Tag SNPs: rs3890733, rs4760648, rs1540339 e rs 2248098, e os SNPs funcionais não representados pelos Tag SNPs citados anteriormente: rs2228570 (FokI) e rs11568820 (Cdx2) distribuídos no gene VDR como mostra a figura 5 (DE AZEVEDO SILVA, 2012).

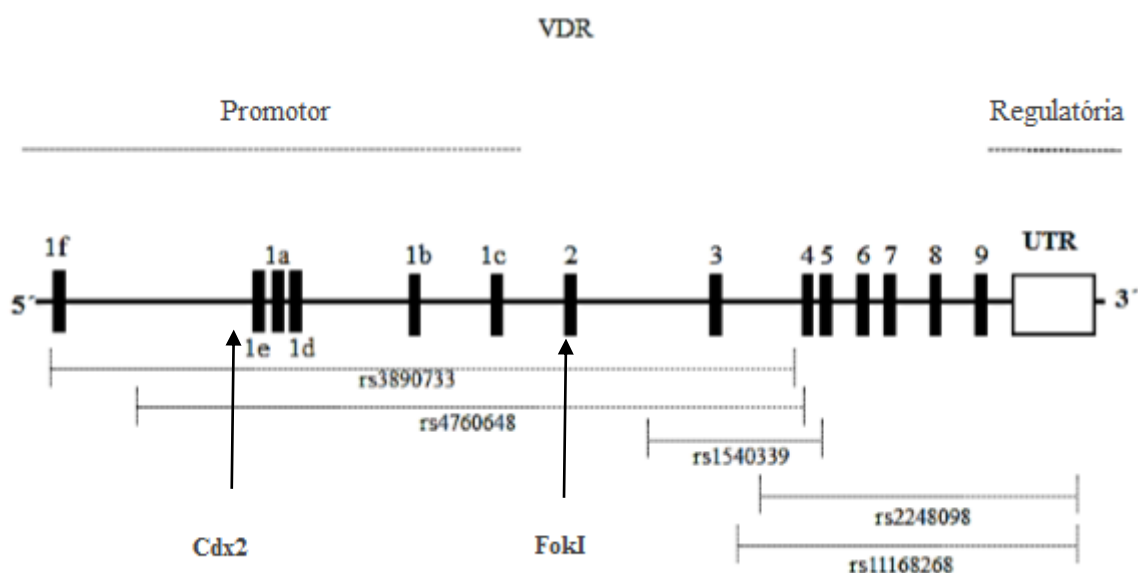


Figura 5 - Estrutura do gene VDR e distribuição e área de cobertura dos Tag SNPs e SNPs funcionais (Cdx2 e FokI) testados ao longo do gene.

Fonte: Modificado de de Azevêdo Silva et al., 2013.

O papel da vitamina D em infecções é controverso, mas foi mostrado que ela promove a síntese de peptídeos que tem efeito sobre a entrada do vírus e por outro lado induz uma resposta imune menos efetiva de linfócitos T helper contra infecções virais. O SNP funcional FokI mostrou relação com infecções por HIV em crianças que apresentam alteração no códon

de iniciação de tradução local do gene VDR resultando em uma proteína mais curta (MOODLEY et al., 2013), com a suscetibilidade de doenças autoimunes, rápida progressão do HIV/aids e baixos níveis de metabólito circulante da vitamina D no soro (LAPLANA et al., 2014). Já o Cdx2 se mostrou mais prevalente em indivíduos não infectados por HIV-1, mas em situação de risco (DE LA TORRE et al., 2008).

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência de polimorfismos de base única (SNPs) nas sequências do gene do receptor de vitamina D (VDR) em relação à resposta dos pacientes à Terapia Antirretroviral (TARV).

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a frequência dos SNPs, (rs3890733, rs476048, rs1540339, rs2248098, rs2228570 e rs11568820) do gene VDR em pacientes infectados por Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1) sob Terapia Antirretroviral;
- Avaliar o grau de associação dos SNPs com o sucesso ou falha do TARV;
- Avaliar o grau de associação dos SNPs com o sucesso ou falha imunológica ao TARV;
- Avaliar a relação entre os fatores clínicos e epidemiológicos e os SNPs com o sucesso/falha do TARV;
- Avaliar a relação entre os fatores clínicos e epidemiológicos e os SNPs com o sucesso/falha imunológica ao TARV.

4. Métodos

4.1 Grupo de estudo

Esse trabalho fez parte de dois projetos maiores previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), a saber: "Fatores genéticos humanos envolvidos no curso da infecção pelo HIV: Transmissão vertical, imunidade e resposta à terapia antirretroviral" e "Polimorfismos em genes de vias de Metabolização e Transporte de Drogas e Terapia Antirretroviral contra o HIV-1". Foram realizadas as coletas de sangue em 508 pacientes com idades entre 18 e 50 anos, atendidos e tratados no Hospital Dia do IMIP, no período de maio de 2011 a dezembro de 2014. Os pacientes foram selecionados inicialmente a partir dos seguintes critérios gerais de inclusão: ausência de comorbidades pré-existentes, tratamento antirretroviral há pelo menos um ano sem intervalos significativos e presença de dados clínicos nos prontuários, totalizando 107 pacientes.

Os indivíduos foram classificados de acordo com sucesso/falha terapêutica (diminuição da carga viral a nível indetectável, inferior a 50 cópias/mL) e sucesso/falha imunológica (>500 células/mm³ ou $> 25\%$) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014) distribuídos em 12 pacientes com falha terapêutica, 95 com sucesso terapêutico e 14 com falha imunológica e 93 com sucesso imunológico.

Um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os indivíduos incluídos neste estudo (Anexo A).

4.2 Extração de DNA genômico

Foi realizada a coleta de aproximadamente 5 mL de sangue venoso periférico em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) por indivíduo. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE) onde o DNA genômico foi isolado a partir das células do sangue periférico de cada paciente seguindo as instruções do protocolo para *Mini Salting Out*. Posteriormente, as amostras foram quantificadas e armazenadas em freezer a -20°C.

