

Avaliação do polimorfismo no gene da metilenotetrahidrofolato redutase e concentração de folato e vitamina B12 em pacientes portadores do HIV-1 em tratamento com anti-retrovirais

Evaluation of the polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene and the levels of folate and B12 in HIV-infected patients under antiretroviral therapy

Iran Malavazi¹, Emiliania Pereira Abrão¹, Angela Yumico Mikawa², Sandra Antônia Tagliavini¹ e Paulo Inácio da Costa^{1, 2}

RESUMO

Neste trabalho, investigamos concentração da vitamina B12 e folato, considerando-se a influência dos genótipos da metilenotetrahidrofolato redutase, o perfil imunológico e a terapia antiretroviral utilizada na população brasileira portadora do HIV. Um grupo de 86 indivíduos portadores do HIV-1 e 29 doadores de sangue foram recrutados para compor a casuística. Entre os infectados pelo HIV-1, observou-se menor concentração de B12 no grupo com maior número de linfócitos TCD4+. Não encontramos diferença na distribuição genotípica para as mutações MTHFR C677T e A1298C entre infectados e não infectados pelo HIV-1. Indivíduos portadores do HIV, genótipo C677C, apresentaram concentrações menores de B12 em relação ao grupo controle de mesmo genótipo. A terapia antiretroviral não mostrou qualquer influência nos valores de folato e vitamina B12. Estudos adicionais são necessários para reavaliar a prevalência de menores concentrações de B12 e folato e de hiperhomocisteinemia na população portadora do HIV sob a ótica do uso de HAART e da melhoria na sobrevida dos pacientes.

Palavras-chaves: HIV. Vitamina B12. Folato. Polimorfismos MTHFR. Doença arterial coronariana.

ABSTRACT

In this study we sought to investigate the B12 and folate levels regarding the influence of methylenetetrahydrofolate reductase genotypes, immunological profile and antiretroviral therapy in the Brazilian HIV-infected population. The study group comprised 89 HIV-infected individuals and 29 blood donors. There was a decrease in the B12 levels in the HIV-infected group with higher TCD4+ lymphocyte counts. No differences in the genotype distribution for methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms between the HIV-infected individuals and the controls were found. HIV-infected individuals carrying the C677C genotype presented lower B12 levels (313.91 ± 154.05) than those with the same genotype in the control group (408.27 ± 207.69). Also, the antiretroviral therapy was not a source of variation of the folate and B12 serum levels. Further studies are needed to reanalyze the prevalence of low levels of folate and B12 and hyperhomocysteinemia among HIV-infected patients with regard to the use of HAART and the increased life expectancy of such patients.

Key-words: HIV. B12. Folate. MTHFR polymorphisms. Coronary artery disease.

1. Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP. 2. Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.

Apoio Financeiro: Núcleo de Atendimento a Comunidade (NAC-FCF) e FCFAr/UNESP.

Endereço para Correspondência: Prof. Paulo Inácio da Costa. Dep^o de Análises Clínicas/FCFAr/UNESP. Rua Expedicionários do Brasil 1621, Centro, 14801-902 Araraquara, SP.

Tel: 16 3301-6100, Fax: 16 232-0486.

e-mail: iranmalavazi@bol.com.br

Recebido para publicação em 9/6/2003

Aceito em 10/9/2004

A conduta clínico-terapêutica do portador do HIV tem se modificado amplamente desde a introdução dos inibidores de protease (IP) como agentes chave da terapia antiretroviral de alta atividade (HAART- *Highly Active Antiretroviral Therapy*). A HAART tem contribuído para a sobrevivência dos indivíduos infectados pelo HIV, com melhora da função imunológica e controle da replicação viral¹¹. Entretanto, a HAART, aliada ao estado infeccioso *per se* e a resposta do hospedeiro perante a infecção, tem levado ao aparecimento de alterações metabólicas nesses indivíduos culminando com novas preocupações de caráter relativo ao monitoramento ambulatorial desses pacientes dada sua possível associação com o desenvolvimento de doenças arteriais coronarianas (DAC)^{11 27}. Nesse sentido, são bem estabelecidas alterações no metabolismo lipídico do portador do HIV, decorrentes tanto da ação dislipidêmica da terapia combinada envolvendo os IP, como do próprio estado infeccioso^{9 11 15 27}.

