

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**POLIMORFISMO *IGF-2/APAI* EM GESTANTES
PORTADORAS DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA
HUMANA TIPO 1 USUÁRIAS DE ANTIRETROVIRAIS**

Alessandra Cristina Marcolin

RIBEIRÃO PRETO

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALESSANDRA CRISTINA MARCOLIN

**POLIMORFISMO *IGF-2/APAI* EM GESTANTES
PORTADORAS DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA
HUMANA TIPO 1 USUÁRIAS DE ANTIRETROVIRAIS**

Dissertação de Doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Medicina

Área de Concentração: Tocoginecologia

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Duarte

RIBEIRÃO PRETO

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Marcolin, Alessandra Cristina

Polimorfismo *IGF-2/Apa1* em gestantes portadoras do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 usuárias de antiretrovirais. Ribeirão Preto, 2008.

124p.: il; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia.

Orientador: Duarte, Geraldo.

1. Gestação, 2. HIV-1, 3. IGF-2, 4. Antiretrovirais, 5. Hiperglicemia.

“A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós.”

Marcel Proust

"O sábio envergonha-se dos seus defeitos, mas não se envergonha de corrigi-los."

Confúcio

ESTE TRABALHO É DEDICADO A:

ANGELO E REGINA

Meus amados pais

Meus maiores exemplos de dedicação, honestidade,
amor incansável e confiança

Devo a vocês o que sou e todas as minhas conquistas.

ANDRÉA E ANGELO JÚNIOR

Meus adorados irmãos

Pelo carinho a mim dedicado e pela compreensão nas minhas ausências

Vocês são meu estímulo para continuar

AOS GÊMEOS

Que ainda nem chegaram, mas já são tão amados.

Às **pacientes** e aos **seus filhos**, sem os quais este trabalho não seria possível.

Agradeço a compreensão, a confiança e o exemplo de superação.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. **GERALDO DUARTE**

Meu orientador

Meu exemplo de amor ao trabalho, de dedicação e seriedade.

Ensinou-me a ter responsabilidade pelos meus atos médicos e a não temer o que não compreendo, considerando prioridade o bem-estar da paciente.

Obrigada pela orientação durante a realização deste trabalho e pela confiança.

AGRADECIMENTOS

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, em especial ao Setor de Gestação de Alto Risco por me proporcionar ambiente agradável para o exercício do meu grande amor, a Obstetrícia.

Ao **Prof. Dr. Antônio Alberto Nogueira**, pela disponibilidade e constante apoio com que sempre me recebeu, como coordenador da pós-graduação da Ginecologia e Obstetrícia.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Pereira da Cunha**, por me mostrar o amor pela Obstetrícia e por me auxiliar, com muita paciência e dedicação, no projeto para o Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP.

À **Prof. Dra. Silvana Maria Quintana**, pela companhia agradável diária, por me ajudar nos momentos difíceis, como amiga e como mestre. Obrigada pelo auxílio no término desta tese, sendo membro da banca examinadora.

Ao **Prof. Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli**, pela amizade demonstrada diariamente, ao longo de muitos anos, e pela colaboração na realização deste trabalho como membro da banca do exame de qualificação.

À **Prof. Dra. Ester Silveira Ramos**, por ter confiado em mim como pesquisadora, por ter aberto as portas de seu laboratório, por todo investimento financeiro e ensinamentos em biologia molecular. Obrigada por acreditar nesta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Aderson Tadeu Berezowski**, pelos ensinamentos diários, pela amizade e incentivo importantes para meu crescimento profissional.

À **Prof. Dra. Maria Célia Mendes**, pela amizade sempre disponível, interesse e apoio nos momentos difíceis.

Aos **demais docentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia**, pelo constante incentivo e disponibilidade, auxiliando na minha formação científica.

Aos Professores **Dr. José Antonio Simões** (UNICAMP) e **Dr. José Carlos Peraçoli** (UNESP-Botucatu), pela atenção e pelas valiosas sugestões realizadas para o término deste trabalho, como membros da banca examinadora.

À amiga e pós-graduanda **Francielle Marques Araújo**, sem a ajuda da qual este trabalho não teria sido terminado. Obrigada pela sua disposição em me ajudar, pela paciência e dedicação.

À amiga **Patrícia El Beitune**, pela confiança em mim depositada para a continuação de um trabalho iniciado com tanto cuidado e disciplina.

Às amigas **Laura Ferreira Santana, Carla Vitola Gonçalves, Thaís de Oliveira Gozzo, Flávia Corrêa Meziara, Viviane Fernandes Schiavon, Lauriane Gisele Abreu e Lúcia Alves da Silva Lara**, por terem confiado, me apoiado nos momentos difíceis e acreditado nos meus sonhos e ideais.

Aos colegas **pós-graduandos**, por compartilharem as soluções dos problemas, tornando as dificuldades mais amenas.

Aos meus colegas médico-assistentes, em especial aos Doutores **Davina Helena Vieira Borges, Rafael Kioshi Yano, Elaine Christine Dantas Moisés, Conrado Milani Coutinho, Hermes de Freitas Barbosa e Francisco Magário**, companheiros da vida obstétrica diária, por serem compreensivos nos momentos difíceis.

Às funcionárias (enfermeiras e auxiliares de enfermagem) do Centro Obstétrico do HCFMRP-USP, pela amizade inestimável que surgiu durante os anos de convívio neste setor e pela ajuda na coleta do material deste trabalho.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia Ilza Alves Rezende Mazzocato, Rosane Aparecida Cunha Casula, Reinaldo Vicente Tavares, Ricardo José da Silva, pela valiosa colaboração e amizade.

Às funcionárias do Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP (Corredor 2), pela disponibilidade e ajuda na coleta do material deste trabalho, nas tardes de terça-feira.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico (SAME) e do Arquivo Semi-Ativo (ASA) pelo auxílio no levantamento dos prontuários médicos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro, na forma de Bolsa do Programa de Doutorado no Brasil com Estágio no Exterior - PDEE.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 A INFECÇÃO PELO HIV-1	18
1.2 AS DROGAS ANTIRETROVIRAIS E SEUS EFEITOS	19
1.3 ASPECTOS GENÉTICOS DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	25
1.4 SISTEMA DOS FATORES DE CRESCIMENTO SEMELHANTES À INSULINA ..	26
1.4.1 ESTRUTURA DO <i>IGF-2</i> E FUNÇÃO BIOLÓGICA DO IGF-II.....	28
1.4.2 <i>IGF-2</i> E O PÂNCREAS	29
1.5 <i>IMPRINTING</i> GENÔMICO	30
2. OBJETIVOS	35
3. PACIENTES E MÉTODOS	37
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	38
3.2 MODELO DO ESTUDO	38
3.3 SELEÇÃO DAS PACIENTES.....	38
3.4 DROGAS ANTIRETROVIRAIS.....	40
3.5 MÉTODOS.....	41
3.5.1 EXTRAÇÃO DO DNA	41
3.5.2 QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	41
3.5.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	42
3.5.4 POLIMORFISMO <i>IGF-2/APAI</i>	42
3.5.5 GEL DE AGAROSE	43
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43

4. RESULTADOS	47
4.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO	48
4.2 POLIMORFISMO <i>IGF-2/APAI</i>	49
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
8. ANEXOS	86
SUMMARY	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
3TC	Lamivudina
AGAR	Ambulatório de Gestação de Alto Risco
AMIGO	Ambulatório de Moléstias Infecto-Contagiosas em Ginecologia e Obstetrícia
APRN	Ambulatório de Pré-Natal Normal
ARV	Antiretrovirais
ASC	�rea sob a curva
AZT	Zidovudina
CTCF	Proteínas sensíveis � metilação
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMG	<i>Diabetes mellitus</i> gestacional
DMR	Regiões de DNA diferentemente metiladas
DNA	�cido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleot�deo trifosfato
DO	Densidade �ptica
EDTA	�cido etilenodiaminotetraacético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
H19	Gene supressor tumoral
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HCl	�cido clorídrico
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1
HNF-1�	Fator nuclear dos hepatócitos 1�

HNF-4 α	Fator nuclear dos hepatócitos 4 α
HNF-1 β	Fator nuclear dos hepatócitos 1 β
ICR	Regiões controladoras de <i>imprinting</i>
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (gene)
IGF-2	Fator de crescimento semelhante à insulina 2 (gene)
IGFBP	Proteína ligante do fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (proteína)
IGF-II	Fator de crescimento semelhante à insulina 2 (proteína)
IGF-IIR	Receptor do IGF-II
IGF-IR	Receptor do IGF-I
INNTR	Inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa
INTR	Inibidor nucleosídico da transcriptase reversa
IP	Inibidores da protease
IR	Receptor de insulina
IR/IGF-IR	Receptor híbrido insulina /IGF-IR
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ml	Mililitro
M	Molar
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NFV	Nelfinavir
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pb	Pares de bases

RFLP	Polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TBE	Tris/borato EDTA (tampão)
TT	Terapia tríplice
UV	Ultravioleta
U	Unidade
µg	Microgramas
µl	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Quadro 1 - Agentes antiretrovirais utilizados no tratamento da infecção pelo HIV-1 e na profilaxia da transmissão vertical	21
Figura 1 - Componentes do sistema IGF	27
Figura 2 - Modelo de regulação da expressão monoalélica dos genes <i>IGF-2</i> e <i>H19</i> no cromossomo 11p15.5	33
Figura 3 - Produto de PCR do <i>IGF-2</i> . Amplificação de fragmentos de 236 pb	45
Figura 4 - Genotipagem por meio do RFLP <i>IGF-2/ApaI</i>	46
Figura 5 - Distribuição dos genótipos do <i>IGF-2</i> no grupo de gestantes normais	53
Figura 6 - Distribuição dos genótipos do <i>IGF-2</i> no grupo de gestantes soropositivas para o HIV-1	53
Figura 7 - Distribuição dos genótipos do <i>IGF-2</i> no grupo de gestantes com DMG	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das características das gestantes segundo os grupos estudados.....	51
Tabela 2 - Frequências genótípicas para o <i>IGF-2</i> na população total	52
Tabela 3 - Análise das frequências genótípicas para o <i>IGF-2</i> considerando os três grupos estudados, o tratamento antiretroviral e a cor das pacientes	54
Tabela 4 - Análise das frequências genótípicas nas amostras estudadas após reagrupamento dos genótipos	55
Tabela 5 - Frequências gênicas nos três grupos estudados.....	56

RESUMO

Introdução: Estudos avaliando os efeitos dos antiretrovirais (ARV) em pacientes portadoras do HIV-1 têm demonstrado a ocorrência de hiperglicemia e intolerância à glicose secundárias à resistência insulínica ou até quadros semelhantes ao *Diabetes mellitus* tipo 1. Por outro lado, algumas publicações mencionam o efeito dos distúrbios da expressão dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) na função da célula β pancreática em humanos. Polimorfismos do *IGF-2/ApaI* têm sido associados à obesidade e à distúrbios do metabolismo da glicose.

Objetivos: Estudar o polimorfismo *IGF-2/ApaI* em gestantes portadoras do HIV-1 usuárias de ARV que desenvolveram hiperglicemia ao longo do período gestacional e identificar os subgrupos de pacientes que estão sob maior risco de desenvolverem esse distúrbio.

Métodos: Estudo de coorte histórica com controle externo envolvendo 87 gestantes normais, 43 gestantes portadoras do HIV-1 usuárias de ARV que apresentaram acréscimo dos valores da Área sob a Curva das glicemias ao longo da gravidez e 43 pacientes diabéticas gestacionais, soronegativas para o HIV-1. A reação em cadeia da polimerase foi utilizada para amplificação da seqüência do *IGF-2*, a partir do DNA genômico extraído do sangue periférico. Para avaliação do polimorfismo *IGF-2/ApaI* foi utilizada a técnica do polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição. Para análise estatística foram utilizados o teste de *Kolmogorov-Smirnov*, o teste *ANOVA* e o teste do Qui-quadrado.

Resultados: Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências genótípicas obtidas nos três grupos analisados. Considerando a terapêutica ARV utilizada, não há diferenças na distribuição dos genótipos entre o grupo de usuárias de Zidovudina e o da terapia tríplice. Não foram detectadas diferenças entre as frequências gênicas das populações examinadas neste estudo. Pacientes não brancas têm maior probabilidade de apresentarem o genótipo GG quando comparadas às gestantes brancas.

Conclusões: Os resultados obtidos contribuem para o melhor entendimento das alterações do metabolismo glicídico em gestantes submetidas à terapia ARV, desonerando o polimorfismo *IGF-2/ApaI* como único responsável por essas alterações. Esses dados sinalizam positivamente que outras variáveis devem ser estudadas para a elucidação dessas anormalidades.

Palavras-chave: gestação, HIV-1, *IGF-2*, antiretrovirais, hiperglicemia.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A INFECCÃO PELO HIV-1

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) foi reconhecida como entidade clínica em 1981, apresentando estreita correlação com a homossexualidade masculina e uso de drogas ilícitas endovenosas (GOTTLIEB et al., 1981). Seu agente etiológico, o Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1), foi isolado na França em 1983 (BARRÉ SINOUSI et al., 1983). Desde então, a história natural desta infecção tem sofrido notáveis transformações ao longo dos últimos 25 anos.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, a crescente prevalência da SIDA qualifica-a como a principal pandemia dos tempos modernos, sendo que mais de 70% das infecções pelo HIV-1 decorre da transmissão heterossexual. Avaliando a evolução cronológica das taxas de prevalência de SIDA entre as mulheres, verifica-se incremento do número de casos neste segmento populacional (MS, 2006; WHO, 2006).

No mundo, mais de dois milhões de mulheres infectadas pelo HIV-1 engravidam a cada ano, especialmente nos países em desenvolvimento (MCINTYRE, 2003). Visto que o aumento da prevalência da infecção pelo HIV-1 verificou-se entre mulheres em idade reprodutiva é lógico o aumento do número de casos de transmissão vertical desse vírus, resultando em 2,3 milhões de crianças infectadas (UNAIDS, 2006). No Brasil, estima-se que a prevalência de gestantes infectadas pelo HIV-1 seja de 0,4%, o que corresponde a 12.635 gestante-parturientes portadoras do HIV/ano (MS, 2006).

O HIV-1 pode ser transmitido de uma mulher infectada para seu feto ou recém-nascido durante a gravidez, parto e durante o período puerperal através da amamentação, com a maioria dos casos ocorrendo no período periparto (DUNN et al., 1992; MOFENSON, 1995; MOCK et al., 1999; COLL et al., 2002). Sem qualquer intervenção, a transmissão vertical do

HIV-1 é de 15% a 25% entre portadoras do vírus que não amamentam e de 25% a 45% entre aquelas que amamentam (JOHN-STEWART et al., 2004).

O risco da transmissão vertical do HIV-1 pode ser reduzido para cifras inferiores a 2% por meio de intervenções, tais como a administração de drogas antiretrovirais (ARV) durante o período gestacional e no trabalho de parto, a realização de cesárea eletiva (antes do início do trabalho de parto e da ruptura de membranas amnióticas em uma gestação a termo) e a contra-indicação da amamentação. Além disso, o fornecimento de terapêutica ARV ao recém-nascido, nas suas primeiras semanas de vida, tem papel relevante (INTERNATIONAL PERINATAL HIV GROUP, 1999; EUROPEAN MODE OF DELIVERY COLLABORATION, 1999; MINKOFF, 2003; EUROPEAN COLLABORATIVE GROUP, 2005). Com essas intervenções, casos novos de crianças infectadas têm se tornado raros em muitas partes do mundo.

1.2 AS DROGAS ANTIRETROVIRAIS E SEUS EFEITOS

O primeiro ensaio clínico de um agente ARV administrado a gestantes infectadas pelo HIV-1, avaliando sua segurança, tolerância e eficácia na proteção da transmissão vertical do HIV-1, foi publicado em 1994 pelo *Pediatric AIDS Clinical Trials Groups 076* (PACTG 076). Este trabalho mostrou que a administração de Zidovudina (AZT) a gestantes durante o pré-natal e o trabalho de parto, acrescida do uso deste ARV ao recém-nascido, reduziu a transmissão vertical do vírus em 67,5% (CONNOR et al., 1994; CDC, 1995).

Os avanços obtidos a partir do entendimento da patogênese da transmissão perinatal do HIV-1 e sua redução com o uso do AZT estimularam o estudo de novas drogas com potente ação ARV, que pudessem ser utilizadas com segurança no período gestacional. No entanto, informações sobre doses, farmacocinética e efeitos colaterais desses fármacos se

inovam constantemente, originando inúmeros trabalhos na literatura (SCOTT & TUOMALA, 1998; CDC, 2002; CDC, 2005; EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY 2005; TUOMALA et al., 2005).

Além do AZT, um inibidor nucleosídico da transcriptase reversa (INTR), vários esquemas terapêuticos são utilizados para gestantes, incluindo os inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa (INNTR) e inibidores da protease (IP), com vasto apoio na literatura. Ensaios clínicos demonstram que esquemas terapêuticos que empregam a associação dessas drogas possuem potente ação contra o HIV-1, reduzindo significativamente a carga viral materna e conseqüentemente o risco de transmissão vertical (MINKOFF & AUGENBRAUN, 1997; CARPENTER *et al.*, 1998; EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY, 2003; CDC, 2005; TUOMALA et al., 2005; READ et al., 2007). Por outro lado, os riscos decorrentes do uso dos ARV fazem com que utilizemos estes fármacos com cautela, lembrando que grande parte deles pertence à categoria “C”, segundo a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América (Quadro 1).

Quadro 1. Agentes antiretrovirais utilizados no tratamento da infecção pelo HIV-1 e na profilaxia da transmissão vertical

Classe	Agente	Outros Nomes	Passagem Placenta [Taxa de droga RN / mãe]	Estudo Carcinogenético	Estudo Teratogênico	Categoria Gestacional *FDA
Inibidores Nucleosídicos da Transcriptase Reversa	Zidovudina	AZT	Em humanos [0,85]	Positivo (roedores, tumores epiteliais vaginais não invasivos)	Positivo (roedores, se dose letal)	C
	Zalcitabina	ddC	Em macacos [0,30-0,50]	Positivo (roedores, linfomas de timo)	Positivo (roedores, em altas doses, hidrocefalia)	C
	Didanosina	ddI	Em humanos [0,5]	Negativo	Negativo	B
	Stavudina	d4T	Em macacos [0,76]	Positivo (roedores, tumor de fígado e bexiga)	Negativo (porém reduz a calcificação esternal em roedores)	C
	Lamivudina	3TC	Em humanos [~1,0]	Negativo	Negativo	C
	Abacavir	ABC	Em ratos	Positivo (roedores, tumor de fígado, tireóide, clitóris e prepúcio)	Positivo (roedores, anasarca e malformações esqueléticas)	C
	Tenofovir	TDF	Em humanos [0,95 - 0,99]	Positivo (roedores fêmeas, adenoma hepático)	Negativo (osteomalácia em animais jovens)	B
	Emtricitabine	FTC	Em ratos e coelhos [0,4 - 0,5]	Negativo	Negativo	B
Inibidores Não Nucleosídicos da Transcriptase Reversa	Nevirapina	NVP	Em humanos [~1,0]	Positivo (roedores, tumores hepáticos)	Negativo	B
	Delavirdina	DLV	NA	Positivo (roedores, tumores hepáticos e vesicais)	Positivo (roedores, defeito de septo ventricular)	C
	Efavirenz	EFZ	Em macacos, ratos, coelhos [~1,0]	Positivo (roedores, tumores hepáticos e adenomas pulmonares)	Positivo (macacos, anencefalia, anoftalmia e microftalmia)	D

Quadro 1. Agentes antiretrovirais utilizados no tratamento da infecção pelo HIV-1 e na profilaxia da transmissão vertical – Continuação

Classe	Agente	Outros Nomes	Passagem Placenta [Taxa de droga RN / mãe]	Estudo Carcinogênico	Estudo Teratogênico	Categoria Gestacional *FDA
Inibidores de Protease	Indinavir	IDV	Mínima em humanos	Positivo (ratos, adenomas de tireóide)	Negativo (porém, costela supranumerária em roedores)	C
	Ritonavir	RTV	Mínima em humanos	Positivo (ratos, tumores hepáticos)	Negativo (porém, criptorquidia em roedores)	B
	Saquinavir	SQV	Mínima em humanos	Negativo	Negativo	B
	Nelfinavir	NFV	Variável em humanos	Positivo (ratos, tumores de tireóide)	Negativo	B
	Amprenavir	APV	Variável em humanos	Positivo (roedores, tumores hepáticos)	Negativo (porém, ossificação deficiente e alongamento tímico em ratos e coelhos)	C
	Lopinavir/ Ritonavir	LPV/RTV	Em humanos [0,20 ± 0,13]	Positivo (roedores, tumores hepáticos)	Negativo (ossificação incompleta em ratos, em doses tóxicas maternas)	C
	Atazanavir	ATV	Variável em humanos	Positivo (roedores, adenomas hepáticos)	Negativo	B
	Fosamprenavir	FPV	NA	Positivo (roedores, tumores hepáticos)	Negativo	C
	Darunavir	DRV	NA	Incompleto	Negativo	B
	Tipranavir	TPV	NA	Incompleto	Negativo (ossificação incompleta em ratos, em doses tóxicas maternas)	C

Quadro 1. Agentes antiretrovirais utilizados no tratamento da infecção do HIV-1 e na profilaxia da transmissão vertical – Continuação

Classe	Agente	Outros Nomes	Passagem Placenta [Taxa de droga RN / mãe]	Estudo Carcinogênico	Estudo Teratogênico	Categoria Gestacional *FDA
Inibidores do fuso	Enfuvirtide	ENF	NA	Não realizado	Negativo	B
	Maraviroc		NA	Negativo	Negativo	B
Inibidores da integrase	Raltegravir	RGV	Em ratos [1,5 - 2,5] Em coelhos [0,02]	Incompleto	Negativo (porém, costela supranumerária em ratos)	C

(Modificado de U.S. Public Health Service Task Force, CDC 2007)

*** Classificação dos agentes antiretrovirais pela *Food and Drug Administration* (FDA)**

As classificações do *Food and Drug Administration* (FDA) são baseadas nas informações disponíveis quanto ao risco para o feto, balanceado quanto ao potencial benefício da droga para o paciente.