4.3 Seleção dos polimorfismos de base única

Os polimorfismos foram selecionados a partir de busca na literatura e utilizando os bancos de dados SNPBrowser software 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) e HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Tag SNPs (rs3890733, rs4760648, rs1540339 e rs2248098) e SNPs funcionais (rs2228570 e rs11568820) apresentavam frequência do alelo minoritário (MAF) de 10%.

4.4 Genotipagem dos indivíduos

A genotipagem dos SNPs foi realizada com sondas alelo específicas fluorescentes (Taqman Probes, Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando a plataforma para PCR em tempo real ABI7500, com base no protocolo do fabricante, sendo C__2880800_10 correspondente ao rs3890733, C__1744890_10 correspondente ao rs476048, C__8716064_1_ correspondente ao rs1540339, C__3290630_1_ correspondente ao rs2248098, C__12060045_20 correspondente ao rs2228570 e C__2880808_10 correspondente ao rs11569920 para o total de 107 pacientes.

4.5 Métodos estatísticos

4.5.1 Variáveis clínicas e epidemiológicas

As variáveis selecionadas para a análise no contexto deste estudo incluíram as que possivelmente influenciariam no resultado do tratamento: gênero, idade, peso, etnia, carga viral e contagem de células T CD4+.

4.5.2 Análises estatísticas

O teste t de Student e o ANOVA foram utilizados para avaliar se os valores da variável peso estariam associados às posteriores respostas terapêutico-imunológicas.

As frequências alélicas e genotípicas e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram realizados utilizando a ferramenta SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>).

O pacote R "SNPassoc" (software R, versão 2.12.2), desenvolvido para estudos genéticos, foi utilizado para avaliar a associação entre SNPs e o sucesso/falha do TARV e o sucesso/falha imunológica ao TARV, e avaliar a associação entre SNPs e os fatores clínicos e epidemiológicos com o sucesso/falha do TARV e o sucesso/falha imunológica ao TARV.

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos e incluídos na análise de regressão logística.

5. O PAPEL DE POLIMORFISMOS NO GENE VDR NA RESPOSTA À TERAPIA ANTIRRETROVIRAL (TARV) EM INFECÇÃO POR HIV-1 NA POPULAÇÃO DO NORDESTE BRASILEIRO

INTRODUÇÃO

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1) é complexa e multifatorial, influenciada pela variabilidade dos indivíduos relacionada à suscetibilidade à infecção e à progressão para a aids¹. Os alvos principais do HIV-1 são linfócitos T CD4⁺ e linhagens de monócitos/macrófagos², sendo a depleção de células T CD4⁺ a principal característica da patogenicidade dessas infecções³.

A vitamina D é produzida pela pele e metabolizada na sua forma ativa pelos rins⁴. Seu potencial papel em infecções por HIV-1 tem sido considerado em processos como a síntese de peptídeos antimicrobianos contra a entrada do vírus evitando a infecção ou diminuindo a ativação imunológica na fase aguda, sendo esse último o principal mecanismo patogênico, e a indução de ferramentas para uma resposta mediada por linfócitos T helper menos efetiva contra essas infecções durante a fase crônica da infecção. Seus níveis circulantes podem variar de quase normais, em pacientes que não apresentam eventos de aids descritos, a bastante reduzidos durante a progressão para essa doença⁵. Além disso, apresenta envolvimento com o sistema imune, com função imunomoduladora, por promover a diferenciação de monócitos e a inibição da proliferação de células T e citocinas (IL-2, IFN- γ e IL-12) bem como o aumento do TGF- β 1, IL-4, IL-5 e IL-10^{6,7} e sua ação é regulada principalmente pelo receptor de vitamina D (VDR)⁴.

Sua ligação com o (VDR) induz a translocação do VDR para o núcleo celular e a formação de um heterodímero com o receptor de ácido retinóico (RXR) ativando a transcrição gênica. A função do VDR está relacionada à modulação da resposta imune e a presença de polimorfismos nesse receptor pode modificar sua função ou ainda tornar a vitamina D ineficiente^{4,8}. Considerando que polimorfismos no gene desse receptor podem levar ao comprometimento do papel da vitamina D, diversos estudos de associação com SNPs tem sido realizados e mostraram envolvimento com a progressão e suscetibilidade a doenças imunes⁹.

Na imunidade inata, os macrófagos desempenham um papel bastante relevante no combate a bactérias. Eles expressam CYP27B1 na superfície e tem a capacidade de produzir vitamina D localmente quando estimulados por $\text{INF}\gamma$ além de, a partir de receptores do tipo Toll (TLR), também aumentar a expressão de CYP27B1 e VDR. Assim, com o aumento de CYP27B1 e VDR ocorre o aumento da síntese de D3 e produção de catalecidina antimicrobiana. No entanto, o mecanismo de regulação de citocinas pró-inflamatórias por essa via ainda não é totalmente compreendido. Mesmo assim, sabe-se que a vitamina D se liga à subunidade $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ do NF κB impedindo sua fosforilação e resultando no bloqueio da via de ativação desse fator de transcrição no tipo celular RAW264.7¹⁰. Nos linfócitos T, o VDR pode ativar uma via alternativa de proteína quinase e está relacionada a uma maior capacidade de resposta dessas células¹¹.

Estudos *in vitro* mostraram da atuação da vitamina D no aumento da autofagia em infecções por HIV-1 e inibição da replicação do HIV-1 em macrófagos infectados⁹. Embora todas essas condições tenham sido descritas, as consequências da deficiência de vitamina D para os parâmetros imunológicos permanecem pouco caracterizados¹².

Neste trabalho, selecionamos quatro Tag SNPs (rs3890733, rs4760648, rs1540339 e rs2248098) e dois SNPs funcionais (rs2228570 e rs11568820) presentes na sequência do gene VDR para um estudo de associação com o objetivo de avaliar se polimorfismos no gene VDR poderiam estar relacionados com a resposta à TARV de pessoas vivendo com HIV-1 na cidade do Recife e região metropolitana.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes: Foram recrutados 508 pacientes positivos para HIV-1 atendidos e tratados no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), com faixa etária entre 18 e 50 anos. Todos os pacientes foram selecionados de acordo com os seguintes critérios de inclusão/exclusão: ausência de co-infecções pré-existentes, tratamento antirretroviral há pelo menos um ano sem intervalos significativos e presença de dados clínicos nos prontuários. Foram excluídos 407 pacientes por não se enquadrarem nos critérios citados anteriormente. Os 107 indivíduos incluídos no estudo foram classificados de acordo com sucesso/falha terapêutica e sucesso/falha imunológica (Tabela 1). Um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os indivíduos incluídos neste estudo que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do IMIP.