Adicionalmente, a infecção pelo HIV é acompanhada no estágio crônico por um estado de má nutrição que pode conduzir o portador à perda de peso progressiva, o que teve principalmente antes da introdução da HAART, considerável influência na morbimortalidade da AIDS⁵. O estado de má nutrição no portador é causado por um conjunto de situações, como a redução da ingestão e má absorção de nutrientes, deficiência calórico-proteica e distúrbios metabólicos. Causas para a redução da ingestão de nutrientes seriam a anorexia induzida por citocinas do curso da AIDS e/ou os medicamentos antiretrovirais⁵. Esse somatório de fatores conduz a estados de carências nutricionais, com destaque para as vitaminas do complexo B. A deficiência de vitamina B12 ocorre comumente nos portadores do HIV em qualquer estágio da doença¹³ e está presente em 10 a 39% dos infectados²⁰. Valores diminuídos de vitamina B6 ocorrem com prevalência de 12 a 52%¹³, o mesmo acontecendo com o folato em 57 a 64% dos portadores que não fazem suplementação alimentar²³. A diminuição dos valores séricos de vitaminas B12, B6 e folato pode conduzir ao aparecimento de hiperhomocistemia uma vez que essas vitaminas participam dos ciclos metabólicos de remetilização e transulfuração da metionina^{7 18 19 22}.

A hiperhomocistemia é um conhecido fator de risco independente para DAC e aterosclerose na população humana, embora a maneira como a homocisteína (HCys) produza seu efeito nocivo sobre o endotélio vascular não esteja bem esclarecida^{22 24}. Estritamente em relação à população portadora do HIV, há falta de dados que levem em conta o efeito da HAART no metabolismo da HCys. A exemplo do que ocorre em inúmeros ciclos metabólicos em humanos, a remetilização e transulfuração da metionina são ciclos fortemente influenciados por polimorfismos em diversas de suas enzimas efetoras. Dentre estas enzimas, a metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) tem grande importância na regulação da concentração de HCys plasmática. Duas principais mutações missense na MTHFR, a mutação C677T e a MTHFR A1298C são capazes de alterar o montante de HCys plasmática (para revisões ver^{4 10 12}). A primeira mutação causa uma substituição de uma alanina por uma valina na cadeia polipeptídica e confere a enzima termolabilidade a 46°C e diminuição da sua atividade

específica em cerca de 35%¹². Essa diminuição da atividade da enzima é responsável pelo aumento de aproximadamente 3,5mmol de HCys em relação ao fenótipo não mutado⁴. A segunda mutação, MTHFR A1298C (Glu → Val), não confere termolabilidade da enzima, porém reduz também a atividade específica da enzima embora em menor extensão que a primeira. Consequentemente, o efeito sobre a HCys é atenuado e será importante em indivíduos que carreguem as duas mutações concomitantemente ou com dieta insatisfatória em folato, B6 ou B12^{26 28}, o que pode ser o caso dos portadores do HIV.

De posse do conhecimento de que valores aumentados de HCys plasmática constituem-se em um reconhecido fator de risco para DAC, esse trabalho visou: (i) estabelecer a concentração de folato e vitamina B12 na população brasileira portadora do HIV a fim de avaliar se existem carências dessas vitaminas e se sua magnitude poderia refletir em valores aumentados de HCys plasmática nesses indivíduos; (ii) investigar a relação dos valores séricos de folato e vitamina B12 em indivíduos portadores do HIV-1 levando em consideração a influência dos genótipos da MTHFR; (iii) verificar a relação da concentração destas vitaminas de acordo com o número de linfócitos TCD4+ e a terapia antiretroviral em uso corrente.

MATERIAL E MÉTODOS

Um grupo de 86 indivíduos portadores do HIV-1 determinados por ELISA e confirmado por *western blot* atendidos pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA) da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e 29 indivíduos doadores de sangue (população controle) atendidos no Hemonúcleo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP) foram recrutados para compor a casuística do trabalho. O grupo portador do HIV-1 foi constituído por 46 homens e 40 mulheres com média de idade de 34,2 ± 6,7 anos variando de 19 a 45 anos. O critério de exclusão do grupo de estudo foi: idade menor que 19 e maior que 45 anos; pacientes portadores de dislipidemia identificada no período de 12 meses anteriores ao recrutamento (colesterol ≥ 6.22 mmol/l e/ou triacilgliceróis ≥ 2.14 mmol); presença de infecção oportunista (*Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida ssp*, co-infecção com vírus da hepatite C e hepatite B. O recrutamento baseou-se no tipo de terapia utilizada nos três meses que antecederam o recrutamento do grupo de estudo, sendo estabelecido o seguinte critério: (i) pacientes sem tratamento; (ii) pacientes recebendo inibidores de transcriptase reversa, análogos nucleosídicos e/ou não análogos nucleosídicos; (iii) pacientes recebendo terapia HAART com pelo menos um IP. O grupo controle foi composto de 20 homens e 9 mulheres. A média de idade para esse grupo foi 30,2 ± 7,6 anos variando também de 19 a 45 anos. Os indivíduos foram selecionados aleatoriamente de forma a contemplar a variação étnica da população brasileira.

