

MARIA DAS GRAÇAS DA MOTA SILVEIRA SASAKI

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTICÓRPICA À VACINA
RECOMBINANTE ANTI-HEPATITE B, UTILIZANDO O GM-CSF COMO
ADJUVANTE VACINAL EM PACIENTES HIV POSITIVOS**

**Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor na área de
Medicina Interna do Departamento de
Clínica Médica, do Setor de Ciências da
Saúde da Universidade Federal do Paraná**

**Orientadora: Profa.Dra. Iara Messias
Reason**

**CURITIBA
2002**

Sasaki, Maria das Graças da Mota Silveira

Avaliação da resposta anticórpica à vacina recombinante anti-hepatite B, utilizando o GM-CSF como adjuvante vacinal em pacientes HIV positivos / Maria das Graças da Mota Silveira Sasaki. – Curitiba, 2002.

ix, 64f

Tese (doutorado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

1.Vacinas sintéticas. 2.Vacinas anti-hepatite B. 3.Fatores estimuladores de coloniais de granulócito-macrófago recombinantes. 4.HIV1. 5.Anticorpos anti-hepatite B. I.Título. NLM WC

503

Dedicatória

Aos meus pais José (in memoriam) e Nair, meu esposo

Mário e meus filhos Daniel e Vítor

Agradecimentos

Ao Departamento de Pós-Graduação de Clínica Médica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela minha acolhida entre seus alunos.

Ao Laboratório Glaxo/Smith-Kline pela doação da vacina Engerix B.

Ao Laboratório de Sorologia do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Ao Laboratório de Imunofenotipagem do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN).

Ao Professor Roberto Focaccia pelo inestimável apoio na execução deste trabalho.

Ao Professor Nelson Szpeiter que com seu grande humor e competência me acolheu no serviço de Infectologia do Hospital de Clínicas e abriu as portas para pertencer ao corpo docente desta Universidade, aproveito aqui para lhe ser eternamente grata.

A Professora Iara Messias Reason pelas horas dedicadas na orientação desta pesquisa.

A todos pacientes que participaram desta pesquisa, meu respeito e minha gratidão.

Aos ex-alunos Rinaldo Focaccia, Rogério Mello e Lina Wang que me ajudaram nesta pesquisa.

A senhorita Márcia Barbosa pelo trabalho de digitação

A senhorita Aurea Maria Costin, pela normalização do trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 VACINA ANTI- HEPATITE B	3
2.2 MECANISMO ENVOLVIDOS NA RESPONSABILIDADE A VACINA ANTI-HEPATITE..B.....	4
2.1.1 Defeitos na apresentação do HBsAg aos linfócitos T.....	6
2.1.2 Falha no reconhecimento do antígeno HBs pelas células T	6
2.2.3 Supressão do HBsAg específico pelos linfócitos CD8+	6
2.2.4 Falha na produção de anticorpos específicos pelas células B.....	6
2.3 VACINA ANTI-HEPATITE B EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS.....	7
2.4 CONSEQUÊNCIAS DA NÃO-RESPONSIVIDADE DA VACINA ANTI- HEPATITE B.....	9
2.5 ESTRATÉGIAS PARA SUPERAR À NÃO RESPONSABILIDADE À VACINA ANTI-HEPATITE B.....	9
2.6 ADJUVANTES VACINAIS.....	10
2.7 BASE PARA O USO DO GM-CSF COMO ADJUVANTE VACINAL.....	13
3 OBJETIVOS	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1.CASUÍSTICA.....	18
4.2 MÉTODOS.....	19
4.2.1 Esquema de imunização e uso do GM-CSF como adjuvante.....	19
4.2.2 Avaliação Laboratorial	20
4.2.3 Determinação quantitativa dos anticorpos anti-HBs.....	20
4.2.4 Determinação das subpopulações de linfócitos CD4 e CD8.....	21
4.2.5 Determinação da carga viral.....	21
4.3.ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
5 RESULTADOS	23
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44
APÊNDICES	53

ABREVIATURAS E SIGLAS

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HVB - Vírus da hepatite B

HBsAg - Antígeno de superfície do vírus B da hepatite

Anti-HBs - Anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus B da hepatite.

Anti-HBc - Anticorpos contra o antígeno core do vírus B da hepatite da sub-classe IgG.

