

Ricardo Augusto Monteiro de Barros Almeida

*β -2 microglobulina e citocinas séricas como
indicadores de falha terapêutica
aos anti-retrovirais*

Orientador: Prof. Emérito Domingos Alves Meira

*Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Doenças Tropicais da
Faculdade de Medicina de Botucatu,
UNESP - Universidade Estadual
Paulista, para obtenção do Título de
Doutor.*

Botucatu - SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Almeida, Ricardo Augusto Monteiro de Barros.

β -2 microglobulina e citocinas séricas como indicadores de falha
terapêutica aos antirretrovirais / Ricardo Augusto Monteiro de Barros
Almeida. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Emérito Domingos Alves Meira

Assunto CAPES: 40101096

1. HIV-1 - Tratamento 2. Aids - Aspectos genéticos 3. Terapia
antirretroviral

CDD 616.9792

Palavras chave: β -2 microglobulina; Citocinas séricas; Falha terapêutica;
Genotipagem; HAART; HIV-1; Resistência

Trabalho realizado no Serviço de Ambulatórios Especializados e Hospital Dia Professor Emérito Domingos Alves Meira, da Fundação para o Desenvolvimento Médico e Hospitalar do Complexo da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB)-UNESP, no Hospital das Clínicas da FMB-UNESP, no Hemocentro de Botucatu e no Laboratório de Pesquisa da Área de Doenças Tropicais, do Departamento de Doenças Tropicais da FMB-UNESP, com auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

EPÍGRAFE

“Conhecimento real é saber a extensão

da própria ignorância”

(Confúcio)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Emérito Domingos Alves Meira, o sincero agradecimento por todos os ensinamentos a mim oferecidos.

Temendo o risco de cometer alguma injustiça, agradeço, anonimamente, a todas as pessoas e instituições que colaboraram, diretamente ou indiretamente, com a realização e avaliação deste estudo, aos meus familiares e aos inestimáveis e verdadeiros amigos. Cada um sabe a gratidão que carregarei eternamente comigo.

Finalmente, agradeço e dedico esta tese aos pacientes que prontamente se ofereceram a participar da mesma. Meu maior desejo é que este trabalho possa ser útil, de algum modo, para que tenham uma vida melhor.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	01
2. ABSTRACT.....	04
3. FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA.....	07
4. OBJETIVO.....	21
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
6. APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO.....	30
7. MANUSCRITO.....	31
7.1. FOLHA DE ROSTO.....	31
7.2. RESUMO E PALAVRAS-CHAVE.....	33
7.3. INTRODUÇÃO.....	34
7.4. MÉTODOS.....	36
7.5. RESULTADOS.....	40
7.6. DISCUSSÃO.....	41
7.7. AGRADECIMENTOS.....	46
7.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
7.9. TABELAS E FIGURAS.....	52
8. MANUSCRIPT.....	56
8.1. TITLE PAGE.....	56
8.2. ABSTRACT AND KEYWORDS.....	58

8.3. INTRODUCTION.....	59
8.4. METHODS.....	61
8.5. RESULTS.....	65
8.6. DISCUSSION.....	66
8.7. ACKNOWLEDGEMENTS.....	70
8.8. REFERENCES.....	71
8.9. TABLES AND FIGURES.....	76
9. ANEXOS.....	80

RESUMO

1. RESUMO

Iniciativas como a “WHO/UNAIDS ‘3 by 5’ permitiram que se atingisse, no ano de 2007, a marca de 3 milhões de pessoas com acesso à terapia anti-retroviral (TARV) em países de baixa e média renda. O aumento da cobertura nestes países demanda custos importantes com anti-retrovirais, porém também levanta outro problema, que é o monitoramento da terapia em localidades de poucos recursos. Há consenso no fato de que devem ser pesquisados marcadores de eficácia da TARV mais acessíveis. Considerando o comportamento da β -2 microglobulina sérica e das citocinas séricas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 com relação à atividade inflamatória induzida pela replicação do HIV-1, o objetivo deste estudo foi o de verificar o comportamento destas substâncias como indicadores da presença, ou não, de falha terapêutica à HAART. Entre agosto de 2004 e novembro de 2005, 89 indivíduos infectados pelo HIV-1, atendidos pela Área de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, e 20 indivíduos normais, doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu [43 mulheres e 66 homens; idade média = 39,7 anos (22 - 66 anos)] foram divididos em 4 grupos: G1- 15 indivíduos infectados pelo HIV-1, virgens de tratamento ou sem HAART há pelo menos seis meses e com contagens de linfócitos T CD $_4^+$ menores que 350 células/mm 3 ; G2- 31 indivíduos infectados pelo HIV-1, em uso de HAART e sem falha terapêutica virológica (FT); G3- formado por 43 indivíduos infectados pelo HIV-1, em uso de HAART e com FT, e GC- formado por 20 indivíduos

normais, não infectados pelo HIV-1, que serviram de controles para as citocinas séricas. Foram revisados os dados demográficos, clínicos e de HAART e realizados os exames β -2 microglobulina sérica, citocinas séricas (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10), genotipagem do HIV-1, carga viral plasmática (CV) e linfócitos T CD₄⁺ e T CD₈⁺. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para amostras independentes, quando se tratava de variáveis numéricas e o teste exato de Fisher, quando se tratava de variáveis categóricas. Foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$. Quando se analisou o predomínio do sexo masculino e a idade, não houve diferença significativa entre os grupos. O comportamento da β -2 microglobulina foi diferente, estatisticamente, entre G1, G2 e G3, sendo que os níveis séricos desta foram mais elevados no grupo de indivíduos sem HAART, intermediários nos que utilizavam HAART e apresentavam FT e mais baixos nos que faziam uso de HAART, porém não apresentavam FT. Considerando as dosagens das citocinas séricas, TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10, não se observou diferença significativa entre G1, G2 e G3, porém, estes grupos evidenciaram níveis séricos de todas as citocinas mais elevados que o GC, com exceção apenas da IL-2, que se demonstrou igual em todos os grupos. Ainda com relação a G1, G2 e G3, pôde-se verificar, estatisticamente, maiores contagens de linfócitos T CD₄⁺ e menor porcentagem de pacientes com critérios clínicos definidores de aids atuais em G2, maior frequência de indivíduos que fizeram uso de esquema duplo e que utilizaram maior tempo de TARV total em G3, assim como menor CV neste mesmo grupo, quando

comparado ao G1. Os resultados dos exames de genotipagem do HIV-1 mostraram apenas vírus sensíveis nos grupos 1 e 2 e apenas vírus com resistência intermediária ou plena no grupo 3. A dosagem sérica de β -2 microglobulina, um exame relativamente simples e barato, mostrou-se útil na diferenciação entre indivíduos em FT ou não, após HAART. Outros trabalhos prospectivos, com maior número de participantes e na presença de outras comorbidades, talvez possam corroborar o comportamento deste marcador biológico no monitoramento da HAART, principalmente visando sua possível utilização em locais de baixa renda.

Palavras-chaves: β -2 microglobulina, citocinas séricas, HIV-1, resistência, HAART, falha terapêutica, genotipagem.

ABSTRACT

2. ABSTRACT

Initiatives such as WHO/UNAIDS '3 by 5' made it possible to achieve the figure of 3 million people with access to antiretroviral therapy (ART) in middle- and low-income countries in 2007. The increase in these countries' coverage leads to important expenditure on antiretroviral drugs; however, it also raises another problem, which is therapy monitoring in low-income locations. There is agreement on the fact that more accessible ART efficacy markers must be studied. By considering the behavior of serum β -2 microglobulin and serum cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 in relation to inflammatory activity induced by HIV-1 replication, the objective of this study was to assess the behavior of such substances as indicators of the presence, or not, of antiretroviral therapeutic failure (TF). From August 2004 to November 2005, 89 HIV-1-infected individuals assisted by the Tropical Diseases Sector of the Botucatu School of Medicine – UNESP and 20 normal blood donors at the Blood Transfusion Center of Botucatu [43 female and 66 male; mean age = 39.7 years (22 - 66 years)] were divided into 4 groups: G1- 15 HIV-1-infected individuals, previously untreated or without HAART for at least six months and $CD_4^+ < 350$ cells/mm³; G2- 31 HIV-1-infected individuals undergoing HAART without virological therapeutic failure (TF), G3- 43 HIV-1-infected individuals undergoing HAART with TF, and CG- 20 normal individuals who served as controls for serum cytokines. Demographic, clinical and HAART data were reviewed, and serum β -2 microglobulin, serum cytokines (TNF-

α , IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10), HIV-1 genotyping, plasma viral load (VL) and T CD $_4^+$ and T CD $_8^+$ lymphocytes tests were performed. The Mann-Whitney test for independent samples was used for between-group comparison in the case of numeric variables, and Fisher's exact test was applied for category variables. Statistical difference was considered when $p < 0.05$. When analyzing the predominance of males and age between the groups, no significant difference was found. β -2 microglobulin behavior was statistically different between G1, G2 and G3, and its serum levels were higher in the group of individuals without HAART, intermediate in those using HAART and presented TF, and lower in those using HAART but did not present TF. By considering the dosages of serum cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10, no significant difference was observed between G1, G2 e G3; however, these groups presented higher serum levels for all cytokines than CG, except only for IL-2, which showed to be the same in all groups. Also, in relation to G1, G2 and G3, it was possible to statistically observe higher T CD $_4^+$ lymphocytes counts and lower percentages of patients with present clinical AIDS-defining criteria in G2, a higher frequency of individuals who used a dual scheme and who used total ART for a longer time in G3, as well as lower VL in the same group when compared to G1. The results of HIV-1 genotyping tests showed that only sensitive viruses were observed in G1 and G2, and only intermediate- or full-resistance in G3. Serum β -2 microglobulin measurement, a relatively simple and inexpensive procedure, showed to be useful for differentiating individuals with TF or not after HAART. Further prospective studies on a larger

number of patients and in the presence of other co-morbidities may be able to corroborate the behavior of this biological marker for HAART monitoring, particularly aiming at its possible use in low-income areas.

Keywords: β -2 microglobulin, serum cytokines, HIV-1, resistance, HAART, therapeutic failure, genotyping.

*FUNDAMENTAÇÃO
CIENTÍFICA*

3. FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA

A implementação da terapia anti-retroviral combinada e potente (Highly Active Antiretroviral Therapy – HAART) na prática clínica, a partir de 1996, foi indiscutivelmente o fator mais associado à melhora expressiva da qualidade de vida de indivíduos infectados pelo HIV, permitindo a redução drástica da morbimortalidade e do número de internações [1]. No Brasil, o direito ao acesso universal e gratuito a essa terapia é garantido pela Lei nº 9.313, promulgada em 13 de novembro de 1996 e essa iniciativa permitiu a redução de aproximadamente 50% na mortalidade e de 80% no número de internações associadas à aids [2]. Mesmo assumindo elevados gastos com a aquisição de anti-retrovirais (ARV), calcula-se que, entre os anos de 1996 e 2004, foram economizados pelo governo brasileiro cerca de US\$ 2.2 bilhões em custos hospitalares [3]. O acesso universal aos ARV, através da conseqüente redução da carga viral plasmática (CV) do HIV, também foi essencial para que a estimativa do número de pessoas vivendo com HIV/aids no Brasil, no ano de 2000, fosse reduzida em cerca de 50% [3]. Seguindo o mesmo raciocínio brasileiro, WHO e UNAIDS declararam na segunda “UN General Assembly Special Session on HIV/AIDS”, ocorrida em setembro de 2003, que a carência de terapia anti-retroviral em países de baixa e média renda deveria ser considerada como uma emergência para a saúde pública mundial [4]. Foi lançada, então, a iniciativa “3 by 5”, a qual pretendia disponibilizar essa terapia

para 3 milhões de pessoas ao final de 2005. A marca inicialmente desejada por esta campanha foi somente alcançada no final de 2007, representando uma ampliação de 7,5 vezes na cobertura da HAART, porém ainda beneficiando apenas 31% da demanda destes países [4].

A expansão da HAART nos países de baixa e média renda resultou não somente na elevação dos custos diretos com a compra dos medicamentos, mas também na conseqüente necessidade de aquisição de exames laboratoriais para o acompanhamento dessa terapia [5]. Nos países mais desenvolvidos, o monitoramento da eficácia da HAART é realizado através de avaliações clínicas e laboratoriais freqüentes, sendo a CV considerada o exame de padrão ouro atual, acompanhada pela contagem de linfócitos T CD_4^+ (CD_4^+). A CV pode alcançar mais de US\$ 60 por exame, assim como cada contagem de CD_4^+ possui custo unitário aproximado de US\$ 20 [6,7]. Os custos dos kits e a necessidade de infra-estrutura e tecnologias avançadas para a realização desses exames parecem ser impraticáveis em várias localidades nas quais a HAART está sendo disponibilizada. Vários autores vêm alertando para o fato de que, para que se possa continuar a expansão do acesso à HAART, devem ser pesquisados marcadores de eficácia da terapia anti-retroviral (TARV) mais acessíveis, assim como há necessidade de que se diminua o preço dos exames de padrão ouro [6,8]. Respondendo a esta demanda, o preço do exame de CV foi bastante reduzido no Brasil, resultado da realização de processo licitatório nacional que permitiu atingir o preço de US\$ 10 por amostra. Porém, esse

custo e a necessidade de tecnologia específica ainda parecem inalcançáveis para muitos países.

Considerando os fatos supracitados, há, atualmente, três vertentes quanto ao monitoramento da HAART. Uma delas é amparada por Phillips *et al* [6], que utilizaram um modelo de simulação computadorizada para sugerir que os benefícios da CV e da contagem de CD_4^+ seriam muito modestos para pacientes iniciando esquemas ARV de primeira linha, quando comparados à utilização isolada do monitoramento clínico. Esta linha de raciocínio também é compartilhada pela WHO que, em locais onde a contagem de CD_4^+ não está disponível, orienta a troca do esquema ARV através da verificação de estágios clínicos após seis meses de terapia [9]. Neste caso, seriam economizados recursos importantes com exames laboratoriais, porém, haveria maiores riscos de complicações clínicas e de seleção de mutantes, considerando o maior tempo de falha terapêutica (FT), além da conseqüente elevação da transmissão do HIV [6]. Por outro lado, há a linha que defende o uso de CV e CD_4^+ que, mesmo com maior custo, diminuiriam os riscos de infecções oportunistas, a seleção de mutantes e ou a transmissão viral. Lawn *et al* [10] afirmam que o monitoramento da HAART através da CV poderia resultar em melhor relação custo-benefício pelo fato de ajudar a diagnosticar precocemente a baixa adesão dos pacientes, permitindo a sua intensificação e prevenindo trocas desnecessárias para esquemas de segunda linha, muito mais caros que os de primeira. E, finalmente, existe a opção por alternativa intermediária, a qual

sugere que alguns exames laboratoriais mais básicos, como os níveis de hemoglobina e a contagem de linfócitos totais periféricos, poderiam ser associados à apresentação clínica do paciente para o monitoramento da HAART [5].

Ao se buscar marcadores alternativos de eficácia da HAART, é importante que se compreendam os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência do HIV e, conseqüentemente, na ocorrência da falha terapêutica. A resistência das cepas de HIV aos medicamentos ARV segue um padrão tipicamente “darwiniano” e a principal responsável pelo desenvolvimento dessa resistência é a transcriptase reversa (TR). O HIV não possui capacidade de auto-reparação, ou seja, a TR possui elevadas taxas de erro ao produzir as fitas de DNA complementares a partir de suas fitas de RNA originais [11]. Essas mutações induzem trocas de aminoácidos que, por sua vez, geram estruturas moleculares das suas proteínas virais aberrantes. Considerando que o índice de erro natural da TR é cerca de 1/40,000, que a replicação viral em pacientes cronicamente infectados e sem TARV atinge cerca de 10 bilhões de vírions diariamente, e que o vírus possui genoma com o tamanho de 10 kb, todas as mutações possíveis são geradas, diariamente, ao longo do genoma do HIV-1 [12]. Naturalmente, esses vírus mutantes não se fixam, ou seja, não prevalecem, visto que possuem alterações estruturais que diminuem sua capacidade replicativa, quando comparada aos vírus selvagens. Porém, ao se utilizar TARV, principalmente de forma inadequada, os vírus que

possuem mutações genéticas e carregam alterações estruturais em suas enzimas, que os tornam resistentes a esses ARV, podem prevalecer frente aos vírus selvagens e naturalmente sensíveis. Essa “seleção artificial” de vírus resistentes ocorre, principalmente, quando o paciente não adere corretamente à TARV, quando os níveis de ARV se encontram abaixo da concentração inibitória mínima devido a interações medicamentosas, quando se utilizam esquemas de baixa potência, como as terapias simples e dupla e ou quando se administram ARV com baixa barreira genética [12].

Uma consequência negativa para a seleção de vírus resistente é a redução de seu “fitness”, ou seja, da sua capacidade replicativa. Geralmente, há uma cinética característica da CV correspondente a essa diminuição do “fitness” viral. Após queda da CV a níveis indetectáveis com a introdução de HAART, a seleção de vírus resistentes resulta, inicialmente, em elevação discreta da CV. A explicação para tal comportamento sustenta-se na presença de mutações genéticas que reduzem substancialmente a sua capacidade replicativa. Ao se manter o mesmo esquema ARV, ocorre o acúmulo de mutações, pois há replicação do HIV frente à presença de TARV ineficaz. A partir de então, dentre os vírus mutantes, os que acumularem mutações que resultem em recuperação da sua capacidade replicativa irão se fixar. Deste modo, há tendência de que a CV cada vez mais se eleve [13,14]. A manutenção de valores de CV mais baixos nos pacientes em falha terapêutica (FT), quando comparados aos dos indivíduos que ainda não utilizam a referida

terapia, também está associada ao efeito residual da HAART, mesmo que já se apresente ineficaz em tornar a CV indetectável [15].

A hipótese que motivou o presente estudo foi a de que a intensidade e a qualidade da resposta imune nos indivíduos infectados pelo HIV-1 sem uso de HAART, nos que a utilizam e não se encontram em FT e nos pacientes sob HAART que apresentam FT pudessem ser significativamente diferentes, frente à capacidade replicativa do vírus. Procurou-se por marcadores de resposta imune que pudessem refletir essa diferença e que também fossem economicamente mais viáveis que a CV, requerendo pouca infra-estrutura e tecnologia menos avançada. Foram, então, selecionadas para o estudo a β -2 microglobulina sérica e as citocinas séricas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10.

A β -2 microglobulina é uma proteína de 12 KDa, codificada fora do gene do MHC, que se liga não covalentemente à cadeia α 3 do Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano classe I (MHC-I), conferindo estabilidade ao mesmo [16]. As concentrações dessa molécula encontram-se elevadas nos indivíduos com infecção pelo HIV, provavelmente pela elevada produção e liberação induzidas pela ativação de células mononucleares periféricas. Alguns autores sugerem que esse incremento na produção de β -2 microglobulina e outras moléculas do MHC-I poderia ser resultante da produção endógena de interferons e outras citocinas, estimulada pela infecção pelo HIV [17]. Vários trabalhos demonstraram que a β -2 microglobulina poderia ser considerada um marcador de progressão da aids, tanto em adultos quanto na faixa etária

pediátrica [18-20]. Iuliano R *et al* demonstraram, ainda, correlação positiva entre a β -2 microglobulina e a CV [21] e Wanchu *et al* evidenciaram correlação negativa com CD_4^+ [22]. Antes do advento da CV e da HAART, havia poucos trabalhos estudando o comportamento deste marcador biológico com relação à TARV [23,24]. Jacobson *et al* já demonstravam queda dos níveis séricos de β -2 microglobulina com esquemas de monoterapia com AZT [25]. Após a introdução da HAART, houve o estabelecimento da CV como marcador de resposta terapêutica, tornando escassos os artigos que estudaram a mesma ação pela β -2 microglobulina. Murdaca *et al* demonstraram diminuição dos níveis séricos de antígenos da classe I do MHC após HAART, dentre eles a β -2 microglobulina, entre pacientes em estágios A e B do Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e a manutenção de níveis elevados nos pacientes em FT após 36 meses [17].

As citocinas são um grupo diverso de proteínas sinalizadoras intercelulares, que regulam não somente as respostas imunes locais e sistêmicas e respostas inflamatórias, mas, também, a cicatrização de feridas, a hematopoiese e muitos outros processos biológicos [16].

A interleucina-2 (IL-2) é um fator de crescimento para linfócitos T estimulados por antígeno, produzido principalmente por linfócitos T CD_4^+ e, em menores quantidades, por linfócitos T CD_8^+ . Dentre suas ações biológicas, destacam-se a proliferação de células antígeno-específicas, a proliferação e diferenciação de células NK e linfócitos B, estimulando sua produção de

anticorpos, a indução da produção da proteína anti-apoptótica Bcl-2, que promove a sobrevivência celular, além de estimular a produção de citocinas pelas células T [16].