Categoria A: Estudos controlados não demonstram riscos;

Categoria B: Sem evidências de risco em humanos; Estudos em animais não demonstram riscos ou estudos em animais demonstram riscos, porém estudos em humanos não demonstram;

Categoria C: Risco não pode ser definido pela falta de estudos, porém, potencial benefício pode justificar seu uso, apesar do risco;

Categoria D: Evidência positiva de risco para o feto. Em algumas circunstâncias o benefício do uso pode justificar o risco;

Categoria X: Contra-indicado na gravidez. O risco fetal claramente contra-indica o uso.

Efeitos adversos conseqüentes ao uso dos esquemas ARV, durante a gestação, estão bem estabelecidos na literatura mundial. Como efeitos maternos observam-se anemia, elevação das transaminases hepáticas, sintomas gastrintestinais, pancreatite, alterações dermatológicas, nefrolitíase, desordens associadas à toxicidade mitocondrial (neuropatia, miopatia, cardiopatia e acidose láctica), intolerância à glicose e *Diabetes mellitus* (MARTIN *et al.*, 1997; LORENZI *et al.*, 1998; MINKOFF, 2003; EL BEITUNE, 2004; TUOMALA *et al.*,

2005; TIMMERMANS et al., 2005; CDC, 2005). Como efeitos fetais e/ou neonatais observam-se, entre outros, a prematuridade, anemia, má-formações fetais, hepatite, hipoinsulinemia neonatal, toxicidade mitocondrial e convulsões (CDC, 2002; LANDREAU-MASCARO et al., 2002; EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY, 2003; EL BEITUNE et al., 2005; MUSSI-PINHATA et al., 2007).

Destaque deve ser dado à resistência periférica à insulina e ao *Diabetes mellitus* (DM), intercorrente em uma proporção significativa de gestantes usuárias de ARV. Estudos avaliando os efeitos dos IP, em pacientes não gestantes portadores do HIV-1, demonstram resistência periférica insulínica, hiperglicemia, DM e casos de cetoacidose diabética. HADIGAN et al. (2001) demonstraram que a positividade pelo HIV-1 confere aumento de 3,1 vezes no risco de DM. Segundo o *Adult Aids Clinical Trial Group* (AACTG, 2003), até 40% dos pacientes portadores do HIV-1, em uso de regimes terapêuticos ARV, desenvolverão intolerância à glicose secundária à resistência insulínica.

O primeiro relato sobre a associação entre o uso de ARV por indivíduos infectados pelo HIV-1 e o desenvolvimento de hiperglicemia é de 1997 (MURRAY & LUMPKIN, 1997). Vários são os fatores que influenciam a ocorrência de distúrbios na homeostase da glicose em um indivíduo. Em pacientes portadores do HIV-1, existem fatores adicionais, tais como: o processo inflamatório produzido pela infecção, o efeito tóxico do ARV sobre o pâncreas e os efeitos dos ARV relacionados à lipodistrofia (CARR *et al*, 1998; BEHRENS et al., 1999; MULLIGAN et al., 2000; EL BEITUNE et al., 2005; TUOMALA et al., 2005; SHIKUMA et al., 2007).

Os regimes ARV contendo IP podem ocasionar intolerância à glicose por dois mecanismos: pela indução periférica de resistência à insulina no músculo esquelético e tecido adiposo, e pela incapacidade das células β pancreáticas de produzirem mais insulina para compensar o aumento da resistência periférica (WOERLE et al., 2003). Portanto, na maior parte dos casos, a intolerância à glicose em pacientes usuários de ARV cursa com

hiperinsulinemia, semelhante ao DM tipo 2 (CARR et al., 1998; MURATA et al., 2000; HUI, 2003; TUOMALA et al., 2005, SHIKUMA et al., 2007). Em outras situações, os IP causam insulinopenia, semelhante aos quadros de DM tipo 1. Alguns estudos demonstram que a infecção pelo HIV-1, independente do uso de qualquer ARV, está associada com dano pancreático em até 50% dos pacientes (GRINSPOON & BILEZIKIAN, 1992).

Estudos experimentais mostram que a maioria dos ARV reduz a tolerância à glicose por dois possíveis mecanismos: comprometem a secreção e ação da insulina ou exercem toxicidade direta sobre as células β pancreáticas, culminando com morte destas células, insulinopenia e hiperglicemia (FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2004). Além disso, cumpre destacar a contribuição dos IP na inibição da conversão da proinsulina em insulina levando a insulinopenia (BEHRENS et al., 1999; WOERLE et al., 2003).

1.3 ASPECTOS GENÉTICOS DO *DIABETES MELLITUS*

Os aspectos genéticos do DM são estudados há várias décadas com o objetivo de se descobrir o padrão de herança envolvido na sua complexa etiologia. A destruição auto-imune das células β pancreáticas está associada à predisposição genética, porém também se relaciona a fatores ambientais mal definidos (KIM & POLYCHRONAKOS, 2005). Por outro lado, a grande maioria dos pacientes com DM possui formas da doença relacionadas à obesidade e à secreção de insulina defeituosa, insuficiente para compensar a resistência periférica ao hormônio. Nestes casos, não há destruição das células β pancreáticas e os mesmos estão associados a vários defeitos genéticos, como: mutações no gene do fator nuclear dos hepatócitos 1α (*HNF-1 α*) localizado no cromossomo 12, mutações no gene da glucoquinase no cromossomo 7, mutações no gene *HNF-4 α* , *HNF-1 β* , do fator promotor da insulina 1, do NeuroD1 e mutações no DNA mitocondrial (YAMAGATA et al., 1996; SLINGERLAND, 2006).

Anormalidades genéticas que determinam incapacidade de conversão da proinsulina em insulina já foram identificadas em algumas famílias, assim como a existência de moléculas mutantes de insulina, ambas as alterações ligadas à herança autossômica dominante. Os distúrbios metabólicos também podem se associar a mutações no gene do receptor de insulina e a mutações nos genes que codificam os vários componentes celulares protéicos que coordenam as complexas vias de resposta à insulina após a ligação deste hormônio ao seu receptor, tais como os substratos do receptor de insulina (JAFFIOL et al., 1999; SESTI et al., 2001; OKAMOTO & ACCILI, 2003; WHITE, 2006; THIRONE et al., 2006). Merece ainda destaque o efeito dos distúrbios da expressão dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) na função da célula β pancreática em humanos, que têm sido associados com predisposição à obesidade e a distúrbios característicos de síndromes metabólicas, tais como: resistência periférica à insulina, distúrbios da secreção de insulina e aumento de gordura visceral e subcutânea (O'DELL et al., 1997; GAUNT et al., 2001; UKKOLA et al., 2001; GOMES et al., 2005). Polimorfismos do gene do fator de crescimento semelhante à insulina 2 (*IGF-2*) podem estar associados à secreção alterada da insulina (O'DELL et al., 1999; UKKOLA et al., 2001; 'T HART et al., 2004).

1.4 SISTEMA DOS FATORES DE CRESCIMENTO SEMELHANTES À INSULINA

Em 1957, SALMON & DAUGHADAY sugeriram que as ações do hormônio de crescimento eram mediadas por outras substâncias plasmáticas, o que determinou a descoberta dos IGF. O sistema desses fatores de crescimento consiste em um grupo heterogêneo de polipeptídios relacionados entre si, que inclui três ligantes [insulina, fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-I) e o fator de crescimento semelhante à insulina 2 (IGF-II)], pelo menos 4 receptores [receptor de insulina (IR), receptor do IGF-I (IGF-IR),

receptor do IGF-II (IGF-IIR) e um receptor híbrido insulina/IGF-IR (IR/IGF-IR)] e 6 proteínas ligantes (IGFBP 1 - 6) que modulam a atividade biológica dos IGFs, regulando seu transporte e biodisponibilidade em diferentes tecidos (figura 1). Ainda fazendo parte deste sistema, existem diversas proteases específicas que clivam as proteínas ligantes, convertendo-as em formas com baixa ou nenhuma afinidade pelos fatores de crescimento (O'DELL & DAY, 1998; MONZAVI & COHEN, 2002; RANDHAWA & COHEN, 2005).

Os IGF estão amplamente distribuídos em diferentes órgãos e tecidos mediando ou influenciando inúmeras funções fisiológicas. Em nível celular podem atuar como fatores de crescimento autócrinos e parácrinos, controlando a mitose, a morte celular programada (apoptose), a diferenciação, os fenômenos de quimiotaxia e regulação metabólica (HAWKES & KAR, 2004). Portanto, essas substâncias são importantes no crescimento e desenvolvimento pré e pós-natal, podendo estar associadas com vários estados patológicos que se estabelecem na infância, adolescência e vida adulta, como aterosclerose, diabetes e neoplasias (FRYSTYK, 2004; RANDHAWA & COHEN, 2005).

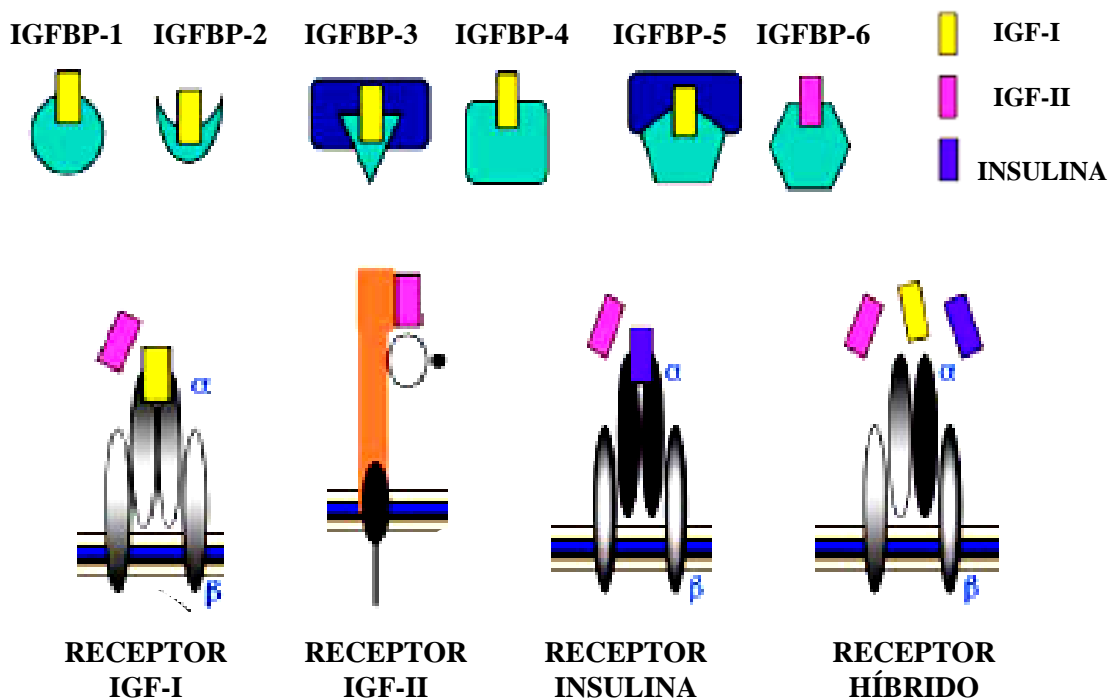


Figura 1. Componentes do sistema IGF (Adaptado de RANDHAWA & COHEN, 2005).

1.4.1 ESTRUTURA DO *IGF-2* E FUNÇÃO BIOLÓGICA DO IGF-II

O gene *IGF-2* está localizado no cromossomo 11p15 (muito próximo ao gene da insulina) e possui 30 Kb de extensão, nove *exons* e quatro promotores (BRISSENDEN et al., 1984). A transcrição dos *exons* 7, 8 e 9 produz um polipeptídeo com 180 aminoácidos (pré-proIGF-II), que é proteoliticamente clivado e dá origem ao IGF-II plasmático maduro de 67 aminoácidos, de estrutura homóloga a da insulina e a do IGF-I (NIELSEN, 1992). A importância dessa semelhança está no fato de que o IGF-II pode se ligar ao receptor da insulina (fracamente) e ao IGF-IR, desempenhando funções parecidas com as de seus homólogos. A ligação do IGF-II a esses receptores estimula a atividade tirosina quinase intrínseca a eles, dando início a uma cascata de fosforilações enzimáticas que resultam em inúmeros efeitos biológicos locais (órgãos-específicos) e sistêmicos. A ligação do IGF-II ao seu receptor provoca a internalização dessa proteína, bem como sua degradação (O'DELL & DAY, 1998).

O melhor entendimento das funções biológicas do IGF-II é proveniente de resultados de estudos animais e deleções gênicas. Uma série admirável de estudos, baseados em deleções de genes que expressam componentes do sistema IGF, foi realizada por EFSTRATIADIS et al. na década de 90. Camundongos com deleção do *IGF-1* ou *IGF-2* têm descendentes com redução de 40% do peso ao nascimento, quando comparados à animais normais e, os que manifestam deleção do *IGF-2* têm placentas menores. Animais que apresentam deleção conjunta do *IGF-1* e *IGF-2* exibem restrição de crescimento adicional de 80% (DECHIARA et al., 1990).

Estudos considerando deleção do gene do IGF-IR mostram animais com 55% de redução do peso ao nascimento e hipoplasia generalizada de órgãos. Camundongos com dupla deleção dos genes dos IGF-I/IGF-IR não mostram redução acentuada do peso, reafirmando

que a função do IGF-I se faz via IGF-IR (LIU et al., 1993). Ainda, animais com associação da deleção do *IGF-2* e do gene do IGF-IR exibem restrição de crescimento maior que aqueles com deleção do gene do IGF-IR, sugerindo que o IGF-II exerce suas funções por meio de outro receptor (LUDWIG et al., 1996).

1.4.2 IGF-2 E O PÂNCREAS

Durante o período pré-natal, a diferenciação e maturação das células β pancreáticas dependem da interação dos IGF, tais como o IGF-I e IGF-II e seus receptores. Na vida adulta, o IGF-II influencia o crescimento e desenvolvimento dessas células, agindo na replicação, renovação e apoptose celular (BONNER-WEIR, 2000). Desequilíbrios entre a renovação e apoptose das células β , conseqüentes a níveis plasmáticos alterados de IGF-II, são de grande importância para o aparecimento de intolerância à glicose, principalmente por alterações no número dessas células e defeitos na secreção de insulina (KIM & ACCILI, 2002).

A variação do nível plasmático do IGF-II em adultos é determinada geneticamente e polimorfismos do seu gene já foram associados a distúrbios do metabolismo glicídico. O processo pelo qual o IGF-II e outros fatores de crescimento regulam a capacidade final de secreção de insulina pelas células β pancreáticas é determinado pela expressão genética desses fatores. Além disso, os genes podem operar provocando mudanças na susceptibilidade de um estado patológico. Um gene alterado ou a existência de polimorfismo aumenta o risco de desenvolvimento de uma característica, mas pode não ser suficiente para o desenvolvimento da doença (O'DELL et al., 1999; VAN HAEFTEN & TWICKLER, 2004).

SERRADAS et al. (2002) mostraram que ratos Goto-Kakizaki, linhagem utilizada para estudos de DM, sintetizam uma molécula defeituosa de IGF-II que pode ser a causa do desenvolvimento insuficiente das células β pancreáticas. Em humanos, um número limitado

de estudos explorou as possíveis associações entre níveis plasmáticos de IGF-II e secreção de insulina e poucos investigaram o polimorfismo *IGF-2/ApaI* e a secreção de insulina.

Destaque deve ser dado ao estudo de UKKOLA et al. (2001), que procurou demonstrar a relação entre os polimorfismos do gene *IGF-1* e *IGF-2* e as alterações metabólicas subseqüentes a um período de superalimentação. Os resultados obtidos mostraram redução da sensibilidade à insulina em indivíduos com *IGF-2/ApaI* GG. Por outro lado, os resultados obtidos por 'T HART et al. (2004), avaliando indivíduos caucasianos normais e intolerantes à glicose, não mostraram diferenças significativas com relação aos níveis de glicose e insulina, obtidos durante o GTT 75 g, considerando os diferentes genótipos *IGF-2/ApaI*. Porém, houve tendência a uma segunda fase de secreção de insulina diminuída em homozigotos GG.

Assim, o estudo do polimorfismo *IGF-2/ApaI* poderia ajudar na definição de subgrupos populacionais, nos quais medidas preventivas e novas abordagens terapêuticas poderiam promover melhoras na homeostase da glicose.

1.5 IMPRINTING GENÔMICO

Modulações herdadas da expressão gênica que não alteram a seqüência do DNA (mecanismos epigenéticos) desempenham papel relevante em um grande número de doenças, incluindo síndromes complexas, doenças multifatoriais e neoplasias (WALTER & PAULSEN, 2003).

Em mamíferos, os genomas materno e paterno são necessários para um adequado desenvolvimento pré e pós-natal. Conseqüentemente, a maioria dos genes possui um padrão de expressão bi-alélica, com exceção de certos *loci* onde a transcrição é estritamente dependente da sua origem parental. Esta alternativa, nomeada *imprinting* genômico, é uma

forma epigenética de regulação gênica que permite a expressão controlada de apenas um alelo parental: a cópia materna ou paterna (WALTER & PAULSEN, 2003; ARNEY, 2003). As duas cópias parentais do gene fornecem informação genética igual, porém o não silenciamento de um alelo pré-determina que qualquer função relacionada a ele seja agora dependente desta simples cópia ativa (MURPHY & JIRTLE, 2003).

O processo de *imprinting* é reversível, ou seja, as modificações alelo-específicas são reiniciadas em cada geração para refletir o sexo dos pais. O alelo “silenciado” pode ser reativado na linhagem germinativa de um dos pais do sexo oposto e o gene ativado é silenciado. Este padrão de “marcação” é mantido nas células somáticas do novo organismo (REIK & WALTER, 2001; WEKSBERG et al., 2003).

DECHIARA et al. (1991) demonstraram que a transmissão do alelo paterno mutado do *IGF-2* resultava em camundongos descendentes com restrição de crescimento. Por outro lado, quando o *IGF-2* mutado era de origem materna, o descendente era fenotipicamente normal. Os autores concluíram que os diferentes fenótipos dependiam do tipo de gameta que contribuía com o alelo mutado e que, em vista disso, o *IGF-2* estava sujeito ao *imprinting* genômico parental.

Embora o processo de *imprinting* genômico não esteja completamente elucidado, sabe-se que envolve alguns mecanismos de regulação da expressão gênica: modificações das histonas por meio de acetilações, fosforilações e metilações de resíduos de aminoácidos, metilação diferencial do DNA, silenciamento gênico mediado por RNA, diferenças no tempo de replicação, ação de proteínas (CTCF) sensíveis a metilação (*methylation-dependent sensitive insulators*) que previnem a interação entre elementos regulatórios e proteínas do grupo Polycomb e Trithorax (DELAVAL & FEIL, 2004; SANTOS-REBOUÇAS & PIMENTEL, 2007).

A metilação do DNA, ou seja, a adição de um grupo metil a uma base citosina dos dinucleotídeos CpG representa importante mecanismo de aquisição e transferência de *imprinting* genômico. A presença de regiões diferentemente metiladas (DMR), áreas onde o grau de metilação difere entre os alelos parentais, são encontradas na vizinhança dos genes que sofrem *imprinting* e representam regiões controladoras de *imprinting* (ICR) (WRZESKA & REJDUCH, 2004).

Genes que sofrem *imprinting* raramente são encontrados isolados, sendo que cerca de 80% deles estão organizados em grupos (*clusters*). O *IGF-2* faz parte de um grande grupo de genes que sofrem *imprinting* no cromossomo 11p15.5 humano. Muitos autores sugerem que os genes pertencentes a essa região estão divididos em dois domínios distintos, regulados por duas ICR, separadas por uma região de alelos que não sofrem *imprinting* (PAULSEN et al., 1998; WEKSBERG et al., 2003). O *IGF-2* encontra-se no domínio 1 em íntima relação com outro gene, o *H19*, havendo diferenças com relação à origem parental do alelo que sofre *imprinting*: o alelo materno para o *IGF-2* e o alelo paterno para o *H19* (DECHIARA et al., 1991; BARTOLOMEI et al., 1991).