GM-CSF - Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos e Granulócitos

HBV_x - Vacina recombinante contra hepatite B

CD4 - Linfócito T auxiliador

CD8 - Linfócito T citotóxico

RNA - Ácido ribonucleico

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade humano

IL-2 - Interleucina 2

IL-3 - Interleucina 3

ABS - Albumina bovina sérica

IFN γ - Interferon gama

IFN α - Interferon alfa

APC - Células apresentadoras de antígenos

MPL - Monophosphoryl Lipid A

CDC - Centro de Controle de Doenças dos EUA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA HUMANA À VACINA ANTI-HEPATITE B (HbsAg) USANDO GM-CSF COMO ADJUVANTE	16
TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES	19
TABELA 2 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE SOROCONVERSÃO À VACINA RECOMBINANTE ANTI- HEPATITE B, USANDO O GM-CSF COMO ADJUVANTE VACINAL.-TEMPO 28 DIAS.....	23
TABELA 3 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE SOROCONVERSÃO À VACINA RECOMBINANTE ANTI- HEPATITE B,USANDO O GM-CSF COM ADJUVANTE VACINAL –TEMPO 60 DIAS.....	24
TABELA 4 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE SOROCONVERSÃO À VACINA RECOMBINANTE ANTI- HEPATITE B,USANDO O GM-CSF COM ADJUVANTE VACINAL –TEMPO 210 DIAS.....	24
GRÁFICO 1 - PERCENTUAL DE RESPOSTA ANTI-HBs DE ACORDO COM O ESQUEMA DE VACINAÇÃO (0,1 E 6 MESES) NOS GRUPOS HBV _x +GM-CSF E HBV _x	25
GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO DA MÉDIA DOS TÍTULOS DE ANTICORPO ANTI-HBs NOS GRUPOS HBV _x +GM-CSF E HBV _x	26
TABELA 5 - AVALIAÇÃO DA MÉDIAS DOS TÍTULOS DE ANTI-HBs E CARGA VIRAL	27
TABELA 6 - AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DE CD4/CD8	28
GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO DA MÉDIA DE CD4 NOS TEMPOS BASAL E 210 DIAS.....	29
TABELA 7 - AVALIAÇÃO DA CARGA VIRAL (BASAL E 210 DIAS.....	30

GRÁFICO 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS MÉDIAS DAS CARGAS VIRAIS NOS TEMPOS BASAL E 210 DIAS.....	31
TABELA 8 - AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DE LINFÓCITOS CD4 e CD8 NOS PACIENTES REAGENTES E NÃO REAGENTES À VACINA RECOMBINANTE ANTI-HEPATITE B.....	32
GRÁFICO 5 - COMPARAÇÃO DA MÉDIAS DOS TÍTULOS DE ANTI-HBs EM RELAÇÃO AO SEXO.....	33
GRÁFICO 6 - COMPARAÇÃO DA MÉDIAS DOS TÍTULOS DE ANTI-HBs NO GRUPO HBVX+ GM-CSF E HBVX EM RELAÇÃO AO FATOR DE RISCO.....	34

RESUMO

Estudos sobre a imunogenicidade à vacina anti-hepatite B em pessoas infectadas pelo HIV têm mostrado respostas subótimas. Com o objetivo de melhorar a resposta anticórpica à vacina recombinante da hepatite B em pacientes HIV positivos, utilizou-se o rhGM-CSF (recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor), que é uma citocina de ação imunoestimuladora e aumenta a resposta primária de anticorpos. Estudos clínicos anteriores sugerem que o rhGM-CSF pode ser utilizado como um adjuvante-vacinal. Oitenta indivíduos com idade de 18 à 35 anos (média 28, anos), 40 homens e 40 mulheres portadores de HIV, com marcadores negativos para hepatite B, $CD4/CD8 \geq 350$ cels/mm³, foram incluídos em estudo duplo cego placebo/controlado. Os pacientes foram randomizados a receber uma dose de 20µg do GM-CSF (Leucomax®) ou placebo intramuscular simultaneamente com 40 µg de vacina recombinante anti-hepatite B (Engerix B®) no esquema 0, 1 e 6 meses. Os títulos de anti-HBs (≥ 10 mLU/ml) foram monitorados nos momentos 28, 60 e 210 dias após a primeira dose da vacina; e a carga viral e os linfócitos CD4/CD8 nos momentos basal e 210 dias. As taxas de soroconversão após a segunda dose da vacina foram de: 62%(25/40) para o grupo que usou o GM-CSF e 30%(12/40 $p < 0,007$) para o grupo controle. A média dos títulos protetores de anti-HBs avaliados nos 28, 60 e 210 dias foram respectivamente de 40,3; 366,54 e 644,784 mLU/ml no grupo GM-CSF e de 62,4, 166,47 e 375,02 mLU/ml no grupo controle, com ($p < 0,05$) nos momentos 60 e 210 dias. O GM-CSF como adjuvante vacinal se mostrou seguro e eficaz, elevando os títulos de anti-HBs mais precocemente no grupo GM-CSF do que no grupo controle. A contagem de linfócitos CD4 e CD8 não influenciou na soroconversão à vacina recombinante para hepatite B e a carga viral não apresentou alterações significativas com o esquema vacinal. Não se observou alteração da imunogenicidade da vacina recombinante anti-hepatite B em relação à idade, sexo e fator de risco.