O interferon gama (IFN- γ) é componente da resposta imune do tipo celular. Essa citocina é produzida, principalmente, por células NK e linfócitos T. Suas principais propriedades biológicas na resposta imune são a potente estimulação de macrófagos, com aumento de sua capacidade microbicida e síntese de reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio, o estímulo à expressão de moléculas MHC da classe I e II e de co-estimuladores de células apresentadoras de antígenos, a ativação de linfócitos T, induzindo a diferenciação para o perfil Th1 e inibindo o Th2, a elevação da atividade de células NK, dentre outras [16].

A interleucina-4 (IL-4) é produzida por linfócitos T CD₄⁺ e mastócitos, estimulando a proliferação e a diferenciação de linfócitos para o perfil Th2, a produção de IgE e reações mediadas por mastócitos/basófilos, além da supressão de reações dependentes de macrófagos. Sua presença é deletéria para a produção de resposta imune do tipo celular [16].

A interleucina-10 (IL-10), produzida por macrófagos e células T, é um inibidor de macrófagos e células dendríticas ativadas. Essa citocina está relacionada com a inibição da produção de citocinas como a interleucina-12 (IL-12) e, conseqüentemente, o IFN- γ , além de inibir a expressão de co-estimuladores e de moléculas MHC da classe II em macrófagos e células

dendríticas, promovendo desta forma a resposta imune do tipo humoral. Com essas ações, a IL-10 acaba por inibir a ativação da célula T e finaliza as reações de imunidade mediada por células [16].

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é produzido predominantemente por fagócitos mononucleares ativados, podendo ainda ser secretado por células T estimuladas por antígenos, células NK e por mastócitos. O estímulo mais importante para a secreção dessa citocina é o LPS, principalmente em infecções por bactérias Gram-negativas. A principal função biológica do TNF- α é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção e ativar essas células para erradicar microrganismos. Esse efeito ocorre através da expressão de moléculas de adesão pelo endotélio vascular e do estímulo à produção de quimiocinas. Quando o TNF- α é produzido em grandes quantidades, pode produzir efeitos sistêmicos anômalos, agindo sobre o hipotálamo e produzindo febre, sobre hepatócitos, aumentando a síntese de proteínas de fase aguda e, ainda, induzindo à perda de apetite e suprimindo a síntese de lipase lipoprotéica, resultando em quadro de caquexia. Elevadas concentrações de TNF- α também geram inibição da contratilidade do miocárdio e de vasos sanguíneos, trombose intravascular e hipoglicemia incompatível com a vida. Como consequência das ações sistêmicas dessa citocina em grandes quantidades, pode ocorrer o choque séptico, muitas vezes resultando em óbito do paciente. Além de seu papel inflamatório, o TNF- α também está

associado à indução de apoptose, sendo importante fator associado à perda celular durante a infecção pelo HIV-1 [16].

A principal célula envolvida na produção de citocinas na imunidade adaptativa é o linfócito T “helper” (Th) ou auxiliador e essa pode ser dividida em subtipos. O subtipo Th0 virgem caracteriza-se por células recém produzidas pelo timo, e produzem IL-2. Tais células poderão proliferar e se polarizarem para outros subtipos. O subtipo Th1 caracteriza-se por células que produzem IL-2 e IFN- γ , cujo efeito principal é estimular a imunidade mediada por células. O subtipo Th0 maduro caracteriza-se por células que produzem IFN- γ , IL-4, e outras citocinas. O subtipo Th2 caracteriza-se por células que produzem IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 e TGF- β . Seus efeitos principais são a produção de resposta imune humoral e inibição de processos inflamatórios. Todos os linfócitos Th produzidos apresentam, inicialmente, o perfil Th0 virgem. Dependendo de diferentes estímulos, as mesmas poderão polarizar para o perfil Th1 ou Th2. Os principais estímulos para a polarização são a presença de certas citocinas locais, considerado o mais importante, a presença de hormônios imunologicamente ativos, a quantidade de antígenos, bem como a rota de administração dos mesmos, o tipo de célula apresentadora de antígeno que estimula o linfócito Th e a “firmeza” do sinal das mesmas [26].

Clerici e Shearer foram, em 1993, os primeiros a proporem o uso das citocinas como marcadores de progressão da aids, demonstrando tendência à diminuição dos níveis de IL-2 e IFN- γ e, ainda, a elevação de IL-4 e IL-10 com o

evoluir da doença [27]. Outros trabalhos também estudaram o comportamento das citocinas séricas frente à HAART e, por serem marcadores qualitativos, estas substâncias mostraram-se capazes de oferecer importantes informações sobre a recuperação da resposta imune dos indivíduos sob tratamento, mesmo após os níveis de CV se tornarem indetectáveis e a despeito das contagens de linfócitos T CD₄⁺ não se elevarem significativamente [28-30].

Almeida *et al* demonstraram que os níveis séricos de TNF- α apresentaram-se elevados na fase imediatamente pré-tratamento e declinaram com a instituição da HAART [30]. Estudos relataram que a diminuição dos níveis de TNF- α era compatível com a diminuição da replicação viral e da apoptose, uma vez que essa citocina é indutora de tais fenômenos [31,32]. Lew *et al* [33] referem diminuição do número de células T produtoras de TNF- α nas semanas iniciais do tratamento com esquema potente de anti-retrovirais combinados. Kaufmann *et al* [34] mostraram declínio na secreção de TNF- α com o mesmo tratamento. Aukrust *et al* [35] descreveram dados concordantes com os trabalhos citados, demonstrando que os níveis de TNF- α plasmáticos e *in vitro* apresentaram queda com o tratamento, porém não alcançaram níveis normais. Esses autores [35] associaram a ativação persistente dos componentes do sistema TNF- α à falha terapêutica virológica e imunológica.

Almeida *et al* [30] também demonstraram que os níveis séricos de IL-2 apresentaram-se reduzidos na fase imediatamente pré-tratamento e que se elevaram após HAART, porém mantiveram-se no mesmo nível que dos

indivíduos do grupo controle de normais. Meira *et al* [29] encontraram níveis séricos de IL-2 semelhantes em indivíduos normais, em pacientes sem HAART, nos que faziam uso da terapia e apresentavam CV detectável e, também, nos tratados em que a CV era indetectável. Deve-se enfatizar que as principais hipóteses para a manutenção de baixos níveis séricos da IL-2 sejam devidas à persistência de apoptose de células T CD4⁺ e à mudança do fenótipo dessas células pelo HIV-1, deixando-as com capacidade apenas para produzir IFN- γ , IL-4 e IL-10, tornando a recuperação imune parcial após HAART [36,37]

Ainda de acordo com Meira *et al* [29] e Almeida *et al* [30], os níveis séricos de IFN- γ elevaram-se significativamente nos indivíduos com HAART, quando comparados aos pacientes sem uso dessa terapia. Este achado está de acordo com os verificados por trabalhos que estudaram o comportamento da mesma citocina pelo método de RT-PCR [28,29]. Essa elevação talvez possa ser corroborada pelo estudo de Jansen, Baarle and Miedema, o qual sugere que o comportamento de indivíduos rapidamente progressores, que apresentam CV elevas e células T CD4⁺ específicas continuamente ativadas, induz à diferenciação de células somente capazes de produzir IFN- γ (IL-2⁻ IFN- γ ⁺ ; CD45RA⁻ CCR7⁻) [37]. Outra possível explicação para esse fenômeno seria a manutenção de grande quantidade de linfócitos T CD8⁺, que são os principais produtores de IFN- γ [38].

Trabalhos que estudaram o comportamento da IL-4 e da IL-10 na aids demonstraram que os níveis séricos dos pacientes infectados apresentaram-se

mais elevados que os dos indivíduos normais, porém não se alteraram frente à HAART e à presença, ou não, de CV indetectável após instituição da terapia [29,30].

Atualmente, o exame de genotipagem do HIV-1 mostra-se como importante ferramenta para guiar a troca do esquema HAART, quando o mesmo apresenta-se em falha, evidenciando as mutações genéticas selecionadas a partir do histórico dos esquemas ARV utilizados. [39,40]. Alguns estudos, considerando taxas de resistência primária, concluem que o teste de genotipagem do HIV-1 deva ser realizado antes da introdução da HAART [41,42]. Em estudo realizado pelo Ministério da Saúde, em 2003, a resistência primária no Brasil não ultrapassou 7,0%, sendo de 2,2% para inibidores de protease (IP), 2,4% para os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN) e 2,1% para os inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN) [43]. Porém, outro estudo conduzido na cidade de Santos por Sucupira *et al*, utilizando pacientes com infecção recente pelo HIV-1, revelou a prevalência de resistência cumulativa de 36% [44]. Até o momento, não há indicação para a realização da genotipagem pelo Programa Nacional de DST/Aids do Ministério da Saúde (PN-DST/Aids) [45]. A introdução do teste de genotipagem do HIV-1 no presente trabalho teve como objetivo melhor evidenciar o padrão de resistência viral nos pacientes sem HAART e nos com HAART, principalmente nos que se encontrassem em FT,

relacionando-o com o padrão de resposta imunológica dos marcadores β -2 microglobulina e as citocinas séricas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10.

OBJETIVO

4. OBJETIVO

Considerando a justificativa científica acima apresentada, o objetivo deste estudo foi verificar o comportamento da β -2 microglobulina sérica e das citocinas séricas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 como indicadores de falha da terapia anti-retroviral combinada e potente (HAART).

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(De acordo com o International Committee of Medical Journal Editors - www.icmje.org)

1. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, *et al.* **Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection.** *N Engl J Med* 1998; **338**:853-860.
2. Programa Nacional de DST e Aids do Ministério da Saúde. *Resposta positiva 2008. A experiência do Programa Brasileiro de DST e Aids.* Brasília: Programa Nacional de DST e Aids do Ministério da Saúde 2008. Accessed August 2008: http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments/%7BB8EF5DAF-23AE-4891-AD36-1903553A3174%7D/%7B0CAD21C6-B31E-4358-B67E-4896EAFAAC9E%7D/resposta_2008.pdf.
3. Okie S. **Fighting HIV—lessons from Brazil.** *N Engl J Med* 2006; **354**:1977–1981.
4. World Health Organization. *Towards universal access: scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector: progress report 2008.* Geneva: World Health Organization 2008. Accessed August 2008: <http://www.who.int/hiv/mediacentre/2008progressreport/en/index.html>.
5. Colebunders R, Moses KR, Laurence J, Shihab HM, Semitala F, Lutwama F, *et al.* **A new model to monitor the virological efficacy of antiretroviral treatment in resource-poor countries.** *Lancet Infect Dis* 2006; **6**:53–59.

6. Phillips AN, Pillay DH, Miners AE, Bennett DF, Gilks CD, Lundgren J. **Outcomes from monitoring of patients on antiretroviral therapy in resource-limited settings with viral load, CD4 cell count, or clinical observation alone: a computer simulation model.** *Lancet* 2008; **371**:1443-1451.
7. Rouet F, Rouzioux C. **HIV-1 viral load testing cost in developing countries: what's new?** *Expert Rev Mol Diagn* 2007; **7**:703-707.
8. Moore DM, Mermin J. **Monitoring antiretroviral failure in resource-poor settings.** *Lancet* 2008; **371**:1396-1397.
9. World Health Organization. *Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents: recommendations for a public health approach – 2006 rev.* Geneva: World Health Organization 2008. Accessed December 2008: <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/artadultguidelines.pdf>.
10. Lawn S, Bekker L, Calmy A, Wood R. **Monitoring of antiretroviral therapy in low-resource settings.** *Lancet* 2008; **372**:287-288.
11. Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA. **The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1.** *Science* 1988; **242**:1171-1173.
12. Clavel F, Hance AJ. **Medical progress: HIV drug resistance.** *N Engl J Med* 2004; **350**:1023–1035.
13. Dykes C, Demeter LM. **Clinical Significance of Human Immunodeficiency Virus Type 1 replication fitness.** *Clin Microbiol Rev* 2007; **20**:550-578.

14. Nijhuis M, Deeks S, Boucher C. **Implications of antiretroviral resistance on viral fitness.** *Curr. Opin. Infect. Dis* 2001; **14**:23-28.
15. Deeks SG, Martin JN, Hoh R, Wrin T, Petropoulos C, Grant RM. **Continued Reverse Transcriptase Inhibitor Therapy is Sufficient to Maintain Short-Term Partial Suppression of Multi-drug Resistant Viremia.** *Tenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.* Boston, February 2003.
16. Abbas AK, Litchman AH. **Biologia Celular e Molecular.** Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
17. Murdaca G, Contini P, Setti M, Cagnati P, Villa R, Lantieri F, et al. **Behavior of serum human major histocompatibility complex class I antigen levels in human immunodeficiency virus-infected patients during antiretroviral therapy: Correlation with clinical outcome.** *Hum Immunol* 2007; **68**:894-900.
18. Mildvan D, Landay A, De Gruttola V, Machado SG, Kagan J. **An approach to the validation of markers for use in AIDS clinical trials.** *Clin Infect Dis* 1997; **24**:764-774.
19. Ellaurie M, Rubinstein A. **Beta-2-microglobulin concentrations in pediatric human immunodeficiency virus infection.** *Pediatr Infect Dis J* 1990; **9**:807-809.
20. Multicohort Analysis Project Workshop. **Immunologic markers of AIDS progression: consistency across five HIV-infected cohorts. Part I.** *AIDS* 1994, **8**:911–921.

21. Iuliano R, Forastieri G, Brizzi M, Mecocci L, Mazzotta F, Ceccherini-Nelli L. **Correlation between plasma HIV-1 RNA levels and the rate of immunologic decline.** *J Acquired Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; **14**:408-414.
22. Wanchu A, Arora S, Bhatnagar A, Sud A, Bamberg P, Singh S. **Beta2 microglobulin as a surrogate marker for HIV infection: good correlation with CD4 counts.** *Indian J Pathol Microbiol* 2004; **47**:298-301.
23. Siller L, Martin NL, Kostuchenko P, Beckett L, Rautonen J, Cheng SC, *et al.* **Serum levels of soluble CD8, neopterin, b2-microglobulin and p24 antigen as indicators of disease progression in children with AIDS on zidovudine therapy.** *AIDS* 1993; **7**:369-373.
24. Jacobson MA, Bacchetti P, Kolokathis A, Chaisson RE, Szabo S, Polsky B, *et al.* **Surrogate markers for survival in patients with AIDS and AIDS-related complex treated with zidovudine.** *Br Med J* 1990; **320**:73–78.
25. Jacobson MA, Abrams DI, Volberding PA, Bacchetti P, Wilber J, Chaisson RE, *et al.* **Serum beta 2-microglobulin decreases in patients with AIDS or ARC treated with azidothymidine.** *J Infect Dis* 1989; **159**:1029–1036.
26. Spellberg B, Edwards JE. **Type1/Type2 immunity in infectious diseases.** *Clin Infect Dis* 2001; **32**:76-102.
27. Clerici M, Shearer G. **A Th1→Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection.** *Immunol Today* 1993; **14**:107-111.
28. Imami N, Antonopoulos C, Hardy GA, Gazzard B, Gotch FM. **Assessment of Type 1 and Type 2 cytokines in HIV Type 1- infected individuals:**

- impact of Highly Active Antiretroviral Therapy.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; **15**:1499-1508.
29. Meira DA, Souza LR, Calvi AS, Lima CRG, Henriques RMS, Pardini MI, *et al.* **Correlation between cytokine serum levels, number of CD4⁺T cell/mm³ and viral load in HIV-1 infected individuals with or without antiretroviral therapy.** *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2004; **10**:293-310.
30. Almeida RAMB, Souza LR, Calvi SA, Ikoma MRV, Silva VA, Curi PR, *et al.* **Immune reconstitution in HIV-1 infected patients treated for two years with highly active antiretroviral therapy.** *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2006; **12**:91-109.
31. Ledru E, Lecoœur H, Garcia S, Debord T, Gougeon ML. **Differential susceptibility to activation-induced apoptosis among peripheral Th1 subsets: correlation with Bcl-2 expression and consequences for AIDS pathogenesis.** *J Immunol* 1998; **160**: 3194-3206.
32. Alfano M, Poli G. **Multiple roles of cytokines in HIV infection, replication, and therapy.** In: *Cellular aspects of HIV infection*. Cossariza A, Kaplan D (editors). New York: Wiley-Liss; 2002. pp. 293-312.
33. Lew E, Gallaguer L, Kuehnert M, Rimland D, Hubbard M, Parekh B, *et al.* **Intracellular cytokines in the acute response to highly active antiretroviral therapy.** *AIDS* 2001; **15**:1665-1670.

34. kaufmann GR, Zaunders J, Cooper DA. **Immune reconstitution in HIV-1 infected subjects treated with potent antiretroviral therapy.** *Sex Trans Infect* 1999; **75**:218-224.
35. Aukrust P, Muller F, Lien E, Nordoy I, Liabakk NB, Kvale D, *et al.* **Tumor necrosis factor (TNF) system levels in human immunodeficiency virus-infected patients during highly active antiretroviral therapy: persistent TNF activation is associated with virologic and immunologic treatment failure.** *J Infect Dis* 1999; **179**:74-82.
36. Hel Z, McGhee JR, Mestecky J. **HIV infection: first battle decides the war.** *Trends Immunol* 2006; **27**:274-281.
37. Jansen CA, Van Baarle D, Miedema F. **HIV-specific CD4⁺ T cells and viremia: who's in control?** *Trends Immunol* 2006; **27**:119-124.
38. Gougeon ML, LeCoeur H, Pinto LMO, Ledru E. **Homeostasis and restoration of the immune system in HAART-treated HIV infected patients: implications of apoptosis.** In: *Cellular aspects of HIV infection*. Cossariza A, Kaplan D (editors). New York: Wiley-Liss; 2002. pp. 251-68.
39. Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, Neaton JD, Hoover ML, Winters MA, *et al.* **A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS.** *AIDS* 2000; **14**:F83–F93.

40. Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Schapiro J, Viciano P, Gonzalez J, *et al.* **Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial.** *AIDS* 2002; **16**:209-218.
41. Hecht FM, Grant RM. **Resistance testing in drug-naive HIV-infected patients: is it time?** *Clin Infect Dis* 2005; **41**:1324–1325.
42. Sax PE, Islam R, Walensky RP, Losina E, Weinstein MC, Goldie SJ, *et al.* **Should resistance testing be performed for treatment-naive HIV-infected patients? A cost-effectiveness analysis.** *Clin Infect Dis* 2005; **41**:1316-1323.
43. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, *et al.* **Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals.** *AIDS* 2003; **17**:1063-1069.
44. Sucupira MC, Caseiro MM, Alves K, Tescarollo G, Janini LM, Sabino EC, *et al.* **High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos Brazil.** *AIDS Patient Care STDs* 2007; **21**:116–128.
45. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. *Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos infectados pelo HIV: 2008.* Brasília: Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids 2008. Accessed January 2009:
<http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments/%7BB8EF5DAF->

[23AE-4891-AD36-1903553A3174%7D/%7B762E0EBF-A859-4779-8A92-704EB1F3B290%7D/consensoAdulto005c_2008montado.pdf.](#)

*APRESENTAÇÃO DO
MANUSCRITO*

6. APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO

Após a exposição de sua fundamentação científica, o estudo, como um todo, será apresentado sob a forma de artigo científico, nas línguas portuguesa e inglesa. O formato selecionado está de acordo com o periódico científico “AIDS”, para o qual este estudo está sendo encaminhado para avaliação. As normas de formatação do referido periódico encontram-se em www.aidsonline.com e, também, na seção de anexos desta tese. Para a melhor organização e visualização, os números de páginas dos referidos manuscritos permanecerão na seqüência original de numeração das páginas da tese e as legendas das figuras serão anexadas às mesmas.

Este protocolo de estudo está registrado no “*ClinicalTrials.gov*” com o número NCT00831207 e a cópia do registro também se encontra anexada.

MANUSCRITO

“ β -2 microglobulina e citocinas séricas como indicadores de falha terapêutica aos anti-retrovirais”

“ β -2 microglobulina e citocinas séricas x HAART”

Ricardo AMB Almeida^a, Lenice R Souza^a, Alexandre N Barbosa^b, Sueli A Calvi^a, Maria IMC Pardini^c, Rejane MT Grotto^c, Domingos A Meira^a.

^a Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil.

^b Serviço de Ambulatórios Especializados e Hospital Dia Professor Emérito Domingos Alves Meira, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil.

^c Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil.

Correspondência para Ricardo Augusto Monteiro de Barros Almeida, Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, Distrito de Rubião Jr. S/N, Botucatu-SP, Brasil, CEP-18618-000.