O modelo de regulação da expressão dos genes *IGF-2* e *H19* é aquele em que o silenciamento transcricional gênico é mediado por proteínas CTCF (BELL & FELSENFELD, 2000). Neste modelo, entre o *IGF-2* e o *H19* existe uma DMR que adquire metilação no cromossomo de origem paterna, processo este que se estende ao promotor do *H19*, provocando seu silenciamento. No cromossomo de origem materna, ocorre a ligação de uma proteína CTCF à DMR hipometilada. Conseqüentemente, forma-se uma barreira entre o promotor do *IGF-2* e os *enhancers* (regiões do DNA que estimulam a transcrição) localizados distalmente ao *H19*, tornando a expressão do *IGF-2* impossível. Conforme esse modelo, a CTCF não pode se ligar à DMR metilada do cromossomo paterno, sendo possível a estimulação do promotor do *IGF-2* pelos *enhancers* e, conseqüentemente, sua expressão (figura 2).

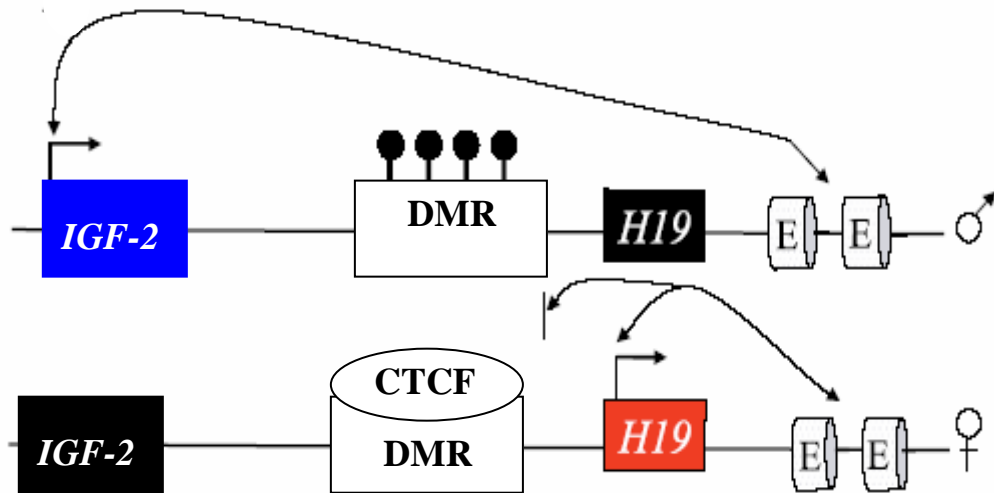


Figura 2. Modelo de regulação da expressão monoalélica dos genes *IGF-2* e *H19* no cromossomo 11p15. 5 (Adaptado de WOOD & OAKEY, 2006).

Resumindo, alguns estudos avaliando os efeitos das drogas ARV em pacientes portadoras do HIV-1 têm demonstrado a ocorrência de hiperglicemia e intolerância à glicose secundária à resistência insulínica ou ao hipoinsulinismo. Em 2004, EL BEITUNE mostrou, em sua tese, que tanto o grupo de gestantes soropositivas para o HIV-1 usuárias apenas de AZT como o grupo de pacientes usuárias de terapia tríplice (TT), ou seja, Zidovudina + Lamivudina + Nelfinavir apresentaram um acréscimo dos valores da Área sob a Curva (ASC) das glicemias, quando comparados ao grupo controle de pacientes normais. No entanto, no grupo TT a elevação dos valores da ASC das glicemias durante a gestação foi significativamente maior, principalmente entre 33-38 semanas de gestação. Além dos resultados relacionados à glicemia, EL BEITUNE observou que houve acréscimo da ASC dos valores de insulina nos três grupos estudados ao longo da gestação, independente da terapia ARV utilizada no grupo de soropositivas para o HIV-1. Porém, a comparação dos grupos demonstrou um acréscimo da ASC de insulina significativamente menor em pacientes usuárias de ARV quando comparadas às gestantes do grupo controle, mesmo antes da introdução de seu uso na gestação.

Por outro lado, encontram-se na literatura algumas publicações mencionando o efeito dos distúrbios da expressão dos fatores de crescimento semelhantes à insulina na função da célula β pancreática em humanos, levando a alterações do metabolismo glicídico. Assim, procurando-se elucidar algumas das alterações na homeostase da glicose em gestantes HIV-1 positivas usuárias de ARV, propõe-se estudar o polimorfismo o *IGF-2/ApaI* nas gestantes pertencentes à pesquisa de EL BEITUNE (2004).

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

PRINCIPAL: estudar o polimorfismo *IGF-2/ApaI* em gestantes portadoras do HIV-1 usuárias de ARV que desenvolveram hiperglicemia durante a gestação.

SECUNDÁRIO: identificar subgrupos de gestantes que estão sob maior risco de desenvolverem distúrbios na homeostase da glicose.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (processo HCRP nº 7240/2007), em sua 255ª reunião ordinária (ANEXO 1), para ser desenvolvida no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP em conjunto com o Departamento de Genética da FMRP-USP.

3.2 MODELO DO ESTUDO

Estudo de coorte histórica com controle externo.

3.3 SELEÇÃO DAS PACIENTES

Foram selecionadas 173 pacientes, que foram estratificadas em três grupos de estudo:

Grupo A: composto por 87 gestantes da população geral consideradas normais do ponto de vista clínico e laboratorial, seguidas no Ambulatório de Pré-Natal Normal (APRN) do HCFMRP-USP. Essas pacientes foram selecionadas do banco de dados constituído por ocasião do estudo intitulado “ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA REGIÃO 11p15.5 NA PRÉ-ECLÂMPSIA”, desenvolvido pela pesquisadora Francielle Marques Araújo e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (HCRP nº 4628/2004) em sua 180ª reunião ordinária, realizada em 24/05/2004 (ANEXO 2).

Não foram selecionadas pacientes que apresentaram:

- História familiar de DM;
- DM prévio a gestação;

- Qualquer doença intercorrente ou não do processo gestacional;
- Gestação múltipla;
- Obesidade (índice de massa corporal $> 30 \text{ Kg/m}^2$);
- Uso de drogas hiperglicemiantes (por exemplo, corticóides).

Grupo B: constituído por 43 gestantes portadoras do HIV-1 seguidas no Ambulatório de Moléstias Infecto-Contagiosas em Ginecologia e Obstetrícia (AMIGO) do HCFMRP-USP, usuárias de ARV e que desenvolveram hiperglicemia ao longo da gestação, segundo resultados obtidos e apresentados na tese intitulada “EFEITO DAS DROGAS ANTI-RETROVIRAIS SOBRE O METABOLISMO GLICÊMICO E LIPÍDICO EM GESTANTES PORTADORAS DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1”, desenvolvida pela pesquisadora Dra. Patrícia El Beitune e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (HCRP nº 6685/2001) em sua 119ª reunião ordinária, realizada em 05/11/2001 (ANEXO 3). Das pacientes selecionadas para este grupo, 17 eram usuárias apenas de AZT para profilaxia da transmissão vertical e 26 eram usuárias de TT (Zidovudina + Lamivudina e Nelfinavir) para tratamento.

Para estudo do polimorfismo *IGF-2/ApaI* foram utilizadas amostras de sangue colhidas por ocasião da pesquisa supracitada (EL BEITUNE, 2004), armazenadas em um banco de amostras que foi reconhecido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (HCRP nº 4865/2007), em sua 256ª reunião ordinária (ANEXO 4).

Não foram selecionadas pacientes que apresentaram:

- DM prévio a gestação;
- História familiar de DM;
- Uso incorreto dos ARV;
- Gestação múltipla;
- Obesidade (índice de massa corporal $> 30 \text{ Kg/m}^2$);
- Uso de drogas hiperglicemiantes (por exemplo, corticóides).

Grupo C: formado por 43 gestantes, soronegativas para o HIV-1, portadoras de *Diabetes mellitus Gestacional* (DMG), recrutadas no Ambulatório de Gestação de Alto Risco (AGAR) ou no Centro Obstétrico do HCFMRP-USP. O diagnóstico de DMG foi estabelecido por meio do teste oral de tolerância à glicose com 75 gramas de dextrose (GTT 75g) realizado no 2º trimestre gestacional. Foram consideradas diabéticas as gestantes que apresentaram glicemia de jejum ≥ 126 mg% e/ou glicemia de duas horas após 75g de dextrose ≥ 140 mg%. Destas pacientes foram coletados 10 ml de sangue periférico, em tubos estéreis contendo EDTA, pelo sistema *Vacutainer*, após esclarecimento sobre a pesquisa e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 5). Para esse grupo foi criado um banco de amostras sanguíneas, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (HCRP nº 5236/2007), em sua 255ª reunião ordinária. (ANEXO 6). Foram excluídas pacientes com outros processos patológicos além do DMG, aquelas com gestação múltipla ou usuárias de terapêutica hiperglicemiante. Não houve qualquer modificação dos critérios assistenciais existentes para essas pacientes em decorrência do presente projeto.

3.4 DROGAS ANTIRETROVIRAIS

As drogas antiretrovirais utilizadas pelas gestantes portadoras do HIV-1 foram: AZT – 600 mg/dia, Lamivudina (3TC) – 300 mg/dia e Nelfinavir (NFV): 2500 mg/dia, divididos em duas tomadas diárias. A prescrição dessas drogas levou em consideração: a idade gestacional de seu início, a contagem de linfócitos CD4, a quantificação da carga viral do HIV-1 e as condições de saúde da paciente, seguindo os critérios estabelecidos pelo *Perinatal HIV Guidelines Working Group Members* para tratamento de gestantes (2002) e pelo protocolo assistencial de gestantes portadoras do HIV-1 do AMIGO do HCFMRP-USP.

3.5 MÉTODOS

Para a realização do estudo do polimorfismo *IGF-2/ApaI* nas 173 pacientes selecionadas houve necessidade de extração de DNA a partir de amostras de sangue total.

3.5.1 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA foi extraído pelo método de extração e precipitação em NaCl (OLERUP & ZETTERQUIST, 1992, modificado). Ao volume de 1,0 ml de sangue total foram adicionados 450 µl de Solução de Lise gelada (Sacarose 0,32M, Tris HCl - pH 7,5 - 12 mM, MgCl₂ 5,0 M, Triton X 1,0%) em microtubos de 1,5 ml. Essas amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido até a obtenção de um *pellet* branco. O *pellet* foi ressuspendido em 80,0 µl de Tampão de Proteínas K (5X) - (NaCl 0,375 M, EDTA - pH 8,0 - 0,12 M), 8,0 µl de proteinase K (20 mg/ml), 10 µl de SDS a 20% e 280 µl de água destilada e incubado à 55° C *overnight*.

No dia seguinte, foram adicionados 120 µl de NaCl 5M à solução anterior e após agitação por 8 segundos a amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante resultante desta operação (400 µl) foi transferido para outro microtubo e o *pellet* foi descartado. Seguiu-se a adição de etanol absoluto à -20° e homogeneização e centrifugação do material por 10 minutos a 13.000 rpm (à 0° C). O novo sobrenadante foi descartado e o *pellet* restante desidratado. Houve novamente ressuspensão do *pellet* em 50 µl de água deionizada, obtendo-se o DNA pronto para os próximos passos.

3.5.2 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Foi realizada quantificação de DNA total por meio de espectrofotômetro. A Densidade Óptica (DO) de 260 nm forneceu a quantidade de DNA e a de 280 nm nos proporcionou a obtenção da quantidade de proteína. A relação entre DO 260/DO 280 sempre esteve abaixo de dois.

3.5.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) foi utilizada para amplificação da seqüência do gene estudado (*IGF-2*) a partir do DNA genômico extraído do sangue periférico. As condições da PCR foram padronizadas para cada par de *primers*.

As reações foram realizadas em um aparelho termociclador programável T-gradiente (Biometra), seguindo os protocolos recomendados pelos fabricantes e descritos por INNIS *et al.* (1990). Para o *IGF-2* foram utilizados *primers* específicos para amplificar o fragmento que contém o local do polimorfismo e está dentro de uma seqüência não-traduzida no *exon 9*: *primer sense* (5'- CTTGGACTTTGAGTCAAATTGG-3') e *antisense* (5'- CCTCCTTTGGTCTTACTGGG -3') descritos por TADOKORO *et al.* (1991). O produto da PCR do *IGF-2* é um fragmento amplificado de 236 pb (Figura 3). As condições das reações foram padronizadas para evitar amplificações inespecíficas.

O meio de reação da PCR foi constituído por KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Tris HCl (pH 8,4) 10 mM, dNTP (0,1 mM de cada nucleotídeo), *primer* 0,2 mM (de cada), Taq DNA Polimerase 1U, DNA genômico 0,1 µg. Durante a preparação do material para a PCR, foram tomados os devidos cuidados de assepsia para impedir a sua contaminação. O protocolo de amplificação para a seqüência do *IGF-2* constituiu-se de um ciclo de 94°C por 5 minutos, 60°C por 1 minuto e trinta segundos e 72°C por trinta segundos, seguido por 39 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto.

3.5.4 POLIMORFISMO *IGF-2/ApaI*

Para identificação do polimorfismo *IGF-2/ApaI* foi utilizada a técnica do polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP). Os produtos da PCR foram

submetidos à digestão enzimática por mais de 12 horas nas condições ótimas de restrição, à 37°C, com a enzima de restrição *ApaI* (20U) e o tampão recomendado pelo fabricante. A diferença dos alelos envolvidos em cada genótipo foi estabelecida pela presença ou não do sítio de restrição GGGCC/CC no fragmento amplificado, sítio este que é reconhecido e clivado pela enzima de restrição *ApaI*. Na ausência do sítio de restrição e, conseqüentemente, da digestão enzimática o fragmento gerado é de 236 pb (alelo A). Na presença do sítio de restrição são produzidos dois fragmentos, um de 173 pb (alelo G) e outro de 63 pb (o qual não é visualizado) e, quando presente em apenas um cromossomo (heterozigoto AG), são gerados três fragmentos, um de 236 pb, um de 173 pb e outro de 63 pb (Figura 4).

3.5.5 GEL DE AGAROSE

Após o término do processo de digestão enzimática do produto da PCR, os alelos foram diferenciados pelo padrão de migração eletroforética dos fragmentos de restrição em gel de agarose a 2%, utilizando-se TBE 1X (Tris-base 0,089 M, ácido bórico 0,089 M, EDTA 0,5 M - pH 8,0) como tampão de corrida e brometo de etídio como corante. A visualização dos fragmentos foi realizada por transiluminação (luz UV). Para documentação dos resultados foi utilizado o programa Kodak Digital Science – 1D Image Analysis Software.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Houve dificuldade para se fazer o cálculo do tamanho da amostra, uma vez que não há trabalhos semelhantes a este na literatura mundial. Portanto, a presente pesquisa pode ser considerada como um projeto piloto.

Após o término do trabalho de campo foi realizada a codificação dos dados, seguida por sua digitação no banco de dados criado no programa *Excel for Windows*. Os dados foram armazenados em três bancos: um para gestantes portadoras do HIV usuárias de drogas antiretrovirais, outro para gestantes consideradas normais e um terceiro para gestantes portadoras de DMG.

A seguir os dados foram transportados para o software *GraphPad Prism version 3.00 for Windows* (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia USA, www.graphpad.com), onde foi realizada a análise estatística.

Para verificar a homogeneidade entre os grupos da variável idade foi utilizado o teste não-paramétrico de *Kolmogorov-Smirnov* e para comparação desta variável entre os três grupos estudados foi utilizado teste *ANOVA* com pós-teste de *Newman-keuls*. Para comparação entre as variáveis qualitativas foi utilizado o teste do Qui-quadrado. O nível de significância adotado neste estudo foi de 5%.

M S S S S S S S S S S B

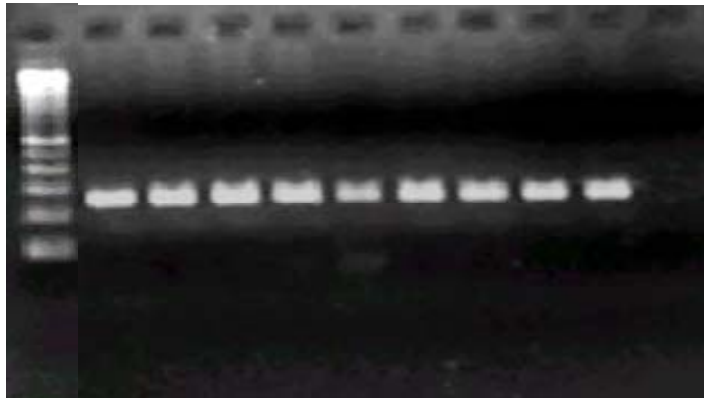


Figura 3. Produto de PCR do *IGF-2*. Amplificação de fragmentos de 236 pb. Note a ausência de amplificação em B. (**M**) marcador (padrão de pares de base), (**S**) fragmento amplificado, (**B**) branco, reação sem DNA.

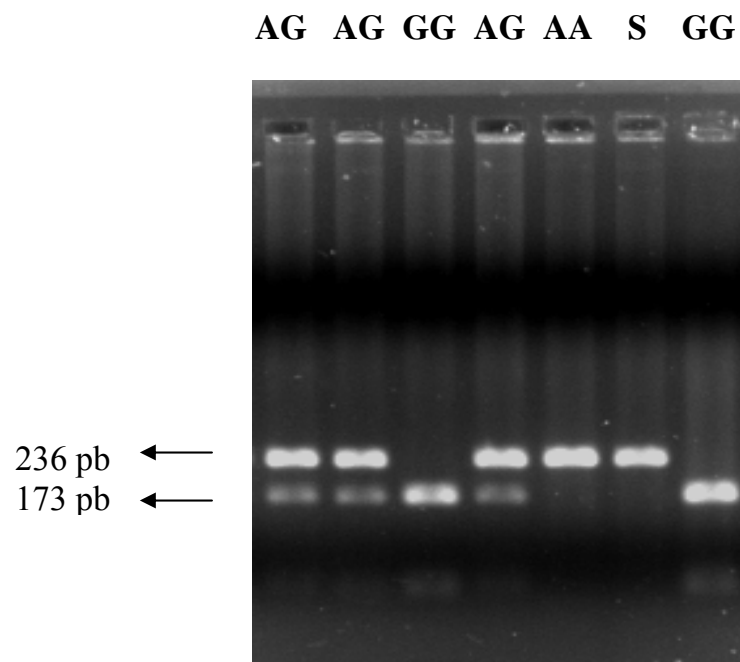


Figura 4. Genotipagem por meio do RFLP *IGF-2/ApaI*. (**A**) alelo A, (**G**) alelo G, (**S**) fragmento sem digestão, (**pb**) pares de bases.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO

Para a realização dessa pesquisa foram selecionadas 173 pacientes. Os dados demográficos referentes aos três grupos estudados encontram-se na tabela 1. A idade materna apresentou distribuição normal em todos os grupos analisados. No grupo de gestantes normais a idade materna média foi de $25,3 \pm 5,5$ anos (16 a 41 anos), no grupo das gestantes soropositivas para o HIV-1 a idade materna média foi de $26,4 \pm 5,6$ anos (17 a 43 anos) e nas gestantes diabéticas a idade materna média foi de $29,1 \pm 6,0$ anos (17 a 40 anos). A análise estatística desse dado demográfico mostrou diferenças significativas entre as idades das pacientes diabéticas quando comparadas às idades das pacientes pertencentes aos outros dois grupos ($p < 0,05$).

Com relação à cor da pele, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados, mostrando que as populações examinadas são homogêneas com relação a esta característica. Outras características demográficas que mostraram resultados interessantes foram aquelas relacionadas à história obstétrica. Analisando-se estatisticamente os dados da tabela 1, foram observadas diferenças na distribuição das pacientes dos grupos analisados, com relação ao número de gestações ($p=0,002$). Os resultados foram semelhantes para as pacientes normais e as gestantes diabéticas ($p=0,90$). Por outro lado, a grande maioria das pacientes soropositivas para o HIV-1 são multigestas, havendo diferença significativa entre estas e os dois outros grupos ($p < 0,01$). Com relação à paridade, foram observadas semelhanças na distribuição das pacientes nos três grupos analisados ($p=0,12$).

Com relação ao aborto clinicamente evidenciado, apesar de não existirem diferenças significativas entre os grupos ($p=0,08$), observou-se que quase metade das pacientes HIV-1 positivas já vivenciou pelo menos um aborto, ao contrário do que ocorreu com as gestantes dos dois outros grupos, que mais uma vez mostraram distribuições bastante homogêneas.

4.2 POLIMORFISMO *IGF-2/APAI*

Os dados referentes às frequências genotípicas da população estudada encontram-se na tabela 2 e figuras 5,6,7. A análise estatística dos três grupos estudados (gestantes normais, HIV-1 positivas e diabéticas) mostra que não existiram diferenças estatisticamente significativas entre as frequências genotípicas encontradas para estes grupos ($p=0,29$) (tabela 3).

Quando o grupo de pacientes soropositivas para o HIV-1 é estratificado de acordo com a terapêutica administrada, ou seja, usuárias de AZT ou usuárias de TT, também não existem diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p=0,75$). Logo, podemos inferir que a distribuição dos genótipos é bastante homogênea entre as pacientes HIV-1 positivo analisadas (tabela 3).