ABSTRACT

Recombinant human Granulocyte—Macrophage Colony-Stimulating Factor (rhGM-CSF) is a cytokine with a potential vaccine adjuvant activity. It is also known that HIV infected patients often show poor immunologic responses to immunization. It was examined whether or not the use of locally applied GM-CSF could augment the immunologic response to recombinant vaccine against the hepatitis B virus (HBV) in patients infected with HIV. Eighty HIV-seropositive individuals, aged between 18 to 35 years old (mean age 28.02), 42 male and 38 female, with CD4 lymphocyte count >350 cells/mm³ and negative markers for HBV, were included in a randomized, open-label study. All individuals received three doses of 40 µg of recombinant vaccine against HBV (Engerix®), administered at 0, 1 and 6 months. Concomitant with the first vaccine dose, 40 individuals received 20 µg of GM-CSF (Leucomax ®) (the GM-CSF+HBVx group), and 40 individuals received placebo + HBVx (the control group). Seroconversion rates after the second dose (day 60) were 25 (62%) for the GM-CSF+HBVx group and 12 (30%) for the control group ($p < 0.008$). The average anti-HBs titers in patients with protecting levels (≥ 10 mUI/ml) after 28, 60 and 210 days were 40.3; 366.5 and 644.8 mUI/ml respectively in the GM-CSF group, and 62.4; 166.4 and 375.0 mUI/ml respectively in the control group. Significant differences were recorded at 60 and 210 days ($p < 0.01$). No significant differences were found between responders and non-responders with regard to CD4 and CD8 lymphocytes counts, CD4/CD8 ratio, age, sex or risk group. No increase in the blood viral load RNA following vaccine administration was observed. No local or systemic adverse events were noted. This study suggests that 20 µg GM-CSF, used as a local vaccinal adjuvant, increases the immunogenicity of recombinant HBV vaccine, when it is administered to HIV infected individuals.

1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) é comum entre os indivíduos infectados pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), pois ambas as viroses apresentam os mesmos modos de transmissão: sexual, sanguínea e vertical (mãe para o filho).

Com o avanço da pandemia pelo vírus HIV, atualmente os indivíduos, com fatores de risco se expõem ao HIV antes de adquirir o HBV, e segundo alguns autores, esta co-infecção pode estar presente entre 10 a 40% dos homossexuais masculinos e usuários de drogas endovenosas. Outro aspecto relevante é que na co-infecção HIV/HBV, o risco de cronicidade pela hepatite B é elevado e que os indivíduos co-infectados apresentam altas concentrações séricas do vírus da hepatite B e um maior risco de transmissão deste vírus à outros indivíduos susceptíveis.

Tem sido documentado que os indivíduos infectados pelo HIV apresentam uma perda acelerada dos anticorpos anti-HBs, adquiridos tanto por exposição natural como vacinal. A progressão e a severidade da imunodeficiência leva a uma diminuição da resposta anticórpica a antígenos vivos ou mortos nestes pacientes, particularmente aos antígenos T- dependentes, tal como o antígeno B de superfície (HBsAg).

Embora os dados da literatura indiquem que os indivíduos infectados pelo HIV possam desenvolver respostas subótimas após a vacinação contra a hepatite B, a maioria deles alcança níveis protetores de anticorpos anti-HBs, com taxas de soroconversão variando entre 50 a 70% nos indivíduos vacinados. Portanto, a utilização da prevenção contra hepatite B através de vacinação nesta população é plenamente justificada.