Seleção de SNPs e Genotipagem: Extração de DNA genômico a partir de PBMC foi realizada seguindo as instruções do protocolo para Mini Salting out. Os polimorfismos foram selecionados a partir de busca na literatura e utilizando os bancos de dados SNPBrowser software 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) e HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Tag SNPs (rs3890733, rs4760648, rs1540339 e rs2248098) e SNPs funcionais (rs2228570 e rs11568820) apresentavam frequência do alelo minoritário (MAF) menor do que 10%. A genotipagem dos SNPs foi realizada com sondas alelo específicas fluorescentes (Taqman Probes, Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando a plataforma para PCR em tempo real ABI7500, com base no protocolo do fabricante.

Análises estatísticas: As frequências alélicas e genotípicas e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram realizados utilizando a ferramenta SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>). O teste t de Student e o ANOVA foram utilizados para avaliar a associação entre os SNPs e o sucesso/falha do TARV e o sucesso/falha imunológica ao TARV. As análises foram realizadas pelo software R, pacote SNPAssoc (software R, versão 2.12.2). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos e incluídos na análise de regressão logística. Análise por Bonferroni não foi utilizada porque essa combinação de SNPs nunca foi usada com HIV e usá-la iria restringir a análise e excluir novos potenciais SNPs.

RESULTADOS

As medidas das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs funcionais e Tag SNPs do VDR de pacientes HIV-1+ se encontraram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com exceção do Tag SNP rs3890733 para as variáveis de sucesso imunológico e sucesso terapêutico. Não foi observado desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados do VDR na nossa população (Tabela 2).

O Tag SNP rs3890733 C/C apresentou um *p-value* igual a 0,037 em relação à resposta imunológica (OR=2,97, CI=0,87-10,19) como mostrado na tabela 2. Para os demais polimorfismos dos genes do VDR em relação à falha ou a resposta imunológica, não foram observadas associações.

Quando realizada análise multivariada incluindo as variáveis peso, etnia, idade e gênero e os polimorfismos, foi observada associação entre o rs2248098 e o peso com a resposta virológica ($p=0,044$ e $p=0,017$, respectivamente).

Quando comparados os genótipos com relação às variáveis clínicas/epidemiológicas em particular, foram observadas associações entre o gênero e o genótipo C/C do rs1540339 indicando que mulheres com esse genótipo apresentam mais chances de ter sucesso terapêutico (OR=0,08, CI=0,01-0,97, $p=0,04$) como mostra a tabela 3.

Análise multivariada incluindo gênero, peso e etnia mostrou associação do rs3890733 com a falha imunológica para os genótipos C/C e T/T no modelo sobredominante (OR=0,21, $p=0,024$) indicando que indivíduos com esse genótipo têm mais chances de sucesso imunológico em relação aos heterozigotos.

DISCUSSÃO

Em nossa população de estudo, os resultados não mostraram envolvimento do polimorfismo FokI (rs2228570) no VDR com a resposta ao TARV dos pacientes HIV-1+ (OR=1,09, CI=0,4-2,92, $p=0,536$). Por outro lado, no estudo em que García-Martín e colaboradores (2013) relacionaram esse polimorfismo com outras variações do CYP27B1 na resposta à terapia para hepatite C crônica foi observado que os portadores do alelo T menor tinham uma maior probabilidade de obter resposta viral sustentada à terapia, mostrando que esse SNP pode de alguma forma contribuir para o sucesso terapêutico em infecções virais. Demais relatos abordando associações significativas relacionados ao FokI mostram que o genótipo homozigoto recessivo estava ligado a diferentes concentrações de vitamina D em variadas populações de pacientes acometidos por tuberculose¹⁴ e que esse mesmo tipo de associação estava presente entre o genótipo CT do FokI e LES¹⁵.

Estudo anterior mostrando associação do SNP rs1540339 com predisposição a doenças foi encontrado em pacientes com DM1¹⁶. No presente trabalho, as mulheres que apresentavam o genótipo C/C para esse SNP tinham mais chances de alcançar o sucesso terapêutico do que os demais pacientes. Em relação ao HIV-1, resultados para esse polimorfismo não foram relatados recentemente em nenhum estudo de associação. Assim, levando em consideração o papel inibidor exercido pelo estrógeno¹⁷, e a expressão abundante de VDR em monócitos e macrófagos que expressam CYP27B1, responsável por catalisar a síntese de D3, estimula a

sensibilização dessas células a promover um mecanismo autócrino acelerado e, dentre outros fatores, a estimular a produção de prostaglandina imunossupressora (PGE2) por esses macrófagos¹⁸, essas características possivelmente exerceram influência imunomoduladora na resposta à infecção viral auxiliando na eficácia da terapia.

O estrógeno desempenha importante papel inibidor no fator estimulador de crescimento de macrófagos (M-CSF), e a presença do VDR e CYP27B1 em monócitos e macrófagos, é responsável por catalisar a síntese de D3. Assim, em mulheres, que apresentam normalmente níveis mais elevados de estrógeno do que em homens, os macrófagos são estimulados a produzir prostaglandina imunossupressora (PGE2), o que pode aumentar a resposta à infecção viral auxiliando na eficácia da terapia¹⁷.

Em se tratando da resposta imunológica dos pacientes decorrente da infecção pelo HIV-1, o que se observa é a depleção das células T gerando a imunodeficiência na patogênese da aids¹⁹. Para tanto, as drogas anti-HIV agem diretamente na diminuição da carga viral além de agirem, indiretamente, na recuperação imunológica. No que diz respeito ao SNP rs3890733, o presente estudo foi o primeiro a descrever uma associação entre esse polimorfismo e a resposta imunológica ao TARV. Foi observado que pacientes homozigotos (C/C e T/T) apresentavam mais chances de ter sucesso imunológico em relação aos heterozigotos, o que remete ao papel imunomodulador do VDR em doenças crônicas. Em modelos sobredominantes de interação alélica, normalmente, indivíduos heterozigotos se sobressaem em relação aos homozigotos por herdarem “vantagem genética” de ambos os alelos, condição essa que não foi observada nesses resultados, o que possivelmente pode ter ocorrido devido à uma seleção negativa consequente das características herdadas em relação à resposta terapêutica, mas esses motivos ainda permanecem incertos.