Os parâmetros analisados em todos os indivíduos foram idade, sexo, concentração de vitaminas B12 e folato séricas. Para os portadores do HIV-1, foram determinados adicionalmente o número de linfócitos CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+. Todos os indivíduos estavam sob dieta normal. O termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o Termo de Doação de Material Biológico

foram obtidos de todos os participantes do estudo. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp.

As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa no período entre 7:00 e 9:00 da manhã após 12 horas de jejum. Sangue total colhido em tubos contendo EDTA foi utilizado para a contagem de linfócitos TCD4+ e TCD8+. A contagem de linfócitos foi realizada por citometria de fluxo (Beckton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, California, USA) com dupla coloração imunofluorescente (isotiocianato de fluoresceína e ficoeritrina). De acordo com a contagem de linfócitos TCD4+ os pacientes foram divididos em três grupos: (a) TCD4+ <200 células/mm³; (b) TCD4+ 201-400 células/mm³ (c) TCD4+ >400 células/mm³. Amostras de soro foram utilizadas para a determinação quantitativa de folato e B12 por eletroquimioluminescência em aparelho de automação Elecsys 2010 - Roche com reagentes Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Na população portadora do HIV, 16 amostras apresentaram-se fortemente hemolisadas e, portanto foram retiradas da análise devido à alta concentração de folato eritrocitária.

Genotipagem da MTHFR. O DNA genômico foi extraído a partir de leucócitos periféricos utilizando técnica de *salting out*⁶. A mutação MTHFR C677T foi detectada através de amplificação por PCR da seqüência correspondente a região polimórfica do éxon 4 do gene da MTHFR flanqueada pelo oligonucleotídeos descritos por Frosst e colaboradores e subsequente digestão com *Hinf*I⁸. A mutação MTHFR A1298C foi determinada pela amplificação da região polimórfica no éxon 7 do gene com os oligonucleotídeos descritos por van der Put e colaboradores e digestão do produto de PCR com *Mbo* II²⁶. Os fragmentos esperados de cada mutação foram visualizados em gel de poliacrilamida não desnaturante 8% para a mutação MTHFR C677T e 15% para a mutação MTHFR A1298C, ambos corados pela prata. Para excluir qualquer possibilidade de má interpretação do padrão de bandas, 30% das amostras escolhidas aleatoriamente tiveram seu genótipo determinado duas vezes.

Análise Estatística. Diferenças na concentração das variáveis contínuas determinadas no trabalho foram apresentadas descritivamente nas tabelas pertinentes contendo média, desvio padrão e intervalo de confiança de 95%. As diferenças estatísticas foram determinadas entre os vários grupos de indivíduos usando o Teste *t* de Student não pareado presumindo variâncias populacionais diferentes. As frequências genotípicas e alélicas foram estimadas utilizando o método da contagem dos genes. O teste de qui-quadrado (χ^2) foi usado para testar as diferenças nas frequências genotípicas entre os grupos portadores e não portadores do HIV-1 e para verificar a concordância com a Hipótese do Equilíbrio de Hard-Weinberg (EHW). Correlações entre as variáveis contínuas foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Pearson. O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Em nenhum dos grupos houve diferença significativa em relação ao sexo ou idade. As Figuras 1A e 1B mostram o padrão de bandas esperado após clivagem dos produtos de PCR com