Não existe relato de efeitos adversos relevantes associados à imunização de pacientes infectados pelo HIV utilizando-se a vacina anti-hepatite B, tanto derivada de plasma quanto a recombinante

O CDC (Centro de Controle de Doença dos EUA) recomenda que, após o esquema de vacinação básica anti-hepatite B, os níveis de anticorpos anti-HBs sejam mensurados e, aqueles indivíduos que não responderem, com títulos protetores de anti-HBs iguais ou superiores a 10mUI/mL, sejam revacinados com 1 a 3 doses de reforço.

Estudos adicionais são necessários para avaliar os efeitos de doses maiores, da vacina anti-hepatite B ou o uso de adjuvantes para aumentar a resposta primária de anticorpos anti-HBs em pacientes imunodeprimidos.

Com este objetivo, utilizou-se neste trabalho, como adjuvante vacinal o GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*), que é uma potente citocina com atividade imunoestimulatória sobre a imunidade celular e humoral, associado a vacina recombinante anti-hepatite B em dose dupla, num esquema de três doses em estudo duplo-cego placebo controlado randomizado. A eficácia e a tolerabilidade do GM-CSF foi avaliada, quando usado concomitantemente com primeira dose da vacina recombinante anti-hepatite B, em pacientes HIV positivos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 VACINA ANTI-HEPATITE B

Desde que foi introduzida para o uso humano, no começo dos anos 80, a vacina da hepatite B tem se mostrado bem tolerada e efetiva em pessoas imunocompetentes, aumentando os anticorpos protetores em aproximadamente 85 a 95 % das pessoas (HOLLINGER, 1989). Entretanto, esta vacina pode ser menos efetiva nas populações onde a sua eficácia seja mais desejável, como por exemplo, os pacientes com insuficiência renal submetidos a hemodiálise, os alcoólatras, os receptores de transplantes de órgãos, os pacientes com câncer e os portadores de HIV/AIDS (RECOMMENDATIONS, 1993). Em geral, adultos e crianças sintomáticos, com infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), apresentam respostas imunológicas subótimas às vacinas (COLLIER et al., 1988; ARRAZOLA et al., 1995).

A progressão e a severidade da imunodeficiência levam a diminuição da resposta anticórpica a antígenos vivos ou mortos nestes pacientes, o que é particularmente verificado para os antígenos T-dependente, tais como: influenza e tétano (KRON et al., 1994). Tem sido previamente demonstrada que a resposta anticórpica ao antígeno usado na vacina anti-hepatite B, o antígeno B de superfície (HBsAg), é T dependente (CUPPS et al, 1984), induzindo a produção de níveis séricos de anticorpos anti-HBs considerados subótimos nestes pacientes (HADLER et al., 1986; COLLIER et al., 1988; SASAKI et al., 1998).

Com base nas alterações imunológicas desencadeadas pelo HIV, pode-se esperar que os indivíduos infectados por este vírus apresentem pobre resposta à vacinação contra hepatite B, semelhante ao observado em outras formas de imunocomprometimento (STEVENS et al., 1984; JACOBSON et al., 1985).

De fato, os estudos sobre a imunogenicidade das vacinas anti-hepatite B em pessoas infectadas pelo HIV têm mostrado resultados subótimos (MILICH et al., 1984; HADLER

et al., 1986; MILICH 1986; CARNE et al., 1987; COLLIER et al., 1988; ODAKA 1988; WONG et al., 1996).

Outro aspecto relevante, é que na co-infecção HIV-HBV a lesão histológica hepática costuma ser rapidamente fibrosante, induzindo o desenvolvimento de cirrose e/ou hepatocarcinoma (HORVATH ; RAFFANTS, 1994). Tal fato reforça a necessidade de proteção vacinal contra o vírus da hepatite B em pacientes HIV positivos.

Em homossexuais masculinos infectados pelo HIV, demonstrou-se que estes apresentam 20% de risco estimado de adquirir HBV em relação a 6% dos indivíduos HIV negativos. Outros estudos mostram que o risco de se tornar portador entre os que não responderam à vacina anti-hepatite B é de aproximadamente 30% nos indivíduos HIV soropositivos, e 10% nos soronegativos. Contudo, os indivíduos soropositivos que responderam à vacina tiveram aparentemente uma excelente proteção contra hepatite B, por um período de até sete anos (COLLIER et al., 1988; HADLER et al., 1991).

Embora os resultados indiquem que os indivíduos HIV infectados possam desenvolver respostas subótimas após a vacinação contra hepatite B, a maioria dos indivíduos alcança níveis protetores de anticorpos, com uma taxa de soroconversão que pode atingir 50 a 70% dos vacinados (CARNE et al., 1987; HADLER, 1988; COLLIER et al., 1988), justificando-se, portanto, a utilização da vacinação anti-hepatite B nesta população. Não existe relato de efeitos adversos relevantes associados à imunização de indivíduos com a vacina derivada do plasma ou recombinante (CARNE et al., 1987; MOK et al., 1987; HADLER, 1988; COLLIER et al., 1991).