Tel: +55 14 38116212; fax: +55 14 38159898.

E-mail: ralmeida@fmb.unesp.br

Suporte financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Número de palavras do texto: 3136.

Resumo

Objetivo: Verificar o comportamento da β -2 microglobulina e das citocinas séricas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 como indicadores de falha da terapia anti-retroviral combinada e potente (HAART).

Desenho: Estudo de corte transverso.

Métodos: 89 indivíduos HIV-1+ e 20 indivíduos normais foram divididos em 4 grupos: G1- 15 indivíduos HIV-1+, virgens de tratamento ou sem HAART há pelo menos seis meses e $CD_4^+ < 350$ células/mm³; G2- 31 indivíduos HIV-1+, em uso de HAART, sem falha terapêutica virológica (FT), G3- 43 indivíduos HIV-1+, em uso de HAART, com FT e GC- 20 indivíduos normais, que serviram de controle para as citocinas séricas. Foram revisados os dados demográficos, clínicos e de HAART e realizados exames de β -2 microglobulina sérica, citocinas séricas (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10), genotipagem do HIV-1, carga viral plasmática, linfócitos T CD_4^+ e T CD_8^+ .

Resultados: Na comparação entre G1, G2 e G3, para verificar FT, apenas a β -2 microglobulina diferenciou estatisticamente estes grupos ($G1 > G3 > G2$; $p < 0,05$).

Conclusões: A β -2 microglobulina sérica mostrou-se útil na diferenciação entre indivíduos em FT ou não, após HAART. Outros trabalhos prospectivos, com maior número de participantes e na presença de outras co-morbidades, talvez possam corroborar o comportamento deste marcador biológico no monitoramento da HAART, principalmente visando sua possível utilização em locais de baixa renda.

Palavras-chave: β -2 microglobulina, citocinas séricas, HIV-1, resistência, HAART, falha terapêutica, genotipagem.

Introdução

Iniciativas como a “WHO/UNAIDS ‘3 by 5’ permitiram que se atingisse, no ano de 2007, a marca de 3 milhões de pessoas com acesso à terapia anti-retroviral (TARV) em países de baixa e média renda. Esta marca representava uma ampliação de 7,5 vezes nos últimos quatro anos, porém ainda beneficiava apenas 31% da demanda [1]. No Brasil, o acesso ao tratamento da aids é obrigatório e gratuito através de lei e estimava-se que 180.640 pacientes eram beneficiados pela TARV no final 2007. Com isso, foram evitadas cerca de 1.300.000 internações em 10 anos, além da redução na mortalidade e na transmissão da doença [2]. O aumento da cobertura nestes países demanda custos importantes com anti-retrovirais (ARV), porém também levanta outro problema, que é o monitoramento da terapia em localidades de poucos recursos [3]. Considerando os custos elevados do teste de contagem de linfócitos T CD_4^+ (CD_4^+) e de determinação da carga viral plasmática (CV) [4,5], há, atualmente, três vertentes quanto a este monitoramento. Uma delas afirma existir adequada relação custo-benefício ao se introduzir e trocar a TARV considerando apenas parâmetros clínicos. Neste caso, seriam economizados recursos importantes com exames laboratoriais, porém, haveria maiores riscos de complicações clínicas e de seleção de mutantes, considerando maior tempo de falha terapêutica (FT), além da conseqüente elevação da transmissão do HIV [5]. Por outro lado, há a linha que defende o uso de CV e CD_4^+ que, mesmo com maior custo, diminuiriam os riscos de infecções oportunistas, a seleção de mutantes e ou a transmissão viral. Estes exames poderiam demonstrar melhor relação custo-benefício pelo fato de ajudarem a diagnosticar

precocemente a baixa adesão dos pacientes, permitindo a sua intensificação e evitando que fossem efetuadas trocas desnecessárias para esquemas de segunda linha, muito mais caros que os de primeira [6]. E, finalmente, existe a opção por alternativa intermediária, na qual alguns exames laboratoriais de menor complexidade, como a dosagem de hemoglobina e a contagem de linfócitos totais periféricos, seriam associados à apresentação clínica do paciente para o monitoramento da terapia anti-retroviral combinada e potente (HAART) [3]. Há consenso no fato de que devem ser pesquisados marcadores de eficácia da TARV mais acessíveis, assim como a diminuição do preço dos exames de padrão ouro, como a CV, utilizados em países mais ricos.

A β -2 microglobulina é uma proteína de 12 KDa que confere estabilidade ao Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano classe I (MHC-I). As concentrações dessa substância encontram-se elevadas nos indivíduos com infecção pelo HIV, sendo a mesma considerada, ainda, um marcador de progressão da doença [7]. Poucos trabalhos descrevem a ação da β -2 microglobulina como marcador de eficácia da HAART [8].

Clerici e Shearer foram, em 1993, os primeiros a proporem o uso das citocinas como marcadores de progressão da aids, demonstrando tendência à diminuição dos níveis de IL-2 e IFN- γ e, ainda, a elevação de IL-4 e IL-10 com o evoluir da doença [9]. Outros trabalhos também estudaram o comportamento das citocinas séricas frente à HAART e, por serem marcadores qualitativos, estas substâncias mostraram-se capazes de oferecer importantes informações sobre a recuperação da resposta imune dos indivíduos sob tratamento, mesmo após os níveis de CV se tornarem indetectáveis e a despeito das contagens de linfócitos T CD_4^+ não se elevarem significativamente [10-12].

Considerando o comportamento destas substâncias com relação à atividade inflamatória induzida pela replicação do HIV-1 e a necessidade do estudo de marcadores alternativos para o monitoramento da HAART, principalmente em locais de poucos recursos financeiros, o objetivo deste estudo foi o de verificar o comportamento da β -2 microglobulina sérica e das citocinas séricas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 como indicadores da presença, ou não, de FT.

Métodos.

Entre agosto de 2004 e novembro de 2005, foram recrutados para o estudo de corte transversal 89 indivíduos infectados pelo HIV-1, atendidos pela Área de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, e 20 indivíduos normais, doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu. Para serem incluídos no estudo, os infectados pelo HIV-1 deveriam apresentar idade maior que 18 anos e assinarem o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE), além de não possuírem outras causas de imunossupressão, como neoplasias, transplantes, tratamento com substâncias imunossupressoras ou doenças auto-imunes, não estarem em uso de substâncias imunoestimulantes e não se encontrarem em qualquer época do período gestacional. Os indivíduos normais foram incluídos após triagem do Hemocentro de Botucatu, sem queixas clínicas e apresentando exames sorológicos para HIV-1/2, HTLV I/II, hepatite C, hepatite B, sífilis e doença de Chagas não reagentes. Esses também concordaram em assinar o TCLE.

Para que se pudesse alcançar o objetivo do estudo, foram organizados quatro grupos: grupo 1 (G1), formado por 15 indivíduos infectados pelo HIV-1, virgens de tratamento ou sem HAART há pelo menos seis meses e com contagens de linfócitos T CD_4^+ menores que 350 células/mm^3 (neste grupo estariam representados os pacientes com indicação para início ou reinício de HAART, considerando a literatura atual); grupo 2 (G2), formado por 31 indivíduos infectados pelo HIV-1, em uso de HAART e sem falha terapêutica virológica (CV indetectável ou $< 50 \text{ cópias/mL}$, após pelo menos seis meses de HAART); grupo 3 (G3), formado por 43 indivíduos infectados pelo HIV-1, em uso de HAART e com falha terapêutica virológica (CV detectável ou $> 50 \text{ cópias/mL}$, após pelo menos seis meses de HAART), além do grupo controle (GC), formado por 20 indivíduos normais, não infectados pelo HIV-1, doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.

A figura 1 demonstra os parâmetros avaliados em cada grupo de estudo. Para avaliação dos critérios de inclusão, os pacientes foram abordados, aleatoriamente e por ordem de chegada, na data em que coletavam material clínico para os exames de rotina de acompanhamento. Após os mesmos serem entrevistados e incluídos no estudo, foram coletados os dados relacionados aos parâmetros demográficos, condição clínica e TARV, os quais foram complementados, posteriormente, pelo estudo de seus prontuários. Em seguida, foram coletadas amostras de sangue para os parâmetros laboratoriais e encaminhadas aos respectivos laboratórios responsáveis.

As dosagens séricas de β -2 microglobulina foram realizadas, através da técnica de ensaio enzimático de micropartículas - MEIA (AxSYM Abbott), segundo especificações do fabricante. Para a determinação das citocinas séricas IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 e TNF- α , os

soros obtidos foram imediatamente separados e estocados em alíquotas sob refrigeração a -70°C , por até 3 meses. Os níveis séricos das citocinas foram determinados pelo método de ELISA, utilizando-se Quantikine Human Kits (R&D[®] Systems, Minneapolis, MN, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os limites mínimos e máximos de detecção das citocinas séricas foram, respectivamente, 15,6 a 1.000 pg/mL para o TNF- α e IFN- γ , 31,2 a 2.000 pg/mL para a IL-2, 1,6 a 5.000 pg/mL para a IL-4 e 3,2 a 10.000 pg/mL para a IL-10. As determinações da carga viral plasmática do HIV-1 foram realizadas pelo teste de amplificação de DNA em cadeia ramificada (VERSANT[®] HIV-1 RNA 3.0 bDNA system, Bayer Corporation, East Walpole, MA, USA), com o limite de detecção de 50 cópias de RNA/mL de plasma. As contagens de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺, foram realizadas por citometria de fluxo, no aparelho modelo FACSCalibur[™] (BD, San José, CA, USA), utilizando kit TRITEST[™] (BD[®]) anti-CD3-PerCP/CD4-FITC/CD8-PE e tubos TruCount[™] (BD[®]). A genotipagem do HIV-1 foi realizada a partir de RNA viral extraído com o Kit QuiaAmp RNA Viral mini Kit (Quiagen), segundo instruções do fabricante. A técnica utilizada para a realização do teste de genotipagem consistiu numa retrotranscrição seguida por reações de PCR, cujos produtos foram analisados por um sistema de seqüenciamento automático. A retrotranscrição foi realizada utilizando o Kit High Capacity (Applied Biosystems). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do gene da polimerase do HIV-1 foi realizada utilizando 1X Buffer (Invitrogen), 3,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,4mM dNTP, 0,2 μM do primer Kozal 1 (5'-CAGAGCCAA CAGCCCCACCA-3'), 0,2 μM do primer Kozal 2 (5'-TTTCCCCACTAACTTCTGTATGTCATTGACA-3') [13], 2,5U de Taq Recombinant

DNA polimerase (Invitrogen – 5U/ μ L) e 150ng do cDNA num volume total de reação de 50 μ L. A reação procedeu-se com uma desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos, e 1 ciclo para extensão final de 72°C por 10 minutos. A Nested – PCR para amplificação do gene da Transcriptase Reversa foi realizada utilizando 1X Buffer (Invitrogen), 2,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,4mM dNTP (Pharmacia), 0,2 μ M do primer Frenkel 1 (5'-GTTGACTCAGATTGGTTGCAC-3'), 0,2 μ M do primer Frenkel 2 (5'-GTATGTCATTGACAGTCCAGC-3') [14], 2,5U de Taq Recombinant DNA polimerase (Invitrogen – 5U/ μ L) e 5 μ L do produto da PCR num volume total de reação de 50 μ L. A reação procedeu-se com uma desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1,5 minuto, e 1 ciclo para extensão final de 72°C por 10 minutos. A Nested – PCR para amplificação do gene da Protease foi realizada utilizando 1X Buffer (Invitrogen), 2,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,4mM dNTP (Pharmacia), 0,2 μ M do primer DP10 (5'-TAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCG-3'), 0,2 μ M do primer DP 11 (5'-CCATTCCTGGCTTTAATTTTACTGGTA-3') [15], 2,5U de Taq Recombinant DNA polimerase (Invitrogen – 5U/ μ L) e 5 μ L do produto da PCR num volume total de reação de 50 μ L. A reação procedeu-se com uma desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 1 ciclo para extensão final de 72°C por 10 minutos. A reação de marcação fluorescente foi realizada em microplaca de 96 poços, adicionando-se 4 μ L de Big Dye (Applied Biosystems), 0,16 μ M do primer, 4 μ L da amostra purificada num volume total de reação de 10 μ L. Foram realizadas duas reações para cada gene uma utilizando o “primer

forward” e outra o “primer reverse”. As seqüências foram analisadas utilizando o programa de alinhamento de seqüências BioEdit e após a obtenção de uma seqüência consenso, a mesma foi analisada pelo algoritmo seq-HIV do site da Universidade Stanford [16]. Foram consideradas como sensíveis à HAART amostras classificadas como “susceptible” ou “potential low-level resistance”, como resistentes intermediárias “low-level resistance” e “intermediate resistance” e, finalmente, consideradas plenamente resistentes as denominadas “high-level resistance”. As regiões gênicas codificadoras da protease e transcriptase reversa foram subtipadas por ferramentas de alinhamento e similaridade das seqüências geradas utilizando o banco de seqüências da Universidade de Stanford.

Análise estatística

Para a comparação entre os grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para amostras independentes, quando se tratava de variáveis numéricas e o teste exato de Fisher, quando se tratava de variáveis categóricas. Foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

O presente trabalho recebeu parecer favorável pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

Resultados

Quando se analisou o predomínio do sexo masculino, não houve diferença significativa entre G1, G2, G3 e GC. Também não houve diferença estatística com relação à idade entre estes grupos (Tabela 1). O comportamento da β -2 microglobulina foi

diferente, estatisticamente, entre G1, G2 e G3, sendo que os níveis desta foram mais elevados no grupo de indivíduos sem HAART, intermediários nos que utilizavam HAART e apresentavam falha terapêutica virológica e mais baixos nos que faziam uso de HAART, porém não apresentavam falha terapêutica virológica (Tabela 1 e Fig. 2). Considerando as dosagens das citocinas séricas, TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10, não se observou diferença significativa entre G1, G2 e G3, porém, estes grupos evidenciaram níveis séricos de todas as citocinas mais elevados que o GC, com exceção apenas da IL-2, que se demonstrou igual em todos os grupos (Tabela 1 e Fig. 3). Ainda com relação a G1, G2 e G3, pôde-se verificar, estatisticamente, maiores contagens de CD4⁺ e menor porcentagem de pacientes com critérios clínicos definidores de aids atuais em G2, maior frequência de indivíduos que fizeram uso de esquema duplo e que utilizaram maior tempo de TARV total em G3, assim como menor CV neste mesmo grupo, quando comparado ao G1. Outros resultados encontram-se na tabela 1.

Os resultados dos exames de genotipagem do HIV-1 demonstraram que, dentre os pacientes em cujas amostras foi possível realizar a amplificação e o seqüenciamento, observou-se apenas vírus sensíveis nos grupos 1 e 2 e, no grupo 3, apenas vírus com resistência intermediária ou plena (Tabela 1).

Discussão

A β -2 microglobulina foi bastante estudada como marcador de progressão da aids [7,17-20]. Iuliano R *et al* demonstraram correlação positiva entre a β -2 microglobulina e a

CV [19] e Wanchu *et al* evidenciaram correlação negativa com CD_4^+ [17]. Antes do advento da CV e da HAART, havia poucos trabalhos estudando o comportamento deste marcador biológico com relação à TARV. Jacobson *et al* já demonstravam queda dos níveis de β -2 microglobulina com esquemas de monoterapia com AZT [21]. Após a introdução da HAART, houve o estabelecimento da CV como marcador de resposta terapêutica, tornando escassos os artigos que estudaram a mesma ação pela β -2 microglobulina. Murdaca *et al* demonstraram diminuição dos níveis séricos de antígenos da classe I do MHC após HAART, dentre eles a β -2 microglobulina, entre pacientes em estágios A e B do Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e a manutenção de níveis elevados nos pacientes em FT após 36 meses [8]. Após a recente ampliação da HAART para países de baixa e média renda, em que a realização de CV parece impraticável para todos os pacientes, novos trabalhos vêm chamando a atenção para a necessidade da utilização de outros métodos para o monitoramento da terapia [3,22,23]. Não foram encontrados na literatura, até então, artigos que estudassem a utilização de β -2 microglobulina como marcador de evolução da resposta à TARV, na tentativa de diferenciar, mais especificamente, os indivíduos que respondem adequadamente a essa terapia dos que evoluem para falha terapêutica, sejam quais forem as causas.

Os resultados deste trabalho demonstraram que apenas a β -2 microglobulina foi capaz de diferenciar os grupos de indivíduos sem HAART e $CD_4^+ < 350/\text{mm}^3$, os com HAART e sem FT e, também, os com HAART e FT estabelecida. Estes resultados talvez possam ser explicados pelo fato de a β -2 microglobulina ser considerada marcador de atividade inflamatória que, neste caso, tende a diminuir com a redução da CV e do

conseqüente estímulo ao sistema imune. Além da β -2 microglobulina, apenas o CD_4^+ foi capaz de distinguir o grupo de pacientes sem TARV e os que a utilizavam e não apresentavam FT, corroborando estudos anteriores, que consideram este marcador útil, porém com menor importância no seguimento dos pacientes sob TARV, devido a sua grande variabilidade individual na resposta ao tratamento [24].

A determinação das citocinas séricas não foi capaz de diferenciar os grupos de estudo com relação à FT, porém, vale ressaltar que, dentre o seu comportamento, apenas o da IL-2 foi diferente, sendo a única citocina que não conseguiu se elevar de modo significativo quando comparamos aos níveis do grupo controle. Uma hipótese para este comportamento é que a manutenção de baixos níveis séricos da IL-2 seja devida à persistência de apoptose de células T CD_4^+ e a mudança do fenótipo dessas células pelo HIV-1, deixando-as com capacidade apenas para produzir IFN- γ , IL-4 e IL-10, tornando a recuperação imune parcial após HAART [25,26]. Este comportamento não ocorreu com relação aos níveis de, IFN- γ , IL-4 e IL-10, que não se alteraram significativamente com o HAART, porém mantiveram-se sempre acima dos níveis dos indivíduos normais. A manutenção de níveis elevados de IL-10 e IL-4, mesmo após tratamento, dificulta a evolução do perfil tipo Th1 de resposta imune, o que seria desejável para os infectados pelo HIV-1, induzindo os mesmos ao padrão Th0 de resposta. Almeida *et al* demonstraram que os níveis de TNF- α declinaram e os de IL-2 e IFN- γ elevaram-se após HAART [12], o que não foi possível demonstrar estatisticamente neste trabalho. Talvez isto tenha ocorrido pelo fato de que, no presente estudo, as contagens medianas de CD_4^+ no G1 tenham sido ainda relativamente elevadas em comparação as do G2 e G3.

Considerando, ainda, o comportamento das outras variáveis dentre os grupos estudados com relação à FT, foi possível observar o maior tempo de TARV total em G3, menor porcentagem de indivíduos com critérios clínicos atuais definidores de aids e menor número de pacientes que utilizaram esquema duplo em G2, quando comparados à G3 e menor CV em G3 que em G1. Estes achados encontram-se de acordo com a literatura existente.

Atualmente, o exame de genotipagem do HIV-1 mostra-se como importante ferramenta para guiar a troca do esquema HAART, quando o mesmo apresenta-se em falha [27,28]. Apesar do número restrito de pacientes que puderam obter amplificação e seqüenciamento de sua população viral predominante através de genotipagem, notou-se predomínio de vírus com resistência à HAART no grupo de indivíduos com FT. A presença de níveis mais baixos de β -2 microglobulina nesse grupo, quando comparado ao grupo sem HAART, talvez possa ser explicada pela menor capacidade replicativa dos vírus resistentes e pela ação da HAART, mesmo que seja residual sobre esses vírus [29,30]. Pôde-se notar que a CV no grupo de indivíduos sem HAART apresentou-se mais elevada, corroborando a hipótese apresentada. A eficácia da HAART em diminuir a CV a níveis indetectáveis parece explicar os menores níveis de β -2 microglobulina no grupo com HAART e sem FT, quando comparado ao grupo de indivíduos sob HAART e com FT.

O custo do teste para determinação dos níveis séricos de β -2 microglobulina é cerca de duas vezes mais barato que o da CV no Brasil. Deve-se considerar que o preço do exame de CV foi bastante reduzido no Brasil devido à licitação nacional, atingindo cerca de US\$ 10. Caso o mesmo fosse feito com os testes de β -2 microglobulina, esta diferença talvez

poderia ser ainda maior. Considerando o grande aumento na demanda de pacientes em uso de HAART e a conseqüente necessidade de novos marcadores de eficácia da HAART nas localidades em que o exame de CV parece impraticável, os resultados encontrados neste trabalho parecem sugerir que a dosagem sérica de β -2 microglobulina, uma técnica relativamente simples e barata, possa ser útil na diferenciação entre indivíduos em FT ou não, após HAART.