Quando comparamos a distribuição dos genótipos entre pacientes brancas e não brancas observamos que existe diferença significativa entre essas duas populações analisadas ($p=0,03$). Porém, deve-se ter cautela nessa avaliação, uma vez que o grupo de não brancas com genótipo AA é muito pequeno ($n=1$), o que pode gerar significância, mas o resultado pode não estar correto. Talvez seja mais prudente apenas dizer que pacientes não brancas têm maior probabilidade de apresentarem o genótipo GG (tabela 3).

Devido à reduzida frequência do homozigoto AA, as frequências genotípicas nas amostras estudadas foram reavaliadas reagrupando os genótipos encontrados em dois novos grupos (GG e AG + AA), o que permitiu novas análises (tabela 4). Não foram detectadas diferenças significativas entre as gestantes normais, soropositivas para o HIV-1 e as diabéticas gestacionais ($p=0,09$). Porém, ao se realizar a comparação entre o grupo de gestantes normais e o de soropositivas para o HIV-1 detectou-se nas pacientes portadoras do HIV-1 tendência maior em apresentar genótipos com o alelo A ($p=0,05$). O mesmo resultado foi obtido quando

se submeteu à análise os grupos de pacientes diabéticas e as soropositivas ($p=0,05$). A ausência de significância também é vista na comparação do grupo de usuárias de AZT com aquelas usuárias de TT, considerando os genótipos reagrupados ($p=0,58$).

Os dados sobre as frequências gênicas em cada grupo examinado estão apresentados na tabela 5. Avaliando-se as frequências gênicas, ou seja, as frequências do alelo G [$f(G)$] e as frequências do alelo A [$f(A)$], não foram detectadas diferenças significativas entre as três populações examinadas ($p=0,28$). Também não foram significativas as diferenças encontradas entre as frequências gênicas quando se avaliou a variável cor da pele ($p=0,12$).

Tabela 1 - Distribuição das características das gestantes segundo os grupos estudados

Variável	Normais n= 87	HIV positivas n=43	Diabéticas n=43	p
Idade (anos)				< 0,05
Média (Variação)	25,3 (16 - 41)	26,4 (17 - 43)	29,1 (17 - 40)	
Desvio padrão	5,5	5,6	6,0	
Cor				0,36
Branças	59,8%	60,5%	72,1%	
Não Brancas	40,2%	39,5%	27,9%	
Estado civil				0,94
Sem companheiro	35,6%	34,9%	32,6%	
Com companheiro	64,4%	65,1%	67,4%	
Nº Gestações				0,002
Primigesta	31,0%	12,5%	34,9%	
Secundigesta	27,6%	10,0%	25,6%	
Multigesta	41,4%	77,5%	39,5%	
Nº Partos				0,12
Nulípara	35,6%	20,0%	46,5%	
1 a 3 partos	52,9%	60,0%	44,2%	
Multípara	11,5%	20,0%	9,3%	
Abortos				0,08
Sim	27,6%	42,5%	20,9%	
Não	72,4%	57,5%	79,1%	

Tabela 2 - Frequências genotípicas para o *IGF-2* na população total

Genótipo	n	Frequência genotípica
GG	97	56,0%
AG	64	37,0%
AA	12	7,0%
Total	173	100,0%

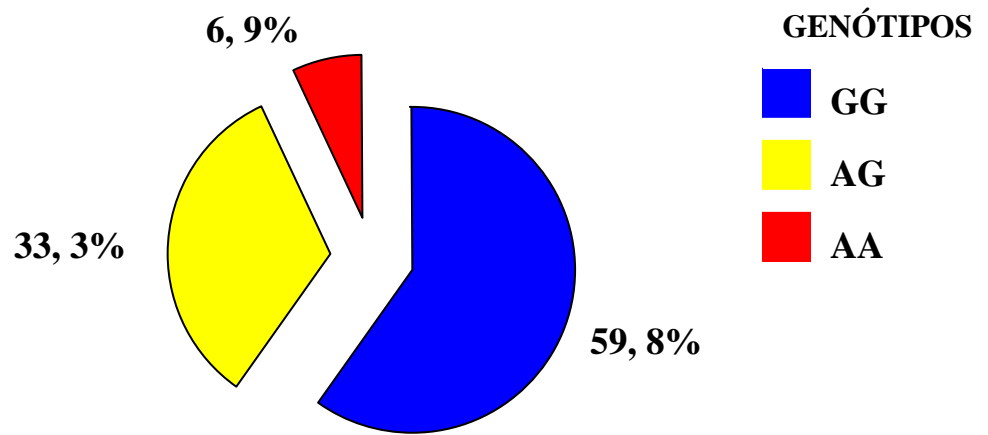


Figura 5. Distribuição dos genótipos do IGF-2 no grupo de gestantes normais.

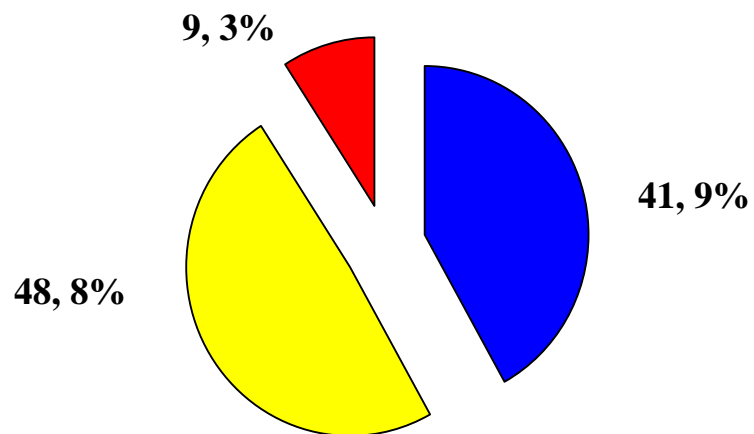


Figura 6. Distribuição dos genótipos do IGF-2 no grupo de gestantes soropositivas para o HIV-1.

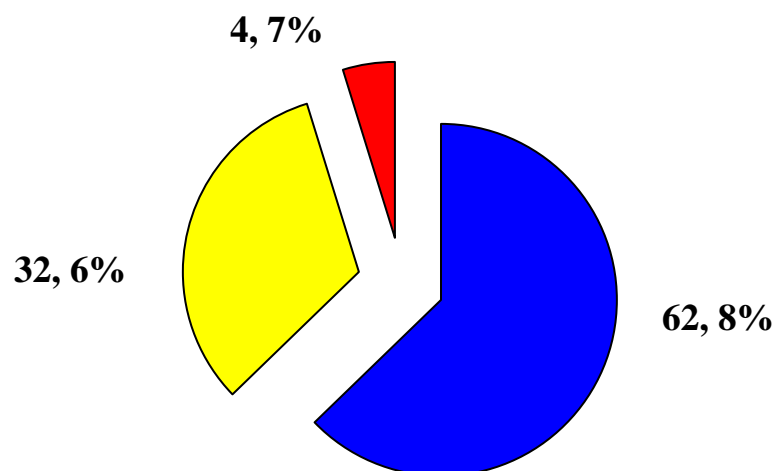


Figura 7. Distribuição dos genótipos do IGF-2 no grupo de gestantes com DMG.

Tabela 3 - Análise das frequências genótípicas para o *IGF-2* considerando os três grupos estudados, o tratamento antiretroviral e a cor das pacientes

Genótipos Grupos	GG	AG	AA	<i>p</i>
	n	n	n	
Normais	52	29	6	0,29
HIV positivas	18	21	4	
Diabéticas	27	14	2	
HIV positivas	18	21	4	0,15
Normais	52	29	6	
HIV positivas	18	21	4	0,14
Diabéticas	27	14	2	
Normais	52	29	6	0,86
Diabéticas	27	14	2	
HIV (AZT)	8	8	1	0,75
HIV (TT)	10	13	3	
Branças	56	42	11	0,03
Não Brancas	41	22	1	

Tabela 4 - Análise das freqüências genótípicas nas amostras estudadas após reagrupamento dos genótipos

Genótipo	GG	AG +AA	p
Grupo	n (%)	n (%)	
Normais	52 (59,8)	35 (40,2)	0,09
HIV positivas	18 (41,9)	25 (58,1)	
Diabéticas	27 (62,8)	16 (37,2)	
Normais	52 (59,8)	35 (40,2)	0,05
HIV positivas	18 (41,9)	25 (58,1)	
HIV positivas	18 (41,9)	25 (58,1)	0,05
Diabéticas	27 (62,8)	16 (37,2)	
Normais	52 (59,8)	35 (40,2)	0,74
Diabéticas	27 (62,8)	16 (37,2)	
AZT	8 (47,1)	9 (52,9)	0,58
TT	10 (38,5)	16 (61,5)	

Tabela 5 - Frequências gênicas nos três grupos estudados

f(alelo) \ Grupos	Total	Normais	HIV-1 positivas	Diabéticas
n	173	87	43	43
*f(G)	0,75	0,76	0,66	0,79
*f(A)	0,25	0,24	0,34	0,21

*f (alelo) frequência do alelo

$p = 0,28$

5. DISCUSSÃO

Vários fatores justificam a importância dos estudos dos distúrbios na homeostase da glicose em pacientes portadores do HIV-1 usuários de ARV, destacando-se a elevada prevalência, o conhecimento restrito sobre a etiologia dessas alterações e as consequências de seu aparecimento nessa população. A freqüente associação entre o DM e o uso de ARV por pacientes infectados pelo HIV-1 tem sido relatada ao longo da última década. As anormalidades do metabolismo glicídico são caracterizadas pela ocorrência de resistência insulínica periférica, hiperinsulinemia e hiperglicemia, simulando o DM tipo 2 (CARR et al., 1998; MURATA et al., 2000; HUI, 2003; TUOMALA et al., 2005, SHIKUMA et al., 2007). Por outro lado, quadros semelhantes ao DM tipo 1, caracterizados por insulinopenia e hiperglicemia também estão citados na literatura mundial (BEHRENS et al., 1999; WOERLE et al., 2003; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2004).

Ao se estudar as questões relacionadas ao uso da terapêutica ARV e seu efeito sobre o metabolismo da glicose durante a gestação, deve-se considerar que o próprio processo gestacional representa um fator de risco para hiperglicemia, verificando-se que em cerca de 7% de todas as pacientes o DM é diagnosticado durante a gravidez. Essa prevalência, entretanto, pode variar de 1 a 14% na dependência da população estudada e do teste empregado para o diagnóstico da doença em questão (ADA, 2004).

Como já comentado anteriormente, no cromossomo 11 humano estão mapeados importantes genes relacionados ao controle da homeostase da glicose. O *IGF-2* é um gene que sofre *imprinting* genômico, ou seja, tem sua expressão modulada por vários mecanismos de regulação, que variam desde modificações de histonas e DNA até vias de silenciamento gênico mediadas por RNA e por proteínas específicas (WALTER & PAULSEN, 2003; ARNEY, 2003; MURPHY & JIRTLE, 2003). São inúmeras as teorias que tentam explicar as razões para este fenômeno. A hipótese melhor documentada é aquela do conflito entre os alelos maternos e paternos (MOORE & HAIG, 1991). Essa teoria prediz que, em espécies nas

quais a fêmea faz grande investimento em seus descendentes, com possibilidade de vários genitores masculinos, os alelos maternos terão uma vantagem seletiva se atuarem limitando os nutrientes destinados para cada filho. Por outro lado, os alelos paternos serão vantajosos quando, em última análise, espoliarem o mais intensamente possível as reservas maternas. Concluindo, genes de origem paterna que são expressos, tal como o *IGF-2*, favorecem o crescimento e desenvolvimento fetal adequados, agindo em importantes vias metabólicas, enquanto genes expressos de origem materna auxiliam no controle do crescimento fetal e placentário (TYCKO & EFSTRATIADIS, 2002).

Assim, o *IGF-2* ocupa lugar de destaque no estudo do *imprinting* genômico, principalmente por apresentar dramáticos efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento fetal, sobre o sistema hormonal pós-natal e importantes vias metabólicas, sobre o comportamento adulto e neoplasias, além de interagir com os produtos de outros genes que sofrem *imprinting* (REIK et al., 2000).

Neste contexto a presente pesquisa é original, pois estudou o polimorfismo *IGF-2/ApaI* em mulheres portadoras do HIV-1, usuárias de drogas ARV e que desenvolveram hiperglicemia ao longo do período gestacional e comparou os achados neste grupo com os resultados obtidos para o grupo de pacientes consideradas normais e para aquele de portadoras de DMG.

Levando-se em consideração o estudo do polimorfismo *IGF-2/ApaI*, os grupos analisados no presente trabalho não apresentaram diferenças significativas entre as frequências genotípicas encontradas para cada um. Uma revisão cuidadosa da literatura mundial foi realizada a fim de comparar essas frequências genotípicas encontradas com as de outros estudos relacionados ao tema e a descoberta foi de que existem poucos trabalhos associando o polimorfismo do *IGF-2/ApaI* aos distúrbios do metabolismo glicídico.

Em 1997, O'DELL et al. realizaram um estudo denominado “Northwick Park Heart Study II (NPHSII)” sobre o polimorfismo do *IGF-2/ApaI* (alelos A e G) em homens de meia idade. Os resultados mostraram que os homozigotos AA apresentam peso corporal médio 4,0 kg menor que os homozigotos GG, com resultados intermediários para os heterozigotos AG. Além disso, os homozigotos AA exibiram concentração sérica média de IGF-II mais elevada que os outros grupos. Os autores concluíram que os homozigotos GG têm risco 1,67 vezes maior de ter IMC anormal e as complicações resultantes de sua ocorrência. As frequências genóticas encontradas para a população estudada foram: GG 53%, AG 40% e AA 7%. Comparando-as com as do presente trabalho, observa-se que não existem diferenças significativas entre elas, apesar das diferenças existentes entre os delineamentos de cada pesquisa. Não existem diferenças mesmo quando se compara a população estudada no NPHSII com qualquer subgrupo da presente pesquisa isoladamente (gestantes normais, portadoras do HIV-1 ou diabéticas gestacionais).

Em 2001, GAUNT et al. avaliaram a *coorte* do estudo de O'DELL et al. (1997) considerando outras variações genéticas relacionadas à obesidade e também mostraram que o polimorfismo *IGF-2/ApaI* é um fator determinante significativo do peso corporal em homens de meia idade.

Um estudo brasileiro realizado por GOMES et al. (2005) testou a associação entre o polimorfismo *IGF-2/ApaI* e o IMC de indivíduos saudáveis (95 homens e 199 mulheres) na faixa etária entre 18 e 30 anos e correlacionaram os resultados com seus pesos de nascimento (PN). Os autores relataram que, embora os genótipos do *IGF-2* não tenham sido significativamente associados com o IMC ou com o PN, houve correlação significativa entre o PN e o IMC de indivíduos homozigotos GG que nasceram com mais de 3.500 gramas. Sugerem que PN elevado associado com homozigose do alelo G pode ser um fator importante na predisposição à obesidade e suas complicações no adulto. As frequências genóticas

encontradas para a população estudada pertencente a este estudo foram: GG 48,3%, AG 43,9% e AA 7,8%.

Comparando-se as frequências genóticas obtidas no trabalho de GOMES et al. (2005) com as frequências dos genótipos encontrados nos três grupos avaliados na presente pesquisa, verifica-se que não existem diferenças significativas entre elas, mesmo considerando as frequências da população geral do estudo de GOMES et al. (2005) e as frequências dos grupos de pacientes normais, portadoras do HIV-1 e diabéticas gestacionais separadamente.

Devido à similaridade existente entre as frequências genóticas encontradas nos trabalhos analisados e os resultados obtidos na presente pesquisa, pode-se inferir que as alterações na homeostase da glicose demonstradas no grupo de pacientes soropositivas não são secundárias à prevalência maior de um genótipo, ou que um determinado polimorfismo genético do *IGF-2* estaria, isoladamente, levando a essas modificações no metabolismo glicídico. Cabe destacar que os autores desses trabalhos analisados consideraram como sujeitos das pesquisas pessoas normais pertencentes à população geral.

Os dados referentes à avaliação genética obtidos nesta pesquisa também podem ser comparados com os resultados de T HART et al. (2004). Esses autores selecionaram indivíduos caucasianos normais e intolerantes à glicose, de acordo com resultados obtidos por GTT 75g e os submeteram ao *clamp* hiperglicêmico. Não encontraram diferenças significativas com relação aos valores de glicose e insulina obtidos durante o teste de sobrecarga e tanto a primeira quanto a segunda fase de secreção da insulina estimulada pela glicose não foram diferentes, independentemente dos genótipos *IGF-2/ApaI*. As frequências genóticas encontradas neste trabalho não diferem significativamente entre os grupos, sejam eles de sujeitos normais ou intolerantes à glicose e também não diferem da distribuição genotípica existentes nos grupos de pacientes normais, portadoras do HIV-1 e de diabéticas

gestacionais. Mesmo quando comparados os grupos, levando em consideração os genótipos agrupados AA + AG, uma vez que a prevalência de genótipos AA é baixa, não existem diferenças significativas entre eles. Mais uma vez, o polimorfismo *IGF-2/ApaI* parece não ser o único responsável pelas alterações no metabolismo da glicose.

Para UKKOLA et al. (2001), indivíduos portadores do genótipo *IGF-2/ApaI* GG quando submetidos a uma dieta hipercalórica apresentam aumento da insulina de jejum e da insulina produzida durante o GTT, ou seja, possuem sensibilidade reduzida à insulina, sem apresentarem aumento da área sob a curva de glicose. Na presente pesquisa, as pacientes portadoras do HIV-1, que apresentam hiperglicemia e hipoinsulinemia, mostram maior tendência em apresentar genótipos com o alelo A quando comparadas às pacientes diabéticas gestacionais, as quais apresentam hiperinsulinemia e resistência periférica à insulina, como é de conhecimento comprovado na literatura específica (BUTTE, 2000). Pode ser que os mecanismos fisiopatológicos que levam aos distúrbios da homeostase da glicose sejam diferentes para os diversos genótipos.

As frequências gênicas, ou seja, aquelas relacionadas aos alelos que originam os genótipos também foram avaliadas neste trabalho, objetivando a descoberta de alguma relação entre os distúrbios da glicose com o tipo de alelo do *IGF-2*. Ao confrontar os resultados obtidos com aqueles recuperados por O'DELL et al. (1997) não se observam diferenças significativas entre as frequências gênicas existentes na população estudada por estes autores e as frequências gênicas obtidas na amostra de gestantes normais, soropositivas para o HIV-1 e de pacientes diabéticas gestacionais. Também não existe significância quando comparados os dados da presente pesquisa, levando-se em consideração os três grupos avaliados, com os dados de GOMES et al. (2005).

Também não foram observadas diferenças significativas entre as frequências gênicas encontradas na população estudada por 'T HART et al. (2004) e as frequências obtidas nos

grupos delineados nesta pesquisa. Procurando apurar essa avaliação, confrontou-se as frequências dos alelos dos indivíduos tolerantes à glicose do estudo daqueles pesquisadores com os dados das gestantes normais do presente estudo e, como era de se esperar, não houve diferença significativa entre eles. Por outro lado, comparando-se as frequências gênicas obtidas no grupo de intolerantes à glicose com os resultados do grupo de portadoras do HIV-1 e de diabéticas, também não se obteve qualquer significância estatística. Assim, mais uma vez, parece não haver associação entre qualquer um dos alelos do *IGF-2* e os distúrbios do metabolismo da glicose.

Sendo o genótipo de um indivíduo o responsável pelas suas características, foram analisadas as frequências genotípicas das pacientes do presente estudo com relação à cor da pele das mesmas. Verificou-se que as pacientes não brancas têm maior probabilidade de apresentar o genótipo GG, sem haver diferença significativa entre os grupos analisados, ou seja, de brancas e não brancas. Como os trabalhos existentes na literatura tentam associar o genótipo GG aos distúrbios da glicose, torna-se prudente destacar que pacientes não brancas talvez tenham maior prevalência de hiperglicemia e *Diabetes mellitus* durante a gravidez. Porém, cumpre lembrar que neste trabalho não foram demonstradas diferenças significantes entre os grupos estudados com relação ao dado demográfico cor da pele. Não há trabalhos divulgados, nos principais bancos de dados de literatura científica, que mostrem valores de normalidade das frequências genotípicas nos vários grupos étnicos.

Adicionalmente, houve a preocupação em se avaliar as distribuições genotípicas existentes nos grupos de gestantes portadoras do HIV-1, diferenciando-os em usuárias de AZT ou de terapia tríplice. Não foram encontradas diferenças nas frequências genotípicas, assim como em relação às demais características demográficas. Isso garante a homogeneidade do grupo avaliado de pacientes soropositivas para o HIV-1.

Alguns dados demográficos também foram analisados na busca de fatores que pudessem influenciar a existência dos distúrbios glicídicos. Ao avaliar a variável idade observou-se que as pacientes diabéticas encontram-se na faixa etária maior que as pacientes pertencentes aos outros dois grupos analisados. Este achado coincide com a prevalência mais elevada de DMG em gestantes com idade mais elevada, fato que é corroborado pelas orientações estatuídas pela *American Diabetes Association* (2005) para o diagnóstico do DMG. Segundo essa entidade, as gestantes com idade inferior a 25 anos podem ser consideradas de baixo risco para o DMG. Por outro lado, a semelhança entre as idades das pacientes normais e das gestantes soropositivas para o HIV-1 torna pouco provável a influência da idade sobre a ocorrência da hiperglicemia neste último grupo. Cabe destacar que a variável idade não afeta a prevalência de genótipos.