A vacinação contra hepatite B ainda é considerada uma grande estratégia mundial de controle da hepatite, e as pessoas com alto risco de infecção para o HIV devem ser priorizadas nesta prevenção. O Centro de Controle de Doenças dos EUA recomenda que os títulos de anticorpos anti-HBs sejam medidos após a vacinação e que aqueles que não responderem ou melhor, que não obtiverem títulos protetores de anticorpos anti-HBs iguais ou maiores a 10.0 mUI/mL, sejam revacinados com 2 ou 3 doses adicionais (RECOMMENDATIONS 1993).

2.2 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA RESPONSABILIDADE À VACINA ANTI- HEPATITE B

A resposta imunológica contra a vacina da hepatite B é determinada por vários fatores, tanto os relacionados com a imunização, quanto ao hospedeiro. Entre os fatores associados à imunização incluem-se: a dose administrada, o esquema de imunização, o local e a via de administração, e as condições de estocagem das vacinas. Inúmeros trabalhos clínicos em campo têm demonstrado que resultados ótimos são encontrados quando 3 a 4 doses de 20µg de HBsAg (antígeno de superfície da hepatite B) são administradas no músculo deltóide 0, 1 e 6 meses, ou 0, 1, 2 e 12 meses respectivamente, alcançando uma taxa de soroconversão em torno de 90% nos indivíduos vacinados (HOLLINGER, 1989). Fatores relacionados ao hospedeiro que influenciam na resposta contra a vacina da hepatite B incluem: idade, sexo, peso, hábitos de fumar e estado de doença. A resposta imunológica à vacina da hepatite B é expressada em taxa de soroconversão, sendo que a média dos títulos anti- HBs declina com a idade (DENIS, 1984; ANDRÉ, 1989). A obesidade também interfere na resposta anti-HBs (WEBER et al., 1985).

Em geral, mulheres produzem melhor resposta do que os homens, e isto pode estar relacionado às diferenças hormonais e ao peso corporal (HOLLINGER et al. citados por LEROUX-ROELS, 1993). Doenças concomitantes ou hábitos de vida, tais como, HIV/AIDS, diabetes insulino dependente, pacientes renais crônicos, tabagismo, uso de drogas endovenosas e homossexualismo, podem prejudicar o sistema imunológico, afetando a resposta contra a vacina da hepatite B (JACOBSON, 1985; CARNE et al., 1987; BRUGERA et al., 1989; GOILAV; PIOT, 1989; RUMI et al., 1991; ZOULEK et al. citados por LEROUX-ROELS, 1993). Por outro lado, aproximadamente 10% dos indivíduos saudáveis não respondem ou apresentam títulos subprotetores de anti-HBs (< 10 UI/mL), (WALKER, 1981).

Além destes fatores, que contribuem para a variabilidade da resposta imunológica, fatores genéticos ligados a um gene recessivo do complexo principal de histocompatibilidade humano (MHC) estão associados a não responsividade à vacina em humanos. Esta hipótese, de que genes associados ao MHC poderiam controlar a resposta imunológica ao HbsAg, foi descrita pela primeira vez por WALKER (1981) e confirmada posteriormente por WATANABE et al., (1988), ALPER et al. (1989) e KRUSKALL et al. (1992). Baseados nos estudos *in vitro* e *in vivo* destes autores, podem ser postuladas as seguintes alterações imunológicas, tentando explicar a não responsividade à vacina anti-hepatite B.

2.2.1 Defeitos na apresentação do antígeno HBs aos linfócitos T

Associados ao inadequado processo de apresentação do antígeno HBs (HbsAg) pelas células apresentadoras de antígenos (APC), e na falha da produção de fragmentos de peptídeos do HBsAg e na sua conseqüente interação com as moléculas MHC de classe II (MILICH et al., 1984; EGEEA et al., 1991).

2.2.2 Falha no reconhecimento do antígeno HBs pelas células T

Por razões até o momento desconhecidas, é provável que o linfócito T (CD4) não reconheça o HBsAg processado pela célula APC, apresentado juntamente com a molécula MHC de classe II (MILICH; LEROUX-ROELS; CHISANI, 1983).