O papel imunomodulador do VDR e seu ligante (vitamina D) em associação com o Tag SNP rs2248098 também foi estudado no presente trabalho, onde encontramos sua relação com a resposta terapêutica para o genótipo A/G, também sendo citado por de Azevedo Silva, 2012, quanto à presença de alterações imunológicas e cutâneas em pacientes acometidos por LES juntamente com o rs3890733. Não foram encontrados dados comparativos publicados recentemente entre associações do rs2248098, infecções por HIV-1 e resposta à TARV, mas sua associação com alterações cutâneas e imunológicas em doenças crônicas mostra que o derivado

hormonal da vitamina D3 (1,25 (OH) 2D3), que se liga ao VDR, tem ação antiproliferativa e efeito pró-diferenciação sobre células que expressam VDR⁴.

Além disso, dentre todas as variáveis estudadas, o peso também se mostrou associado à resposta virológica em pacientes HIV-1+. A associação existente entre o peso e a resposta à TARV pode estar relacionada ao aumento do potencial risco de dislipidemia decorrente da terapia antirretroviral, que pode aumentar a síntese de triglicerídeos e colesterol²⁰. Atualmente, a HAART baseada em inibidores de protease é a opção mais “potente” contra infecções por HIV-1, mas tem sido encontrada alteração no metabolismo lipídico de pacientes HIV+ em tratamento com esta classe de antirretrovirais visto que essas drogas prejudicam a hidrólise de lipoproteínas ricas em triglicerídeos reduzindo o armazenamento de ácidos graxos livres e interferindo no metabolismo desses ácidos²¹. A dislipidemia está associada também a baixos níveis de vitamina D (que podem sofrer influência de antirretrovirais, como os inibidores de proteinase, já que eles inibem a atividade das enzimas 25-hidroxilase, 24-hidroxilase e 1 α -hidroxilase)²² e complicações cardiovasculares em adultos já que ocorre a diminuição da sua biodisponibilidade devido à sua característica lipossolúvel. Em adição, em crianças obesas também é encontrada associação entre níveis baixos da vitamina e padrões lipídicos desfavoráveis²³.

CONCLUSÕES

Neste estudo foram encontrados dados significativos que mostram associações entre polimorfismos do VDR e as respostas terapêutica e imunológica dos pacientes à terapia antirretroviral indicando a importância do receptor de vitamina D em infecções por HIV-1 no intuito de contribuir para o entendimento da variabilidade das respostas dos pacientes à TARV. Este trabalho é o primeiro a descrever uma combinação de SNPs no VDR em infecções por HIV-1 e resposta dos pacientes ao TARV. Foi ainda observado ainda que SNPs no gene VDR estão associados à resposta virológica ou imunológica dos pacientes à terapia antirretroviral e ainda que variáveis clínicas e epidemiológicas como gênero e peso podem também influenciar nessas respostas. Contudo, estudos envolvendo número maior de indivíduos e diferentes populações étnicas são necessários para reforçar nossos resultados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), ao Departamento de Patologia, ao Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco e ao Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) pelo suporte técnico-científico, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Nasi M, Riva A, Borghi V, D'Amico R, Del Giovani C, Casoli C, et al. Novel genetic association of TNF- α 238 and PDCD1-7209 polymorphisms with long-term non-progressive HIV-1 infection. *Int J Infect Dis*. 2013 Oct; 17(10): e845-50.
2. Kumar A, Abbas W, Herbein G. HIV-1 latency in monocytes/macrophages. *Viruses*. 2014 Apr 22; 6(4): 183760.
3. Rumlová M, Křížová I, Keprová A, Hadravová R, Doležal M, Strohalmová K, et al. HIV-1 protease-induced apoptosis. *Retrovirology*. 2014 May 20; 11:37.
4. de Azevêdo Silva J, Monteiro Fernandes K, Três Pancotto JA, Sotero Fragoso T, Donadi EA, Crovella S, Sandrin-Garcia P. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2013; 22: 1110.
5. Laplana M, Sánchez-de-la-Torre M, Puig T, Caruz A, Fibla J. Vitamin-D pathway genes and HIV-1 disease progression in injection drug users. *Gene*. 2014 Jul 15; 545(1):163-9.
6. Kamen DL, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med (Berl)*. 2010; 88:441-50.
7. Monticielo OA, Teixeira TDM, Chies JAB, Brenol JCT, Xavier RM. Vitamin D and polymorphisms of VDR gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical rheumatology*. 2012; 31:1411-21.
8. de Azevedo Silva J. Polimorfismos de base única (SNPs) dos genes LIG4, RAD52, VDR E IFIH1 e a susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico e suas manifestações clínicas. [tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2012.
9. Nieto G, Barber Y, Rubio MC, Rubio M, Fibla J. Association between AIDS disease progression rates and the Fok-I polymorphism of the VDR gene in a cohort of HIV-1 seropositive patients. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 May; 89-90(1-5):199-207.
10. Li YC, Chen Y, Liu W, Thadhani R. MicroRNA-mediated mechanism of vitamin D regulation of innate immune response. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014 Oct;144 Pt A:81-6.