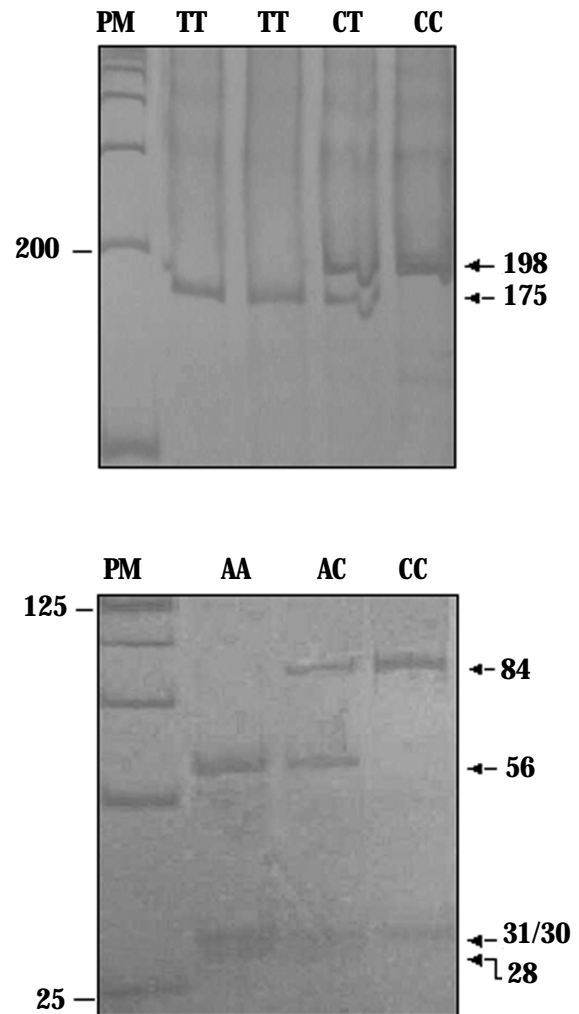


Figura 1 - A) Gel de poliacrilamida 8% mostrando os três diferentes genótipos da MTHFR mutação C677T. TT homocigoto mutado; CT heterocigoto mutado; CC homocigoto não mutado. A banda de 175 pb ocorre quando há pelo menos um alelo mutado em decorrência da inserção de um sítio ativo para *Hinf*I dentro do éxon 4 do gene. B) Gel de poliacrilamida 15% mostrando os genótipos da MTHFR mutação A1298C. A mutação abole um dos sítios de restrição da *Mbo* II presentes no éxon 7 do gene. Como consequência, no alelo selvagem a banda de 85 pb é clivada nos fragmentos de 56 e 28 pb. AA homocigoto não mutado; AC heterocigoto mutado; CC homocigoto mutado. Coloração pela prata.

*Hinf*I e *Mbo* II para genotipagem da MTHFR, mutações C677T e A1298C respectivamente. A distribuição da frequência genotípica e alélica da mutação MTHFR C677T mostrou concordância com a hipótese do EHW com relação a ambos os grupos. A população não infectada pelo HIV-1 mostrou maior frequência do genótipo CC (79,3%) e com isso maior frequência do alelo C (0,90) em relação ao grupo portador do HIV-1 (54,7% do genótipo CC e 0,74 do alelo C). Essa diferença não foi significativa conforme mostra o teste χ^2 (portadores x controles). Esses dados indicam que as amostras foram representativas da população e estão mostrados na Tabela 1. A respeito da mutação MTHFR A1298C, nos dois grupos estudados, cerca de 65% dos indivíduos eram portadores do genótipo AA, aproximadamente 25% portadores do genótipo heterocigoto para a mutação AC e cerca de 7% da população apresentou o genótipo CC (homocigoto mutado).

Os dados das frequências genotípicas e alélicas estão mostrados na Tabela 2. As duas populações mostraram concordância com a hipótese do EHW.

Tabela 1 - Distribuição da frequência genotípica e alélica da MTHFR, mutação C677T na população portadora e não portadora do HIV-1 (controle).

População	Genótipo (%) ^a			Frequência dos Alelos	
	CC	CT	TT	C	T
Portadora (n = 86) *	54,7	38,4	7,0	0,74	0,26
Controle (n = 29) **	79,3	27,6	0,0	0,90	0,10
Total (n = 115)	60,9	33,9	5,2	0,78	0,22

χ^2 no EHW = 0,012 (1 gl p > 0,05) ** χ^2 no EHW = 0,42 (1 gl p > 0,05)

^a portadores x controles $\chi^2 = 4,20$ (2 gl p > 0,05)

Tabela 2 - Distribuição da frequência genotípica e alélica da MTHFR, mutação A1298C na população portadora do HIV-1 e controle

População	Genótipo (%) ^a			Frequência dos Alelos	
	AA	AC	CC	A	C
Portadora (n = 86) *	68,3	24,4	7,0	0,81	0,19
Controle (n = 29) **	65,5	27,6	6,9	0,79	0,21
Total (n = 115)	67,8	26,1	6,1	0,81	0,19

* χ^2 no EHW = 2,05 (1 gl p > 0,05) ** χ^2 no EHW = 0,73 (1 gl p > 0,05)

^a Portadores X Controles $\chi^2 = 0,66$ (2 gl p > 0,05)

A Tabela 3 mostra a avaliação da concentração de folato e vitamina B12 nas populações portadora e não portadora do HIV-1 evidenciando que não houve alteração significativa nos portadores do HIV em relação aos controles. A concentração de folato tendeu a permanecer inalterada entre os diferentes grupos de contagem de linfócitos TCD4+. Verificou-se uma tendência ao aumento de vitamina B12 em direção ao grupo com menor contagem de linfócitos TCD4+. Os valores de vitamina B12 foram significativamente maiores nos grupos CD4+<200 e CD4+201-400 células/mm³ em comparação ao grupo CD4+>400 células/mm³ (p=0,05, para ambos os casos). Entretanto, a correlação entre os valores de folato e vitamina B12 com o número de linfócitos TCD4+ e TCD8+ não mostrou nenhum coeficiente de correlação (r) significante entre eles (dados não mostrados).