2.2.3 Supressão da resposta específica ao HBsAg pelos linfócitos CD8+

Evidências desta hipótese são obtidas dos trabalhos de WATANABE et al., (1988 e 1990) e de observações que indivíduos não respondedores ao HBsAg tinham significativo aumento do número absoluto de linfócitos CD2⁺, CD57⁺ e CD8⁺ (NOWICKI; TONG; BOHMAN, 1985).

2.2.4 Falha na produção de anticorpos específicos pelas células B

Embora esta hipótese seja teoricamente possível, indivíduos não respondedores podem ser induzidos a secretar anti- HBs, quando altas doses ou doses adicionais de vacina são administradas, ou ainda por procedimentos que promovam aumento das células T auxiliares específicas (MILICH et al., 1983).

2.3 A VACINA ANTI- HEPATITE B EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS

Tem sido observado que pacientes renais crônicos, transplantados de órgãos, diabéticos insulino-dependentes, etilistas crônicos e portadores de HIV/AIDS apresentam respostas subótimas à vacina contra hepatite B, fato este que pode acarretar uma maior suscetibilidade à infecção crônica pela hepatite B nestes indivíduos.

Os pacientes soropositivos por infecção pelo HIV apresentam pobre resposta anticórpica contra algumas vacinas. Quanto mais reduzido o número de linfócitos CD4 + (que mede aproximadamente o estado evolutivo da infecção), menor é a eficácia vacinal. Nas fases muito avançadas da doença com CD4 < 200 células/ml de sangue, os pacientes respondem insatisfatoriamente às vacinas.

Além do defeito da imunidade mediada por células, caracterizada pelo declínio dos linfócitos CD4+ e da disfunção dos monócitos e macrófagos, há evidências também de disfunção de linfócitos B com hipergamaglobulinemia e do desaparecimento das células de memória (CD45RO), que podem explicar a falta de resposta primária à imunização nos indivíduos HIV+ (ROSSEAU; DELMONT, 2000).

Os autores, ODAKA et al. (1988); JILG; SCHIMIDT; DEINHARDT (1990) e WONG (1996) observaram que a vacinação anti-HBV foi muito menos eficaz para fornecer proteção em indivíduos homossexuais masculinos HIV+, utilizando tanto a vacina derivada do plasma quanto a vacina recombinante, quando comparados com homossexuais masculinos HIV negativos. COLLIER et al. (1988) demonstraram uma

taxa de soroconversão à vacina recombinante anti-hepatite B de 56% em indivíduos HIV+, quando comparados com 91% de soroconversão no grupo controle HIV negativos. Estes dados foram também confirmados por SASAKI et al. (1998) que observaram uma taxa de soroconversão à vacina recombinante anti-hepatite B de 45,5% nos indivíduos HIV+, e de 100% no grupo controle de indivíduos saudáveis.

Um fenômeno importante, que tem sido observado por BIGGAR; GOERDERT; HOOFNAGLE (1987) é que uma rápida perda na concentração de anticorpos anti-HBs ocorre após a vacinação em pacientes HIV+, o que está relacionado com a progressão da doença. Na fase inicial da infecção pelo HIV, estes pacientes podem apresentar ainda um período normal de proteção, devido as células de memória estarem ainda sensibilizadas e aptas a responder a novos estímulos antigênicos. Entretanto, na fase avançada de infecção pelo HIV, a proteção contra nova infecção está reduzida devido à destruição de linfócitos, inclusive os de memória (FOCACCIA; SANTOS, 1999).

A quantificação da carga viral (que mede a intensidade de infecção pelo HIV) ainda não pode servir de parâmetro para a indicação de imunização básica, por falta de conhecimento sobre a influência desta na resposta anticórpica. Entretanto, a estimulação antigênica do sistema imunológico pela vacinas rotineiras, incluindo a anti-hepatite B, parece não afetar significativamente a replicação do HIV e a progressão da infecção (FOCACCIA; SANTOS, 1999).

As implicações destes achados devem ser avaliadas no contexto de outros aspectos de vacinação contra hepatite B ou da exposição natural ao HBV. Geralmente a revacinação não modifica uma resposta insuficiente aos esquemas iniciais de vacinação contra hepatite B nestes indivíduos. Os autores HADLER (1987) e NAGAFUCHI (1987) relataram que a revacinação com três doses adicionais da vacina anti-hepatite B não produziu nenhuma resposta em 6 pessoas infectadas pelo HIV, quando comparadas com o grupo controle HIV negativo que respondeu em torno de 50%.