11. Joseph RW, Bayraktar UD, Kim TK, St John LS, Popat U, Khalili J, Molldrem JJ, Wieder ED, Komanduri KV. Vitamin D receptor upregulation in alloreactive human T cells. *Hum Immunol*. 2012 Jul;73(7):693-8.
12. Fabre-Mersseman V, Tubiana R, Papagno L, Bayard C, Briceno O, Fastenackels S, Dudoit Y, Rostane H, Salmon D, Costagliola D, Caby F, Sauce D, Viard JP, Appay V. Vitamin D supplementation is associated with reduced immune activation levels in HIV-1-infected patients on suppressive antiretroviral therapy. *AIDS*. 2014 Nov 28; 28(18):2677-82.
13. García-Martín E, Agúndez JA, Maestro ML, Suárez A, Vidaurreta M, Martínez C, Fernández-Pérez C, Ortega L, Ladero JM. Influence of vitamin D-related gene polymorphisms (CYP27B and VDR) on the response to interferon/ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *PLoS One*. 2013 Sep 20; 8(9):e74764.
14. Rashedi J, Asgharzadeh M, Moaddab SR, Sahebi L, Khalili M, Mazani M, Abdolalizadeh J. Vitamin d receptor gene polymorphism and vitamin d plasma concentration: correlation with susceptibility to tuberculosis. *Adv Pharm Bull*. 2014 Dec; 4(Suppl 2):607-11.
15. Carvalho C, Marinho A, Leal B, Bettencourt A, Boleixa D, Almeida I, Farinha F, Costa PP, Vasconcelos C, Silva BM . Association between vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus in Portuguese patients. *Lupus*. 2015 Feb 6.
16. De Azevêdo Silva J, Guimarães RL, Brandão LA, Araujo J, Segat L, Crovella S, Sandrin-Garcia P. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and age onset in type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity*. 2013 Sep;46(6):382-7.
17. Ribeiro AFC, Serakides R, Nunes VA, Da Silva CM, Ocarino NM. A Osteoporose e os Distúrbios Endócrinos da Tireóide e das Gônadas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. Junho 2003; 47(3).
18. Di Rosa M, Malaguarnera G, De Gregorio C, Palumbo M, Nunnari G, Malaguarnera L. Immuno-modulatory effects of vitamin D3 in human monocyte and macrophages. *Cell Immunol*. 2012 Nov; 280(1):36-43.
19. Kumar A, Abbas W, Herbein G. HIV-1 latency in monocytes/macrophages. *Viruses*. 2014 Apr 22; 6(4): 1837-60.
20. Rokx C, Verbon A, Rijnders BJ. Lipids and Cardiovascular Risk After Switching HIV-1 Patients on Nevirapine and Emtricitabine/Tenofovir-DF to Rilpivirine/Emtricitabine/Tenofovir-DF. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015 Jan 27.
21. da Cunha J, Maselli LMF, Stern ACB, Spada C, Bydlowski SP. Impact of antiretroviral therapy on lipid metabolism of human immunodeficiency virus-infected patients: Old and new drugs. *World J Virol* 2015 May 12; 4(2): 56-77.
22. Cozzolino M, Vidal M, Arcidiacono MV, Tebas P, Yarasheski KE, Dusso AS. HIV-protease inhibitors impair vitamin D bioactivation to 1,25-dihydroxyvitamin D. *AIDS*. 2003 Mar 7; 17(4):513-20.

23. Rusconi RE, De Cosmi V, Gianluca G, Giavoli C, Agostoni C. Vitamin D insufficiency in obese children and relation with lipid profile. *Int J Food Sci Nutr*. 2015 Feb 6:1-3.

Tabela 1. Perfil clínico/epidemiológico de 107 pacientes HIV-1+ no Recife e Região Metropolitana

PERFIL CLÍNICO/EPIDEMIOLOGICO		PACENTES HIV-1+	
		n (%)	X±S‡
Gênero	Masculino	37 (34,58%)	
	Feminino	70 (65,42%)	
Etnia	Parda	49 (45,79%)	
	Negra	34 (31,77%)	
	Branca	23 (21,49%)	
Idade			38,45 (8,73)
Peso			63,27 (13,67)
Sucesso Terapêutico		95 (88,78%)	
Falha Terapêutica		12 (11,21%)	
Sucesso Imunológico		93 (86,91%)	
Falha Imunológica		14 (13,08%)	

‡Média ± Desvio padrão

Tabela 2. Frequências genotípicas dos SNPs associadas às manifestações clínicas e epidemiológicas dos pacientes HIV-1+

		SUCESSO IMUNOLÓGICO		FALHA IMUNOLÓGICA		p-value	OR† (95% CI†)		SUCESSO VIROLÓGICO		FALHA VIROLÓGICA		p-value	OR† (95% CI†)
		n	Freq.	n	Freq.*				n	Freq.*	n	Freq.		
rs3890733	C	119	0,64	20	0,71			C	123	0,65	16	0,73		
	T	67	0,36	8	0,29			T	67	0,35	6	0,27		
	CC	52	0,56	7	0,5	0,037	2,97 (0,87-10,19)	CC	52	0,55	7	0,64	0,836	0,78 (0,15-4,1)
	CT	15	0,16	6	0,43	0,15	0,29 (0,03-2,45)	CT	19	0,2	2	0,18	0,912	0,62 (0,12-3,2)
	TT	26	0,28	1	0,07	0,418	0,71 (0,3-1,7)	TT	24	0,25	2	0,18	0,846	0,69 (0,26-1,84)
rs4760648	C	83	0,45	16	0,57			C	85	0,45	12	0,55		
	T	103	0,55	12	0,43			T	105	0,55	10	0,45		
	CC	21	0,23	4	0,29	0,355	1,02	CC	20	0,21	4	0,36	0,512	0,44
	CT	41	0,44	8	0,57	0,766	0,34 (0,06-2,02)	CT	45	0,47	4	0,36	0,487	0,50 (0,1-2,48)
	TT	31	0,33	2	0,14	0,426	0,6 (0,27-1,55)	TT	30	0,32	3	0,27	0,651	0,67 (0,28-1,64)
rs1540339	C	133	0,72	18	0,64			C	135	0,71	15	0,68		
	T	53	0,28	10	0,36			T	55	0,29	7	0,32		
	CC	47	0,51	7	0,5	0,216	0,69	CC	49	0,52	5	0,45	0,914	1,32
	CT	39	0,42	4	0,29	0,808	2,88 (0,6-13,81)	CT	37	0,39	5	0,45	0,932	1,09 (0,11-10,45)
	TT	7	0,08	3	0,21	0,374	1,39 (0,6-3,22)	TT	9	0,09	1	0,09	0,605	1,15 (0,44-2,96)
rs2248098	A	86	0,46	15	0,54			A	90	0,47	9	0,41		
	G	100	0,54	13	0,46			G	100	0,53	13	0,59		
	AA	21	0,23	5	0,36	0,54	0,48	AA	24	0,25	1	0,09	0,38	4
	AG	44	0,47	5	0,36	0,46	0,60 (0,14-2,51)	AG	42	0,44	7	0,64	0,341	2,48 (0,24-25,44)
	GG	28	0,3	4	0,29	0,734	0,75 (0,34-1,65)	GG	29	0,31	3	0,27	0,79	1,30 (0,53-3,19)
rs2228570	A	53	0,28	8	0,29			A	55	0,29	6	0,27		
	G	133	0,72	20	0,71			G	135	0,71	16	0,73		
	AA	9	0,1	0	0	0,254		AA	9	0,09	0	0	0,426	
	AG	35	0,38	8	0,57	0,368		AG	37	0,39	6	0,55	0,536	
	GG	49	0,53	6	0,43	0,671	1 (0,41-2,4)	GG	49	0,52	5	0,45	0,775	1,09 (0,4-2,92)
rs11568820	C	98	0,53	17	0,61			C	102	0,54	11	0,5		
	T	88	0,47	11	0,39			T	88	0,46	11	0,5		
	CC	27	0,29	5	0,36	0,713	0,86	CC	28	0,29	3	0,27	0,927	1,01
	CT	44	0,47	7	0,5	0,935	0,49 (0,09-2,78)	CT	46	0,48	5	0,45	0,715	1,33 (0,24-7,28)
	TT	22	0,24	2	0,14	0,683	0,72 (0,32-1,62)	TT	21	0,22	3	0,27	0,917	1,16 (0,48-2,8)