Outros trabalhos prospectivos, com maior número de participantes e na presença de outras co-morbidades, talvez possam corroborar o comportamento deste marcador biológico no monitoramento da HAART. Assim como já vem sendo estudado por outros autores [3], talvez a β -2 microglobulina, em associação com outros parâmetros clínicos e laboratoriais mais acessíveis, possam ser suficientemente eficazes no reconhecimento da FT e até mesmo sua causa. Isto poderia reduzir gastos diretos com exames mais complexos e, indiretos, ao se evitar a troca desnecessária do esquema para os de segunda linha, financeiramente bem menos acessíveis.

Agradecimentos

Agradecemos a importante e espontânea ajuda dos pacientes e doadores de sangue participantes do estudo.

Este projeto de pesquisa recebeu suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

R.A.M.B.A., L.R.S., A.N.B., S.A.C., M.I.M.C.P., R.M.T.G. e D.A.M. participaram do desenho, desenvolvimento, análise dos dados, escrita e revisão do estudo.

Referências Bibliográficas

1. World Health Organization. *Towards universal access: scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector: progress report 2008*. Geneva: World Health Organization 2008. Accessed August 2008: <http://www.who.int/hiv/mediacentre/2008progressreport/en/index.html>.
2. Programa Nacional de DST e Aids do Ministério da Saúde. *Resposta positiva 2008. A experiência do Programa Brasileiro de DST e Aids*. Brasília: Programa Nacional de DST e Aids do Ministério da Saúde 2008. Accessed August 2008: http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments/%7BB8EF5DAF-23AE-4891-AD36-1903553A3174%7D/%7B0CAD21C6-B31E-4358-B67E-4896EAFAAC9E%7D/resposta_2008.pdf.
3. Colebunders R, Moses KR, Laurence J, Shihab HM, Semitala F, Lutwama F, *et al*. **A new model to monitor the virological efficacy of antiretroviral treatment in resource-poor countries**. *Lancet Infect Dis* 2006; **6**:53–59.
4. Rouet F, Rouzioux C. **HIV-1 viral load testing cost in developing countries: what's new?** *Expert Rev Mol Diagn* 2007; **7**:703-707.
5. Phillips AN, Pillay DH, Miners AE, Bennett DF, Gilks CD, Lundgren J. **Outcomes from monitoring of patients on antiretroviral therapy in resource-limited settings with viral load, CD4 cell count, or clinical observation alone: a computer simulation model**. *Lancet* 2008; **371**:1443-1451.

6. Lawn S, Bekker L, Calmy A, Wood R. **Monitoring of antiretroviral therapy in low-resource settings.** *Lancet* 2008; **372**:287-288.
7. Mildvan D, Landay A, De Gruttola V, Machado SG, Kagan J. **An approach to the validation of markers for use in AIDS clinical trials.** *Clin Infect Dis* 1997; **24**:764-774.
8. Murdaca G, Contini P, Setti M, Cagnati P, Villa R, Lantieri F, *et al.* **Behavior of serum human major histocompatibility complex class I antigen levels in human immunodeficiency virus-infected patients during antiretroviral therapy: Correlation with clinical outcome.** *Hum Immunol* 2007; **68**:894-900.
9. Clerici M, Shearer G. **A Th1→Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection.** *Immunol Today* 1993; **14**:107-111.
10. Imami N, Antonopoulos C, Hardy GA, Gazzard B, Gotch FM. **Assessment of Type 1 and Type 2 cytokines in HIV Type 1- infected individuals: impact of Highly Active Antiretroviral Therapy.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; **15**:1499-1508.
11. Meira DA, Souza LR, Calvi AS, Lima CRG, Henriques RMS, Pardini MI, *et al.* **Correlation between cytokine serum levels, number of CD4⁺T cell/mm³ and viral load in HIV-1 infected individuals with or without antiretroviral therapy.** *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2004; **10**:293-310.
12. Almeida RAMB, Souza LR, Calvi SA, Ikoma MRV, Silva VA, Curi PR, *et al.* **Immune reconstitution in HIV-1 infected patients treated for two years with highly active antiretroviral therapy.** *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2006; **12**:91-109.

13. Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan TC, *et al.* **Extensive polymorphism observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays.** *Nature Med* 1996; **2**:753-759.
14. Frenkel LM, Wagner II LE, Atwood SM, Cummins TJ, Dewhurst S. **Specific, sensitive, and rapid assay for human immunodeficiency virus type 1 pol mutations associated with resistance to zidovudine and didanosine.** *J Clin Microbiol* 1995; **33**:342-347.
15. Cerqueira DM, Ramalho ED, Oliveira CP, Silva RR, Franchini M, Felipe MSS, *et al.* **HIV-1 subtypes and mutations associated to antiretroviral drug resistance in human isolates from Central Brazil.** *Braz J Microbiol* 2004; **35**:187-192.
16. Stanford University. *Stanford University HIV Drug Resistance Database*. Palo Alto: Stanford University 2008. Accessed April 2008: <http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/HIVdb.html>.
17. Wanchu A, Arora S, Bhatnagar A, Sud A, Bambery P, Singh S. **Beta2 microglobulin as a surrogate marker for HIV infection: good correlation with CD4 counts.** *Indian J Pathol Microbiol* 2004; **47**:298-301.
18. Ellaurie M, Rubinstein A. **Beta-2-microglobulin concentrations in pediatric human immunodeficiency virus infection.** *Pediatr Infect Dis J* 1990; **9**:807-809.
19. Iuliano R, Forastieri G, Brizzi M, Mecocci L, Mazzotta F, Ceccherini-Nelli L. **Correlation between plasma HIV-1 RNA levels and the rate of immunologic decline.** *J Acquired Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; **14**:408-414.
20. Phillips AN, Sabin CA, Elford J, Bofill M, Timms A, Janossy G, *et al.* **Serum beta 2-microglobulin at HIV-1 seroconversion as a predictor of severe**

- immunodeficiency during 10 years of follow-up.** *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; **13**:262-266.
21. Jacobson MA, Abrams DI, Volberding PA, Bacchetti P, Wilber J, Chaisson RE, *et al.* **Serum beta 2-microglobulin decreases in patients with AIDS or ARC treated with azidothymidine.** *J Infect Dis* 1989; **159**:1029–1036.
 22. Kent DM, McGrath D, Ioannidis JP, Bennish ML. **Suitable monitoring approaches to antiretroviral therapy in resource poor settings: setting the research agenda.** *Clin Infect Dis* 2003; **37**:S13–S24.
 23. Moore DM, Mermin J. **Monitoring antiretroviral failure in resource-poor settings.** *Lancet* 2008; **371**:1396-1397.
 24. Chaiwarith R, Wachirakaphan C, Kotarathititum W, Praparatanaphan J, Sirisanthana T, Supparatpinyo K. **Sensitivity and specificity of using CD4+ measurement and clinical evaluation to determine antiretroviral treatment failure in Thailand.** *Int J Infect Dis* 2007; **11**:413–416.
 25. Hel Z, McGhee JR, Mestecky J. **HIV infection: first battle decides the war.** *Trends Immunol* 2006; **27**:274-281.
 26. Jansen CA, Van Baarle D, Miedema F. **HIV-specific CD4⁺ T cells and viremia: who's in control?** *Trends Immunol* 2006; **27**:119-124.
 27. Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, Neaton JD, Hoover ML, Winters MA, *et al.* **A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS.** *AIDS* 2000; **14**:F83–F93.

28. Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Schapiro J, Viciano P, Gonzalez J, *et al.* **Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial.** *AIDS* 2002; **16**:209-218.
29. Nijhuis M, Deeks S, Boucher C. **Implications of antiretroviral resistance on viral fitness.** *Curr. Opin. Infect. Dis* 2001; **14**:23-28.
30. Deeks SG, Martin JN, Hoh R, Wrinn T, Petropoulos C, Grant RM. **Continued reverse transcriptase inhibitor therapy is sufficient to maintain short-term partial suppression of multi-drug resistant viremia.** *Tenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.* Boston, February 2003.

Tabela 1 – Comparação entre GC, G1, G2 e G3 em relação aos parâmetros demográficos, clínicos, laboratoriais, terapêuticos e genotípicos.

Variável	n	GC	n	G1	n	G2	n	G3
Sexo masculino (%) ⁽²⁾	20	80,0a	15	46,7a	31	67,7a	43	51,2a
Idade (anos) ⁽¹⁾	20	37(27 ; 49)a	15	38(33 ; 50)a	31	37(31 ; 46)a	43	40(33 ; 46)a
TNF- α (pg/mL) ⁽¹⁾	20	97,5(78 ; 118)a	15	510(360 ; 710)b	31	410(311 ; 604)b	43	516(380 ; 704)b
IFN- γ (pg/mL) ⁽¹⁾	20	209(177 ; 271)a	15	580(450 ; 610)b	31	580(417 ; 717)b	43	588(320 ; 686)b
IL-2 (pg/mL) ⁽¹⁾	20	104(70 ; 137)a	15	88(81 ; 113)a	31	98(91 ; 117)a	43	102(86 ; 128)a
IL-4 (pg/mL) ⁽¹⁾	20	10(5 ; 10)a	15	41(38 ; 48)b	31	44(36 ; 48)b	43	46(36 ; 61)b
IL-10 (pg/mL) ⁽¹⁾	20	9(5 ; 10)a	15	41(36 ; 56)b	31	46(36 ; 63)b	43	46(41 ; 61)b
β -2 microglobulina (mg/mL) ⁽¹⁾	-	-	12	2,92(2,29 ; 3,86)a	29	1,61(1,31 ; 1,89)b	41	2,02(1,51 ; 2,36)c
CD4 ⁺ (células/mm ³) ⁽¹⁾	-	-	15	244(234 ; 274)a	31	393(291 ; 550)b	43	298(187 ; 431)a
CD8 ⁺ (células/mm ³) ⁽¹⁾	-	-	15	696(600 ; 1216)a	31	847(522 ; 1120)a	42	892(636 ; 1150)a
CV (cópias de RNA/mL) ⁽¹⁾	-	-	15	59.264(28.196 ; 133.705)a	-	-	43	5.171(928 ; 16.915)b
Resistência viral (%)	-	-	4	0,0	1	0,0	16	100,0
Critério prévio definidor de aids (%) ⁽²⁾	-	-	15	40,0a	28	82,1b	43	79,1b
Critério clínico atual definidor de aids (%) ⁽²⁾	-	-	15	6,7a	31	0,0b	42	4,8a
Subtipo B (%)	-	-	3	100,0	1	100,0	16	93,8
Subtipo F (%)	-	-	3	0,0	1	0,0	16	6,2
Tempo de TARV atual contínua (meses) ⁽¹⁾	-	-	-	-	29	25(12 ; 31)a	42	31(17 ; 49)a
Esquema atual com ITRNN (%) ⁽²⁾	-	-	-	-	30	50,0a	43	39,5a
Esquema atual com IP (%) ⁽²⁾	-	-	-	-	30	46,7a	43	55,8a
Tempo de TARV total (meses) ⁽¹⁾	-	-	12	0(0 ; 0)a	22	39(27 ; 67)b	34	71(57 ; 90)c
Número de esquemas ARV por paciente ⁽¹⁾	-	-	14	0(0 ; 1)a	30	2(1 ; 4)b	42	4(2 ; 6)b
Uso prévio de esquema duplo (%) ⁽²⁾	-	-	14	7,1a	30	36,7a	41	61,0b
Tempo de esquema duplo (meses) ⁽¹⁾	-	-	13	0(0 ; 0)a	28	0(0 ; 10)b	36	6(0 ; 20)b

(1) Letras diferentes entre dois grupos indica diferença significativa, $p < 0,05$, pelo teste de Mann-Whitney para amostras independentes. Resumo descritivo em mediana e quartis.

(2) Letras diferentes entre dois grupos indicam diferença significativa, $p < 0,05$, pelo teste exato de Fisher. GC - formado por 20 indivíduos normais, doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu. G1 - formado por 15 indivíduos infectados pelo HIV-1, virgens de tratamento ou sem uso de HAART há pelo menos seis meses e com contagens de linfócitos T CD4⁺ menores que 350 células/mm³. G2 - formado por 31 indivíduos infectados pelo HIV-1, em uso de HAART e sem falha terapêutica virológica (CV indetectável, < 50 cópias/mL, após pelo menos seis meses de HAART). G3 - formado por 43 indivíduos infectados pelo HIV-1, em uso de HAART e com falha terapêutica virológica (CV detectável, > 50 cópias/mL, após pelo menos seis meses de HAART).

Parâmetro	Grupo			
	G1	G2	G3	GC
Idade	•	•	•	•
Sexo	•	•	•	•
IL-2	•	•	•	•
IFN- γ	•	•	•	•
IL-4	•	•	•	•
IL-10	•	•	•	•
TNF- α	•	•	•	•
β -2 microglobulina	•	•	•	
CD $_4^+$ atual	•	•	•	
CD $_8^+$ atual	•	•	•	
Carga viral plasmática atual	•		•	
Resistência viral genotípica	•	•	•	
Critério definidor de aids prévio	•	•	•	
Critério clínico definidor de aids atual	•	•	•	
Subtipo viral (B ou F)	•	•	•	
Número de esquemas ARV utilizados por paciente	•	•	•	
Tempo de TARV total	•	•	•	
Uso prévio de esquema duplo	•	•	•	
Tempo total de esquema duplo		•	•	
Tempo de TARV atual contínua		•	•	
Esquema atual com inibidor de protease (IP)		•	•	
Esquema atual com inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo (ITRNN)		•	•	

Fig. 1. Parâmetros avaliados em cada grupo de estudo. G1 - formado por 15 indivíduos infectados pelo HIV-1, virgens de tratamento ou sem uso de HAART há pelo menos seis meses e com contagens de linfócitos T CD $_4^+$ menores que 350 células/mm 3 . G2 - formado por 31 indivíduos infectados pelo HIV-1, em uso de HAART e sem falha terapêutica virológica (CV indetectável ou < 50 cópias/mL, após pelo menos seis meses de HAART). G3 - formado por 43 indivíduos infectados pelo HIV-1, em uso de HAART e com falha terapêutica virológica (CV detectável ou > 50 cópias/mL, após pelo menos seis meses de HAART). GC - formado por 20 indivíduos normais, doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.

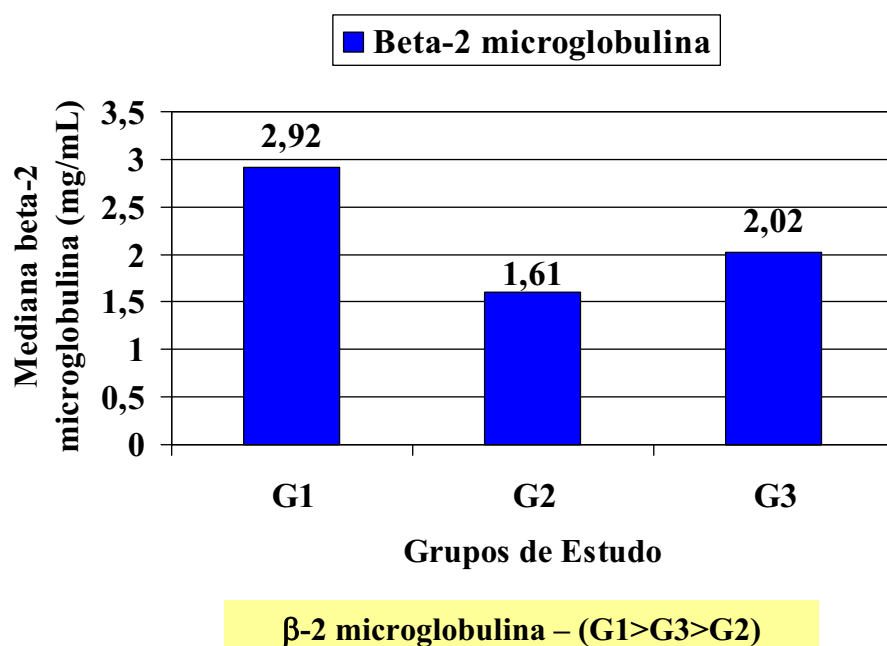


Fig. 2. Medianas das dosagens de β -2 microglobulina e análise estatística comparativa entre os grupos ($p < 0,05$). G1 - 15 indivíduos infectados pelo HIV-1, virgens de tratamento ou sem uso de HAART há pelo menos seis meses e com contagens de linfócitos T CD_4^+ menores que 350 células/mm³. G2 - 31 indivíduos infectados pelo HIV-1, em uso de HAART e sem falha terapêutica virológica (CV indetectável, < 50 cópias/mL, após pelo menos seis meses de HAART). G3 - 43 indivíduos infectados pelo HIV-1, em uso de HAART e com falha terapêutica virológica (CV detectável, > 50 cópias/mL, após pelo menos seis meses de HAART).

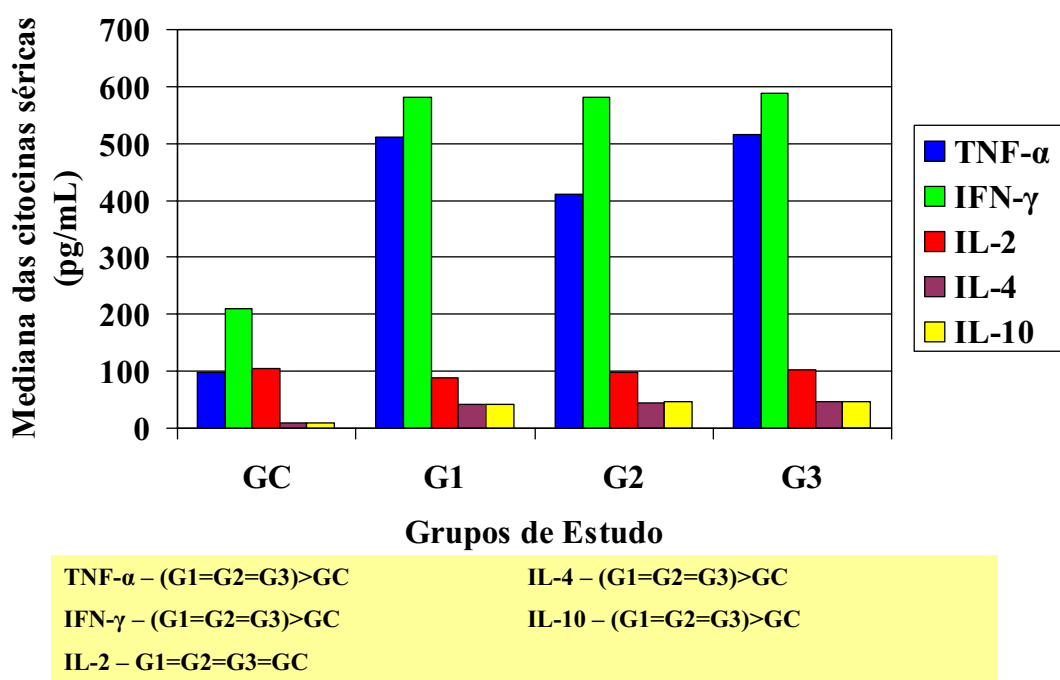


Fig. 3. Medianas das dosagens das citocinas séricas (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10) e análise estatística comparativa entre os grupos ($p < 0,05$). GC - 20 indivíduos normais, doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu. G1 - 15 indivíduos infectados pelo HIV-1, virgens de tratamento ou sem uso de HAART há pelo menos seis meses e com contagens de linfócitos T CD $_4^+$ menores que 350 células/mm 3 . G2 - 31 indivíduos infectados pelo HIV-1, em uso de HAART e sem falha terapêutica virológica (CV indetectável, < 50 cópias/mL, após pelo menos seis meses de HAART). G3 - 43 indivíduos infectados pelo HIV-1, em uso de HAART e com falha terapêutica virológica (CV detectável, > 50 cópias/mL, após pelo menos seis meses de HAART).

MANUSCRIPT

β -2 microglobulin and serum cytokines as indicators of antiretroviral therapy failure

β -2 microglobulin and serum cytokines x HAART

Ricardo AMB Almeida^a, Lenice R Souza^a, Alexandre N Barbosa^b, Sueli A Calvi^a, Maria IMC Pardini^c, Rejane MT Grotto^c, Domingos A Meira^a.

^a Department of Tropical Diseases and Imaging Diagnosis, Botucatu School of Medicine, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

^b Specialized Outpatient Service and Day Hospital Professor Emeritus Domingos Alves Meira, Botucatu School of Medicine Hospital Complex, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

^c Blood Transfusion Center, Botucatu School of Medicine, São Paulo State University – UNESP, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

Corresponding author: Ricardo Augusto Monteiro de Barros Almeida

Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem

Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Distrito de Rubião Jr. S/N

18618-000 - Botucatu – SP

Brazil

Tel: +55 14 3811 6212 - Fax: +55 14 3815 9898.