2.4 CONSEQÜÊNCIAS DA NÃO-RESPONSIVIDADE CONTRA A VACINA ANTI-HEPATITE B

A não responsividade à vacina contra hepatite B em indivíduos saudáveis parece estar associada a um defeito seletivo que afeta somente a resposta imunológica à vacina contra hepatite B, não estando associada a outros antígenos ou vacinas (KRUSKALL et al., 1992). Portanto, indivíduos não respondedores devem ter o mesmo risco para contrair hepatite B (HBV) que indivíduos não vacinados, além do risco à cronicidade (HADLER et al., 1986; BORTOLOTTI et al., 1988).

É conhecido que pacientes portadores de HIV apresentem uma perda acelerada dos títulos de anticorpos anti-HBs, tanto após a infecção natural como a resposta vacinal (BIGGAR; GOERDERT; HOOFNAGLE, 1987; DRAKE; PARMELY; BRITTON, 1987). Considerando-se que a população de alto risco para o HIV expõe-se ao HIV antes de desenvolver imunidade específica ao vírus da hepatite B, com maior risco de co-infecção (HIV/HBV) e de se tornar portador crônico do vírus B, acarretando maior risco da transmissão a outros indivíduos, seria de grande valor programas de prevenção, incluindo a vacinação anti-hepatite B na população geral (KROGSGAARD et al., 1987; BODSWORTH; COOPER; DONOVAN, 1991; HORVATH; RAFFANTI, 1994).

2.5 ESTRATÉGIAS PARA SUPERAR A NÃO RESPONSIVIDADE À VACINA ANTI-HEPATITE B

O efeito de doses adicionais de vacina em indivíduos não respondedores tem sido examinado por vários investigadores, como WISMANS et al. (1988), JILG; SCHMIDT; DEINHARDT (1990). Estes autores observaram que a administração intramuscular de 3 doses suplementares em indivíduos saudáveis hiporrespondedores e não respondedores induziu a títulos protetores ($\geq 10\text{IU/mL}$) de anti-HBs em 75% dos indivíduos.

NAGAFUCHI et al. (1987) e YASUMURA et al. (1991) mostraram que injeções intradérmicas de 5 µg HBsAg com intervalo de 2 semanas induziram a resposta positiva para anti-HBs (≥ 10 IU/mL) e reação de hipersensibilidade retardada em todos os indivíduos saudáveis.

Estas observações sugerem que em humanos, assim como em animais, as células B - HBs específicas estão presentes em indivíduos normais usualmente não respondedores à vacinação convencional anti-hepatite B. Estas células B podem ser estimuladas a produzir e secretar anti-HBs, tão logo estas sejam estimuladas pelas células T CD4+. Aproximadamente 10% dos indivíduos adultos saudáveis não respondem adequadamente a esquema básico de vacinação contra hepatite B; esta falha na responsividade é seletiva e não indica deficiência imunológica generalizada. O mecanismo responsável pela falta de resposta à vacina da hepatite B permanece ainda desconhecido

Embora os fatores genéticos ligados ao MHC tenham um papel importante na regulação desta resposta, outros fatores estão envolvidos na gênese dessa hiporresponsividade. Várias estratégias têm sido utilizadas para superar a não responsividade ao HBsAg, principalmente em pacientes hemodializáveis, entre elas as de aumentar a dose do antígeno ou a administração de adjuvantes (MEUER et al., 1989). Os adjuvantes são substâncias que têm a propriedade de aumentar o potencial de antigenicidade das vacinas, melhorando a resposta imunológica. Entre os adjuvantes que tem sido utilizados para melhorar a resposta a HBsAg incluem-se: a interleucina-2 (IL-2, o interferon gama (IFN γ), o -interferon alfa (IFN α) e a timopentina (MEUER, 1989; HEATH et al., 1989; QUIROGA et al., 1990; HILMAN, 1994).

2.6 ADJUVANTES VACINAIS

Numerosas estratégias têm sido usadas com o intuito de aumentar a imunogenicidade das vacinas utilizando-se adjuvantes. Por exemplo, antígenos polissacarídeos têm sido conjugados com antígenos protéicos com o objetivo de eliciar máxima ativação de células T auxiliares (CD4+), requeridas para estimular a produção de anticorpos IgG como também a memória imunológica. Entretanto, em muitos casos, múltiplas doses de vacinas são necessárias para induzir uma imunidade protetora de longa duração. Em alguns casos, porém, esta estratégia tem falhado em induzir uma resposta imunológica que seja clinicamente benéfica. Entre os fatores que limitam a eficácia das vacinas estão: a relativa baixa imunogenicidade das vacinas protéicas (por exemplo, para malária), a variabilidade antigênica dos microorganismos em questão (HIV) e os defeitos imunológicos nas populações alvo (idosos, AIDS e pacientes em diálise) (BOLLA et al. citados por TARR; LIN; JONES, 1996).