*Frequência, †Odds ratio, ‡Intervalo de confiança

Tabela 3. Associações genotípicas entre rs1540339 do VDR e o gênero de pacientes HIV-1+

Genótipos	Gênero	Falha Terapêutica	Sucesso Terapêutico	p-value	OR‡ (95% CI§)
		N	n		
C/C	Feminino	1	34	0,04	1
	Masculino	4	14		0,08 (0,01-0,97)
	Feminino	3	23	1	1
C/T	Masculino	2	12		2,14 (0,18-25,98)
	Feminino	1	6		1
T/T	Masculino	0	2		

‡Odds ratio, §Intervalo de confiança

6. Conclusões

- Na população estudada, os SNPs no gene VDR estão associados a respostas terapêuticas e imunológicas em pacientes sob Terapia Antirretroviral indicando a importância desse receptor em infecções por HIV-1;
- Variáveis clínicas e epidemiológicas avaliadas neste estudo, tais como gênero e peso, podem influenciar as respostas dos pacientes à TARV;
- Este trabalho é o primeiro a descrever a combinação de SNPs no gene VDR na infecção por HIV-1 relacionando-a com a resposta do paciente à TARV.

Referências

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 592p.

AGUILAR-JIMÉNEZ, W.; ZAPATA, W.; CARUZ, A.; RUGELES, M.T. High Transcript Levels of Vitamin D Receptor Are Correlated with Higher mRNA Expression of Human Beta Defensins and IL-10 in Mucosa of HIV-1-Exposed Seronegative Individuals. **Plos one**. 8:12-e82717, 2013.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO HIV.AIDS. Brasília: Ministério da Saúde, Ano II - n. 01, dez. 2013. 68 p.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO HIV.AIDS. Brasília: Ministério da Saúde, Ano III, n. 01, dez. 2014. 84 p.

COELHO, A.V.C.; BRANDÃO, L.A.C.; GUIMARÃES, R.L.; LOUREIRO, P.; DE LIMA FILHO, J.L.; ALENCAR, L.C.A. et al. Mannose Binding Lectin and Mannose Binding Lectin-Associated Serine Protease-2 Genes Polymorphisms in Human T-Lymphotropic Virus Infection. **Journal of Medical Virology**. 9999:1–7, 2013.

COELHO, A.V.C.; SILVA, S.P.S.; ALENCAR, L.C.A.; STOCCO, G.; CROVELLA, S.; BRANDÃO, L.A.C. et al. ABCB1 and ABCC1 Variants Associated With Virological Failure of First-Line Protease Inhibitors Antiretroviral Regimens in Northeast Brazil Patients. **The Journal of Clinical Pharmacology**. 1–8, 2013.

COZZOLINO, M.; VIDAL, M.; ARCIDIACONO, M.V.; TEBAS, P.; YARASHESKI, K.E.; DUSSO, A.S. HIV-protease inhibitors impair vitamin D bioactivation to 1,25-dihydroxyvitamin D. **AIDS**. 17(4):513-20, 2003.

CRESSEY, T.R.; LALLEMANT, M. Pharmacogenetics of antiretroviral drugs for the treatment of HIV-infected patients: an update. **Infect Genet Evol**. 7:333-342, 2007.

DE AZEVÊDO SILVA, J.; MONTEIRO FERNANDES, K.; TRÉS PANCOTTO, J.A.; SOTERO FRAGOSO, T.; DONADI, E.A.; CROVELLA, S. et al. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus clinical manifestations. **Lupus**. 22(11):1110-7, 2013.

DE AZEVÊDO SILVA, J.; GUIMARÃES, R.L.; BRANDÃO, L.A.C.; ARAUJO, J.; SEGAT, L.; CROVELLA, S. et al. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and age onset in type 1 diabetes mellitus. **Autoimmunity**. 46(6):382-7, 2013.

DOITSH, G.; CAVROIS, M.; LASSEN, K.G.; ZEPEDA, O.; YANG, Z.; SANTIAGO, M.L. et al. Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue. **Cell**. 143, 789–801, 2010.

FABRE-MERSSEMAN, V.; TUBIANA, R.; PAPAGNO, L.; BAYARD, C.; BRICENO, O.; FASTENACKELS, S. et al. Vitamin D supplementation is associated with reduced immune activation levels in HIV-1-infected patients on suppressive antiretroviral therapy. **AIDS**. 28(18):2677-82, 2014.

FANALES-BELASIO, E.; RAIMONDO, M.; SULIGOI, B.; BUTTO, S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. **Ann Ist Super Sanita**. 46:5-14, 2010.