A influência das duas mutações da MTHFR nos valores séricos de folato e B12 foi observada dividindo-se os grupos de acordo com seus genótipos encontrados na casuística. Por ser mais frequente, os genótipos C677C e A1298A foram dispostos em grupos isolados. Os genótipos C677T e T677T, assim como A1298C e C1298C foram unidos. A Tabela 4 mostra os valores médios obtidos, desvio padrão e o intervalo de confiança 95% para cada um dos grupos. Apenas vitamina B12 no genótipo C677C do grupo controle mostrou diferença significativa em

Tabela 3 - Concentração sérica de vitamina B12 e folato na população controle e portadora do HIV-1

	Contagem de linfócitos TCD4+ (células/mm ³)				
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
	Controle (n = 29)	HIV (n = 70)	>400 (n = 30)	>201-400 (n = 18)	<200 (n = 22)
B12 (pg/ml)	391,8±153,6 (333,4-450,3)	329,7±159,2 (292,0-367,2)	283,6±105,4§ (244,2-323,0)	351,7±126,1 (288,9-414,4)	375,4±222,3 (276,9-473,9)
Folato (ng/ml)	5,5±2,8 (4,5-6,6)	2,1±2,1 (4,6-5,6)	5,4±2,6 (4,4-6,4)	5,1±1,6 (4,2-5,9)	4,9±1,6 (4,2-5,6)

§ Significativamente diferente do grupo 4 e 5 (p<0,05)

Valores entre parênteses indicam IC 95%

Tabela 4 - Concentração de vitamina B12 e folato de acordo com os genótipos da MTHFR nas populações controle e portadora do HIV-1.

	Portadores HIV (n=70)		Controles (n= 29)	
	B12 (pg/ml)	Folato (ng/ml)	B12 (pg/ml)	Folato (ng/ml)
C677C	n=39		n=23	
	313,9±154,1§ (264,0-363,8)	5,3±2,4 (4,5-6,1)	408,3±207,7 (318,5-498,1)	5,8±2,3 (4,5-7,1)
C677T*	n=31		n= 6	
	350,1±165,8 (289,3-411,0)	4,9±1,7 (4,3-5,6)	328,9±94,8 (229,4-428,3)	4,6±2,1 (2,4-6,7)
A1298A	n=47		n=19	
	337,9±170,8 (287,7-388,0)	5,4±2,3 (4,7-6,1)	394,13±180,0 (307,8-480,4)	5,8±3,0 (4,3-7,2)
A1298C**	n=23		n=10	
	313,8±134,4 (255,6-371,9)	4,6±1,3 (4,0-5,2)	379,13±98,1 (303,7-454,5)	4,9±2,6 (2,8-6,9)

* Indivíduos com genótipos C677T + T677T

** Indivíduos com genótipos A1298C + C1298C

§ Significativamente diferente do grupo controle C677C (p<0,05)

Valores entre parênteses indicam IC 95%

relação ao mesmo genótipo na população portadora ($p=0,026$). Quando as duas mutações C677T e A1298C ocorrem concomitantemente presume-se que há diminuição mais acentuada da atividade da MTHFR, aumento conseqüente de HCys plasmática e possível diminuição de folato sérico. Em virtude dessa premissa, combinações genotípicas das duas mutações da MTHFR foram analisadas a fim de verificar se haviam alterações nas concentrações de vitaminas. As combinações genotípicas possíveis foram executadas de forma a proporcionar um número de representantes pelo menos igual a cinco para aplicação do teste estatístico. Foram encontrados seis dos nove haplótipos possíveis. Do total de indivíduos infectados pelo HIV, cerca de 12% eram heterozigotos para ambas as mutações (CT/AC). Não foram encontrados duplos homozigotos mutados (TT/CC). A análise das concentrações de folato e B12 de acordo com os haplótipos foi realizada tanto inter grupo (HIV vs. controle) e intragrupos dos infectados e dos doadores. Houve apenas uma tendência de diminuição de vitamina B12 no grupo com haplótipo CC/AA dos portadores do HIV-1 ($320,06 \pm 172,6$) em relação ao mesmo haplótipo no grupo controle ($423,66 \pm 188,65$). Finalmente, a Tabela 5 mostra que não ocorreu nenhuma alteração significativa em nenhum dos grupos de acordo com a terapia antiretroviral em uso.

Tabela 5 - Concentração de vitamina B12 e folato na população portadora do HIV-1 de acordo com a terapia antiretroviral.