São poucas as informações da literatura relacionadas ao impacto da “raça” e da etnia sobre a apresentação clínica e progressão das alterações no metabolismo da glicose. Indivíduos afro-descendentes, asiáticos e hispânicos ou latinos apresentam maior risco que a população caucasiana de desenvolverem *Diabetes mellitus* e suas complicações (MARSHALL, 2005; CABALLERO, 2007; MISRA et al., 2007). Fatores ambientais e genéticos complexos são responsabilizados por essa disparidade.

A ingesta reduzida em fibras, com elevado teor de gordura animal e carboidratos processados é um dos hábitos alimentares presentes na maioria dos grupos populacionais com maior probabilidade de desenvolverem distúrbios no metabolismo glicídico. Normalmente, os efeitos nocivos desta variável são potencializados pela atividade física reduzida, inadequações essas que resultam do processo de urbanização (ABATE & CHANDALIA, 2007). Outros fatores ambientais podem influenciar a prevalência de DM nessas populações tais como a obesidade, que se relaciona intimamente com a resistência periférica à insulina, a presença de outras doenças de base, condições sócio-econômicas precárias que impossibilitam uma

alimentação adequada e o acesso aos serviços de saúde e fatores culturais que interferem na percepção de um grupo sobre o ganho de peso e sua aparência física (CANDIB, 2007).

Com relação aos fatores genéticos, algumas publicações demonstram que as variantes genéticas relacionadas aos afro-descendentes são excepcionais e estatisticamente maiores que a de qualquer outra etnia, provavelmente justificando a prevalência duas vezes maior de DM tipo 2 quando comparada aos caucasianos (ELBEIN, 2007). No Brasil, as informações sobre “raça” devem ser avaliadas com cuidado, pois existem diferenças com relação à percepção das características raciais em determinados contextos regionais, culturais e sociais. Torna-se mais prudente a adoção da característica “cor da pele” para a realização da avaliação desse dado demográfico.

No presente estudo não houve diferença significativa entre os grupos estudados com relação à cor da pele, demonstrando que as populações examinadas são homogêneas com relação a esta característica. Esse achado sugere que essa característica, quando avaliada isoladamente, não é a responsável pela hiperglicemia existente no grupo de soropositivas pelo HIV-1 e no de gestantes diabéticas.

Outras características demográficas também passaram por avaliação na busca dos fatores de risco para hiperglicemia no período gestacional. Já é de domínio da comunidade científica que grandes múltiparas têm maior risco para o desenvolvimento de DM. Assim, BAI et al. (2002) avaliaram prospectivamente 510.989 gestantes e mostraram que a grande multiparidade está associada à DMG, entre outras complicações obstétricas. Neste contexto, não foram encontradas diferenças significativas relacionadas à multiparidade entre os três grupos analisados neste trabalho. O fator multiparidade parece, assim como o fator “cor da pele”, não influenciar a maior prevalência de hiperglicemia no grupo das mulheres portadoras do HIV-1.

O IGF-II exerce papel fundamental na divisão e diferenciação celular, particularmente durante o período perinatal, momento em que a grande maioria dos tecidos corporais estão se adaptando às novas condições do ambiente (FOWDEN, 2003). Portanto, distúrbios na sua produção, que é determinada geneticamente, podem estar associados a várias doenças que se estabelecem na infância, adolescência e vida adulta, como aterosclerose, *Diabetes mellitus* e neoplasias (RANDHAWA & COHEN, 2005).

O gene *IGF-2* pode atuar modificando a susceptibilidade de um indivíduo a uma doença, ou seja, pode aumentar o risco de ocorrência de um estado patológico sem que ele seja expresso. Em diversas ocasiões, quando avaliado isoladamente, a simples existência do gene pode não ser suficiente para explicar o desenvolvimento de uma doença (O'DELL et al., 1999). O polimorfismo do *IGF-2/ApaI* está localizado em uma região que não é codificada e que, portanto, não causa alterações na seqüência de aminoácidos da proteína IGF-II. Porém, esse polimorfismo poderia estar associado com outras mutações de maior significado funcional, influenciando desta forma a susceptibilidade do organismo a uma doença (UKKOLA et al., 2001). Além disso, os polimorfismos relacionados às moléculas do sistema IGF podem afetar a transcrição ou o processamento de RNA mensageiros (RANDHAWA & COHEN, 2005).

Os resultados obtidos contribuíram para o conhecimento sobre as alterações do metabolismo glicídico em gestantes submetidas à terapia ARV, tirando do polimorfismo *IGF-2/ApaI* a responsabilidade por essas alterações. Esses dados sinalizam positivamente que outras variáveis devem ser estudadas para a elucidação dessas anormalidades, talvez sendo necessário aprofundar os estudos experimentais, a fim de identificar subgrupos de gestantes que possam se beneficiar de medidas preventivas e/ou terapêuticas.

6. CONCLUSÕES

1. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados (gestantes normais, portadoras do HIV-1 e diabéticas gestacionais) em relação ao polimorfismo *IGF-2/ApaI*. As frequências genotípicas são estatisticamente semelhantes entre os mesmos, mostrando que, provavelmente, não influenciaram o desenvolvimento dos distúrbios da homeostase da glicose;

2. Com relação às frequências genotípicas, não houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de gestantes portadoras do HIV-1 usuárias apenas de AZT e o grupo de gestantes usuárias de TT, mostrando que o grupo de pacientes soropositivas para o HIV-1 é homogêneo com relação a essa variável;

3. Não foram detectadas diferenças significativas entre as três populações examinadas com relação às frequências gênicas;

4. Existem diferenças significativas entre as pacientes brancas e não brancas com relação aos genótipos, uma vez que, pacientes não brancas têm maior probabilidade de apresentarem o genótipo GG.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE N.; CHANDALIA M. Ethnicity, type 2 diabetes & migrant Asian Indians. **Indian J. Med. Res.** v.125, p.251-8, 2007.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Gestational Diabetes Mellitus. **Diabetes Care.** v.27, n.S1, p.S88-90, 2004.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care.** v.28, n.S1, p.S37-42, 2005.

ADULT AIDS CLINICAL TRIAL GROUP (AACTG). AACTG recommendations for metabolic problems. Guide covers insulin resistance and diabetes. **Aids Alert.**, v.18, p.6-9, 2003.

ARNEY K.L. H19 and Igf2--enhancing the confusion? **Trends Genet.** v.19, n.1, p.17-23, 2003.

BAI J.; WONG W.S.; BAUMAN A.; MOHSIN M. Parity and pregnancy outcomes. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v.186, p.274-8, 2002.

BARRÉ-SINOUSSE F.; CHERMANN J.C.; REY F.; NUGEYRE M.T.; CHAMARET S.; GRUEST J.; DAUGUET C.; AXLER-BLIN C.; VÉZINET-BRUN F.; ROUZIOUX C.; ROZENBAUM W.; MONTAGNIER L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science.** v.220, n.4599, p.868-71, 1983.

BARTOLOMEI M.S.; ZEMEL S.; TILGHMAN S.M. Parental imprinting of the mouse H19 gene. **Nature**. v.351, n.6322, p.153-5, 1991.

BEHRENS G.; DEJAM A.; SCHMIDT H.; BALKS H.J.; BRABANT G.; KÖRNER T.; STOLL M.; SCHMIDT R.E. Impaired glucose tolerance, beta cell function and lipid metabolism in HIV patients under treatment with protease inhibitors. **AIDS**. v.13, n.10, p.F63-70, 1999.

BELL A.C.; FELSENFELD G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. **Nature**. v.405, n.6785, p.482-5, 2000.

BONNER-WEIR S. Life and death of the pancreatic beta cells. **Trends Endocrinol. Metab.** v. 11, p.375-8, 2000.

BRISSENDEN J.E.; ULLRICH A.; FRANCKE U. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. **Nature**. v.310, n.5980, p.781-4, 1984.

BUTTE, N.F. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy; normal compared with gestational diabetes mellitus. **Am. J. Clin. Nutr.** v.7(suppl.), p.1256-61, 2000.

CABALLERO A.E. Type 2 diabetes in the Hispanic or Latino population: challenges and opportunities. **Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.** v.14, n.2, p.151-7, 2007.

CANDIB L.M. Obesity and diabetes in vulnerable populations: reflection on proximal and distal causes. **Ann. Fam. Med.** v.5, n.6, p.547-56, 2007.

CARPENTER C.C.J.; FISCHL M.A.; HAMMER S.M. ; HIRSCH M.S.; JACOBSEN D.M.; KATZENSTEIN D.A.; MONTANER J.S.; RICHMAN D.D.; SAAG M.S.; SCHOOLEY R.T.; THOMPSON M.A.; VELLA S.; YENI P.G.; VOLBERDING P.A. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1998: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. **JAMA**. v.280, n.1, p.78-86, 1998.

CARR A.; SAMARAS K.; CHISHOLM D.J.; COOPER D.A. Pathogenesis of HIV-1-protease inhibitor-associated peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance. **Lancet**. v. 351, p.1881-1883, 1998.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Recommendations of the U.S. Public Health Service Task Force on the use of Zidovudine to reduce perinatal transmission of human immunodeficiency virus. **MMWR**. v.44, p.1-15, 1995.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Public Health Service Task Force. Recommendations for the use of antiretroviral drugs in pregnant women infected with HIV-1 for maternal health and for reducing perinatal HIV-1 transmission in the United States. **MMWR Recommendations and Reports**. v.51, n.18, p.1-38, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Public Health Service Task Force. Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV-1-Infected Women for Maternal Health and Interventions to Reduce Perinatal HIV-1 Transmission in the United States. **MMWR**. v.24, p.1-58, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Public Health Service Task Force. Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV-1-Infected

Women for Maternal Health and Interventions to Reduce Perinatal HIV-1 Transmission in the United States. **MMWR.** v., p.1-96, 2007.

COLL O.; FIORE S.; FLORIDIA M.; GIAQUINTO C.; GROSCH-WÖRNER I.; GUILIANO M.; LINDGREN S.; LYALL H.; MANDELBROT L.; NEWELL M.L.; PECKHAM C.; RUDIN C.; SEMPRINI A.E.; TAYLOR G.; THORNE C.; TOVO P.A. Pregnancy and HIV infection. A European consensus on management. **AIDS.** v.16, n.2, p.S1-18, 2002.

CONNOR, E.M.; SPERLING, R.S.; GELBER, R.; KISELEV P.; SCOTT G.; O'SULLIVAN M.J.; VAN DYKE R.; BEY M.; SHEARER W.; JACOBSON R.L.; ET AL. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. **N. Engl. J. Med.** v.331, n.18, p.1173-80, 1994.

DECHIARA T.M.; EFSTRATIADIS A.; ROBERTSON E.J. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. **Nature.** v.345, n.6270, p.78-80, 1990.

DECHIARA T.M.; ROBERTSON E.J.; EFSTRATIADIS A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. **Cell.** v.64, n.4, p.849-59, 1991.

DELAVAL K.; FEIL R. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. **Curr. Opin. Genet. Dev.** v.14, n.2, p.188-95, 2004.

DUNN D.T.; NEWELL M.L.; ADES A.E.; PECKHAM C.S. Risk of human immunodeficiency virus type 1 transmission through breast-feeding. **Lancet**. v.340, p.585-588, 1992.

ELBEIN S.C. Evaluation of polymorphisms known to contribute to risk for diabetes in African and African-American populations. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**. v.10, n.4, p.415-9, 2007.

EL BEITUNE P. Efeito do uso de antiretrovirais em gestantes portadoras do HIV-1 sobre o metabolismo glicídico materno e parâmetros antropométricos e bioquímicos do neonato. 2004. 101f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

EL BEITUNE P.; DUARTE G.; FOSS M.C.; MONTENEGRO JR R.M.; QUINTANA S.M.; FIGUEIRÓ-FILHO E.A.; NOGUEIRA A.A. Effect of maternal use of antiretroviral agents on serum insulin levels of the newborn infant. **Diabetes Care**. v.28, n.4, p.856-9, 2005.

EUROPEAN COLLABORATIVE GROUP. Mother-to-child transmission of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. **Clinical Infectious Diseases**. v.40, n. 3, p.458-65, 2005.

EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY. Exposure to antiretroviral therapy in utero or early life: the health of uninfected children born to HIV-infected woman. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr**. v.32, n.4, p.380-387, 2003.

EUROPEAN MODE OF DELIVERY COLLABORATION. Elective cesarean section versus vaginal delivery in prevention of vertical HIV-1 transmission: a randomised clinical trial. **Lancet.** v.353, n.9158, p.1035–9, 1999.

FOWDEN A.L. The Insulin-like Growth Factor and feto-placental growth. **Placenta.** v. 24, p.803-12, 2003.

FIGUEIRO'-FILHO E.A.; EL BEITUNE P.; RUDGE M.V.C.; QUINTANA S.M.; MARCOLIN A.C.; DUARTE G. Efeitos das drogas antiretrovirais sobre o metabolismo glicídico e células de Langerhans de pâncreas de ratas Wistar prenhes. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v.26, p.369 –375, 2004.

FRYSTYK J. Free insulin-like growth factors -- measurements and relationships to growth hormone secretion and glucose homeostasis. **Growth Horm. IGF Res.** v.14, n.5, p.337-75, 2004.

GAUNT T.R.; COOPER J.A.; MILLER G.J.; DAY I.N.; O'DELL S.D. Positive associations between single nucleotide polymorphisms in the IGF2 gene region and body mass index in adult males. **Hum. Mol. Genet.** v.10, n.14, p.1491-501, 2001.

GOMES M.V.; SOARES M.R.; PASQUALIM-NETO A.; MARCONDES C.R.; LÔBO R.B.; RAMOS E.S. Association between birth weight, body mass index and IGF2/ApaI polymorphism. **Growth Horm. IGF Res.** v.15, n.5, p.360-2, 2005.

GOTTLIEB M.S.; SCHROFF R.; SCHANKER H.M.; WEISMAN J.D.; FAN P.T.; WOLF R.A.; SAXON A. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously

healthy homosexual men: Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. **N. Engl. J. Med.** v.305, p.1425-31, 1981.

GRINSPOON SK, BILEZIKIAN JP. HIV disease and the endocrine system. **N. Engl. J. Med.** v.327, n.19, p.1360-5, 1992.

HADIGAN C.; MEIGS J.B.; CORCORAN C.; RIETSCHEL P.; PIECUCH S.; BASGOZ N.; DAVIS B.; SAX P.; STANLEY T.; WILSON P.W.; D'AGOSTINO R.B.; GRINSPOON S. Metabolic abnormalities and cardiovascular disease risk factors in adults with human immunodeficiency virus infection and lipodystrophy. **Clin Infect Dis.** v.32, n.1, p.130-9, 2001.

HAWKES C.; KAR S. The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system. **Brain. Res. Rev.** v.44, n.2-3, p.117-40, 2004.

HUI D.Y. Effects of HIV protease inhibitor therapy on lipid metabolism. **Prog. Lipid. Res.** v.42, n.2, p.81-92, 2003.

INNIS M.A.; GELFAND D.H.; SNISSKY H.J.; WHITE T.J. **PCR Protocols.** A guide to methods and applications. San Diego; Academic Press, 1990).

INTERNATIONAL PERINATAL HIV GROUP. The mode of delivery and the risk of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1—a meta-analysis of 15 prospective cohort studies. **N. Engl. J. Med.** v.340, p.977–87, 1999.

JAFFIOL C, ROUARD M, MACARI F, LAUTIER C, AIT EL MKADEM S, MÃ©CHALY I, BRUN JF, RENARD E, CROS G, BRINGER J, GRIGORESCU F. Insulin resistance: from clinical diagnosis to molecular genetics. Implications in diabetes mellitus. **Bull. Acad. Natl. Med.** v.183, n.9, p.1761-75, 1999.

JOHN-STEWART G.; MBORI-NGACHA D.; EKPINI R.; JOHN-STEWART G.; MBORI-NGACHA D.; EKPINI R.; JANOFF E.N.; NKENGASONG J.; READ J.S.; VAN DE PERRE P.; NEWELL M.L.; GHENT IAS WORKING GROUP ON HIV IN WOMEN CHILDREN. Breast-feeding and transmission of HIV-1. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.** v.35, p.196-202, 2004.

KIM J.J.; ACCILI D. Signalling through IGF-I and insulin receptors: where is the specificity? **Growth Horm. IGF Res.** v.12, n.2, p.84-90, 2002.

KIM M.S.; POLYCHRONAKOS C. Immunogenetics of type 1 diabetes. **Horm. Res.** v.64, n.4, p.180-8, 2005.

LANDREAU-MASCARO A.; BARRET B.; MAYAUX M.J.; TARDIEU M.; BLANCHE S.; FRENCH PERINATAL COHORT STUDY GROUP. Risk of early febrile seizure with perinatal exposure to nucleoside analogues. **Lancet.** v.359, n.9306, p.583-4, 2002.

LORENZI P.; SPICHER V.M.; LAUBEREAU B.; HIRSCHHEL B.; KIND C.; RUDIN C.; IRION O.; KAISER L. Antiretroviral therapies in pregnancy: maternal, fetal and neonatal effects. Swiss HIV Cohort Study, the Swiss Collaborative HIV and Pregnancy Study, and the Swiss Neonatal HIV Study. **AIDS.** v.12, n.18, p.F241- 7, 1998.

LUDWIG T.; EGGENSCHWILER J.; FISHER P.; D'ERCOLE A.J.; DAVENPORT M.L.; EFSTRATIADIS A. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in *Igf2* and *Igf1r* null backgrounds. **Dev. Biol.** v.177, n.2, p.517-35, 1996.

LIU J.P.; BAKER J.; PERKINS A.S.; ROBERTSON E.J.; EFSTRATIADIS A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (*Igf-1*) and type 1 IGF receptor (*Igf1r*). **Cell.** v.75, n.1, p.59-72, 1993.

MARSHALL M.C. Jr. Diabetes in African Americans. **Postgrad. Med. J.** v.81, n.962, p.734-40, 2005.

MARTIN R.; BOYER P.; HAMMIL H.; PEAVY H.; PLATZKER A.; SETTLAGE R.; SHAH A.; SPERLING R.; TUOMALA R.; WU M. Incidence of premature birth and neonatal respiratory disease in infants of HIV positive mothers. The Pediatric Pulmonary and Cardiovascular Complications of Vertically Transmitted Human Immunodeficiency Virus Infection Study Group. **J. Pediatr.** v.131, p.851-6, 1997.

MCINTYRE J. Mothers infected with HIV. **Br. Med. Bull.** v.67, p.127-35, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL – SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS. Recomendações para Profilaxia da Transmissão Vertical do HIV e Terapia Anti-Retroviral em Gestantes. Brasília, 2006.

MINKOFF H. Human immunodeficiency virus infection in pregnancy. **Obstet. Gynecol.** v.101, n.4, p.797-810, 2003.

MISRA A.; MISRA R.; WIJESURIYA M.; BANERJEE D. The metabolic syndrome in South Asians: continuing escalation & possible solutions. **Indian J. Med. Res.** v.125, n.3, p.345-54, 2007.

MOFENSON L.M. A critical review of studies evaluating the relationship of role of delivery to prenatal transmission of human immunodeficiency virus. **Pediatr. Infect. Dis.** v.14, n.3, p.169-76, 1995.

MOCK P.A.; SHAFFER N.; BHADRAKOM C.; SIRIWASIN W.; CHOTPITAYASUNONDH T.; CHEARSKUL S.; ROONGPISUTHIPONG A.; YOUNG N.L.; CHINAYON P.; KALISH M.L.; PAREKH B.; MASTRO T.D. Maternal viral load and timing of mother-to-child HIV transmission, Bangkok, Thailand. **AIDS.** v.13, n.3, p.407-414, 1999.

MINKOFF H.; AUGENBRAUN M. Antiretroviral therapy for pregnant women. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v.176, p.478-89, 1997.

MONZAVI R.; COHEN P. IGFs and IGFBPs: role in health and disease. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.** v.16, n.3, p.433-47, 2002.

MOORE T.; HAIG D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. **Trends Genet.** v.7, n.2, p.45-9, 1991.

MULLIGAN K.; GRUNFELD C.; TAI V.W.; ALGREN H.; PANG M.; CHERNOFF D.N.; LO J.C.; SCHAMBELAN M. Hyperlipidemia and insulin resistance are induced by protease inhibitors independent of changes in body composition in patients with HIV infection. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.** v.23, n.1, p.35-43, 2000.

MURPHY S.K.; JIRTLE R.L. Imprinting evolution and the price of silence. **Bioessays**. v.25, n.6, p.577-88, 2003.

MURATA H.; HRUZ P.W.; MUECKLER M. The mechanism of insulin resistance caused by HIV protease inhibitor therapy. **J. Biol. Chem.** v.275, n.27, p.20251-4, 2000.