E-mail: ralmeida@fmb.unesp.br

Financial support: *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* and *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*.

Word count of text: 3042.

Abstract

Objective: To assess the behavior of serum β -2 microglobulin and serum cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 as indicators of highly active antiretroviral therapy (HAART) failure

Design: Cross-sectional study.

Methods: Eighty-nine HIV-1+ patients and 20 normal individuals were divided into 4 groups: G1- 15 HIV-1+ individuals, previously untreated or without HAART for at least six months and $CD_4^+ < 350$ cells/mm³; G2- 31 HIV-1+ individuals undergoing HAART without virological therapeutic failure (TF), G3- 43 HIV-1+ individuals undergoing HAART with TF, and CG- 20 normal individuals who served as controls for serum cytokines. Demographic, clinical and HAART data were reviewed, and serum β -2 microglobulin, serum cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10), HIV-1 genotyping, plasma viral load and T CD_4^+ and CD_8^+ lymphocytes tests were performed.

Results: G1, G2 and G3 comparison to assess TF showed statistical difference only for β -2 microglobulin between these groups ($G1 > G3 > G2$; $p < 0.05$).

Conclusions: Serum β -2 microglobulin showed to be useful for differentiating individuals with TF or not after HAART. Further prospective studies on a larger number of patients and in the presence of other co-morbidities may be able to corroborate the behavior of this biological marker for HAART monitoring, particularly aiming at its possible use in low-income areas.

Key words: β -2 microglobulin, serum cytokines, HIV-1, resistance, HAART, therapeutic failure, genotyping.

Introduction

Initiatives such as WHO/UNAIDS '3 by 5' made it possible to achieve the figure of 3 million people with access to antiretroviral therapy (ART) in middle- and low-income countries in 2007. This figure represented a 7.5-fold increase in the last four years; however, it still only benefited 31% of the demand [1]. In Brazil, access to AIDS treatment is mandated and free by law, and it is estimated that 180,640 patients were benefited by ART at the end of 2007. As a result, approximately 1,300,000 hospitalizations were prevented in 10 years, in addition to reduction in mortality and disease transmission [2]. The increase in these countries' coverage leads to important expenditure on antiretroviral drugs (ART); however, it also raises another problem, which is therapy monitoring in low-income locations [3]. Taking into account the high cost of T CD₄⁺ (CD₄⁺) lymphocyte counts and plasma viral load (VL) tests [4,5], three tendencies presently exist as regards such monitoring. One of them states that an adequate cost-benefit relationship exists when ART is introduced or changed based only on clinical parameters. In this case, important resources would be economized on laboratory tests; however, there would be higher risk of clinical complications and mutant selection, considering a longer therapeutic failure (TF) time in addition to the resulting increase in HIV transmission [5]. On the other hand, some authors advocate the use of VL and CD₄⁺ which, although more costly, would decrease risks for opportunistic infections, mutant selection and viral transmission. Such tests could show a better cost-benefit relationship for helping the early diagnosis of patients' low adherence, thus enabling its intensification and preventing unnecessary changes to second-line schemes, which are much more costly than first-line treatment schemes [6]. And finally, there is the option for an intermediate alternative, in which some more basic

laboratory tests, such as hemoglobin level and total lymphocyte count, would be associated with patients' clinical presentation for highly active antiretroviral therapy (HAART) monitoring [3]. There is agreement on the fact that more accessible ART efficacy markers must be studied, as for instance the price reduction for gold-standard tests, such as VL, which is used in richer countries.

β -2 microglobulin is a 12-Kda protein which provides stability to the human major histocompatibility complex class I (MHC-I), and high levels of such protein are found in HIV-infected patients. It is still considered to be a disease progression marker [7]; however, few studies describe β -2 microglobulin action as an efficacy marker for the HAART [8].

Clerici and Shearer were the first to propose the use of cytokines as AIDS progression markers in 1993 by showing a tendency to reduction in IL-2 and IFN- γ levels and also to an increase in IL-4 and IL-10 as the disease developed [9]. Other studies have also investigated the behavior of serum cytokines in relation to HAART and, because they are qualitative markers, these substances showed to be capable of providing important information on the recovery of immune response in individuals under treatment even after VL levels became undetectable and despite the fact that T CD $_4^+$ lymphocyte count did not significantly increase [10-12].

By considering the behavior of such substances in relation to inflammatory activity induced by HIV-1 replication and the need to study alternative markers for HAART monitoring, particularly in areas with reduced financial resources, this study aimed at assessing the behavior of serum β -2 microglobulin and serum cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 as indicators of the presence, or not, of TF.

Methods

From August 2004 to November 2005, 89 HIV-1-infected individuals assisted by the Tropical Diseases Sector of the Botucatu School of Medicine – UNESP and 20 normal blood donors at the Blood Transfusion Center of Botucatu were recruited for participation in this cross-sectional study. To be included in the investigation, the HIV-1-infected individuals should be over 18 years old and sign the “written consent form” (WCF), in addition to not presenting other immunosuppression causes, such as neoplasias, transplantations, treatment by immunosuppressive substances or auto-immune diseases. They should not also be using any type of immunostimulating substances or at any time of gestation. The normal individuals were included after screening at the Blood Transfusion Center of Botucatu. They had no clinical complaints and presented nonreagent serological test results for HIV-1/2, HTLV I/II, hepatitis C, hepatitis B, syphilis and Chagas Disease. They also agreed to sign the WCF.

In order to achieve the objective of the study, four groups were organized: Group 1 (G1), consisting of 15 HIV-1-infected patients who had been previously untreated or without HAART for at least 6 months and showed T CD4⁺ lymphocyte count smaller than 350 cells/mm³ (patients indicated for HAART commencement or re-commencement would be represented in this group, according to the present literature); Group 2 (G2), consisting of 31 HIV-1-infected individuals undergoing HAART and showing no detectable virological therapeutic failure (undetectable VL or < 50 copies/mL, at least six months after HAART implementation); Group 3 (G3), consisting of 43 HIV-1-infected patients undergoing HAART and showing virological therapeutic failure (detectable VL or > 50 copies/mL, at least six months after HAART implementation), in addition to the control

group (CG), composed of 20 normal non-infected individuals who were blood donors at the Blood Transfusion Center of Botucatu.

Figure 1 shows the parameters evaluated in each study group. For evaluation of the inclusion criteria, the patients were randomly approached according to their time of arrival at the hospital on the date when clinical material samples were collected for routine follow-up tests. After they were interviewed and included in the study, data related to demographic parameters, clinical conditions and ART were collected. Such data were later complemented by the study of their medical charts. Next, blood samples for laboratory parameters were collected and sent to the respective laboratories in charge of each test type.

Serum β -2 microglobulin measurements were performed by the microparticle enzyme immunoassay (MEIA) technique (AxSYM Abbott), according to the manufacturer's specifications. For determining serum cytokines IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 and TNF- α , the sera obtained were immediately separated and stored in aliquots under refrigeration at -70°C for up to 3 months. The serum levels of the cytokines were determined by the ELISA method, using Quantikine Human Kits (R&D® Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. The minimum and maximum limits of serum cytokine detection were, respectively, 15.6 to 1,000 pg/mL for TNF- α and IFN- γ , 31.2 to 2,000 pg/mL for IL-2, 1.6 to 5,000 pg/mL for IL-4 and 3.2 to 10,000 pg/mL for IL-10. Determinations of HIV-1 plasma viral load were conducted by the branched-chain DNA amplification test (VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 bDNA system, Bayer Corporation, East Walpole, MA, USA), with the detection limit of 50 RNA copies/mL of plasma. T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocyte counts were performed by flow cytometry on the equipment model FACSCalibur™ (BD, San Jose, CA, USA), using kit TRITEST™ (BD®) anti-CD3-

PerCP/CD4-FITC/CD8-PE and TruCount™ (BD®) tubes. HIV-1 genotyping was performed from viral RNA extracted by the QuiaAmp RNA Viral mini Kit (Quiagen), according to the manufacturer's instructions. The technique used for performing genotyping tests consisted of a retrotranscription followed by Polymerase Chain Reactions (PCR) whose products were analyzed by an automated sequencing system. Retrotranscription was performed by using the High Capacity kit (Applied Biosystems). PCR for amplification of the HIV-1 polymerase gene was conducted by using 1X Buffer (Invitrogen), 3.5 mM of MgCl₂ (Invitrogen), 0.4mM dNTP, 0.2μM of Kozal-1 primer (5'-CAGAGCCAACAGCCCCACCA-3'), 0.2 μM of Kozal-2 primer (5'-TTTCCCCACTAACTTCTGTATGTCATTGACA-3') [13], 2.5U of Taq Recombinant DNA polymerase (Invitrogen – 5U/μL) and 150ng of cDNA at a total reaction volume of 50μL. The reaction proceeded with an initial denaturation at 94°C for 10 minutes, 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, 72°C for 2 minutes and 1 cycle of 72°C for 10 minutes for final extension. A nested PCR was performed for amplification of the Reverse Transcriptase gene by using 1X Buffer (Invitrogen), 2.5 mM of MgCl₂ (Invitrogen), 0.4mM dNTP (Pharmacia), 0.2 μM of the Frenkel-1 primer (5'-GTTGACTCAGATTGGTTGCAC-3'), 0.2μM of the Frenkel-2 primer (5'-GTATGTCATTGACAGTCCAGC-3') [14], 2.5U of Taq Recombinant DNA polymerase (Invitrogen – 5U/μL) and 5 μL of the PCR product at a total reaction volume of 50μL. The reaction proceeded with an initial denaturation at 94°C for 10 minutes, 35 cycles of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute, 72°C for 1.5 minute, and 1 cycle of 72°C for 10 minutes for final extension. A nested PCR was performed for amplification of the Protease gene by using 1X Buffer (Invitrogen), 2.5 mM of MgCl₂ (Invitrogen), 0.4mM dNTP (Pharmacia),

0.2 μ M of primer DP10 (5'-TAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCG-3'), 0.2 μ M of primer DP 11 (5'-CCATTCCTGGCTTTAATTTTACTGGTA-3') [15], 2.5U of Taq Recombinant DNA polymerase (Invitrogen – 5U/ μ L) and 5 μ L of the PCR product at a total reaction volume of 50 μ L. The reaction proceed with an initial denaturation at 94°C for 10 minutes, 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, 72°C for 1 minute and 1 cycle of 72°C for 10 minutes for final extension. The fluorescent staining reaction was performed on a 96-well microplate by adding 4 μ L of Big Dye (Applied Biosystems), 0.16 μ M of primer, 4 μ L of the purified sample at a total reaction volume 10 μ L. Two reactions were performed for each gene, one using the forward primer and another utilizing the reverse primer. The sequences were analyzed in the BioEdit Sequence Alignment Editor, and after obtaining a consensus sequence, it was analyzed by the seq-HIV algorithm of the Stanford University website [16]. The samples classified as “susceptible” or “potential low-level resistance” were considered to be sensitive to HAART. Those classified as “low-level resistance” and “intermediate resistance” were considered to be intermediate samples, and finally, those denominated “high-level resistance” were considered to be fully resistant. The protease- and reverse-transcriptase-codifying gene regions were subtyped by alignment tools and similarity of the sequences generated by using the sequence database of Stanford University.

Statistical Analysis

The Mann-Whitney test for independent samples was used for between-group comparison in the case of numeric variables, and Fisher's exact test was applied for category variables. Statistical difference was considered when $p < 0.05$.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Botucatu School of Medicine-UNESP.

Results

When analyzing the predominance of males, no significant difference was found between G1, G2, G3 and GC. Also, there was no statistical difference in relation to age between the groups (Table 1). β -2 microglobulin behavior was statistically different between G1, G2 and G3, and its levels were higher in the group of individuals without HAART, intermediate in those using HAART and presented TF, and lower in those using HAART but did not present TF (Table 1 and Fig. 2). By considering the dosages of serum cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10, no significant difference was observed between G1, G2 e G3; however, these groups presented higher serum levels for all cytokines than CG, except only for IL-2, which showed to be the same in all groups (Table 1 and Fig. 3). Also, in relation to G1, G2 and G3, it was possible to statistically observe higher CD₄⁺ counts and lower percentages of patients with present clinical AIDS-defining criteria in G2, a higher frequency of individuals who used a dual scheme and who used total ART for a longer time in G3, as well as lower VL in the same group when compared to G1. Further results are shown in Table 1.

The results of HIV-1 genotyping tests showed that, among the patients on whose samples it was possible to perform amplification and sequencing, only sensitive viruses were observed in groups 1 and 2, and only intermediate- or full-resistance in group 3 (Table 1).

Discussion

β -2 microglobulin has been frequently studied as a marker for AIDS progression [7,17-20]. Iuliano R *et al* have shown a positive correlation between β -2 microglobulin and VL [19], and Wanchu *et al* have reported a negative correlation with CD_4^+ [17]. Prior to the VL advent and HAART, there were few studies on the behavior of such biological marker in relation to ART. Jacobson *et al* have reported a decrease in serum β -2 microglobulin levels as a result of AZT monotherapy [21]. After the introduction of HAART, VL was established as a marker for the therapeutic response, and reports investigating the same action by β -2 microglobulin became scarce. Murdaca *et al* showed a reduction in the serum levels of MHC-I antigens after HAART, among which is β -2 microglobulin, in level-A and level-B patients of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and the maintenance of high levels in patients with TF after 36 months [8]. It was only after the recent expansion of HAART to low- and middle-income countries, where VL performance seems unfeasible for all patients, that new studies have pointed out the need to use other methods for therapy assessment [3,22,23]. So far, no reports have been found in the literature investigating the use of β -2 microglobulin as a marker for ART response development in order to more specifically differentiate individuals who respond adequately to such therapy from those who develop to therapeutic failure, whatever the causes are.

The results in this study have shown that β -2 microglobulin only was able to differentiate the groups of individuals without HAART and $CD_4^+ < 350/\text{mm}^3$, those with HAART and without TF as well as those with HAART and established TF. These findings may be explained by the fact that β -2 microglobulin is considered to be an inflammatory-activity marker which, in this case, tends to diminish with the reduction of VL and of the

consequent stimulation of the immune system. In addition to β -2 microglobulin, only CD_4^+ was capable of distinguishing the group of patients without ART from those who used it and did not present TF, thus corroborating previous studies which consider such marker to be useful although less important in the follow-up of patients undergoing ART due to its high individual variability in treatment response[24].

The determination of serum cytokines was not capable of differentiating the groups in relation to TF; however, it is noteworthy that, in their behavior, only IL-2 was different, since it was the only cytokine that could not increase significantly when compared to the control group. A hypothesis for this behavior is that the maintenance of low IL-2 serum levels is due to the persistence of apoptosis of T CD_4^+ cells and the change in such cells' phenotype by HIV-1, which makes them capable to produce only IFN- γ , IL-4 and IL-10, thus making immune recovery partial after HAART [25,26]. Such behavior did not occur in relation to the levels of IFN- γ , IL-4 and IL-10, which were not significantly altered by HAART, but remained always above the levels shown by normal individuals. The maintenance of high IL-10 and IL-4 levels, even after the treatment, hinders the development of the Th1-type immune response profile, which would be desirable for individuals infected with HIV-1, as it induces them to the Th0 response pattern. Almeida *et al* showed that TNF- α serum levels decreased and those of IL-2 and IFN- γ increased after HAART [12], which was not possible to demonstrate statistically in this study. This may have occurred due to the fact that in this study, median CD_4^+ counts in G1 were still relatively high in comparison to those of G2 and G3.

By also taking into account the behavior of other variables among the studied groups in relation to TF, it was possible to observe the longer total ART time in G3, a

smaller percentage of individuals with present clinical AIDS-defining criteria and a smaller number of patients using a dual scheme in G2 as compared to G3 and lower VL in G3 than in G1. These findings are in accordance with the existing literature.

At present, the HIV-1 genotyping test has shown to be an important tool to guide changes in HAART schemes when they fail [27,28]. Despite the restricted number of patients who were able to have their predominant viral population amplified and sequenced by genotyping, a predominance of HAART-resistance viruses was found in the group of individuals with TF. The presence of lower β -2 microglobulin levels in this group, when compared to the group without HAART, may be explained by the smaller replicative capacity of resistant viruses and by HAART action, even if it is only residual on such viruses [29,30]. It could be observed that VL was higher in the group of individuals without HAART, thus corroborating the hypothesis presented. HAART efficacy in reducing VL to undetectable levels seems to explain the lower β -2 microglobulin levels in the group with HAART and without TF, when compared to the group of individuals undergoing HAART and with TF.

The cost of tests for determining serum β -2 microglobulin levels is approximately twofold lower than VL in Brazil. It must be considered that the price of VL tests has been highly reduced in Brazil due to nationwide bidding, and it has reached the amount of US\$ 10. If the same is done for β -2 microglobulin tests, this difference could be even greater. Considering the large increase in the number of patients undergoing HAART and the resulting need for new markers of HAART efficacy in locations where VL tests seem to be unfeasible, the findings in this study seem to suggest that serum β -2 microglobulin

measurement, a relatively simple and inexpensive procedure, can be useful to differentiate individuals in TF or not after HAART.

Further prospective studies involving a larger number of participants and in the presence of other co-morbidities may corroborate the behavior presented by this biological marker in HAART monitoring. Hence, according to what has been studied by other authors [3], β -2 microglobulin in association with other more accessible clinical and laboratory parameters may be sufficiently effective in recognizing TF and even its cause. This could reduce direct expenditure on more complex tests and indirect by preventing unnecessary scheme changes to second-line schemes, which are financially much less accessible.

Acknowledgments

We thank the important and spontaneous help from patients and blood donors who participated in the study.

This research project was financially supported by *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* and *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*.

R.A.M.B.A., L.R.S., A.N.B., S.A.C., M.I.M.C.P., R.M.T.G. and D.A.M. participated in the design, development, data analysis, writing and review of the study.

References

1. World Health Organization. *Towards universal access: scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector: progress report 2008*. Geneva: World Health Organization 2008. Accessed August 2008: <http://www.who.int/hiv/mediacentre/2008progressreport/en/index.html>.
2. Programa Nacional de DST e Aids do Ministério da Saúde. *Resposta positiva 2008. A experiência do Programa Brasileiro de DST e Aids*. Brasília: Programa Nacional de DST e Aids do Ministério da Saúde 2008. Accessed August 2008: http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments/%7BB8EF5DAF-23AE-4891-AD36-1903553A3174%7D/%7B0CAD21C6-B31E-4358-B67E-4896EAFAAC9E%7D/resposta_2008.pdf.
3. Colebunders R, Moses KR, Laurence J, Shihab HM, Semitala F, Lutwama F, *et al*. **A new model to monitor the virological efficacy of antiretroviral treatment in resource-poor countries**. *Lancet Infect Dis* 2006; **6**:53–59.
4. Rouet F, Rouzioux C. **HIV-1 viral load testing cost in developing countries: what's new?** *Expert Rev Mol Diagn* 2007; **7**:703-707.
5. Phillips AN, Pillay DH, Miners AE, Bennett DF, Gilks CD, Lundgren J. **Outcomes from monitoring of patients on antiretroviral therapy in resource-limited settings with viral load, CD4 cell count, or clinical observation alone: a computer simulation model**. *Lancet* 2008; **371**:1443-1451.
6. Lawn S, Bekker L, Calmy A, Wood R. **Monitoring of antiretroviral therapy in low-resource settings**. *Lancet* 2008; **372**:287-288.

7. Mildvan D, Landay A, De Gruttola V, Machado SG, Kagan J. **An approach to the validation of markers for use in AIDS clinical trials.** *Clin Infect Dis* 1997; **24**:764-774.
8. Murdaca G, Contini P, Setti M, Cagnati P, Villa R, Lantieri F, *et al.* **Behavior of serum human major histocompatibility complex class I antigen levels in human immunodeficiency virus-infected patients during antiretroviral therapy: Correlation with clinical outcome.** *Hum Immunol* 2007; **68**:894-900.
9. Clerici M, Shearer G. **A Th1→Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection.** *Immunol Today* 1993; **14**:107-111.
10. Imami N, Antonopoulus C, Hardy GA, Gazzard B, Gotch FM. **Assessment of Type 1 and Type 2 cytokines in HIV Type 1- infected individuals: impact of Highly Active Antiretroviral Therapy.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; **15**:1499-1508.
11. Meira DA, Souza LR, Calvi AS, Lima CRG, Henriques RMS, Pardini MI, *et al.* **Correlation between cytokine serum levels, number of CD4⁺T cell/mm³ and viral load in HIV-1 infected individuals with or without antiretroviral therapy.** *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2004; **10**:293-310.
12. Almeida RAMB, Souza LR, Calvi SA, Ikoma MRV, Silva VA, Curi PR, *et al.* **Immune reconstitution in HIV-1 infected patients treated for two years with highly active antiretroviral therapy.** *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2006; **12**:91-109.
13. Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan TC, *et al.* **Extensive polymorphism observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays.** *Nature Med* 1996; **2**:753-759.