	Sem Terapia (n = 22)	Terapia com ITR (n = 27)	HAART (n = 21)
Folato (ng/ml)	4,7±2,1 (3,9-5,8)	5,6±2,5 (4,6-6,6)	4,8±1,4 (4,2-5,5)
B12 (pg/ml)	309,4±130,2 (251,6-367,1)	346,4±153,7 (282,5-404,2)	334,3±195,4 (245,4-423,3)

ITR: terapia contendo exclusivamente inibidores de transcriptase reversa (análogos e/ou não análogos nucleosídicos)

HAART: terapia antiretroviral de alta atividade; inclui os inibidores de protease.

DISCUSSÃO

O presente trabalho centrou-se na verificação das concentrações de folato e vitamina B12, em relação ao perfil imunológico, a terapia antiretroviral, e os genótipos da MTHFR na população brasileira infectada pelo HIV-1, o que poderia constituir-se nesses indivíduos como um pré-requisito para o estabelecimento de um processo aterosclerótico derivado de um preditivo aumento plasmático de HCys. Ambas as doenças, AIDS e DAC guardam consigo um componente comum de cronicidade sendo que nesse sentido, o estado infeccioso contínuo do portador do HIV e a terapia antiretroviral poderiam ser fatores para alterações no metabolismo da metionina/homocisteína, já que o estímulo bioquímico para desencadear o processo aterosclerótico estará presente durante todo o longo curso insidioso da AIDS.

A especulação de que valores diminuídos de vitaminas do complexo B, no portador do HIV-1, associado a variantes genéticas que alteram o metabolismo da HCys justificaram nesse trabalho a genotipagem da MTHFR, já que ela está intimamente ligada ao aporte de folato no ciclo de remetilção

da metionina. Isso se torna virtualmente importante, pois o indivíduo portador do HIV requer um aporte maior de folato²³. A análise populacional da distribuição alélica para ambos os polimorfismos da MTHFR mostra similaridade com outros dados dessa natureza obtida da população brasileira^{1,6}. As diferenças observadas na frequência do alelo C encontradas na mutação C677T do grupo controle podem ser atribuídas ao acaso e à aleatoriedade das amostras, uma vez que a distribuição genotípica das mutações MTHFR C677T e A1298C apresentam grande variação étnica^{1,14,19}.

A análise dos dados totalizados (Tabela 2), mostrou que a determinação de folato encontra-se próxima do limite inferior do valor de referência adotado no trabalho (4,20 - 19,90 ng/ml). Os valores de vitamina B12, por sua vez apresentaram-se um pouco mais distantes do valor limítrofe inferior (240 - 900 pg/ml), também dentro do intervalo de normalidade. Com isso, as concentrações de folato e B12 não tiveram diferenças significativas entre portadores e controles o que indica que ambas as populações aparentemente apresentam o mesmo perfil nutricional, característica anteriormente demonstrada para uma população semelhante². Esse resultado difere daqueles observados previamente, nos quais valores diminuídos de vitamina B12 ocorreriam em qualquer estágio da infecção pelo HIV sendo esta causada principalmente por anormalidades das proteínas ligantes de B12 como a transcobalamina^{13,17,20}. Entretanto, um importante ponto nesse sentido deve ser considerado, a maioria dos trabalhos que indicaram valores diminuídos tanto de vitamina B12 quanto de folato no portador do HIV, decorriam unicamente da própria infecção e/ou do seu perfil nutricional alterado pelo curso da infecção, não fazendo, portanto nenhuma alusão a um possível efeito da terapia HAART nesse panorama. A maioria desses trabalhos foi publicada em momentos nos quais os modelos terapêuticos eram menos eficazes, (terapia dupla com inibidores de transcriptase reversa apenas) ou no início da introdução dos consensos terapêuticos com inibidores de protease (HAART). Em razão disso, em estudos mais antigos ocorria uma maior prevalência de alterações nas concentrações dessas vitaminas²¹. Decorrente disso, e como as alterações nutricionais do portador podem ser explicadas em parte pela progressão da doença²⁰, pode-se inferir a razão destas alterações não estarem presentes em indivíduos portadores tratados ambulatorialmente como aconteceu nesse estudo. Quando o grupo portador foi dividido de acordo com a contagem de linfócitos TCD4+, foi verificada diminuição de vitamina B12 no grupo com CD4+ >400 células/mm³ em relação ao grupo com contagens de linfócitos TCD4+ intermediária e mais baixa. Entretanto, concentrações diminuídas de vitamina B12 sempre estiveram correlacionadas com a progressão da doença e, portanto os menores valores deveriam ter sido encontrados no grupo com contagem de TCD4+ mais baixa^{20,23,25}. O resultado oposto encontrado em nosso trabalho poderia ter ocorrido devido ao tamanho amostral e por variáveis confusionais não analisadas nessa coorte. Adicionalmente, e concordando com dados obtidos na "era HAART" não houve qualquer alteração nas concentrações de folato e B12 quando os pacientes foram divididos de acordo com a terapia em uso, o que sugere que