MURRAY M.; LUMPKIM M. Reports of diabetes and hyperglycemia in patients receiving protease inhibitors for the treatment of human immunodeficiency virus infection. **FDA Public Healthy Advisory**. Washington, DC, US FDA, 1997.

MUSSI-PINHATA M.M.; REGO M.A.; FREIMANIS L.; KAKEHASI F.M.; MACHADO D.M.; CARDOSO E.M.; READ J.S.; FOR THE NISDI PERINATAL PROTOCOL STUDY GROUP. Maternal antiretrovirals and hepatic enzyme, hematologic abnormalities among human immunodeficiency virus type 1-uninfected infants: The NISDI Perinatal Study. **Pediatr. Infect. Dis. J.** v.26, n.11, p.1032-7, 2007.

NIELSEN F.C. The molecular and cellular biology of insulin-like growth factor II. **Prog. Growth Factor. Res.** v.4, n.3, p.257-90, 1992.

O'DELL S.D.; DAY I.N. Molecules in focus. Insulin-like growth factor II (IGF-II). **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** v.30, n.7, p.767-71, 1998.

O'DELL S.D.; BUJAC S.R.; MILLER G.J.; DAY I.N. Associations of IGF2 ApaI RFLP and INS VNTR class I allele size with obesity. **Eur. J. Hum. Genet.** v.7, n.7, p.821-7, 1999.

O'DELL S.D.; MILLER G.J.; COOPER J.A.; HINDMARSH P.C.; PRINGLE P.J.; FORD H.; HUMPHRIES S.E.; DAY I.N. Apal polymorphism in insulin-like growth factor II (IGF2) gene and weight in middle-aged males. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.** v.21, n.9, p.822-5, 1997.

OKAMOTO H.; ACCILI D. In vivo mutagenesis of the insulin receptor. **J. Biol. Chem.** v.278, n.31, p.28359-62, 2003.

OLERUP O.; ZETTERQUIST H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens.** v.39, n.5, p.225-35, 1992.

PAULSEN M.; DAVIES K.R.; BOWDEN L.M.; VILLAR A.J.; FRANCK O.; FUERMANN M.; DEAN W.L.; MOORE T.F.; RODRIGUES N.; DAVIES K.E.; HU R.J.; FEINBERG A.P.; MAHER E.R.; REIK W.; WALTER J. Syntenic organization of the mouse distal chromosome 7 imprinting cluster and the Beckwith-Wiedemann syndrome region in chromosome 11p15.5. **Hum. Mol. Genet.** v.7, n.7, p.1149-59, 1998.

PERINATAL HIV GUIDELINES WORKING GROUP. Summary of the updated recommendations from the Public Health Service Task Force to reduce perinatal human immunodeficiency virus-1 transmission in the United States. **Obstet. Gynecol.** v.99, n.6, p.1117-26, 2002.

RANDHAWA R.; COHEN P. The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth. **Mol. Genet. Metab.** v.86, n.1-2, p.84-90, 2005.

READ J.S. ; CAHN P. ; LOSSO M. ; PINTO J. ; JOAO E. ; DUARTE G. ; CARDOSO E. ; FREIMANIS-HANCE L. ; STOSZEK SK. ; NISDI PERINATAL STUDY GROUP. Management of human immunodeficiency virus-infected pregnant women at Latin American and Caribbean sites. **Obstet. Gynecol.** v.109, n.6, p.1358-67, 2007.

REIK W.; CONSTANCIA M.; DEAN W.; DAVIES K.; BOWDEN L.; MURRELL A.; FEIL R.; WALTER J.; KELSEY G. Igf2 imprinting in development and disease. **Int. J. Dev. Biol.** v.44, n.1, p.145-50, 2000.

REIK W.; WALTER J. Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. **J. Nat. Genet.** v. 27, n.3, p.255-6, 2001.

SALMON WD J.R.; DAUGHADAY W.H. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. **J. Lab. Clin. Med.** v.49. n.6, p.825-36, 1957.

SANTOS-REBOUÇAS C.B.; PIMENTEL M.M. Implication of abnormal epigenetic patterns for human diseases. **Eur. J. Hum. Genet.** v.15, n.1, p.10-7, 2007.

SCOTT G.B.; TUOMALA R. Combination antiretroviral therapy during pregnancy. **AIDS.** v.12, p.2495-7, 1998.

SERRADAS P.; GOYA L.; LACORNE M.; GANGNERAU M.N.; RAMOS S.; ALVAREZ C.; PASCUAL-LEONE A.M.; PORTHA B. Fetal insulin-like growth factor-2 production is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. **Diabetes.** v.51, n.2, p.392-7, 2002.

SESTI G.; FEDERICI M.; LAURO D.; SBRACCIA P.; LAURO R. Molecular mechanism of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: role of the insulin receptor variant forms. **Diabetes. Metab. Res. Rev.** v.17, n.5, p.363-73, 2001.

SHIKUMA C.M.; YANG Y.; GLESBY M.J.; MEYER 3RD W.A.; TASHIMA K.T.; RIBAUDO H.J.; WEBB N.; BASTOW B.; KURITZKES D.R.; GULICK R.M. Metabolic effects of protease inhibitor-sparing antiretroviral regimens given as initial treatment of HIV-1 Infection (AIDS Clinical Trials Group Study A5095). **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.** v.44, n.5, p.540–50, 2007.

SLINGERLAND A.S. Monogenic diabetes in children and young adults: Challenges for researcher, clinician and patient. **Rev. Endocr. Metab. Disord.** v.7, n.3, p.171-85, 2006.

TADOKORO K.; FUJII H.; INOUE T.; YAMADA M. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of ApaI polymorphism at the insulin like growth factor II gene (IGF2). **Nucleic Acids Res.** v.19, n.24, p.6967, 1991.

'T HART LM; FRITSCHÉ A; RIETVELD I; DEKKER JM; NIJPELS G; MACHICAO F; STUMVOLL M.; VAN DUIJN C.M.; HÄRING H.U.; HEINE R.J.; MAASSEN J.A.; VAN HAEFTEN T.W. Genetic factors and insulin secretion: gene variants in the IGF genes. **Diabetes.** v. 53, n.S1, p.S26-30, 2004.

THIRONE AC, HUANG C, KLIP A. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. **Trends. Endocrinol. Metab.** v.17, n.2, p.72-8, 2006.

TIMMERMANS S.; TEMPELMAN C.; GODFRIED M.H.; NELLEN J.; DIELEMAN J.; SPRENGER H.; SCHNEIDER M.E.; DE WOLF F.; BOER K.; VAN DER ENDE M.E.; DUTCH HMF STUDY GROUP. Nelfinavir and nevirapine side effects during pregnancy. **AIDS**. v.19, n.8, p.795-9, 2005.

TUOMALA R.E.; WATTS D.H.; LI D.; VAJARANANT M.; PITT J.; HAMMILL H.; LANDESMAN S.; ZORRILLA C.; THOMPSON B.; WOMEN AND INFANTS TRANSMISSION STUDY. Improved obstetric outcomes and few maternal toxicities are associated with antiretroviral therapy, including highly active antiretroviral therapy during pregnancy. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.** v.38, n.4, p.449-73, 2005.

TYCKO B.; EFSTRATIADIS A. Genomic imprinting: piece of cake. **Nature**. v.417, n.6892, p.913-4, 2002.

UNAIDS - JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **AIDS Epidemic Update**. Dezembro 2006. Disponível em: <http://www.unaids.org>.

UKKOLA O.; SUN G.; BOUCHARD C. Insulin-like growth factor 2 (IGF2) and IGF-binding protein 1 (IGFBP1) gene variants are associated with overfeeding-induced metabolic changes. **Diabetologia**. v.44, n.12, p.2231-6, 2001.

VAN HAEFTEN T.W.; TWICKLER T.B. Insulin-like growth factors and pancreas beta cells. **Eur. J. Clin. Invest.** v.34, n.4, p.249-55, 2004.

WALTER J.; PAULSEN M. Imprinting and disease. **Semin. Cell. Dev. Biol.** v.14, n.1, p.101-10, 2003.

WEKSBERG R.; SMITH A.C.; SQUIRE J.; SADOWSKI P. Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. **Hum. Mol. Genet.** v.1, p.R61-8, 2003.

WHITE M.F. Regulating insulin signaling and beta-cell function through IRS proteins. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** v.84, n.7, p.725-37, 2006.

WOERLE H.J.; MARIUZ P.R.; MEYER C.; REICHMAN R.C.; POPA E.M.; DOSTOU J.M.; WELLE S.L.; GERICH J.E. Mechanisms for the deterioration in glucose tolerance associated with HIV protease inhibitor regimens. **Diabetes.** v.52, n.4, p.918-25, 2003.

WOOD A.J.; OAKLEY R.J. Genomic imprinting in mammals: emerging themes and established theories. **PLoS Genet.** v.2, n.11, p.e147, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. HIV/AIDS Programme. Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants: towards universal access. Recommendations for a public health approach. Geneva, WHO, 2006.

WRZESKA M.; REJDUCH B. Genomic imprinting in mammals. **J. Appl. Genet.** v.45, n.4, p.427-33, 2004.

YAMAGATA K.; FURUTA H.; ODA N.; KAISAKI P.J.; MENZEL S.; COX N.J.; FAJANS S.S.; SIGNORINI S.; STOFFEL M.; BELL G.I. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). **Nature.** v.384, n.6608, p.458-60, 1996.

8. ANEXOS

ANEXO 1



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 26 de setembro de 2007


Ofício nº 3338/2007
CEP/MGV

Senhor Professor,

O trabalho intitulado **“ESTUDO GENÉTICO DO POLIMORFISMO APA I DO GENE DO FATOR DE CRESCIMENTO INSULINA-LIKE II (IGF II) EM GESTANTES PORTADORAS DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1 (HIV-1) USUÁRIAS DE DROGAS ANTIRETROVIRAIS”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 255ª Reunião Ordinária realizada em 24/09/2007, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como **o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 7240/2007.

Lembramos que devem ser encaminhados a este CEP relatórios semestrais e relatório final da pesquisa.

Atenciosamente.


DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. GERALDO DUARTE(Orientador)
ALESSANRA CRISTINA MARCOLIN
Depto. de Ginecologia e Obstetrícia

ANEXO 2



CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 26 de maio de 2004

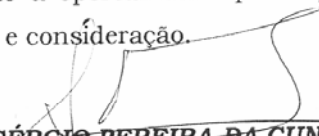
Ofício nº 1525/2004
CEP/SPC

Senhora Professora:

O trabalho intitulado **“ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA REGIÃO 11p15.5 NA PRÉ-ECLÂMPسيا”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 180ª Reunião Ordinária realizada em 24/05/2004, e enquadrado na categoria: **APROVADOS, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 4628/2004. Lembramos que devem ser encaminhados a este CEP relatórios semestrais e relatório final da pesquisa.

Entretanto, deve-se aguardar a manifestação da CONEP, pois o projeto será encaminhado para apreciação e aprovação.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.


PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
PROFª DRª ESTER SILVEIRA RAMOS
FRANCIELLE MARQUES ARAÚJO (Mestranda)
Docente de Genética - FMRP-USP

ANEXO 3



CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

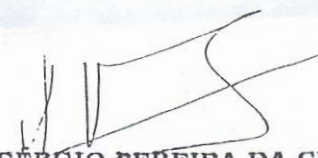
Ribeirão Preto, 08 de novembro de 2001

Ofício nº 3211/2001
CEP/SPC

Prezada Senhora:

O trabalho intitulado "EFEITO DAS DROGAS ANTI-RETROVIRAIS SOBRE O METABOLISMO GLICÊMICO E LIPÍDICO EM GESTANTES PORTADORAS DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1 (HIV-1)", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 119ª Reunião Ordinária realizada em 05/11/2001, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 6685/2001.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.


PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCFMRP-USP

Ilustríssima Senhora
DRª PATRÍCIA EL BEITUNE
Depto. de Ginecologia e Obstetrícia
Em mãos

*Comitê
Tivemos a oportunidade de
postar ao Prof. Gericimonte
do trabalho e orientado
Luz
R. Beitune, 26.11.01*

ANEXO 4



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 09 de outubro de 2007


Ofício nº 3521/2007
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 4865/2007

Prezada Senhora,

O Comitê de Ética em Pesquisa em sua 256ª Reunião Ordinária realizada em 08.10.2007, recebeu a “Proposta de criação do banco de amostras de sangue total de pacientes portadoras do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1)” e a enquadrando na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento de guarda de material, data da versão: 26 de setembro de 2007.**

Atenciosamente.


DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
ALESSANDRA CRISTINA MARCOLIN
Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia

ANEXO 5



FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO-USP DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

Av. Bandeirantes, 3900 - 8º andar - Ribeirão Preto-SP - CEP 14049- 900

Fone (016) 633-0216/633-1028 - Fax (016) 633-0946

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Data da versão: 20 de setembro de 2007

O preenchimento e assinatura deste termo de consentimento têm como objetivo a autorização para utilização da amostra de sangue da Senhora que já foi coletada e armazenada no banco de amostras denominado “Banco de amostras sanguíneas de gestantes portadoras de *Diabetes Mellitus* do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP” e seus responsáveis são o Prof. Dr. Geraldo Duarte (tel.: 3602-2588) e a Dra. Alessandra Cristina Marcolin (tel.: 36022804). Para relembrar, essa amostra de sangue foi coletada por ocasião da coleta de seus exames da rotina pré-natal ou da rotina de internação no Centro Obstétrico por ocasião do nascimento de seu filho.

Caso a senhora concorde em ter a amostra de sangue utilizada, este material será usado na pesquisa intitulada “**Estudo genético do polimorfismo ApAI do gene do fator de crescimento *insulina-like II (IGF-2)* em gestantes portadoras do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) usuárias de drogas antiretrovirais**”. Neste trabalho, será pesquisada a presença de um gene (parte do material genético da Senhora) que pode estar envolvido com o aparecimento da doença que a Senhora possui e que é chamada *Diabetes Mellitus*.

O estudo desse gene pode auxiliar o entendimento da *Diabetes* e assim, ajudar na escolha do melhor tratamento e das medicações para quem tem essa doença. Os resultados obtidos nessa pesquisa serão informados para a Senhora e serão publicados em uma revista médica para que outras pessoas possam aprender mais sobre essa doença. Será garantido o segredo de sua identidade. Além disso, a Senhora poderá desistir de participar dessa pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo de seu tratamento e acompanhamento por este hospital.

Autorizo que a amostra de sangue coletada e armazenada em banco de amostra seja utilizada nessa pesquisa, com meu consentimento.

Assinatura do paciente

Data

Nome da paciente _____

Endereço _____

Telefone _____

Eu conversei com a paciente sobre a utilização de sua amostra de sangue que está armazenada em banco de amostra, utilizando uma linguagem adequada e apropriada. Acredito que a informei o suficiente para tomada de decisão de maneira livre e esclarecida.

Assinatura do médico

Data

Nome, endereço e telefone dos responsáveis pela pesquisa:

Prof. Dr. Geraldo Duarte

Setor de Gestação de Alto Risco do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP

Tel.: 3602-2588 ou 3602-2804

Dra Alessandra Cristina Marcolin

Setor de Gestação de Alto Risco do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP

Tel.: 3602-2588 ou 3602-2804

ANEXO 6



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 26 de setembro de 2007


Ofício nº 3354/2007
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 5236/2007

Prezada Senhora,

O Comitê de Ética em Pesquisa em sua 255ª Reunião Ordinária realizada em 24.09.2007, recebeu a “Proposta de criação de um banco de amostras de sangue total de gestantes portadoras de diabetes mellitus no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP” e a enquadrrou na categoria: **APROVADO**, **bem como o Termo de Consentimento de Guarda de Material, versão de 20 de agosto de 2007.**

Atenciosamente.


DR^a MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
ALESSANDRA CRISTINA MARCOLIN
Depto. de Ginecologia e Obstetrícia

ANEXO 7

ARTIGO

RESUMO

Objetivo: Estudar o polimorfismo *IGF-2/ApaI* em gestantes portadoras do HIV-1 usuárias de antiretrovirais (ARV) que desenvolveram hiperglicemia ao longo do período gestacional.

Métodos: Estudo de coorte histórica com controle externo envolvendo 87 gestantes normais, 43 gestantes portadoras do HIV-1 usuárias de ARV que apresentaram acréscimo dos valores da Área sob a Curva das glicemias durante a gravidez e 43 diabéticas gestacionais, soronegativas para o HIV-1. A reação em cadeia da polimerase foi utilizada para amplificação do *IGF-2* a partir do DNA genômico do sangue periférico. Para avaliação do polimorfismo *IGF-2/ApaI* foi utilizada a técnica do polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição. Para análise estatística foram utilizados o teste *Kolmogorov-Smirnov*, *ANOVA* e o teste do Qui-quadrado.

Resultados: Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências genótípicas obtidas nos três grupos analisados. Considerando o grupo de portadoras do HIV-1, não houve diferenças na distribuição dos genótipos entre o grupo de usuárias de zidovudina e o de terapia tríplice. Não foram detectadas diferenças entre as frequências gênicas das populações examinadas neste estudo. Pacientes não brancas tiveram maior probabilidade de apresentarem o genótipo GG quando comparadas às gestantes brancas.

Conclusões: Com os resultados obtidos contribuiu-se para o melhor entendimento das alterações do metabolismo glicídico em gestantes submetidas à terapia ARV, desonerando o polimorfismo *IGF-2/ApaI* como único responsável pelas alterações. Esses dados sinalizam que outras variáveis devem ser estudadas para a elucidação dessas anormalidades.

Palavras-chave: gestação, HIV-1, *IGF-2*, antiretrovirais, hiperglicemia.

SUMMARY

Purpose: To study the *IGF-2/ApaI* polymorphism in HIV-1 infected pregnant women using antiretroviral drugs (ARV) with hyperglycemia during pregnancy.

Methods: Study of 87 healthy pregnant women, 43 HIV-1 infected pregnant women using ARV with a significant increase in the area under the glycemia curve along pregnancy and 43 pregnant women with gestational diabetes, HIV-1 negative. Blood samples were obtained for DNA extraction and the Polymerase Chain Reaction was performed to amplify the *IGF-2* sequence. Genotyping was carried out by enzymatic digestion with *ApaI*. The data were analyzed by *Kolmogorov-Smirnov* normality, *ANOVA* and Qui-square tests.

Results: There were no significant differences related to the genotypic frequencies of the three groups analyzed. Considering the HIV-1 infected pregnant women, there were no significant differences between the zidovudine group and the triple antiretroviral treatment group related to the genotypic frequencies. There were no significant differences related to the allelic frequencies of the all groups evaluated. Non-white pregnant women have a trend to present the GG genotypes compared to White pregnant women.

Conclusions: These results contribute to the better understanding about metabolic glyceemic disorders in HIV-1 infected pregnant women using ARV, removing the responsibility of *IGF-2/ApaI* polymorphisms as causative factor of the glyceemic alterations. These data point to the fact that others variables should be studied in order to explain those glyceemic abnormalities.

Keywords: pregnancy, HIV-1, *IGF-2*, antiretroviral, hyperglycemia.

**POLIMORFISMO *IGF-2/APAI* EM GESTANTES PORTADORAS DO
VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1 USUÁRIAS DE
ANTIRETROVIRAIS**

*IGF-2/APAI POLYMORPHISM IN HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS
TYPE 1 INFECTED PREGNANT WOMEN USING ANTIRETROVIRAL DRUGS*

INTRODUÇÃO

Desde seu reconhecimento em 1981, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) tem sofrido notáveis transformações ao longo dos últimos 26 anos. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, a crescente prevalência da SIDA nos últimos tempos qualifica-a como a principal pandemia dos tempos modernos. Avaliando a evolução cronológica das taxas de prevalência de SIDA entre as mulheres, verifica-se um aumento considerável do número de casos neste segmento populacional, principalmente entre as pacientes em idade reprodutiva, aumentando o número de casos de transmissão vertical (TV) desse vírus^{1,2}.

Sem qualquer intervenção durante o período gestacional e puerperal, a TV do HIV-1 é de 15 a 25% entre portadoras do vírus que não amamentam e de 25 a 45% entre aquelas que amamentam³. Porém, o risco da TV do HIV-1 pode ser reduzido para cifras inferiores a 2% por meio do uso de diversas intervenções, tais como a administração de terapêutica antiretroviral para a gestante durante a gravidez e no trabalho de parto, a realização de procedimentos obstétricos incluindo a cesárea eletiva e a contra-indicação da amamentação. Além disso, o fornecimento de drogas antiretrovirais ao recém-nascido nas suas primeiras semanas de vida tem papel relevante⁴⁻⁶.

Ensaio clínico têm demonstrado que esquemas terapêuticos que levam em consideração a associação de vários ARV possuem potente ação contra o HIV-1, reduzindo

significativamente a carga viral materna e conseqüentemente o risco de TV⁷⁻¹⁰. Por outro lado, efeitos adversos conseqüentes ao uso dessas drogas, tanto maternos como fetais, estão bem estabelecidos na literatura mundial ^{7-9,11-13}.