FRAIETTA, J.A.; MUELLER, Y.M.; YANG, G.; BOESTEANU, A.C.; GRACIAS, D.T.; DO, D.H. et al. Type I Interferon Upregulates Bak and Contributes to T Cell Loss during Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. **PLOS Pathog**. 9:10, 2013.

GARG, H.; MOHL, J.; JOSHI, A. HIV-1 Induced bystander apoptosis. **Viruses**. 4: 3020-3043, 2012.

GLOBAL AIDS RESPONSE, PROGRESS REPORTING, NARRATIVE REPORT. Brasil: Ministério da Saúde, 2014. 76 p.

GROPPELLI, E.; STARLING, S.; JOLLY, C. Contact-induced mitochondria polarization supports HIV-1 virological synapse formation. **J Virol.** 89(1):14-24, 2015.

HAN, S.; LI, T.; ELLIS, E.; STROM, S.; CHIANG, J.Y. A novel bile acid-activated vitamin D receptor signaling in human hepatocytes. **Mol Endocrinol.** 24(6):1151-64, 2010.

HEGEDUS, A.; WILLIAMSON, M. K.; HUTHOFF, H. HIV-1 pathogenicity and virion production are dependent on the metabolic phenotype of activated CD4⁺ T cells. **Retrovirology.** 11:98, 2014.

HERBEIN, G.; GRAS, G.; KHAN, K.A.; ABBAS W. Macrophage signaling in HIV-1 infection. **Retrovirology.** 7:34, 2010.

JAMISON, D.T.; BREMAN, J.G.; MEASHAM, A.R. et al. **Disease control priorities in developing countries.** 2^a Ed. Washington (DC): World Bank, 2006.

KAMEN, D. L.; TANGPRICHA, V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. **J Mol Med (Berl).** 88:441-50, 2010.

KUMAR, A.; ABBAS, W.; HERBEIN, G. HIV-1 latency in monocytes/macrophages. **Viruses.** Apr 22; 6(4): 1837-60, 2014.

LAFORGE, M.; CAMPILLO-GIMENEZ, L.; MONCEAUX, V.; CUMONT, M.C.; HURTREL, B.; CORBEIL, J. et al. Infection Primes Monocytes and Dendritic Cells for Apoptosis. **PLOS Pathog.** 7:6, 2011.

LAPLANA, M.; SÁNCHEZ-DE-LA-TORRE, M.; PUIG, T.; CARUZ, A.; FIBLA, J. Vitamin-D pathway genes and HIV-1 disease progression in injection drug users. **Gene.** 545(1):163-9, 2014.

MBITA, Z.; HULL, R.; DLAMINI, Z. Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) – mediated apoptosis: new therapeutic targets. **Viruses.** 6(8): 3181-227, 2014.

MICHAUD, V.; BAR-MAGEN, T.; TURGEON, J.; FLOCKHART, D.; DESTA, Z.; WAINBERG, M.A. The Dual Role of Pharmacogenetics in HIV Treatment: Mutations and Polymorphisms Regulating Antiretroviral Drug Resistance and Disposition. **Pharmacol Rev.** 64:803– 833, 2012.

MONROE, K.M.; YANG, Z.; JOHNSON, J.R.; GENG, X.; DOITSH, G.; KROGAN, N.J. et al. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. **Science.** 343(6169):428-32, 2014.

MONTICIELO, O.A.; TEIXEIRA, T. DE M.; CHIES, J.A.; BRENOL, J.C.; XAVIER, R.M. Vitamin D and polymorphisms of VDR gene in patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical rheumatology.** 31:1411-21, 2012.

MOODLEY, A.; QIN, M.; SINGH, K.K.; STEPHEN A. Spector. Vitamin D Related Host Genetic Variants Alter HIV Disease Progression in Children. **Pediatr Infect Dis J.** 32(11), 2013.

NASI, M.; RIVA, A.; BORGHI, V.; D'AMICO, R.; DEL GIOVANE, C.; CASOLI, C. et al. Novel genetic association of TNF- α -238 and PDCD1-7209 polymorphisms with long-term non-progressive HIV-1 infection. **Int J Infect Dis.** 17(10): e845-50, 2013.

PRESS RELEASE. Geneva: UNAIDS, 2014. 4p.

PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA MANEJO DA INFECÇÃO PELO HIV EM ADULTOS. Brasília: Ministério da saúde, 2013. 216 p.

RUAN, L.; ZHU, J.G.; PAN, C.; HUA, X.; YUAN, D.B.; LI, Z.M. et al. Association between Single Nucleotide Polymorphism of Vitamin D Receptor Gene FokI Polymorphism and Clinical Progress of Benign Prostatic Hyperplasia. **ScientificWorldJournal.** 2015:235895, 2015.

SILVA, J.A. **Polimorfismos de base única (SNPs) dos genes LIG4, RAD52, VDR E IFIH1 e a susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico e suas manifestações clínicas**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2012.

TANG, M.W.; SHAFER, R.W. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. **Drugs**. 72(9):e1-25, 2012.

VELLA, S.; SCHWARTLÄNDER, B.; SOW, S.P.; EHOLIE, S.P.; MURPHY, R.L. The history of antiretroviral therapy and of its implementation in resource-limited areas of the world. **AIDS**. 26:1231-1241, 2012.

YANG, L.; MA, J.; ZHANG, X.; FAN, Y.; WANG, L. Protective role of the vitamin D receptor. **Cell Immunol**. 279(2):160-6, 2012.

WANG, Y.; ZHU, J.; DELUCA, H.F. Where is the vitamin D receptor? Archives of biochemistry and biophysics. **Elsevier** Inc.; 2012,1:123–33.

ANEXO A - Formulário A1 – Recrutamento: Coleta de dados clínicos

Pesquisador responsável

Antonio Victor Campos Coelho
Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade
Universitária, Recife, PE. CEP: 50670-901.
Telefone: 2101-2542
avccbio@gmail.com

Comitê de Ética em Pesquisa

Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista, Recife, PE.
CEP: 50070-550.
Telefone: 2122-4756
comitedeetica@imip.org.br

Convidamos você a participar da pesquisa que estamos realizando sobre diferenças genéticas envolvidas no resultado final da terapia contra o HIV.

Em algumas pessoas o remédio contra o HIV não tem o efeito esperado, que é impedir que o vírus se multiplique. Outras pessoas apresentam efeitos não esperados (adversos) durante o tratamento.