14. Frenkel LM, Wagner II LE, Atwood SM, Cummins TJ, Dewhurst S. **Specific, sensitive, and rapid assay for human immunodeficiency virus type 1 pol mutations associated with resistance to zidovudine and didanosine.** *J Clin Microbiol* 1995; **33**:342-347.
15. Cerqueira DM, Ramalho ED, Oliveira CP, Silva RR, Franchini M, Felipe MSS, *et al.* **HIV-1 subtypes and mutations associated to antiretroviral drug resistance in human isolates from Central Brazil.** *Braz J Microbiol* 2004; **35**:187-192.
16. Stanford University. *Stanford University HIV Drug Resistance Database*. Palo Alto: Stanford University 2008. Accessed April 2008: <http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/HIVdb.html>.
17. Wanchu A, Arora S, Bhatnagar A, Sud A, Bambery P, Singh S. **Beta2 microglobulin as a surrogate marker for HIV infection: good correlation with CD4 counts.** *Indian J Pathol Microbiol* 2004; **47**:298-301.
18. Ellaurie M, Rubinstein A. **Beta-2-microglobulin concentrations in pediatric human immunodeficiency virus infection.** *Pediatr Infect Dis J* 1990; **9**:807-809.
19. Iuliano R, Forastieri G, Brizzi M, Mecocci L, Mazzotta F, Ceccherini-Nelli L. **Correlation between plasma HIV-1 RNA levels and the rate of immunologic decline.** *J Acquired Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; **14**:408-414.
20. Phillips AN, Sabin CA, Elford J, Bofill M, Timms A, Janossy G, *et al.* **Serum beta 2-microglobulin at HIV-1 seroconversion as a predictor of severe immunodeficiency during 10 years of follow-up.** *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; **13**:262-266.

21. Jacobson MA, Abrams DI, Volberding PA, Bacchetti P, Wilber J, Chaisson RE, *et al.* **Serum beta 2-microglobulin decreases in patients with AIDS or ARC treated with azidothymidine.** *J Infect Dis* 1989; **159**:1029–1036.
22. Kent DM, McGrath D, Ioannidis JP, Bennish ML. **Suitable monitoring approaches to antiretroviral therapy in resource poor settings: setting the research agenda.** *Clin Infect Dis* 2003; **37**:S13–S24.
23. Moore DM, Mermin J. **Monitoring antiretroviral failure in resource-poor settings.** *Lancet* 2008; **371**:1396-1397.
24. Chaiwarith R, Wachirakaphan C, Kotarathititum W, Praparatanaphan J, Sirisanthana T, Supparatpinyo K. **Sensitivity and specificity of using CD4+ measurement and clinical evaluation to determine antiretroviral treatment failure in Thailand.** *Int J Infect Dis* 2007; **11**:413–416.
25. Hel Z, McGhee JR, Mestecky J. **HIV infection: first battle decides the war.** *Trends Immunol* 2006; **27**:274-281.
26. Jansen CA, Van Baarle D, Miedema F. **HIV-specific CD4⁺ T cells and viremia: who's in control?** *Trends Immunol* 2006; **27**:119-124.
27. Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, Neaton JD, Hoover ML, Winters MA, *et al.* **A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS.** *AIDS* 2000; **14**:F83–F93.
28. Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Schapiro J, Viciano P, Gonzalez J, *et al.* **Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial.** *AIDS* 2002; **16**:209-218.

29. Nijhuis M, Deeks S, Boucher C. **Implications of antiretroviral resistance on viral fitness.** *Curr. Opin. Infect. Dis* 2001; **14**:23-28.
30. Deeks SG, Martin JN, Hoh R, Wrin T, Petropoulos C, Grant RM. **Continued reverse transcriptase inhibitor therapy is sufficient to maintain short-term partial suppression of multi-drug resistant viremia.** *Tenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. Boston, February 2003.

Table 1 – Comparison between CG, G1, G2 and G3 in relation to demographic, clinical, laboratory, therapeutic and genotypic parameters.

Variable	n	CG	n	G1	n	G2	n	G3
Male (%) ⁽²⁾	20	80.0a	15	46.7a	31	67.7a	43	51.2a
Age (years) ⁽¹⁾	20	37(27 ; 49)a	15	38(33 ; 50)a	31	37(31 ; 46)a	43	40(33 ; 46)a
TNF- α (pg/mL) ⁽¹⁾	20	97.5(78 ; 118)a	15	510(360 ; 710)b	31	410(311 ; 604)b	43	516(380 ; 704)b
IFN- γ (pg/mL) ⁽¹⁾	20	209(177 ; 271)a	15	580(450 ; 610)b	31	580(417 ; 717)b	43	588(320 ; 686)b
IL-2 (pg/mL) ⁽¹⁾	20	104(70 ; 137)a	15	88(81 ; 113)a	31	98(91 ; 117)a	43	102(86 ; 128)a
IL-4 (pg/mL) ⁽¹⁾	20	10(5 ; 10)a	15	41(38 ; 48)b	31	44(36 ; 48)b	43	46(36 ; 61)b
IL-10 (pg/mL) ⁽¹⁾	20	9(5 ; 10)a	15	41(36 ; 56)b	31	46(36 ; 63)b	43	46(41 ; 61)b
β -2 microglobulin (mg/mL) ⁽¹⁾	-	-	12	2.92(2.29 ; 3.86)a	29	1.61(1.31 ; 1.89)b	41	2.02(1.51 ; 2.36)c
CD4 ⁺ (cells/mm ³) ⁽¹⁾	-	-	15	244(234 ; 274)a	31	393(291 ; 550)b	43	298(187 ; 431)a
CD8 ⁺ (cells/mm ³) ⁽¹⁾	-	-	15	696(600 ; 1216)a	31	847(522 ; 1120)a	42	892(636 ; 1150)a
VL (RNA copies/mL) ⁽¹⁾	-	-	15	59,264(28,196 ; 133,705)a	-	-	43	5,171(928 ; 16,915)b
Viral resistance (%)	-	-	4	0.0	1	0.0	16	100.0
Previous AIDS-defining criterion (%) ⁽²⁾	-	-	15	40.0a	28	82.1b	43	79.1b
Present clinical AIDS-defining criterion (%) ⁽²⁾	-	-	15	6.7a	31	0.0b	42	4.8a
Subtype B (%)	-	-	3	100.0	1	100.0	16	93.8
Subtype F (%)	-	-	3	0.0	1	0.0	16	6.2
Present ART continuous time (months) ⁽¹⁾	-	-	-	-	29	25(12 ; 31)a	42	31(17 ; 49)a
Present NNRTI scheme (%) ⁽²⁾	-	-	-	-	30	50.0a	43	39.5a
Present PI scheme (%) ⁽²⁾	-	-	-	-	30	46.7a	43	55.8a
Total ART time (months) ⁽¹⁾	-	-	12	0(0 ; 0)a	22	39(27 ; 67)b	34	71(57 ; 90)c
Number of ART schemes per patient ⁽¹⁾	-	-	14	0(0 ; 1)a	30	2(1 ; 4)b	42	4(2 ; 6)b
Dual scheme previous use (%) ⁽²⁾	-	-	14	7.1a	30	36.7a	41	61.0b
Dual scheme time (months) ⁽¹⁾	-	-	13	0(0 ; 0)a	28	0(0 ; 10)b	36	6(0 ; 20)b

(1) Different letters between two groups indicate significant difference, $p < 0.05$, by the Mann-Whitney Test for independent samples. Descriptive summary in medians and quartiles.(2) Different letters between two groups indicate significant difference, $p < 0.05$, by Fisher's exact Test. CG – Formed by 20 normal individuals, blood donors at Blood Transfusion Center of Botucatu. G1 – Formed by HIV-1-infected individuals, previously untreated or without HAART use for at least six months and T CD4⁺ lymphocyte counts smaller than 350 cells/mm³. G2 – Formed by 31 HIV-1-infected individuals undergoing HAART and without virological therapeutic failure (undetectable VL, < 50 copies/mL, at least six months after HAART implementation). G3 – Formed by 43 HIV-1-infected individuals undergoing HAART and with virological therapeutic failure (detectable VL, > 50 copies/mL, at least six months after HAART implementation).

Parameter	Group			
	G1	G2	G3	CG
Age	•	•	•	•
Sex	•	•	•	•
IL-2	•	•	•	•
IFN- γ	•	•	•	•
IL-4	•	•	•	•
IL-10	•	•	•	•
TNF- α	•	•	•	•
β -2 microglobulin	•	•	•	
Present CD ₄ ⁺	•	•	•	
Present CD ₈ ⁺	•	•	•	
Present plasma viral load	•		•	
Genotypic viral resistance	•	•	•	
Previous AIDS-defining criterion	•	•	•	
Present clinical AIDS-defining criterion	•	•	•	
Viral subtype (B or F)	•	•	•	
Number of ART schemes used per patient	•	•	•	
Total ART time	•	•	•	
Previous use of a dual scheme	•	•	•	
Total dual-scheme time		•	•	
Present ART continuous time		•	•	
Present scheme with a protease inhibitor (PI)		•	•	
Present scheme with a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI)		•	•	

Fig. 1. Parameters evaluated in each group of the study. G1 – formed by 15 HIV-1-infected individuals, previously untreated or without HAART for at least six months and T CD₄⁺ lymphocyte counts lower than 350 cells/mm³. G2 – formed by 31 HIV-1-infected individuals undergoing HAART and without virological failure (undetectable VL or < 50 copies/mL, at least six months after HAART implementation). G3 – formed by 43 HIV-1-infected individuals undergoing HAART and with virological therapeutic failure (detectable VL or > 50 copies/mL, at least six months after HAART implementation). CG – formed by 20 normal individuals, blood donors at the Blood Transfusion Center of Botucatu.

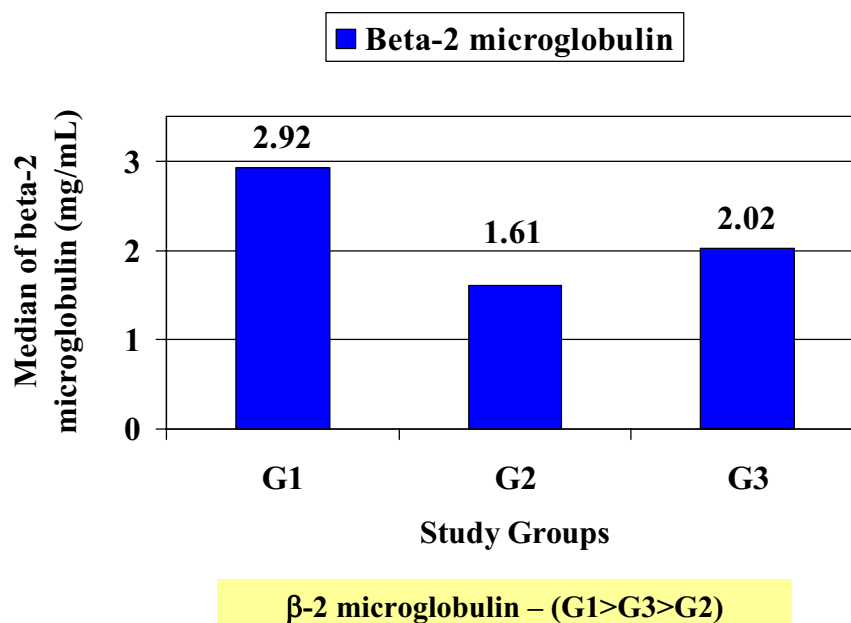


Fig. 2. Medians of β -2 microglobulin measurements and between-group comparative statistical analysis ($p < 0.05$). G1 - 15 HIV-1-infected individuals, previously untreated or without HAART use for at least six months and T CD_4^+ lymphocyte count smaller than 350 cells/mm^3 . G2 - 31 HIV-1-infected individuals undergoing HAART and without virological therapeutic failure (undetectable VL, $< 50 \text{ copies/mL}$, at least six months after HAART implementation). G3 - 43 HIV-1 infected individuals undergoing HAART and with virological therapeutic failure (detectable VL, $> 50 \text{ copies/mL}$, at least six months after HAART implementation).

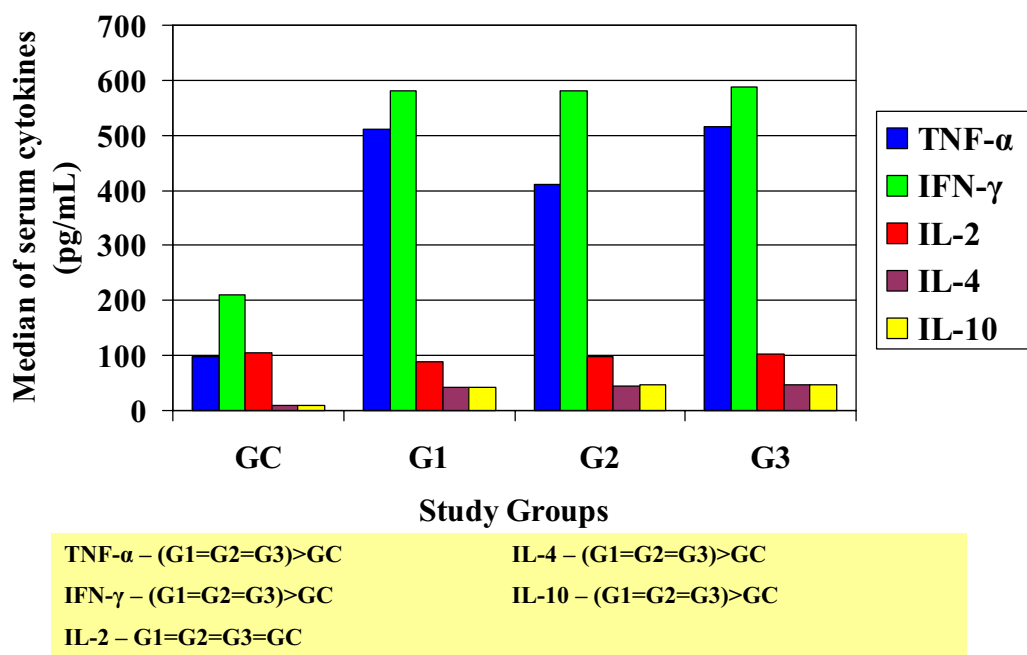
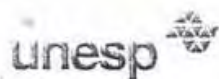


Fig. 3. Medians of serum cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10) measurements and between-group comparative statistical analysis ($p < 0.05$). CG - 20 normal individuals, blood donors at the Blood Transfusion Center of Botucatu. G1 - 15 HIV-1-infected individuals, previously untreated or without HAART use for at least six months and T CD $_4^+$ lymphocyte count smaller than 350 cells/mm 3 . G2 - 31 HIV-1-infected individuals undergoing HAART and without virological therapeutic failure (undetectable VL, < 50 copies/mL, at least six months after HAART implementation). G3 - 43 HIV-1 infected individuals undergoing HAART and with virological therapeutic failure (detectable VL, > 50 copies/mL, at least six months after HAART implementation).

ANEXOS

Anexo 1 - Documento 1. Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista - UNESP.



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 05 de abril de 2.004

OF 124/2004-CEP
MACAH/asc

*Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Domingos Alves Meira
Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por
Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu*

Prezado Dr. Meira

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o projeto de pesquisa intitulado "Correlação entre o perfil de resistência aos anti-retrovirais, o nível sérico das citocinas, a carga viral plasmática e a contagem de linfócitos TCD₄⁺ em indivíduos com infecção pelo HIV-1", de autoria de Ricardo Augusto Monteiro de Barros Almeida, orientado por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 05/04/2004.

Atenciosamente,

*Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP*

Anexo 1 - Documento 2. Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista - UNESP.

unesp DIVISÃO TÉCNICA ACADÊMICA	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CÂMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA Seção de Pós-Graduação	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Fis.</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Proc.</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Rub.</td> </tr> </table>	Fis.	Proc.	Rub.
Fis.					
Proc.					
Rub.					

BOTUCATU, SP - RUIBÃO JÚNIOR - CEP 18 618-970 - PABX (0xx14) 3811-6022

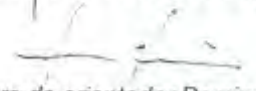
JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

*Declaramos que o Projeto de Pesquisa "Correlação entre o perfil de resistência aos anti-retrovirais, o nível sérico das citocinas, a carga viral plasmática e a contagem de linfócitos TCD4+ em indivíduos com infecção pelo HIV-1", aprovado pelo CEP em 05/04/2004, teve seu título alterado para " **β -2 microglobulina e citocinas séricas como indicadores de falha terapêutica aos anti-retrovirais**", sem nenhuma alteração no seu conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.*

A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Tese de Doutorado.

Botucatu, 22/12/2008


Nome/Assinatura do aluno **Ricardo Augusto Monteiro de Barros Almeida**


Nome/Assinatura do orientador **Domingos Alves Meira**

1414 22/01/2009 0000000 COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

Programa de Pós Graduação em Doenças Tropicais.

OBS.: Preencher formulário em 2 vias e protocolar no respectivo CEP

Anexo 2. Dados obtidos a partir das variáveis estudadas no grupo controle (GC).

Indivíduo	Sexo (M/F)	Idade (anos)	TNF-α (pg/mL)	IFN-γ (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
GC-01	M	27	84	188	58	0	4
GC-02	M	38	76	216	191	10	10
GC-03	F	36	104	102	63	5	7
GC-04	M	28	54	304	94	10	10
GC-05	M	28	118	286	168	8	8
GC-06	M	53	121	204	112	15	10
GC-07	F	62	91	210	69	10	10
GC-08	M	50	88	186	99	8	5
GC-09	M	44	117	174	174	5	5
GC-10	M	47	136	161	189	4	0
GC-11	M	39	63	263	54	10	14
GC-12	M	19	86	208	86	12	10
GC-13	M	53	151	184	91	15	18
GC-14	M	32	108	274	74	10	22
GC-15	M	27	65	112	108	10	10
GC-16	F	36	77	108	142	8	5
GC-17	M	38	121	246	110	0	0
GC-18	M	58	104	288	108	10	5
GC-19	M	23	79	308	121	5	0
GC-20	F	27	108	263	68	10	10

Anexo 3 - Tabela 1. Dados obtidos a partir das variáveis estudadas no grupo 1 (G1). (ND = não disponível)

Indivíduo	Sexo (M/F)	Idade (anos)	Critério definidor de aids prévio	Critério clínico definidor de aids atual	Número de esquemas ARV utilizados
G1-01	F	34	Não	Não	1
G1-02	F	55	Sim	Não	0
G1-03	M	50	Sim	Não	0
G1-04	M	38	Não	Não	0
G1-05	F	22	Não	Não	2
G1-06	F	47	Sim	Não	1
G1-07	F	42	Não	Não	0
G1-08	M	25	Não	Não	0
G1-09	F	53	Não	Não	0
G1-10	F	48	Não	Não	0
G1-11	M	30	Sim	Não	0
G1-12	M	38	Não	Não	0
G1-13	M	33	Sim	Não	3
G1-14	F	63	Não	Não	0
G1-15	M	35	Sim	Sim	ND

Anexo 3 - Tabela 2. Dados obtidos a partir das variáveis estudadas no grupo 1 (G1). (ND = não disponível)

Indivíduo	Uso prévio de esquema duplo	Tempo de esquema duplo (meses)	Tempo de TARV total (meses)	CD4 ⁺ atual (cel/mm ³)	CD8 ⁺ atual (cel/mm ³)	CV atual (cópias/mL)	CV atual (log)
G1-01	Não	0	ND	274	965	37410	4,573
G1-02	Não	0	0	115	345	207987	5,318
G1-03	Não	0	0	237	1786	2413440	6,383
G1-04	Não	0	0	333	953	4850	3,686
G1-05	Não	0	5	234	653	58555	4,768
G1-06	Não	0	1	279	1390	76495	4,884
G1-07	Não	0	0	240	494	8494	3,929
G1-08	Não	0	0	248	645	59973	4,778
G1-09	Não	0	0	285	696	ND	ND
G1-10	Não	0	0	264	600	18736	4,273
G1-11	Não	0	0	183	1216	223398	5,349
G1-12	Não	0	0	240	563	44890	4,652
G1-13	Sim	ND	ND	150	833	93499	4,971
G1-14	Não	0	0	248	1431	31349	4,496
G1-15	ND	ND	ND	244	645	108944	5,037