Destaque deve ser dado à resistência periférica à insulina e ao *Diabetes mellitus* (DM) materna, intercorrente em uma proporção significativa de gestantes usuárias de ARV. Estudos avaliando os efeitos dos IP em pacientes não gestantes portadores do HIV-1 têm demonstrado resistência periférica insulínica, hiperglicemia, DM e até mesmo casos de cetoacidose diabética. HADIGAN et al. (2001)¹⁴ demonstraram que a positividade pelo HIV-1 confere um aumento de 3,1 vezes no risco de DM.

Os regimes antiretrovirais contendo inibidores da protease (IP) podem levar a intolerância à glicose por dois mecanismos: primeiro, pela indução periférica de resistência à insulina e segundo, pela incapacidade das células β pancreáticas em compensar o aumento da resistência periférica aumentando a produção de insulina¹⁵. Portanto, na maior parte dos casos a intolerância à glicose existente em pacientes usuários de ARV cursa com hiperinsulinemia, semelhante ao DM tipo 2 ^{7,16,17}. Em outras situações, os IP causam insulinopenia, semelhantemente ao DM tipo 1. Estudos experimentais têm mostrado que a maioria dos ARV reduz a tolerância à glicose por dois possíveis mecanismos: comprometem a secreção e ação da insulina ou exercem toxicidade direta sobre as células β pancreáticas, culminando com morte destas células, insulinopenia e hiperglicemia ¹⁸.

Nesse contexto, encontram-se na literatura algumas publicações mencionando o efeito de distúrbios da expressão dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) na função da célula β pancreática, levando à alterações do metabolismo glicídico. Desequilíbrios entre a renovação e apoptose das células β , conseqüentes a níveis plasmáticos alterados de IGF-II, são de grande importância para o aparecimento de distúrbios na homeostase da glicose, principalmente por alterações no número dessas células e defeitos na secreção de insulina

^{19,20}. Em humanos adultos, polimorfismos do *IGF-2/ApaI* têm sido associados com predisposição à obesidade e à distúrbios característicos de síndromes metabólicas, tais como: resistência periférica à insulina, distúrbios da secreção de insulina e aumento de gordura visceral e subcutânea ²¹⁻²⁴. Visto isso, mais estudos são necessários para a elucidação das bases do metabolismo glicídico e para que se possa atribuir ou não a hiperglicemia vista em gestantes portadoras do HIV-1 ao uso de ARV. Propusemos, portanto, o presente estudo a fim de avaliar o polimorfismo *IGF-2/ApaI* em gestantes portadoras do HIV-1 usuárias de ARV que desenvolveram hiperglicemia ao longo do período gestacional.

PACIENTES E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP em conjunto com o Departamento de Genética da FMRP-USP, após sua aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Foi um estudo de coorte histórica com controle externo, no qual foram selecionadas 173 pacientes.

As pacientes foram divididas em três grupos: 87 gestantes da população geral consideradas normais do ponto de vista clínico e laboratorial, sem antecedentes mórbidos pessoais ou história familiar de DM, seguidas no Ambulatório de Pré-Natal Normal do HCFMRP-USP, 43 gestantes portadoras do HIV-1 seguidas no Ambulatório de Moléstias Infecto-Contagiosas em Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP, usuárias de ARV e que desenvolveram hiperglicemia e hipoinsulinemia ao longo da gestação, segundo resultados apresentados no trabalho realizado por EL BEITUNE (2004)¹² e 43 gestantes com diagnóstico, no 2º trimestre, de *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) recrutadas no Ambulatório de Gestação de Alto Risco ou no Centro Obstétrico do HCFMRP-USP.

Das 43 pacientes portadoras do HIV-1 selecionadas para este trabalho, 17 eram usuárias apenas de AZT (600 mg/dia) para profilaxia da transmissão vertical e 26 eram usuárias de terapia tríplice (AZT 600 mg/dia + Lamivudina 300 mg/dia e Nelfinavir 2500 mg/dia, divididos em duas tomadas diárias). A prescrição dessas drogas levou em consideração: a idade gestacional de seu início, a contagem de linfócitos CD4, a quantificação da carga viral do HIV-1 e as condições de saúde da paciente, seguindo os critérios estabelecidos pelo *Perinatal HIV Guidelines Working Group Members*²⁵ (2002) para tratamento de gestantes e pelo protocolo assistencial de gestantes portadoras do HIV-1 do HCFMRP-USP. Foram excluídas pacientes que apresentaram DM prévio a gestação em questão, história familiar de DM, uso incorreto dos ARV, obesidade (índice de massa corporal $> 30 \text{ Kg/m}^2$) e uso de drogas hiperglicemiantes (por exemplo, corticóides).

O diagnóstico de DMG foi estabelecido por meio do teste oral de tolerância à glicose com 75 gramas de dextrose (GTT 75g) realizado no 2^o trimestre gestacional. Foram consideradas diabéticas as gestantes que apresentaram um ou dois dos resultados alterados (glicemia de jejum ≥ 126 mg% e/ou glicemia de duas horas após 75g de dextrose ≥ 140 mg%). Foram excluídas pacientes com outros processos patológicos além do DMG, aquelas com gestação múltipla, usuárias de terapêutica hiperglicemiante e obesas.

De todas as pacientes foram coletados 10 ml de sangue periférico, em tubos estéreis contendo EDTA, pelo sistema *Vacutainer*, após esclarecimento sobre a pesquisa e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Para a realização do estudo do polimorfismo *IGF-2/ApaI* houve a necessidade de extração de DNA genômico a partir das amostras de sangue total, pelo método de extração e precipitação em NaCl²⁶. O DNA foi quantificado por meio de espectrofotômetro, considerando-se a densidade óptica (DO) de 260 nm para obtenção da quantidade de DNA e a de 280 nm para a obtenção da quantidade de proteína. A relação entre DO 260/DO 280 sempre esteve abaixo de dois.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizada para amplificação da seqüência do gene estudado (*IGF-2*). As condições da PCR foram padronizadas para cada par de *primers*. As reações foram realizadas em um aparelho termociclador programável T-gradiente (Biometra), seguindo os protocolos recomendados pelos fabricantes e descritos por INNIS *et al.* (1990)²⁷. Para o *IGF-2* foram utilizados *primers* específicos para amplificar o fragmento de 236 pares de bases que contém o local do polimorfismo: *primer sense* (5'-CTTGACTTTGAGTCAAATTGG-3') e *antisense* (5'-CCTCCTTTGGTCTTACTGGG-3') descritos por TADOKORO *et al.* (1991)²⁸.

O protocolo de amplificação para a seqüência do *IGF-2* constituiu-se de um ciclo de 94°C por 5 minutos, 60°C por 1 minuto e trinta segundos e 72°C por trinta segundos, seguido

por 39 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. A PCR do *IGF-2* dá origem a fragmentos amplificados de 236 pb (figura 1).

Para identificação do polimorfismo *IGF-2/ApaI* foi utilizada a técnica do polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP). Os produtos da PCR foram submetidos à digestão enzimática por mais de 12 horas nas condições ótimas de restrição, à 37°C, com a enzima de restrição *ApaI* (20U) e o tampão recomendado pelo fabricante.

Após o término do processo de digestão enzimática do produto da PCR, os alelos foram diferenciados pelo padrão de migração eletroforética dos fragmentos de restrição em gel de agarose a 2%, utilizando-se TBE como tampão de corrida e brometo de etídio como corante. A diferença dos alelos envolvidos em cada genótipo foi estabelecida pela presença ou não do sítio de restrição GGGCC/CC neste fragmento, o qual é reconhecido e clivado pela enzima de restrição. Na ausência do sítio de restrição e, conseqüentemente, da digestão enzimática o fragmento gerado é de 236 pb (alelo A e genótipo AA). Na presença do sítio de restrição são produzidos dois fragmentos, um de 173 pb (alelo G e genótipo GG) e outro de 63 pb (o qual não é visualizado) e, quando presente em apenas um cromossomo (heterozigoto AG), são gerados três fragmentos, um de 236 pb, um de 173 pb e outro de 63 pb (figura 2). Os fragmentos foram visualizados por transiluminação (luz UV).

Para documentação dos resultados foi utilizado o programa Kodak Digital Science – 1D Image Analysis Software.

Os dados foram analisados por meio do software *GraphPad Prism version 3.00 for Windows* (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia USA, www.graphpad.com). Para verificar a homogeneidade da variável idade foi utilizado o teste não-paramétrico de *Kolmogorov-Smirnov* e para comparação desta variável entre os três grupos estudados foi utilizado teste *ANOVA* com pós-teste de *Newman-keuls*. Para comparação entre as variáveis qualitativas foi utilizado o teste do Qui-quadrado. O nível de significância adotado neste estudo foi de 5%.

RESULTADOS

Os dados demográficos referentes aos três grupos estudados encontram-se na tabela 1. Se analisarmos a idade materna, observamos que existem diferenças significativas entre as idades das pacientes diabéticas quando comparadas às idades das pacientes do grupo de portadoras do HIV-1 e do grupo de diabéticas gestacionais ($p < 0,05$).

Com relação à cor da pele, não houve diferenças significativas entre os grupos estudados. Com relação à história obstétrica, observamos que houve semelhanças na distribuição das pacientes normais e do grupo de diabéticas ($p=0,90$) com relação ao número de gestações. Por outro lado, a grande maioria das pacientes soropositivas para o HIV-1 são multigestas, com diferença significativa entre estas e os dois outros grupos ($p= 0,002$). Com relação à paridade, foram observadas semelhanças na distribuição das pacientes nos três grupos analisados ($p=0,12$), o mesmo ocorrendo com os abortos clinicamente evidenciados ($p=0,08$).

Os dados relacionados à avaliação genotípica encontram-se na Tabela 2 e Figura 3. Ao submeter os três grupos (normais, HIV-1 positivas e diabéticas) à análise estatística, observamos que não existiram diferenças significativas entre as frequências genotípicas encontradas para os grupos analisados ($p=0,29$). Se o grupo de gestantes portadoras do HIV-1 for dividido de acordo com a terapêutica administrada, ou seja, usuárias de AZT ou usuárias de terapia tríplice, a fim de compararmos as frequências genotípicas entre ambos os grupos, o resultado nos mostra que não há diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p=0,75$).

Quando comparamos a distribuição dos genótipos entre pacientes brancas e não brancas observamos que existe diferença significativa entre essas duas populações analisadas ($p=0,03$). Porém, deve-se ter cautela nessa avaliação, uma vez que o grupo de não brancas com genótipo AA é muito pequeno ($n=1$). Talvez seja mais prudente dizer que pacientes não brancas têm maior probabilidade de apresentarem o genótipo GG.

Devido à reduzida frequência do homozigoto AA, as frequências genotípicas nas amostras estudadas foram reavaliadas reagrupando os genótipos encontrados em dois novos grupos (GG e AG + AA). Não foram detectadas diferenças significativas entre as gestantes normais, soropositivas para o HIV-1 e as diabéticas gestacionais ($p=0,09$). Porém, ao se realizar uma comparação entre o grupo de gestantes normais com o de soropositivas para o HIV-1 detectou-se que as pacientes HIV-1 positivo têm uma tendência maior em apresentar genótipos com o alelo A ($p=0,05$). O mesmo resultado foi obtido quando se submeteu à análise os grupos de pacientes diabéticas e as soropositivas ($p=0,05$).

Os dados sobre as frequências gênicas em cada grupo examinado estão apresentados na Tabela 3. Avaliando-se as frequências gênicas, ou seja, as frequências do alelo G [$f(G)$] e as frequências do alelo A [$f(A)$], não foram detectadas diferenças significativas entre as três populações examinadas ($p=0,28$).

DISCUSSÃO

Vários fatores justificam a importância dos distúrbios na homeostase da glicose em pacientes portadores do HIV-1 usuários de ARV, destacando-se a elevada prevalência, o conhecimento restrito sobre a etiologia dessas alterações e as conseqüências de seu aparecimento nessa população. As anormalidades do metabolismo glicídico podem envolver a ocorrência de resistência insulínica periférica, hiperinsulinemia e hiperglicemia, simulando o DM tipo 2^{7,16,17}. Por outro lado, quadros semelhantes ao DM tipo 1, caracterizados por insulinopenia e hiperglicemia, também já foram citados na literatura mundial^{15,18,29}.

Os aspectos genéticos do DM são estudados há várias décadas, com o objetivo de se descobrir o padrão de herança envolvido na sua complexa etiologia. A destruição auto-imune das células β pancreáticas está associada à predisposição genética, porém também se relaciona a fatores ambientais mal definidos³⁰. Por outro lado, a grande maioria dos pacientes com DM possui formas da doença relacionadas à obesidade e à secreção de insulina defeituosa e insuficiente para compensar a resistência periférica ao hormônio³¹.

Os distúrbios metabólicos também podem se associar a mutações no gene do receptor de insulina e a mutações nos genes que codificam os vários componentes celulares protéicos que coordenam as complexas vias de resposta à insulina após a ligação deste hormônio ao seu receptor^{32,33}. Ainda dentro desta linha de raciocínio relacionada à genética dos distúrbios metabólicos, existem os polimorfismos do gene do *IGF-2*. Na vida adulta, o *IGF-2* influencia o crescimento e desenvolvimento das células β pancreáticas, agindo na replicação, renovação e apoptose celular³⁴. Distúrbios nessas funções celulares são de grande importância para o aparecimento de intolerância à glicose, secundariamente a alterações no número de células e defeitos na secreção de insulina¹⁹.

Neste contexto, a presente pesquisa é original, pois estudou o polimorfismo *IGF-2/ApaI* em mulheres portadoras do HIV-1 usuárias de ARV que desenvolveram hiperglicemia

ao longo do período gestacional e comparou os achados neste grupo com os resultados obtidos para o grupo de pacientes consideradas normais e com aqueles de portadoras de DMG.

Considerando o estudo do polimorfismo *IGF-2/ApaI*, os grupos analisados no presente trabalho não apresentaram diferenças significativas entre as frequências genóticas encontradas para eles. Na literatura existem poucos trabalhos associando o polimorfismo do *IGF-2/ApaI* aos distúrbios do metabolismo glicídico. Em 1997, O'DELL et al.²¹ realizaram um estudo denominado “Northwick Park Heart Study II (NPHSII)”, no qual foi estudado o polimorfismo do *IGF-2/ApaI* (alelos A e G) em 2560 homens de meia idade. Os autores relataram que os homozigotos AA mostraram um peso corporal médio 4,0 kg menor que os homozigotos GG, com resultados intermediários para os heterozigotos AG. Eles concluíram que os homozigotos GG têm um risco 1,67 vezes maior de ter IMC anormal e as complicações resultantes de sua ocorrência. Não existem diferenças significativas entre as frequências genóticas obtidas no estudo do NPHSII com as do presente trabalho.

Um estudo brasileiro realizado por GOMES et al. (2005)²⁴ testou a associação entre o polimorfismo *IGF-2/ApaI* e o IMC de 294 voluntários saudáveis (95 homens e 199 mulheres) de 18 a 30 anos e correlacionou os resultados com seus pesos de nascimento (PN). Os autores relataram que embora os genótipos do *IGF-2* não tenham sido significativamente associados com o IMC ou com o PN, houve uma correlação significativa entre o PN e o IMC de indivíduos homozigotos GG que tenham nascido com mais de 3.500 gramas. Eles sugerem que PN elevado associado com homozigose do alelo G pode ser um fator importante na predisposição à obesidade e suas complicações no adulto. Também não existem diferenças significativas entre as frequências genóticas obtidas no trabalho de GOMES et al. (2005)²⁴ e as frequências dos genótipos encontrados nos três grupos avaliados na presente pesquisa.

Devido à similaridade existente entre as frequências genótípicas encontradas nos trabalhos analisados até o momento e os resultados obtidos na presente pesquisa pode-se inferir que as alterações na homeostase da glicose demonstradas no grupo de pacientes portadoras do HIV-1 não são secundárias à prevalência maior de um genótipo, ou que um determinado polimorfismo genético do *IGF-2* estaria, isoladamente, levando a essas modificações no metabolismo glicídico.

Em outro trabalho, 'T HART et al. (2004)²³ selecionaram indivíduos caucasianos normais e intolerantes à glicose, de acordo com resultados obtidos por GTT 75g e os submeteram ao *clamp* hiperglicêmico. Não foram encontradas diferenças significativas com relação aos valores de glicose e insulina obtidos durante o teste de sobrecarga e tanto a primeira quanto a segunda fase de secreção da insulina estimulada pela glicose não foram diferentes, independentemente dos genótipos *IGF-2/ApaI*. As frequências genótípicas encontradas neste trabalho não diferem significativamente entre os grupos e também não diferem da distribuição genotípica existentes nos grupos de pacientes normais, portadoras do HIV-1 e de diabéticas gestacionais. Mais uma vez o polimorfismo *IGF-2/ApaI* parece não ser o único responsável pelas alterações no metabolismo da glicose.

Para UKKOLA et al. (2001)²², em resposta a uma dieta hipercalórica, indivíduos portadores do genótipo *IGF-2/ApaI* GG apresentam sensibilidade reduzida à insulina. Na presente pesquisa, as pacientes portadoras do HIV-1, que apresentam hiperglicemia e hipoinsulinemia, mostram uma tendência maior em apresentar genótipos com o alelo A quando comparadas às pacientes diabéticas gestacionais, as quais apresentam hiperinsulinemia e resistência periférica à insulina, como é de conhecimento comprovado na literatura específica³⁵. Pode ser que os mecanismos fisiopatológicos que levam aos distúrbios da homeostase da glicose sejam diferentes para os diversos genótipos.

As frequências gênicas, ou seja, aquelas relacionadas aos alelos que dão origem aos genótipos também foram avaliadas neste trabalho. Ao confrontar os resultados obtidos aqui com aqueles recuperados por O'DELL et al. (1997)²¹ e por GOMES et al. (2005)²⁴ não se observam diferenças significativas entre as frequências gênicas existentes nas populações estudadas por estes autores e as frequências gênicas obtidas na presente pesquisa.

Também não foram observadas diferenças significativas entre as frequências gênicas encontradas na população estudada por 'T HART et al. (2004)²³ e as frequências obtidas nos grupos delineados nesta pesquisa. Comparando-se as frequências gênicas obtidas no grupo de intolerantes à glicose com os resultados de nosso grupo de portadoras do HIV-1 e de diabéticas, também não se obteve qualquer significância estatística.

Outros dados demográficos foram analisados a fim de buscar fatores de risco para os distúrbios glicídicos. As pacientes diabéticas são mais velhas que as pacientes pertencentes aos outros dois grupos analisados. Este achado coincide com a prevalência mais elevada de DMG em gestantes com idade mais elevada, fato que é corroborado pelas orientações estabelecidas pela *American Diabetes Association* (2005)³⁶ para o diagnóstico do DMG. A semelhança entre as idades das pacientes normais e das gestantes portadoras do HIV-1 torna pouco provável a influência da idade sobre a ocorrência da hiperglicemia neste último grupo.

Existem informações limitadas na literatura relacionadas ao impacto da etnia sobre a apresentação clínica e progressão das alterações no metabolismo da glicose. Indivíduos afro-descendentes, asiáticos e hispânicos ou latinos apresentam risco mais elevado que a população caucasiana de desenvolverem *Diabetes mellitus* e suas complicações³⁷⁻³⁹. Fatores ambientais e genéticos complexos são responsáveis por essa disparidade.

Sendo o genótipo de um indivíduo o responsável pelas suas características, foram analisadas as frequências genotípicas das pacientes do presente estudo com relação à cor da pele das mesmas. Verificou-se que as pacientes não brancas têm maior probabilidade de

apresentar o genótipo GG, sem haver diferença significativa entre os grupos analisados, ou seja, de brancas e não brancas. Como os trabalhos existentes na literatura tentam associar o genótipo GG aos distúrbios da glicose, torna-se prudente destacar que pacientes não brancas talvez tenham uma prevalência maior de hiperglicemia e DM durante a gravidez. Porém, cumpre lembrar que neste trabalho não foram demonstradas diferenças significantes entre os grupos estudados com relação ao dado demográfico cor da pele. Não há trabalhos divulgados nos principais bancos de dados de literatura científica que mostrem valores de normalidade das frequências genotípicas nos vários grupos étnicos.

Já é de domínio da comunidade científica que pacientes grandes múltiparas, estão sob maior risco para o desenvolvimento de DM. Em 2002, BAI et al.⁴⁰ avaliaram prospectivamente 510.989 gestantes e mostraram que a grande multiparidade está associada à DMG, entre outras complicações obstétricas. Neste contexto, não foram encontradas diferenças significativas relacionada à multiparidade entre os três grupos de analisados neste trabalho. O fator multiparidade parece não estar influenciando a prevalência mais elevada de hiperglicemia no grupo das portadoras do HIV-1.

O IGF-II tem um papel fundamental na divisão e diferenciação celular, particularmente durante o período perinatal. Distúrbios na sua produção, a qual é determinada geneticamente, podem estar associados a várias doenças que se estabelecem na infância, adolescência e vida adulta, como aterosclerose, *Diabetes mellitus* e neoplasias⁴¹. Por outro lado, o gene *IGF-2* pode atuar modificando a susceptibilidade de um indivíduo a uma doença, ou seja, pode aumentar o risco de ocorrência de um estado patológico sem que ele seja expresso. Em diversas ocasiões, a simples existência do gene pode não ser suficiente para explicar o desenvolvimento de uma patologia quando avaliado isoladamente⁴². O polimorfismo do *IGF-2* está localizado em uma região que não é codificada e que, portanto, não causa alterações na seqüência de aminoácidos da proteína IGF-II. Porém, esse polimorfismo

poderia estar associado com outras mutações que têm maior significado funcional, influenciando desta forma, a susceptibilidade de um organismo a uma doença²². Além disso, os polimorfismos relacionados às moléculas do sistema IGF podem afetar a transcrição ou o processamento de RNA mensageiros⁴¹.