as classes terapêuticas não causam influência nas concentrações dessas vitaminas e, portanto, indiretamente, nos valores de HCys total plasmática. Embora ainda existam poucos trabalhos que estabeleçam análises nutricionais e de micronutrientes nos portadores do HIV-1 em relação a HAART²¹, houve um decréscimo na prevalência de diminuição de vitamina B12 com esse esquema terapêutico²¹. Contrariamente às alterações do metabolismo lipídico no portador do HIV, as anormalidades quantitativas de micronutrientes podem não ser efetivamente persistentes no curso da epidemia e das modificações nesta trajetória pelo tratamento antiretroviral que passa por modificação a cada introdução de nova classe terapêutica.

A importância de se verificar se há ou não hiperhomocisteinemia durante a HAART advém do seu efeito multiplicativo com a hiperlipidemia induzida pelos IP a qual é altamente prevalente e também observada na população brasileira^{11 15 27}. Em trabalhos nos quais se determinou a concentração de HCys total plasmática, esta parece estar ligeiramente aumentada na infecção pelo HIV, porém ainda aquém do limite superior de normalidade. Mesmo nos pacientes com concentrações menores de B12, a HCys ainda estava dentro da faixa de referência, porém com tendência ao aumento^{17 20}. Essas observações podem ser comprovadas com o observado em estudos mais detalhados que levaram em conta a influência dos IP. Verificou-se que menos de 30% dos indivíduos com baixa concentração de vitamina B12 apresentaram hiperhomocisteinemia real, indicando que somente a concentração de B12 é insuficiente para determinar possível presença de hiperhomocisteinemia. Em nossa casuística, a análise dos dados totalizados mostra que concentração de vitamina B12 variou de 135,60 a 934,40pg/ml nos portadores do HIV, sendo que 34% desses indivíduos mostraram queda de vitamina B12 abaixo do intervalo de referência com média de 189,10pg/ml, mediana de 189pg/ml, enquanto que no grupo controle, apenas 7% dos indivíduos apresentaram valores abaixo do valor de referência. O estabelecimento das concentrações de vitamina B12 e folato no portador da infecção pelo HIV pode auxiliar na verificação de que a HCys requer importância especial nos portadores do HIV em relação à população não portadora e se será necessário instaurar medidas preventivas contra um potencial aumento de HCys plasmática. Uma vez que a agressão vascular ocasionada pela HCys é devido mais a um efeito gradual do aumento da sua concentração, ao invés de unicamente um mero valor limite referencial, qualquer contribuição para o aumento plasmático deste metabólito pode ser significativa. Os dados obtidos nesse trabalho parecem mostrar que não há qualquer discrepância em termos de valores médios de folato e B12 entre a população portadora e da população controle. É possível inferir que os valores de HCys plasmática total não apresentariam alteração significativa em direção a hiperhomocisteinemia em termos de valores médios. Todavia para aqueles cerca de 34% de portadores com diminuição de B12 poderia não ser adequado inferir a mesma proposição. Bernasconi e colaboradores encontraram aumento de HCys no grupo tratado com IP em indivíduos do sexo masculino³. Entretanto o estudo de Bernasconi e colaboradores³ não trazia informações sobre as concentrações de vitamina B12 e folato em seu grupo de estudo o que

impossibilita concluir se esse aumento observado foi devido a diminuição desses elementos. Estudos adicionais na população brasileira são necessários para reavaliar a prevalência da diminuição de vitamina B12 e folato na população portadora do HIV sob a ótica do uso de HAART e da melhoria na sobrevida dos pacientes. Estudos dessa natureza deverão primar na diferenciação entre uma real deficiência dessas vitaminas que contribuiriam para o aumento plasmático de HCys de uma mera diminuição sérica comum uma vez que os resultados permitem *a priori* concluir que nem os IP nem a variação genotípica da MTHFR mostraram diferenças relevantes nas concentrações de vitamina B12 e folato.