Anexo 3 - Tabela 3. Dados obtidos a partir das variáveis estudadas no grupo 1 (G1). (ND = não disponível)

Indivíduo	TNF- α (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	β -2 microglobulina (mg/mL)	Subtipo B	Subtipo F	Vírus R/I	Vírus S
G1-01	306	780	89	41	38	2,91	ND	ND	ND	ND
G1-02	720	210	61	61	59	3,03	ND	ND	Não	Sim
G1-03	417	512	61	28	31	5,61	Sim	Não	Não	Sim
G1-04	417	810	140	48	56	4,50	ND	ND	ND	ND
G1-05	512	240	88	39	46	1,67	ND	ND	ND	ND
G1-06	816	450	104	35	28	2,92	ND	ND	ND	ND
G1-07	350	716	145	33	40	1,74	ND	ND	ND	ND
G1-08	510	480	88	38	56	2,43	ND	ND	ND	ND
G1-09	610	488	101	48	36	3,85	ND	ND	ND	ND
G1-10	481	584	117	56	41	2,14	ND	ND	ND	ND
G1-11	710	588	81	66	51	ND	Sim	Não	Não	Sim
G1-12	817	580	113	41	36	ND	ND	ND	ND	ND
G1-13	304	610	66	41	38	ND	Sim	Não	Não	Sim
G1-14	360	580	81	39	46	2,34	ND	ND	ND	ND
G1-15	610	320	81	46	61	3,88	ND	ND	ND	ND

Anexo 4 - Tabela 1. Dados obtidos a partir das variáveis estudadas no grupo 2 (G2). (ND = não disponível)

Indivíduo	Sexo (M/F)	Idade (anos)	Critério definidor de aids prévio	Critério clínico definidor de aids atual	Número de esquemas ARV utilizados
G2-01	M	40	Sim	Não	4
G2-02	M	36	Sim	Não	1
G2-03	M	41	Sim	Não	1
G2-04	F	23	Não	Não	1
G2-05	F	46	Sim	Não	8
G2-06	M	41	Sim	Não	6
G2-07	M	35	ND	Não	ND
G2-08	M	32	ND	Não	4
G2-09	M	27	ND	Não	1
G2-10	M	41	Sim	Não	2
G2-11	M	48	Sim	Não	4
G2-12	M	65	Sim	Não	1
G2-13	M	31	Não	Não	1
G2-14	M	31	Sim	Não	4
G2-15	M	50	Sim	Não	1
G2-16	M	37	Sim	Não	4
G2-17	F	60	Não	Não	1
G2-18	M	36	Não	Não	1
G2-19	M	43	Sim	Não	1
G2-20	M	35	Sim	Não	2
G2-21	M	30	Sim	Não	2
G2-22	M	40	Sim	Não	4
G2-23	F	50	Sim	Não	4
G2-24	M	66	Sim	Não	4
G2-25	M	43	Sim	Não	2
G2-26	F	26	Sim	Não	2
G2-27	F	34	Sim	Não	10
G2-28	F	32	Sim	Não	1
G2-29	F	29	Sim	Não	6
G2-30	F	31	Não	Não	2
G2-31	F	53	Sim	Não	4

Anexo 4 - Tabela 2. Dados obtidos a partir das variáveis estudadas no grupo 2 (G2). (ND = não disponível)

Indivíduo	Uso prévio de esquema duplo	Tempo de esquema duplo (meses)	Esquema atual com ITRNN	Esquema atual com IP
G2-01	Sim	8	Não	Sim
G2-02	Não	0	Não	Sim
G2-03	Não	0	Sim	Não
G2-04	Não	0	Não	Não
G2-05	Sim	31	Não	Sim
G2-06	Sim	29	Não	Sim
G2-07	ND	ND	ND	ND
G2-08	Sim	ND	Não	Sim
G2-09	Não	0	Sim	Não
G2-10	Não	0	Não	Sim
G2-11	Sim	22	Sim	Não
G2-12	Não	0	Sim	Não
G2-13	Não	0	Sim	Não
G2-14	Sim	28	Não	Sim
G2-15	Não	0	Não	Sim
G2-16	Não	0	Não	Sim
G2-17	Não	0	Sim	Não
G2-18	Não	0	Sim	Não
G2-19	Não	0	Não	Sim
G2-20	Não	0	Não	Sim
G2-21	Não	0	Sim	Não
G2-22	Sim	14	Não	Sim
G2-23	Sim	7	Sim	Não
G2-24	Sim	34	Não	Sim
G2-25	Não	0	Sim	Não
G2-26	Não	0	Sim	Não
G2-27	Sim	ND	Não	Sim
G2-28	Não	0	Sim	Não
G2-29	Sim	22	Sim	Não
G2-30	Não	0	Sim	Não
G2-31	Não	0	Sim	Não

Anexo 4 - Tabela 3. Dados obtidos a partir das variáveis estudadas no grupo 2 (G2). (ND = não disponível)

Indivíduo	Tempo de TARV total (meses)	Tempo de TARV contínua (meses)	CD4 ⁺ atual (cel/mm ³)	CD8 ⁺ atual (cel/mm ³)	CV atual (cópias/mL)	TNF- α (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
G2-01	62	21	550	1313	Indetectável	680	286	76	42	49
G2-02	37	25	321	847	Indetectável	304	526	92	39	45
G2-03	41	41	393	943	Indetectável	486	360	76	46	41
G2-04	13	13	393	683	Indetectável	410	717	108	28	31
G2-05	93	12	579	604	Indetectável	756	284	79	42	60
G2-06	123	80	180	378	Indetectável	604	417	98	39	46
G2-07	ND	ND	729	758	Indetectável	720	830	88	27	31
G2-08	ND	6	562	1152	Indetectável	746	187	99	40	41
G2-09	ND	ND	292	275	Indetectável	377	580	98	30	56
G2-10	27	26	615	1104	Indetectável	380	704	56	36	63
G2-11	ND	6	542	926	Indetectável	421	401	149	62	31
G2-12	ND	31	292	511	Indetectável	389	506	94	47	39
G2-13	6	6	425	945	Indetectável	610	820	136	48	77
G2-14	84	29	508	1129	Indetectável	808	480	91	56	68
G2-15	63	63	167	472	Indetectável	348	800	124	44	36
G2-16	57	35	454	505	Indetectável	311	602	113	35	41
G2-17	27	27	478	522	Indetectável	216	530	124	29	33
G2-18	36	36	831	1120	Indetectável	381	613	90	51	42
G2-19	10	10	167	1724	Indetectável	304	728	117	46	36
G2-20	68	67	337	645	Indetectável	133	824	153	48	74
G2-21	ND	6	125	1063	Indetectável	206	817	125	41	66
G2-22	81	22	455	1116	Indetectável	546	233	92	44	46
G2-23	57	12	378	1280	Indetectável	407	700	111	46	33
G2-24	89	28	257	453	Indetectável	487	281	112	36	39
G2-25	35	31	208	995	Indetectável	486	610	131	56	66
G2-26	13	9	327	758	Indetectável	486	617	98	46	49
G2-27	ND	15	312	1732	Indetectável	610	504	62	38	46
G2-28	17	17	180	383	Indetectável	584	506	96	56	49
G2-29	ND	32	291	672	Indetectável	216	450	104	26	22
G2-30	27	21	645	642	Indetectável	304	819	98	61	77
G2-31	ND	26	1069	1239	Indetectável	346	589	110	45	86

Anexo 4 - Tabela 4. Dados obtidos a partir das variáveis estudadas no grupo 2 (G2). (ND = não disponível)

Indivíduo	β-2 microglobulina (mg/mL)	Subtipo B	Subtipo F	Vírus R/I	Vírus S
G2-01	2,57	ND	ND	ND	ND
G2-02	3,22	ND	ND	ND	ND
G2-03	1,05	ND	ND	ND	ND
G2-04	0,93	ND	ND	ND	ND
G2-05	1,80	ND	ND	ND	ND
G2-06	ND	ND	ND	ND	ND
G2-07	1,13	ND	ND	ND	ND
G2-08	2,34	ND	ND	ND	ND
G2-09	ND	ND	ND	ND	ND
G2-10	1,40	ND	ND	ND	ND
G2-11	1,11	ND	ND	ND	ND
G2-12	1,70	ND	ND	ND	ND
G2-13	1,93	ND	ND	ND	ND
G2-14	2,32	ND	ND	ND	ND
G2-15	1,86	ND	ND	ND	ND
G2-16	1,46	ND	ND	ND	ND
G2-17	1,63	ND	ND	ND	ND
G2-18	1,53	ND	ND	ND	ND
G2-19	2,63	ND	ND	ND	ND
G2-20	1,31	ND	ND	ND	ND
G2-21	1,18	ND	ND	ND	ND
G2-22	1,46	ND	ND	ND	ND
G2-23	1,89	ND	ND	ND	ND
G2-24	3,61	ND	ND	ND	ND
G2-25	1,61	ND	ND	ND	ND
G2-26	1,64	ND	ND	ND	ND
G2-27	1,54	ND	ND	ND	ND
G2-28	1,16	ND	ND	ND	ND
G2-29	1,68	ND	ND	ND	ND
G2-30	1,57	ND	ND	ND	ND
G2-31	1,13	1	0	0	1

Anexo 5 - Tabela 1. Dados obtidos a partir das variáveis estudadas no grupo 3 (G3). (ND = não disponível)

Indivíduo	Sexo (M/F)	Idade (anos)	Critério definidor de aids prévio	Critério clínico definidor de aids atual	Número de esquemas ARV utilizados
G3-01	F	38	Sim	Não	2
G3-02	M	35	Sim	Não	4
G3-03	M	47	Não	Não	2
G3-04	F	39	Não	Não	1
G3-05	F	40	Não	Não	5
G3-06	M	45	Não	Não	1
G3-07	F	54	Sim	Não	7
G3-08	M	33	Sim	Não	1
G3-09	M	63	Sim	Não	1
G3-10	M	32	Sim	Não	5
G3-11	M	49	Sim	Não	1
G3-12	M	35	Sim	Não	1
G3-13	M	45	Sim	Não	2
G3-14	M	45	Sim	Não	2
G3-15	F	37	Sim	Não	4
G3-16	F	47	Sim	Não	3
G3-17	M	31	Sim	Sim	1
G3-18	F	46	Sim	Não	4
G3-19	F	53	Sim	Não	11
G3-20	F	43	Não	Não	3
G3-21	F	46	Não	Não	5
G3-22	M	26	Sim	Não	7
G3-23	M	48	Sim	Não	3
G3-24	M	42	Sim	Não	4
G3-25	M	41	Sim	Não	2
G3-26	M	46	Sim	Não	2
G3-27	M	42	Sim	Não	4
G3-28	F	39	Sim	Não	12
G3-29	M	30	Sim	Não	1
G3-30	M	38	Sim	Não	3
G3-31	F	49	Sim	Não	4
G3-32	F	29	Sim	Não	2
G3-33	F	35	Sim	Não	8
G3-34	F	29	Não	Não	3
G3-35	F	44	Sim	Não	8
G3-36	M	36	Não	Não	1
G3-37	F	31	Sim	Sim	8
G3-38	M	40	Sim	Não	6
G3-39	F	29	Sim	Não	8
G3-40	F	27	Sim	Não	9
G3-41	F	31	Sim	Não	ND
G3-42	F	44	Não	Não	4
G3-43	M	37	Sim	ND	6

Anexo 5 - Tabela 2. Dados obtidos a partir das variáveis estudadas no grupo 3 (G3). (ND = não disponível)

Indivíduo	Uso prévio de esquema duplo	Tempo de esquema duplo (meses)	Esquema atual com ITRNN	Esquema atual com IP
G3-01	Sim	73	Não	Não
G3-02	Não	0	Não	Sim
G3-03	Sim	20	Sim	Não
G3-04	Não	0	Não	Sim
G3-05	Sim	24	Sim	Não
G3-06	Não	0	Sim	Não
G3-07	Sim	18	Não	Sim
G3-08	Não	0	Sim	Não
G3-09	Não	0	Sim	Não
G3-10	Sim	41	Sim	Não
G3-11	Não	0	Não	Sim
G3-12	Não	0	Não	Sim
G3-13	Não	0	Não	Sim
G3-14	Não	0	Não	Sim
G3-15	Não	0	Não	Sim
G3-16	Sim	5	Sim	Não
G3-17	Não	0	Não	Sim
G3-18	Sim	37	Sim	Não
G3-19	Sim	ND	Não	Sim
G3-20	Sim	14	Não	Não
G3-21	Sim	28	Sim	Não
G3-22	Sim	11	Não	Sim
G3-23	Sim	ND	Sim	Não
G3-24	Sim	ND	Sim	Sim
G3-25	Sim	ND	Não	Sim
G3-26	Não	0	Sim	Não
G3-27	Sim	17	Não	Sim
G3-28	Sim	ND	Não	Sim
G3-29	Não	0	Não	Sim
G3-30	Sim	12	Não	Não
G3-31	Não	0	Não	Sim
G3-32	Não	0	Não	Sim
G3-33	Sim	20	Não	Sim
G3-34	Sim	2	Sim	Não
G3-35	Sim	6	Não	Sim
G3-36	Não	0	Sim	Não
G3-37	ND	ND	Não	Sim
G3-38	Sim	18	Não	Sim
G3-39	Sim	44	Sim	Não
G3-40	Sim	23	Sim	Sim
G3-41	ND	ND	Sim	Não
G3-42	Sim	63	Sim	Não
G3-43	Sim	9	Não	Sim

Anexo 5 - Tabela 3. Dados obtidos a partir das variáveis estudadas no grupo 3 (G3). (ND = não disponível)

Indivíduo	Tempo de TARV total (meses)	Tempo de TARV contínua (meses)	CD4+ atual (cel/mm3)	CD8+ atual (cel/mm3)	CV atual (cópias/mL)	CV atual (log)	TNF-α (pg/mL)	IFN-γ (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
G3-01	ND	71	376	864	121	2,083	380	480	74	36	41
G3-02	67	34	187	1246	1104	3,043	306	708	112	28	30
G3-03	70	50	469	992	172	2,236	380	404	89	36	41
G3-04	66	27	418	479	132	2,121	512	630	76	38	51
G3-05	87	37	448	1445	13795	4,14	208	720	118	36	41
G3-06	61	61	334	814	5171	3,714	428	806	86	38	56
G3-07	128	55	373	1724	5779	3,762	788	216	58	68	86
G3-08	6	6	284	739	818	2,913	736	320	68	56	71
G3-09	45	45	39	1034	52218	4,718	801	417	146	41	66
G3-10	90	36	540	1411	1725	3,239	811	281	108	71	56
G3-11	57	57	210	620	42724	4,631	291	736	108	72	53
G3-12	87	87	388	925	75022	4,875	289	931	149	27	34
G3-13	83	82	567	701	3559	3,551	622	613	114	61	52
G3-14	26	25	431	742	6735	3,828	716	306	111	38	46
G3-15	ND	14	39	1323	11158	4,048	618	517	101	46	38
G3-16	71	59	344	946	23698	4,375	516	604	142	39	43
G3-17	16	16	198	795	12701	4,104	630	418	136	81	78
G3-18	91	54	503	1067	7083	3,85	821	431	134	81	70
G3-19	ND	25	291	982	8275	3,918	600	249	63	63	98
G3-20	70	31	390	867	2616	3,418	617	340	86	61	86
G3-21	77	28	285	331	1521	3,182	526	380	73	59	61
G3-22	66	7	529	1114	321	2,507	780	320	94	46	76
G3-23	ND	ND	434	1190	1702	3,231	428	608	91	31	29
G3-24	90	30	91	641	3219	3,508	716	613	79	62	49
G3-25	ND	20	187	429	16915	4,228	382	684	103	52	42
G3-26	49	33	287	1048	15421	4,188	346	601	98	53	61
G3-27	48	20	309	682	928	2,968	410	810	136	21	38
G3-28	ND	9	153	328	19964	4,3	728	321	92	50	52
G3-29	18	18	85	349	254	2,405	417	304	86	41	51
G3-30	78	57	484	1137	191	2,281	391	686	102	50	46
G3-31	70	14	259	1360	2654	3,424	417	308	91	38	46
G3-32	47	7	323	1191	477	2,679	591	110	110	44	33
G3-33	82	31	240	916	8852	3,947	517	731	71	40	44
G3-34	ND	47	332	798	18287	4,262	418	620	94	31	46
G3-35	100	9	126	389	26210	4,418	603	681	128	72	61
G3-36	58	58	227	556	12538	4,098	530	811	103	64	71
G3-37	ND	8	80	536	127753	5,106	704	248	128	51	38
G3-38	98	23	506	1754	29517	4,47	191	733	133	36	42
G3-39	103	8	215	455	4314	3,635	404	588	131	29	31
G3-40	135	26	298	ND	1232	3,091	380	527	74	48	49
G3-41	ND	32	175	749	353	2,548	310	600	140	37	41
G3-42	102	36	542	934	598	2,777	211	720	110	29	41
G3-43	89	6	179	1870	23317	4,368	781	317	78	48	37

Anexo 5 - Tabela 4. Dados obtidos a partir das variáveis estudadas no grupo 3 (G3). (ND = não disponível)

Numero	β-2 microglobulina (mg/mL)	Subtipo B	Subtipo F	Vírus R/I	Vírus S
G3-01	1,36	ND	ND	ND	ND
G3-02	3,08	Não	Sim	Sim	Não
G3-03	2,15	Sim	Não	Sim	Não
G3-04	0,97	ND	ND	ND	ND
G3-05	1,29	ND	ND	ND	ND
G3-06	2,02	Sim	Não	Sim	Não
G3-07	3,57	ND	ND	ND	ND
G3-08	1,71	ND	ND	ND	ND
G3-09	3,16	ND	ND	ND	ND
G3-10	1,45	ND	ND	ND	ND
G3-11	1,81	Sim	Não	Sim	Não
G3-12	4,60	Sim	Não	Sim	Não
G3-13	1,31	ND	ND	ND	ND
G3-14	2,40	ND	ND	ND	ND
G3-15	2,16	ND	ND	ND	ND
G3-16	1,51	Sim	Não	Sim	Não
G3-17	3,67	ND	ND	ND	ND
G3-18	1,69	ND	ND	ND	ND
G3-19	2,36	Sim	Não	Sim	Não
G3-20	1,43	ND	ND	ND	ND
G3-21	1,32	ND	ND	ND	ND
G3-22	1,79	Sim	Não	Sim	Não
G3-23	1,43	Sim	Não	Sim	Não
G3-24	1,92	Sim	Não	Sim	Não
G3-25	2,33	Sim	Não	Sim	Não
G3-26	2,05	ND	ND	ND	ND
G3-27	2,41	ND	ND	ND	ND
G3-28	2,02	ND	ND	ND	ND
G3-29	1,59	ND	ND	ND	ND
G3-30	1,38	Sim	Não	Sim	Não
G3-31	2,15	Sim	Não	Sim	Não
G3-32	1,56	ND	ND	ND	ND
G3-33	2,38	Sim	Não	Sim	Não
G3-34	1,34	ND	ND	ND	ND
G3-35	5,32	Sim	Não	Sim	Não
G3-36	2,20	ND	ND	ND	ND
G3-37	7,82	ND	ND	ND	ND
G3-38	1,75	ND	ND	ND	ND
G3-39	2,21	ND	ND	ND	ND
G3-40	ND	Sim	Não	Sim	Não
G3-41	ND	ND	ND	ND	ND
G3-42	1,51	ND	ND	ND	ND
G3-43	2,19	ND	ND	ND	ND

Anexo 6. Regras para submissão de manuscritos do periódico “AIDS”.

Guidance for Authors on the Preparation and Submission of Manuscripts to AIDS

Note: These instructions comply with those formulated by the International Committee of Medical Journal Editors. For further details, authors should consult the following article: International Committee of Medical Journal Editors. "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" *N Engl J Med* 1997;**336**:309-315. The complete document appears at www.icmje.org.

Scope

AIDS publishes papers reporting original scientific, clinical, epidemiological, and social research which are of a high standard and contribute to the overall knowledge of the field of the acquired immune deficiency syndrome. The Journal publishes Original Papers, Concise Communications, Field Notes, Research Letters, and Correspondence, as well as invited Editorial Reviews, Opinion Pieces, and Editorial Comments. All manuscript submissions to the regular issues and supplements of the journal are peer-reviewed. Papers may be subject to a statistical analysis and for flow cytometry results by a group of experts in the field. Case Reports are not encouraged but may be considered as Correspondence letters.

Field Notes

Articles describing experiences with diagnosing and treating HIV infection and its accompanying opportunistic infections and cancers will be considered for this section of the journal. These contributors should report personal experiences and give insight into the way culture and medical care within a particular part of the world influences the approaches taken for HIV/AIDS. Preference is given to individuals working in developing countries. The length should be no longer than 1500 words and can have up to 4 illustrations. Please indicate this section when submitting the manuscript.