Com os resultados obtidos até o momento, contribuí-se para o conhecimento das alterações do metabolismo glicídico em gestantes submetidas à terapia ARV, desonerando os polimorfismos do *IGF-2* como responsáveis por essas alterações. Esses dados sinalizam que outras variáveis devem ser estudadas para a elucidação dessas anormalidades, talvez sendo necessário aprofundar os estudos experimentais neste campo, a fim de identificar subgrupos de gestantes que possam se beneficiar de medidas preventivas e/ou terapêuticas.

BIBLIOGRAFIA

1. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL – SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS. Recomendações para Profilaxia da Transmissão Vertical do HIV e Terapia Anti-Retroviral em Gestantes. Brasília, 2006.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. HIV/AIDS Programme. Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants: towards universal access. Recommendations for a public health approach. Geneva, WHO, 2006.
3. JOHN-STEWART G.; MBORI-NGACHA D.; EKPINI R.; JOHN-STEWART G.; MBORI-NGACHA D.; EKPINI R.; JANOFF E.N.; NKENGASONG J.; READ J.S.; VAN DE PERRE P.; NEWELL M.L.; GHENT IAS WORKING GROUP ON HIV IN WOMEN CHILDREN. Breast-feeding and transmission of HIV-1. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v.35, p.196-202, 2004.
4. INTERNATIONAL PERINATAL HIV GROUP. The mode of delivery and the risk of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1—a meta-analysis of 15 prospective cohort studies. **N. Engl. J. Med.**, v.340, p.977–87, 1999.
5. EUROPEAN MODE OF DELIVERY COLLABORATION. Elective cesarean section versus vaginal delivery in prevention of vertical HIV-1 transmission: a randomised clinical trial. **Lancet**. v.353, n.9158, p.1035–9, 1999.
6. EUROPEAN COLLABORATIVE GROUP. Mother-to-child transmission of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. **Clinical Infectious Diseases**. v.40, n. 3, p.458–65, 2005.
7. TUOMALA R.E.; WATTS D.H.; LI D.; VAJARANANT M.; PITT J.; HAMMILL H.; LANDESMAN S.; ZORRILLA C.; THOMPSON B.; WOMEN AND INFANTS TRANSMISSION STUDY. Improved obstetric outcomes and few maternal toxicities are

associated with antiretroviral therapy, including highly active antiretroviral therapy during pregnancy. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v.38, n.4, p.449-73, 2005.

8. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Public Health Service Task Force. Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV-1-Infected Women for Maternal Health and Interventions to Reduce Perinatal HIV-1 Transmission in the United States. **MMWR**. v., p.1-96, 2007.

9. EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY. Exposure to antiretroviral therapy in utero or early life: the health of uninfected children born to HIV-infected woman. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v.32, n.4, p.380-387, 2003.

10. READ J.S. ; CAHN P. ; LOSSO M. ; PINTO J. ; JOAO E. ; DUARTE G. ; CARDOSO E. ; FREIMANIS-HANCE L. ; STOSZEK SK. ; NISDI PERINATAL STUDY GROUP. Management of human immunodeficiency virus-infected pregnant women at Latin American and Caribbean sites. **Obstet. Gynecol.**, v.109, n.6, p.1358-67, 2007.

11. LANDREAU-MASCARO A.; BARRET B.; MAYAUX M.J.; TARDIEU M.; BLANCHE S.; FRENCH PERINATAL COHORT STUDY GROUP. Risk of early febrile seizure with perinatal exposure to nucleoside analogues. **Lancet**. v.359, n.9306, p.583-4, 2002.

12. EL BEITUNE P. Efeito do uso de antiretrovirais em gestantes portadoras do HIV-1 sobre o metabolismo glicídico materno e parâmetros antropométricos e bioquímicos do neonato. 2004. 101f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

13. MUSSI-PINHATA M.M.; REGO M.A.; FREIMANIS L.; KAKEHASI F.M.; MACHADO D.M.; CARDOSO E.M.; READ J.S.; FOR THE NISDI PERINATAL PROTOCOL STUDY GROUP. Maternal antiretrovirals and hepatic enzyme, hematologic abnormalities among human immunodeficiency virus type 1-uninfected infants: The NISDI Perinatal Study. **Pediatr. Infect. Dis. J.** v.26, n.11, p.1032-7, 2007.

14. HADIGAN C.; MEIGS J.B.; CORCORAN C.; RIETSCHEL P.; PIECUCH S.; BASGOZ N.; DAVIS B.; SAX P.; STANLEY T.; WILSON P.W.; D'AGOSTINO R.B.; GRINSPOON S. Metabolic abnormalities and cardiovascular disease risk factors in adults with human immunodeficiency virus infection and lipodystrophy. **Clin Infect Dis.** v.32, n.1, p.130-9, 2001.
15. WOERLE H.J.; MARIUZ P.R.; MEYER C.; REICHMAN R.C.; POPA E.M.; DOSTOU J.M.; WELLE S.L.; GERICH J.E. Mechanisms for the deterioration in glucose tolerance associated with HIV protease inhibitor regimens. **Diabetes.** v.52, n.4, p.918-25, 2003.
16. MURATA H.; HRUZ P.W.; MUECKLER M. The mechanism of insulin resistance caused by HIV protease inhibitor therapy. **J. Biol. Chem.** v.275, n.27, p.20251-4, 2000.
17. SHIKUMA C.M.; YANG Y.; GLESBY M.J.; MEYER 3RD W.A.; TASHIMA K.T.; RIBAUDO H.J.; WEBB N.; BASTOW B.; KURITZKES D.R.; GULICK R.M. Metabolic effects of protease inhibitor-sparing antiretroviral regimens given as initial treatment of HIV-1 Infection (AIDS Clinical Trials Group Study A5095). **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.** v.44, n.5, p.540–50, 2007.
18. FIGUEIRO'-FILHO E.A.; EL BEITUNE P.; RUDGE M.V.C.; QUINTANA S.M.; MARCOLIN A.C.; DUARTE G. Efeitos das drogas antiretrovirais sobre o metabolismo glicídico e células de Langerhans de pâncreas de ratas Wistar prenhes. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v.26, p.369 –375, 2004.
19. KIM J.J.; ACCILI D. Signalling through IGF-I and insulin receptors: where is the specificity? **Growth Horm. IGF Res.** v.12, n.2, p.84-90, 2002.
20. VAN HAEFTEN T.W.; TWICKLER T.B. Insulin-like growth factors and pancreas beta cells. **Eur. J. Clin. Invest.** v.34, n.4, p.249-55, 2004.
21. O'DELL S.D.; MILLER G.J.; COOPER J.A.; HINDMARSH P.C.; PRINGLE P.J.; FORD H.; HUMPHRIES S.E.; DAY I.N. Apal polymorphism in insulin-like growth factor II (IGF2)

- gene and weight in middle-aged males. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.** v.21, n.9, p.822-5, 1997.
22. UKKOLA O.; SUN G.; BOUCHARD C. Insulin-like growth factor 2 (IGF2) and IGF-binding protein 1 (IGFBP1) gene variants are associated with overfeeding-induced metabolic changes. **Diabetologia.** v.44, n.12, p.2231-6, 2001.
23. 'T HART LM; FRITSCHÉ A; RIETVELD I; DEKKER JM; NIJPELS G; MACHICAO F; STUMVOLL M.; VAN DUIJN C.M.; HÄRING H.U.; HEINE R.J.; MAASSEN J.A.; VAN HAEFTEN T.W. Genetic factors and insulin secretion: gene variants in the IGF genes. **Diabetes.** v. 53, n.S1, p.S26-30, 2004.
24. GOMES M.V.; SOARES M.R.; PASQUALIM-NETO A.; MARCONDES C.R.; LÔBO R.B.; RAMOS E.S. Association between birth weight, body mass index and IGF2/ApaI polymorphism. **Growth Horm. IGF Res.** v.15, n.5, p.360-2, 2005.
25. PERINATAL HIV GUIDELINES WORKING GROUP. Summary of the updated recommendations from the Public Health Service Task Force to reduce perinatal human immunodeficiency virus-1 transmission in the United States. **Obstet. Gynecol.** v.99, n.6, p.1117-26, 2002.
26. OLERUP O.; ZETTERQUIST H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens.** v.39, n.5, p.225-35, 1992.
27. INNIS M.A.; GELFAND D.H.; SNISSKY H.J.; WHITE T.J. **PCR Protocols.** A guide to methods and applications. San Diego; Academic Press, 1990).
28. TADOKORO K.; FUJII H.; INOUE T.; YAMADA M. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of ApaI polymorphism at the insulin like growth factor II gene (IGF2). **Nucleic Acids Res.** v.19, n.24, p.6967, 1991.

29. BEHRENS G.; DEJAM A.; SCHMIDT H.; BALKS H.J.; BRABANT G.; KÖRNER T.; STOLL M.; SCHMIDT R.E. Impaired glucose tolerance, beta cell function and lipid metabolism in HIV patients under treatment with protease inhibitors. **AIDS**. v.13, n.10, p.F63-70, 1999.
30. KIM M.S.; POLYCHRONAKOS C. Immunogenetics of type 1 diabetes. **Horm. Res.** v.64, n.4, p.180-8, 2005.
31. SLINGERLAND A.S. Monogenic diabetes in children and young adults: Challenges for researcher, clinician and patient. **Rev. Endocr. Metab. Disord.** v.7, n.3, p.171-85, 2006.
32. OKAMOTO H.; ACCILI D. In vivo mutagenesis of the insulin receptor. **J. Biol. Chem.** v.278, n.31, p.28359-62, 2003.
33. WHITE M.F. Regulating insulin signaling and beta-cell function through IRS proteins. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** v.84, n.7, p.725-37, 2006.
34. BONNER-WEIR S. Life and death of the pancreatic beta cells. **Trends Endocrinol. Metab.** v. 11, p.375-8, 2000.
35. BUTTE, N.F. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy; normal compared with gestational diabetes mellitus. **Am J Clin Nutr**, v.7(suppl.), p.1256-61, 2000.
36. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care.** v.28, n.S1, p.S37-42, 2005.
37. MARSHALL M.C. Jr. Diabetes in African Americans. **Postgrad. Med. J.** v.81, n.962, p.734-40, 2005.
38. CABALLERO A.E. Type 2 diabetes in the Hispanic or Latino population: challenges and opportunities. **Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.** v.14, n.2, p.151-7, 2007.
39. MISRA A.; MISRA R.; WIJESURIYA M.; BANERJEE D. The metabolic syndrome in South Asians: continuing escalation & possible solutions. **Indian J. Med. Res.** v.125, n.3, p.345-54, 2007.

40. BAI J.; WONG W.S.; BAUMAN A.; MOHSIN M. Parity and pregnancy outcomes. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v.186, p.274-8, 2002.
41. RANDHAWA R.; COHEN P. The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth. **Mol. Genet. Metab.** v.86, n.1-2, p.84-90, 2005.
42. O'DELL S.D.; BUJAC S.R.; MILLER G.J.; DAY I.N. Associations of IGF2 ApaI RFLP and INS VNTR class I allele size with obesity. **Eur. J. Hum. Genet.** v.7, n.7, p.821-7, 1999.

M S S S S S S S S S S B

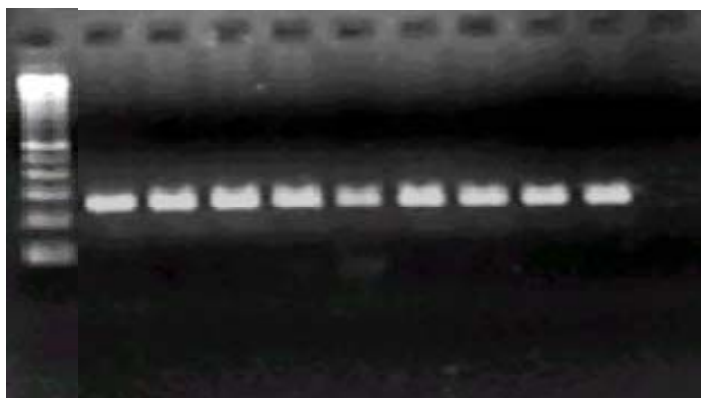


Figura 1. Produto de PCR do *IGF-2*. Amplificação de fragmentos de 236 pb. Note a ausência de amplificação em B. (M) marcador (padrão de pares de base), (S) fragmento amplificado, (B) branco, reação sem *primers*.

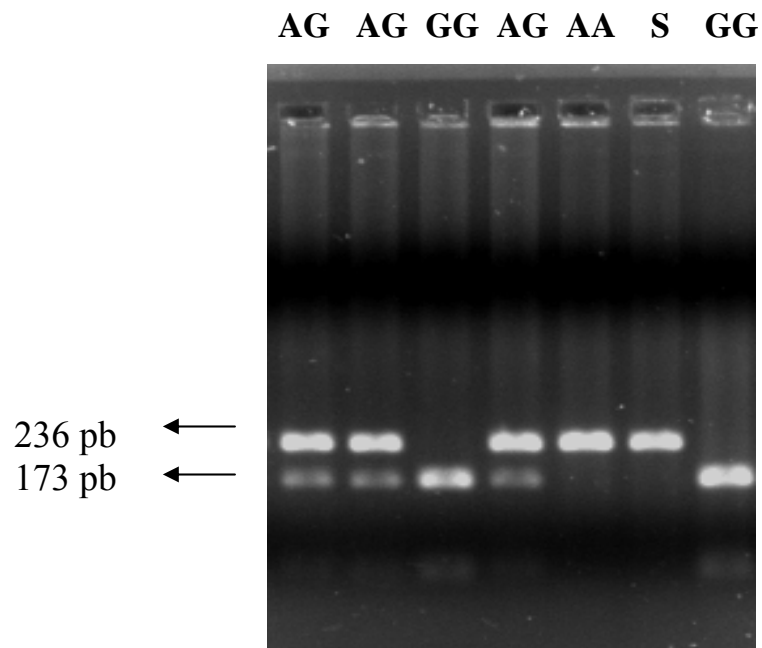


Figura 2. Genotipagem por meio do RFLP *IGF-2/ApaI*. (A) alelo A, (G) alelo G, (S) fragmento sem digestão, (pb) pares de bases.

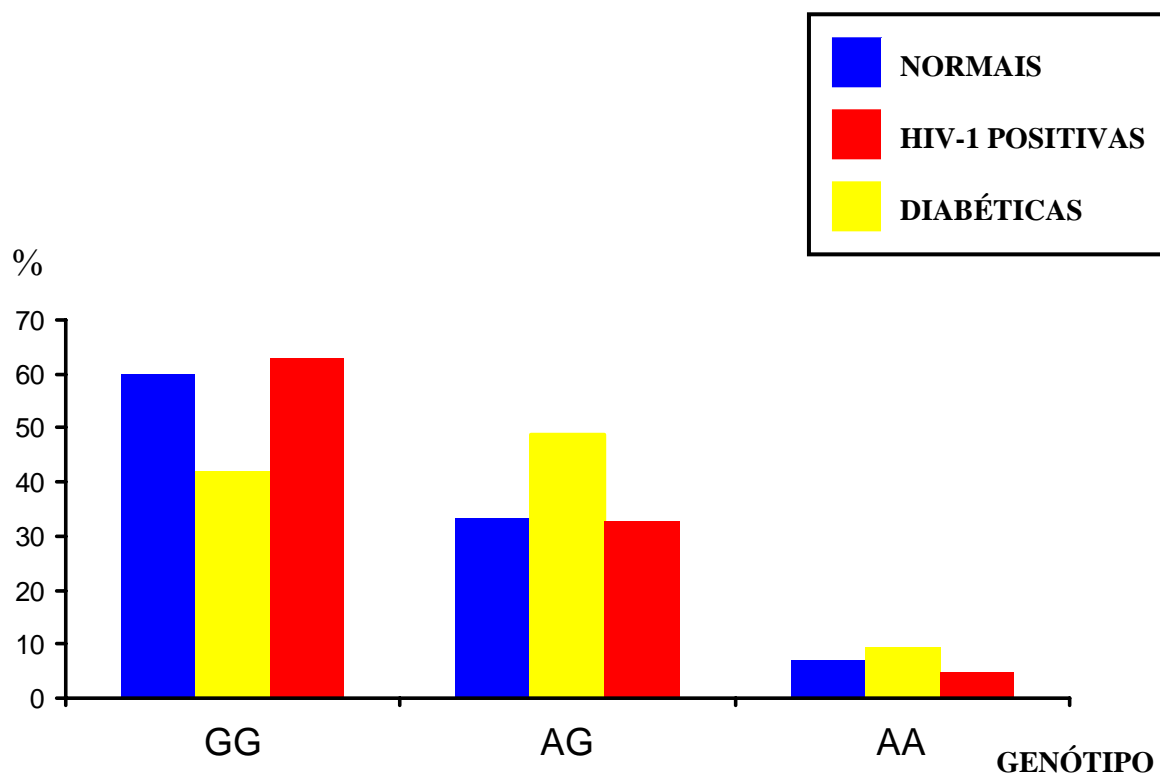


Figura 3. Distribuição das freqüências genóticas do gene *IGF-2* nos três grupos estudados.

Tabela 1 - Distribuição das características das gestantes segundo os grupos estudados

Variável	Grupo	Normais n= 87	HIV positivas n=43	Diabéticas n=43	p
Idade (anos)					< 0,05
Média (Variação)		25,3 (16 - 41)	26,4 (17 - 43)	29,1 (17 - 40)	
Desvio padrão		5,5	5,6	6,0	
Cor					0,36
Branças		59,8%	60,5%	72,1%	
Não Brancas		40,2%	39,5%	27,9%	
Estado civil					0,94
Sem companheiro		35,6%	34,9%	32,6%	
Com companheiro		64,4%	65,1%	67,4%	
Nº Gestações					0,002
Primigesta		31,0%	12,5%	34,9%	
Secundigesta		27,6%	10,0%	25,6%	
Multigesta		41,4%	77,5%	39,5%	
Nº Partos					0,12
Nulípara		35,6%	20,0%	46,5%	
1 a 3 partos		52,9%	60,0%	44,2%	
Multípara		11,5%	20,0%	9,3%	
Abortos					0,08
Sim		27,6%	42,5%	20,9%	
Não		72,4%	57,5%	79,1%	

Tabela 2 - Frequências genóticas para o *IGF-2* na população total

Genótipo	n	Frequência genotípica
GG	97	56,0%
AG	64	37,0%
AA	12	7,0%
Total	173	100,0%

Tabela 3 - Frequências gênicas nos três grupos estudados

Grupos f(alelo)	Total	Normais	HIV-1 positivas	Diabéticas
n	173	87	43	43
*f(G)	0,75	0,76	0,66	0,79
*f(A)	0,25	0,24	0,34	0,21

*f (alelo) frequência do alelo

$p= 0,28$

SUMMARY

SUMMARY

Introduction: Studies carried out to assess the effects of antiretroviral drugs (ARV) in HIV-1 infected pregnant women have demonstrated hyperglycemia, carbohydrate intolerance due to insulin resistance, and cases similar to *Diabetes mellitus* type 1. On the other hand, some reports refer to the effect of disturbances in the expression of the insulin-like growth factors system (IGF) on pancreas beta-cell function in humans and *IGF-2/ApaI* polymorphisms have been associated with obesity and features of the metabolic syndromes.

Objetivos: To study the *IGF-2/ApaI* polymorphism in HIV-1 infected pregnant women receiving ARV with hyperglycemia during pregnancy and to identify the groups of patients at higher risk to develop adverse metabolic glyceemic events.

Methods: Study of 87 healthy pregnant women, 43 HIV-1 infected pregnant women receiving antiretroviral drugs with a significant increase in the area under the glycemia curve along pregnancy and 43 pregnant women with gestational diabetes, HIV-1 negative. Blood samples were obtained for DNA extraction and the PCR was performed to amplify the *IGF-2* sequence. Genotyping was carried out by enzymatic digestion with *ApaI*. The data were analyzed by *Kolmogorov-Smirnov* normality, *ANOVA* and Qui-square tests.

Results: There were no statistically significant differences related to the genotypic frequencies of the three groups analyzed. Considering the HIV-1 infected pregnant women, there were no significant differences between the zidovudine group and the triple antiretroviral treatment group related to the genotypic frequencies. There were no significant differences related to the allelic frequencies of the all groups evaluated. Non-white pregnant women have a trend to present the GG genotypes compared to White pregnant women.

Conclusions: These results contribute to the better understanding about metabolic glyceemic disorders in HIV-1 infected pregnant women receiving antiretroviral drugs, removing the responsibility of *IGF-2/ApaI* polymorphisms as unique responsible factor of the glyceemic alterations. These data point to the fact that others variables should be studied in order to explain those glyceemic abnormalities.

Keywords: pregnancy, HIV-1, *IGF-2*, antiretroviral, hyperglycemia.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)