AGRADECIMENTOS

Ao Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA) pelo auxílio na obtenção das amostras biológicas dos pacientes. Aos funcionários do laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular da FCF/UNESP, Maria Eugênia Coelho Silva, Keila Alves Pinto e Ana Paula Munhoz. A CAPES pela bolsa de Mestrado concedida (Malavazi, D).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, von Zuben PM, Soares MCP, Menezes R, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FE. Prevalence of the mutation C677→T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil American Journal of Medical Genetics 78: 332-335, 1998.
2. Batista GM, Higa E, Costa PI, César TB, Nagano MH, Franco CF, Mikawa AY, Tagliavini AS, Lima OLL. Avaliação nutricional qualitativa de portadores da infecção pelo HIV-1. *In: Anais da 46ª Jornada Farmacêutica da UNESP Araraquara* p. 4, 1999.
3. Bernasconi E, Uhr M, Magenta L, Ranno A, Telenti A. Homocystinemia in HIV-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. AIDS 15:1081-1082, 2001.
4. Brattström L, Wilcken DEL. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? American Journal of Clinical Nutrition 72: 315-323, 2000.
5. Chang HR, Dulloo AG, Bistrian BR. Role of cytokines in AIDS wasting. Nutrition 14: 853-863, 1998.
6. Cunha ALA, Hirata MH, Kim CA, Guerra-Shinohara EM, Nonoyama K, Hirata RDC. Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the MTHFR gene in Brazilian children with neural tube defects. Clinica Chimica Acta 318: 139-143, 2002.
7. Eikelboom JW, Lonn E, Genest JRJ, Hanfey G, Yusuf S. Homocysteine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. Annals of Internal Medicine 131: 363-375, 1999.
8. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel M, Rozen R. A candidate genetic risk for cardiovascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nature Genetics 10: 111-113, 1995.
9. Grunfeld C, Pang M, Doerrler W, Shigenaga JK, Jensen P, Feingold KR. Lipids lipoproteins triglyceride clearance and cytokines in human immunodeficiency syndrome. Journal of Clinical Endocrinology Metabolism 74: 1045-1052, 1992.
10. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. Relation between folate status a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine concentrations. Circulation 93: 7-9 1996.
11. Jain RG, Furfine EF, Pednealt L, White AJ, Lenhard JM. Metabolic complications associated with antiretroviral therapy. Antiviral Research 51: 151-177, 2001.

12. Kang SS, Zhou J, Wong PWK, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocystinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *American Journal of Human Genetics* 43: 414-421, 1988.
13. Liang B, Chung S, Moshen A, Lane LC, Watson RR. Vitamins and immunomodulation in Aids. *Nutrition* 12: 1-7, 1996.
14. Loktionov A, Vorster H, O'neill IK, Nell T, Bingham SA, Runswick AS, Cummings JH. Apolipoprotein E and methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms in relation to other risk factors for cardiovascular disease in UK Caucasian and black south Africans. *Atherosclerosis* 145: 125-135, 1999.
15. Malavazi I, Abrão EP, Mikawa AY, Landgraf VO, Costa PI. Abnormalities in apolipoproteins and lipid levels in HIV-infected Brazilian population under different treatment profiles: the relevance of apolipoprotein e genotypes and immunological status. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 42: 525-532, 2004.
16. Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 1215, 1988.
17. Paltiel O, Falutz J, Veilleux M, Rosenblatt DS, Gordon K. Clinical correlates of subnormal vitamin B₁₂ levels in patients infected with the human immunodeficiency virus. *American Journal of Hematology* 49: 318-322, 1995.
18. Perry JD. Hyperhomocysteinemia. *Baillieres Clinical Haematology* 12: 451-477, 1999.
19. Refsum H, Ueland MD. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annual Reviews of Medicine* 49: 31-62, 1998.
20. Remacha AF, Cadafalch J. Cobalamin deficiency in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Seminars in Hematology* 36: 75-87, 1999.
21. Remacha AF, Cadafalch J, Sardà P, Barceló M, Fuster M. Vitamin B12 metabolism in HIV-infected patients in the age of highly active antiretroviral therapy: role of homocysteine in assessing vitamin B-12 status. *American Journal of Clinical Nutrition* 77: 420-424, 2003.
22. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annual Reviews of Nutrition* 19: 217-246, 1999.
23. Semba RD, Tang AM. Micronutrients and pathogenesis of Human immunodeficiency virus infection. *British Journal of Nutrition* 81: 181-189, 1999.
24. Stamler JS, Slivka A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in the vascular-related disease. *Nutrition Reviews* 54: 1-30, 1996.
25. Tang AM, Graham NMH, Chandra RK, Saah AJ. Low serum vitamin B-12 concentrations are associated with faster immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) disease progression. *Journal of Nutrition* 127: 345-351, 1997.
26. van der Put NMJ, Gabreëls F, Stevens BEM, Smeitink JAM, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP, Blom HJ. A second mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional factor for neural-tube defects? *American Journal of Human Genetics* 62: 1044-1051, 1998.
27. Vella S, Palmisano L. Antiretroviral therapy: state of the HAART. *Antiviral Research* 45: 1-7, 2000.
28. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chem J, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rozem R. The 1298 A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 156, 409-415, 2001.