Original papers

Manuscripts should be concise and not be more than 3500 words, with up to five figures or tables. Papers will be returned if they exceed the maximum stated. The word limit refers to the main body of the text and does not include the abstract, references or figure legends.

Concise Communications

Original research findings that do not require a full paper, but are completed studies, may be submitted as Concise Communications. Papers should not exceed 1800 words, and may be accompanied by a maximum of two inserts only (figures/tables). Papers submitted for consideration as Concise Communications should be clearly identified in the author's covering letter.

Research letters

Research Letters provide a forum for original research results, excluding case reports, and observations that merit publication and can be reported succinctly. Research letters are reviewed by the Editors or external reviewers. Research letters should include a summary of up to 75 words, not exceed 1000 words (excluding summary) and not have more than one figure or table.

Correspondence

The correspondence section is reserved for case reports, and letters that are addressing issues or exchanging views on topics arising from published articles in the journal. Correspondence should not exceed 750 words and not have more than one figure or table. These letters are

subject to review by the Editors, and may be rejected without written explanation. In some instances, correspondence will be peer-reviewed.

According to **AIDS** Editorial policy, the Editors will not enter into direct correspondence regarding a submission to the journal. Where clarification about a decision is requested, all communications should be made in writing and directed to the journal office in London. The Editors endorse the guidelines from the Committee on Publication Ethics (COPE) on good publication practice (www.publicationethics.org.uk).

Opinion Piece

The journal will consider articles that detail an opinion of an author(s) on a particular area of HIV/AIDS. These Opinion Pieces should be limited to 1500 words and can have up to three illustrations or tables. The papers will be subject to the same review process as other original articles.

POINTS TO CONSIDER BEFORE SUBMISSION

Authors should complete an Author Checklist form and send a signed copy by mail or fax to: The Editors, AIDS, AIDS Editorial Office, 250 Waterloo Road, London SE1 8RD, UK, Fax: +44 20 7981-0601.

Redundant or duplicate publication

Submissions are accepted on the understanding that they have not been published in their current form or a substantially similar form (in print or electronically, including on a web site), that they have not been accepted for publication elsewhere, and they are not under consideration by another publication. The International Committee of Medical Journal Editors has provided details of what is and what is not [duplicate or redundant publication](#). If you are in doubt (particularly in the case of material that you have posted on a web site), we ask you to proceed with your submission but to include a copy of the relevant previously published work or work under consideration by other journals.

Conflicts of interest

Authors must state all possible [conflicts of interest](#), including financial, consultant, institutional and other relationships that might lead to bias or a conflict of interest. If there is no conflict of interest, this should be explicitly stated. All sources of funding should be acknowledged in the paper. Some of our journals will print your statement; others at present do not. You might like to look at an editorial in the *British Medical Journal* on [Beyond conflict of interest](#). Remember that sources of funding should be acknowledged in your paper.

Permissions to reproduce previously published material

Authors should include with their submission, copies of written permission to reproduce material published elsewhere (such as illustrations) from the copyright holder. Authors are responsible for paying any fees to reproduce material. We cannot send your paper to press without these permissions!

Subject consent forms

Subjects have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Identifying details (written or photographic) should be omitted if they are not essential, but subject data should never be altered or falsified in an attempt to attain anonymity. Complete anonymity is difficult to achieve, and a consent form should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of subjects is inadequate protection of anonymity. When informed consent has been obtained, it should be indicated in the published article. A [sample patient consent form](#) is available here if required.

Ethics committee approval

All authors must sign a declaration that the research was conducted within the guidelines below and under the terms of all relevant local legislation. Please also look at the latest version of the [Declaration of Helsinki](#). The Editors reserve the right to judge the appropriateness of the use and treatment of humans or animals in experiments for publication in the journal.

Human experiments: All work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Papers describing experimental work on human participants which carries a risk of harm must include (1) a statement that the experiments were conducted with the understanding and the consent of each participant, and (2) a statement that the responsible ethical committee has approved the experiments.

Animal experiments: In papers describing experiments on living animals, include (1) a full description of any anaesthetic and surgical procedure used, and (2) evidence that all possible steps were taken to avoid animals' suffering at each stage of the experiment. In experiments involving the use of muscle relaxants, describe the precautions taken to ensure adequate anaesthesia (*J Physiol* 1990; **420**:xii-xiii).

Experiments on isolated tissues: Indicate precisely how you obtained the donor tissue. The NIH guide for the care and use of laboratory animals (National Institutes of Health Publications No. 80-23, revised 1978) gives guidelines for the acquisition and care of animals.

Clinical trials and behavioural evaluations:

Authors reporting results of randomized controlled trials should include with their submission a complete checklist from the CONSORT statement, see *JAMA* 1996; 227:637-639 or <http://www.consort-statement.org>. For behavioural and public health evaluations involving non-randomized designs, authors should include with their submission a complete checklist from the TREND statement, see *Am J Public Health* 2004; 94:361-366 or <http://www.trend-statement.org>.

Registration of clinical trials: As a condition for publication of a clinical trial in *AIDS*, registration of the trial in a public registry is required. Registration of a trial must be at or before the enrollment of participants. This policy, in concert with that of the ICMJE, applies to clinical trials starting enrollment after 1 July 2005. For trials beginning enrollment before this date the journal will require registration by 13 September 2005. We will use the definition proposed by the ICMJE of a 'clinical trial as a research project that prospectively assigns human subjects to intervention or comparison groups to study a cause and effect relationship between a medical intervention and a health outcome' see *N Engl J Med* 2004; 364:911. Studies such as phase 1 trials will be exempt. The editors of *AIDS* also do not advocate one particular registry but require that the registry utilized meet the criteria set out in the statement of policy of the ICMJE. Thus the registry must include an identifying number of the trial, a description of the intervention(s), comparison(s) investigated, hypothesis, primary and secondary outcome measures, eligibility and exclusion criteria, dates of start, anticipated follow up and closure, number of subjects, funding source, and contact information for the principal investigator.

Authorship

All authors must sign the document accompanying their submission to confirm that they have read and approved the paper, that they have met the [criteria for authorship](#) as established by the International Committee of Medical Journal Editors, that they believe that the paper represents honest work, and that they are able to verify the validity of the results reported. You might also be interested to read the debate on authorship in general in the *British Medical Journal's* [Authorship collection](#).

Many of the points covered above are discussed in the *New England Journal of Medicine's* collection of papers entitled '[Editorial policies](#)'.

The corresponding author should list the principal contributions made by each of the authors to the article in the Acknowledgements section of the submission. The journal discourages a long list of authors and does not recommend more than 10. In rare instances, a maximum of twelve is permitted if well-justified. Persons listed as authors must be able to justify their participation in the study and should have substantially contributed to the study's conception, design, and performance. An Appendix of additional study sites and participants, in addition to the authors, may be included after the References.

Compliance with NIH and Other Research Funding Agency Accessibility Requirements

A number of research funding agencies now require or request authors to submit the post-print (the article after peer review and acceptance but not the final published article) to a repository that is accessible online by all without charge. As a service to our authors, LWW will identify to the National Library of Medicine (NLM) articles that require deposit and will transmit the post-print of an article based on research funded in whole or in part by the National Institutes of Health, Wellcome Trust, Howard Hughes Medical Institute, or other funding agencies to PubMed Central. The revised Copyright Transfer Agreement provides the mechanism.

Copyright assignment

Papers are accepted for publication on the understanding that exclusive copyright in the paper is assigned to the Publisher. Authors are asked to sign a copyright assignment form after acceptance of their papers. They may use material from their paper in other works published by them.

Submissions

Authors are strongly encouraged to submit their manuscripts through the web-based tracking system at <http://aids.edmgr.com/>. Signed author forms may be included in the submission as a 'supporting document' or mailed to the journal office. The site contains instructions and advice on how to use the system. Authors should NOT in addition then post a hard copy submission to the editorial office, unless you are supplying artwork, letters or files that cannot be submitted electronically, or have been instructed to do so by the editorial office. For those authors who have no option but to submit by mail please send one copy of the article, plus an electronic version on disk or CD-ROM to: The Editors, AIDS, AIDS Editorial Office, 250 Waterloo Road, London SE1 8RD, UK, Tel: +44 20 7981-0600, Fax: +44 20 7981-0601. Or alternatively via: AIDS Editorial Office (London), Lippincott Williams & Wilkins, Penn Mutual Building, 530 Walnut Street, Philadelphia, PA 19106, USA. Include the following where appropriate: subject consent forms; transfer of copyright form; permission to reproduce previously published material; checklist.

Double spacing should be used throughout the manuscript, which should include the following sections, each starting on a separate sheet: Title Page, abstract (when required) and keywords, text, acknowledgements, references, individual tables and captions. Margins should be at least 3 cm. Pages should be numbered consecutively, beginning with the Title Page, and the page number should be placed in the top right-hand corner of each page. Abbreviations should be defined on their first appearance in the text; those not accepted by international bodies should be avoided. The word count should be clearly stated on the Title Page. Manuscripts sent by post should be submitted on high quality white paper and on a word-processing disk.

Authors are invited to list up to four potential reviewers, including their full addresses, telephone and fax numbers, and e-mail addresses.

Disks and CD-ROMS

All submissions should include electronic files using either floppy disks or CD ROMs. Put only the latest version of the manuscript on the disk; name the file clearly; label the disk with the format of the file and the file name; provide information on the hardware and software used.

PRESENTATION OF PAPERS

Title Page

The Title Page should carry the full title of the paper (not more than 120 characters) and a short title (not more than 40 characters) to be used as a 'running head' (and which should be so identified). The first name, middle initial and last name of each author should appear. If the work is to be attributed to a department or institution, its full name should be included. Total number of words used should be clearly stated on the Title Page. Any disclaimers should appear on the Title Page, as should the name and address (and email) of the author responsible for correspondence concerning the manuscript and the name and address of the author to whom requests for reprints should be made. Finally, the Title Page should include the sources of any support for the work in the form of grants, equipment, drugs, or any

combination of these. Disclose funding received for this work from any of the following organizations: National Institutes of Health (NIH); Wellcome Trust; Howard Hughes Medical Institute (HHMI); and other(s).

Abstracts

The abstract should *not exceed 250 words* and should follow one of the following two styles:

- a. Articles concerning original scientific research should include a structured abstract with the following headings and information:

Objective(s): State the primary objective of the paper (if appropriate).

Design: State the principal reasoning for the procedures adopted.

Methods: State the procedures used.

Results: State the main results of the study. Numerical data should be kept to a minimum.

Conclusions: State the conclusions that can be drawn from the data given.

- b. Articles containing original data concerning the course, cause, diagnosis, treatment, prevention or economic analysis of a clinical disorder or an intervention to improve the quality of health care should include a structured abstract with the following headings and information:

Objective: State the main question or objective of the study and the major hypothesis tested, if any.

Design: Describe the design of the study indicating, as appropriate, use of randomisation, blinding, criterion standards for diagnostic tests, temporal direction (retrospective or prospective), etc.

Setting: Indicate the study setting, including the level of clinical care (for example, primary or tertiary: private practice or institutional).

Subjects, participants: State selection procedures, entry criteria and numbers of participants entering and finishing the study.

Intervention: Describe the essential features of any interventions including their method and duration of administration.

Main outcome measure(s): The primary study outcome measures should be indicated as planned before data collection began. If the hypothesis being reported was formulated during or after data collection, this fact should be clearly stated.

Results: Describe measurements that are not evident from the nature of the main results and indicate any blinding. Absolute values should be indicated when risk changes or effect sizes are given.

Conclusions: State only those conclusions of the study that are directly supported by data, along with their clinical application (avoiding over generalisation). Equal emphasis must be given to positive and negative findings of equal scientific merit.

Key Words

The abstract should be followed by a list of 5-7 keywords or short phrases which will assist the cross-indexing of the article and which may be published. The terms used should be from the Medical Subject Headings list of the *Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>). Include terms from the AIDS classifications that appear on the Fast Track submission form at the back of each journal issue, and on the

submission website at <http://aids.edmgr.com/>.

Text

Full papers of an experimental or observational nature may be divided into sections headed Introduction, Methods (including ethical and statistical information), Results, and Discussion (including a conclusion), although reviews may require a different format.

Acknowledgements

The corresponding author should list the principal contributions made by each of the authors to the article. Acknowledgements should be made only to those who have made a substantial contribution to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from people acknowledged by name in case readers infer their endorsement of data and conclusions. Sources of funding should be placed in this section.

References

References should be numbered consecutively in the order in which they first appear in the text. They should be assigned Arabic numerals, which should be given in brackets, e.g. [17]. References should include the names of all authors when six or fewer; when seven or more, list only the first six names and add *et al.* References should also include full title and source information. Journal names should be abbreviated as in the *Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov>).

Articles in journals

Standard journal article:

Valori RM, Kumar D, Wingate DL. Effects of different types of stress and of 'prokinetic' drugs on the control of the fasting motor complex in humans. *Gastroenterology* 1986; **90**:1890–1900.

More than six authors:

Gentilini P, Laffi G, La Villa G, Romanelli RG, Buzzelli G, Casini-Raggi V, *et al.* Long course and prognostic factors of virus-induced cirrhosis of the liver. *Am J Gastroenterology* 1997; **92**:1–7.

Supplements:

Goulis J, Burroughs AK. Role of vasoactive drugs in the treatment of bleeding oesophageal varices. *Digestion* 1999; **60**(Suppl 3):25–34.

Letter/Abstract:

Ozsoylu S, Kocak N. Naloxone in hepatic encephalopathy [Letter]. *Am J Dis Child* 1985; **139**:749–750.

Lankisch PG, Assmus D, Pflichthofer D.: The burden of pancreatic disease in a well-defined population [Abstract]. *Gastroenterology* 1998; **114**:A24.

Books

Book:

Whitehead WE, Schuster MM, *Gastrointestinal Disorders. Behavioral and Physiological Basis for Treatment*. Orlando: Academic Press; 1985.

Chapter in a book:

Blackshaw AJ. Non-Hodgkin's lymphomas of the gut. In: *Recent Advances in Gastrointestinal Pathology*. Wright R (editor). New York: Saunders; 1980. pp. 213–240.

Personal communications and unpublished work should not feature in the reference list but should appear in parentheses in the text. Unpublished work accepted for publication but not yet released should be included in the reference list with the words 'in press' in parentheses beside the name of the journal concerned. References must be verified by the author(s) against the original documents.

Tables

Each table should be typed on a separate sheet in double spacing. Tables should not be submitted as photographs. Each table should be assigned an Arabic numeral, e.g. (Table 3) and a brief title. Vertical rules should not be used. Place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Explain in footnotes all non-standard abbreviations that are used in each table. Identify statistical measures of variations, such as standard deviation and standard error of the mean.

Be sure that each table is cited in the text. If you use data from another published or unpublished source, obtain permission and acknowledge the source fully.

Illustrations

References to figures and tables should be made in order of appearance in the text and should be in Arabic numerals in parentheses, e.g. (Fig. 2). If hard copies of figures are submitted they should have a label pasted to the back bearing the figure number, the title of the paper, the author's name and a mark indicating the top of the figure. Illustrations should not be mounted. Half-tone illustrations should be presented as glossy prints to a width of 82 mm; line illustrations should be presented as original artwork or prints to a width of 82 mm or, when the illustration demands it, to a width of 173 mm. Photomicrographs must have internal scale markers. If photographs of people are used, their identities must be obscured or the picture must be accompanied by written consent to use the photograph. If a figure has been published before, the original source must be acknowledged and written permission from the copyright holder for both print and electronic formats should be submitted with the material. Permission is required regardless of authorship or publisher, except for documents in the public domain. Figures may be reduced, cropped or deleted at the discretion of the editor. Colour illustrations are acceptable but authors will be expected to cover the extra reproduction costs (for current charges, contact the publisher).

Legends for illustrations

Captions should be typed in double spacing, beginning on a separate sheet of paper. Each one should have an Arabic numeral corresponding to the illustration to which it refers. Internal scales should be explained and staining methods for photomicrographs should be identified.

Units of measurement

Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units (metre, kilogram, or litre) or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius. Blood pressures should be given in millimetres of mercury.

All haematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Editors may request that alternative or non-SI units be added by the authors before publication.

Abbreviations and symbols

Use only standard abbreviations. Avoid abbreviations in the title and abstract. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.

Offprints

Offprints may be purchased using the appropriate form that will be made available with proofs. Orders should be sent when the proofs are returned; orders received after this time cannot be

fulfilled.

Copyright 2008, Lippincott Williams & Wilkins. All rights reserved
Published by Lippincott Williams & Wilkins

[Copyright/Disclaimer Notice • Privacy Policy](#)

Anexo 7. Registro do projeto de estudo na base “*ClinicalTrials.gov*” NCT00831287.

ClinicalTrials.gov
Protocol Registration System



Protocol Registration Receipt
01/27/2009

Beta-2 Microglobulin and Serum Cytokines x HAART

This study has been completed.

Sponsored by:	UPECLIN HC FM Botucatu Unesp Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, Brasil
Information provided by:	UPECLIN HC FM Botucatu Unesp
ClinicalTrials.gov Identifier:	NCT00831207

► Purpose

Cross-sectional study to assess the behavior of Beta-2 microglobulin and serum cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 as indicators of highly active antiretroviral therapy (HAART) failure.

Condition
HIV Patients

Study Type: Observational

Study Design: Cross-Sectional

Official Title: Beta-2 Microglobulin and Serum Cytokines as Indicators of Antiretroviral Therapy Failure

Further study details as provided by UPECLIN HC FM Botucatu Unesp:

Primary Outcome Measure:

- To assess the behavior of Beta-2 microglobulin as indicator of highly active antiretroviral therapy (HAART) failure. [Time Frame: At subject enrollment.] [Designated as safety issue: No]

Secondary Outcome Measures:

- To assess the behavior of serum cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 as indicators of highly active antiretroviral therapy (HAART) failure. [Time Frame: At subject enrollment.] [Designated as safety issue: No]

Enrollment: 109

Study Start Date: August 2004

Study Completion Date: December 2008

Primary Completion Date: November 2005

Groups/Cohorts	Interventions
G1 15 HIV-1+ individuals, previously untreated or without HAART for at least six months and CD4+ < 350 cells/mm ³ .	
G2 31 HIV-1+ individuals undergoing HAART without virological therapeutic failure (TF).	
G3 43 HIV-1+ individuals undergoing HAART with TF.	
G4 20 normal individuals who served as controls for serum cytokines.	

Objective: To assess the behavior of Beta-2 microglobulin and serum cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 as indicators of highly active antiretroviral therapy (HAART) failure Design: Cross-sectional study. Methods: Eighty-nine HIV-1+ patients and 20 normal individuals were divided into 4 groups: G1- 15 HIV-1+ individuals, previously untreated or without HAART for at least six months and CD4+ < 350 cells/mm³; G2- 31 HIV-1+ individuals undergoing HAART without virological therapeutic failure (TF), G3- 43 HIV-1+ individuals undergoing HAART with TF, and G4- 20 normal individuals who served as controls for serum cytokines. Demographic, clinical and HAART data were reviewed, and Beta-2 microglobulin, serum cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10), HIV-1 genotyping, plasma viral load and CD4+ and CD8+ lymphocytes tests were performed.

Key words: Beta-2 microglobulin, serum cytokines, HIV-1, resistance, HAART, therapeutic failure, genotyping.

► Eligibility

89 HIV-1-infected individuals assisted by the Tropical Diseases Sector of the Botucatu School of Medicine – UNESP and 20 normal blood donors at the Botucatu Blood Bank.

Sampling Method: Non-Probability Sample

Ages Eligible for Study: 18 Years to 80 Years

Genders Eligible for Study: Both

Accepts healthy volunteers.

Inclusion Criteria:

- HIV-1-infected individuals
- Over 18 years old
- Sign the "written consent form" (WCF)

Exclusion Criteria:

- Do not presenting other immunosuppression causes, such as neoplasias, transplantations
- Do not presenting treatment by immunosuppressive substances
- Do not presenting auto-immune diseases
- Not be using any type of immunostimulating substances
- Not at any time of gestation

► Contacts and Locations

Locations

Brazil, Sao Paulo

Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
Botucatu, Sao Paulo, Brazil, 18618-970

Investigators

Principal Investigator: Ricardo MB Almeida, MSc

Departamento de Doencas
Tropicais e Diagnostico por
Imagem - Faculdade de
Medicina de Botucatu - UNESP.

► More Information

Responsible Party: Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, Brasil
(Ricardo Augusto Monteiro de Barros Almeida)

Study ID Numbers: upeclin/HC/FMB-Unesp-19

Health Authority: Brazil: National Committee of Ethics in Research