Estamos fazendo essa pesquisa para tentar descobrir se as pessoas que não respondem bem ao tratamento apresentam diferenças genéticas que expliquem porque isso acontece. Essa pesquisa terá como benefício a geração de conhecimento que poderá contribuir para que, no futuro, os médicos melhorem os tratamentos contra o HIV. No fim da pesquisa, você receberá um protocolo resumindo os resultados do trabalho.

Com sua autorização, gostaríamos de utilizar uma pequena quantidade do seu sangue (um total de 4 mL) que será colhido hoje nos exames de rotina de acompanhamento do seu tratamento. Pedimos também a sua autorização para usar na pesquisa dados como idade, sexo e resultados dos seus últimos exames.

Informamos que você não sofrerá prejuízo algum. Os riscos que você poderá sofrer são apenas sintomas provocados pela coleta do sangue, como vermelhidão e dor no braço no local da coleta. Além disso, todas as suas informações pessoais estarão seguras. Nenhuma pessoa fora da pesquisa terá acesso a elas.

Você não terá nenhum problema caso não queira participar ou desistir dessa pesquisa. Asseguramos que você vai continuar a receber o mesmo atendimento que sempre recebeu neste hospital. Caso você tenha alguma dúvida, por favor, entre em contato com os responsáveis pela pesquisa.

Eu, _____ (nome completo) compreendi as informações repassadas e autorizo que seja realizada a avaliação genética a partir da amostra de sangue coletada, e concordo que os dados obtidos sejam utilizados para pesquisa. Declaro que fui informado(a) pela equipe do pesquisador sobre os objetivos do e estou consciente de que:

1. Concordei em participar da pesquisa sem nenhum tipo de pressão;
2. Posso a qualquer momento entrar em contato por telefone com o pesquisador se tiver dúvida sobre a pesquisa;
3. Posso a qualquer momento desistir da pesquisa e não vou ter problemas no atendimento do hospital por causa disso;
4. O pesquisador poderá ter acesso ao meu prontuário e que minhas informações pessoais serão mantidas em sigilo;
5. Recebi uma cópia deste documento.

Data de Nascimento	Nº da Identidade	Nº do Prontuário
Assinatura do Voluntário		
Assinatura da Testemunha	Assinatura da Testemunha	
Assinatura do Pesquisador Responsável		

FORMULÁRIO A1 – RECRUTAMENTO: COLETA DE DADOS CLÍNICOS

1. Dados pessoais (apenas para identificação, NÃO serão divulgados)

Nome do Paciente				
Data de Nascimento	Naturalidade	Cidade de residência	Sexo	
			M ()	F ()

2. Informações clínicas e epidemiológicas

Etnia (segundo classificação do IBGE)		Escolaridade (anos)	Renda mensal (reais)
() Branca	() Indígena		
() Negra	() Amarela		
() Parda	() Ignorado		
Peso (kg)		Altura (m)	
Fumo		Etilismo	
SIM ()		SIM ()	
Se SIM, quantos cigarros por dia? _____		Se SIM, quantas un. por semana? _____	
NÃO ()		NÃO ()	
Se NÃO, parou de fumar? SIM () NÃO ()		Se NÃO, parou de beber? SIM () NÃO ()	
Comorbidades pré-existentes			
Desordem Psiquiátricas	SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()
Doença autoimune	SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()
Doença cardiovascular	SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()
Diabetes	SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()
Doença renal	SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()
Doença de fígado	SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()
Osteoporose	SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()
Se SIM, houve fratura?	SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()
Local da fratura:			

3. Infecção pelo HIV

Modo de transmissão (marcar todos que se apliquem)			
() Transmissão vertical		() Relação sexual heterossexual	
() Relação sexual homossexual		() Transfusão sanguínea	
() Durante tratamento para hemofilia		() Acidente com material biológico	
() Uso de drogas injetáveis		() IGNORADO	
Idade de Início da vida sexual		O paciente é usuário de drogas?	
		SIM () Qual? _____	NÃO ()
Possui parceiro(a) fixo(a)?			
SIM ()		NÃO (SOLTEIRO(A)) ()	
		MÚLTIPLOS PARCEIROS(AS) ()	
Se respondeu sim à questão anterior, o(a) parceiro(a) é infectado pelo HIV?			
SIM ()		NÃO ()	
		IGNORADO ()	

4. Infecção pelo HIV (continuação)

Se a paciente for mulher, ela está atualmente grávida?				
SIM ()		Mês de gestação: _____ NÃO ()		
O(a) paciente tem filhos?				
Nº	Idade	Sexo	Tipo de parto	Status de HIV
1		M () F ()	normal () cesariana ()	POS () NEG ()
2		M () F ()	normal () cesariana ()	POS () NEG ()
3		M () F ()	normal () cesariana ()	POS () NEG ()
4		M () F ()	normal () cesariana ()	POS () NEG ()
5		M () F ()	normal () cesariana ()	POS () NEG ()

5. Perspectivas do paciente acerca do acompanhamento médico

O paciente concorda com a seguinte frase: "Posso ter uma vida normal se for acompanhado(a) pelo médico e seguir suas orientações"?			
SIM ()		NÃO ()	
PREFERE NÃO OPINAR ()			
Como o paciente considera a consultas médica?			
Importante ()	Indiferente ()	Sem importância ()	PREFERE NÃO OPINAR ()
O que o paciente acha do atendimento no hospital?			
Bom ()	Regular ()	Ruim ()	PREFERE NÃO OPINAR ()
Com relação às consultas, o quão frequentemente o paciente falta a elas?			
Muitas vezes ()	Algumas Vezes ()	Nunca ()	PREFERE NÃO OPINAR ()
Considerando as condições financeiras, de transporte, de trabalho, dentre outras, do paciente, como ele(ela) diria o quão fácil é chegar no hospital?			
Fácil ()	Normal ()	Difícil ()	PREFERE NÃO OPINAR ()
Considerando as visitas anteriores ao hospital, o(a) paciente estaria disposto(a) a continuar o tratamento no hospital, ou seja, voltaria nas próximas consultas?			
SIM ()		NÃO ()	
PREFERE NÃO OPINAR ()			