De acordo com WAKSMAN citado por LIN e JONES (1997), os adjuvantes podem exibir seus efeitos através dos diferentes modos de ação:

- 1) fornecendo um efeito de depósito no sítio de inoculação;
- 2) aumentando a apresentação de antígenos às células imunocompetentes
- 3) estimulando a produção de citocinas...

Por muitos anos, inúmeras substâncias utilizadas como adjuvantes têm apresentado uma ou mais destas funções. Entretanto, apenas um adjuvante, o sal de alumínio (alume), foi o que recebeu aprovação para o uso humano. Este metal pesado é instável e geralmente induz uma resposta imune humoral, porém com pobre resposta mediada por células (CHEDID, 1985). Dentro dos adjuvantes que estão sendo testados em estudos clínicos, incluem-se várias substâncias que podem ser produtos bacterianos naturais e sintéticos, lipossomas, produtos vegetais, hormônios e citocinas.

O adjuvante mais extensivamente testado para a vacina anti-hepatite B tem sido a timopentina,, um hormônio extraído do timo que apresenta ação imunomoduladora,

aumentando a diferenciação e maturação das células T. A timopentina foi principalmente testada como adjuvante da vacina anti-hepatite B em pacientes de hemodiálise que não apresentavam resposta, ou apresentavam apenas uma baixa resposta à vacina (LIN; JONES, 1997). Nos últimos anos, entretanto, houve um declínio na utilização deste adjuvante, provavelmente decorrente da contradição nos resultados obtidos dos diferentes estudos, onde se observou uma taxa de soroconversão que variou entre 77% e 91,5% nos pacientes estudados (TURK; PARKER, 1977; ZARUBA; GROB; BOLLA, 1985; ERVO; MAGNI; CAVATORTA, 1992).

Alguns estudos não mostraram tais efeitos benéficos da timopentina provavelmente decorrentes dos diferentes tempos de administração do adjuvante (GROB et al., 1983; MELAPPIONI et al., 1992) ou ainda do uso de diferentes tipos de vacinas (DONATI; GASTALDI, 1988).

PAGANI et al. citados por LIN e JONES (1997) observaram que 88% dos pacientes diabéticos tratados com timopentina tiveram uma soroconversão (acima dos níveis de proteção), após vacinação contra hepatite B (0-1-2 meses subcutâneo). No entanto, a média dos títulos anti-HBs nos pacientes diabéticos foi significativamente menor do que nos controles normais. Quando a vacina foi administrada na ausência de timopentina, somente 60% dos pacientes responderam, mesmo após a quarta dose da vacina (DUMANN et al., 1990).

O MPL (Monophosphoryl Lipid A) é um análogo do lipídeo A, que apresenta efeito adjuvante por estimular a produção de $IFN\gamma$ por células T e TNF por macrófagos, levando preferencialmente a produção de células Th1. O MPL tem sido testado como adjuvante na prevenção da hepatite B. Demonstrou-se bem tolerado e capaz de induzir uma resposta imunológica mais rápida com soroproteção de anti-HBs em até 100% (PAGANI et al. citados por LIN; JONES, 1989) e 96% (VAN DAMME et al. citados por LIN; JONES, 1997), após a segunda dose de vacinação. Os títulos geométricos mais importantes também foram significativamente maiores nos receptores de MPL-HBs, quando comparados com o grupo controle.

2.7 BASES PARA O USO DO GM-CSF (*GRANULOCYTE MACROPHAGE COLONY STIMULATING FACTOR* - *FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS E MACRÓFAGOS*) COMO ADJUVANTE VACINAL

A atividade estimulatória do GM-CSF sobre os leucócitos maduros tem gerado considerável interesse nesses últimos anos sobre o seu potencial valor como adjuvante vacinal. Os efeitos do GM-CSF na resposta imunológica incluem:

1) Aumento da maturação, migração e função imunoestimulatória das células de Langerhans e células dendríticas. As células de Langerhans são precursoras das células dendríticas na pele, que, após a fagocitose de antígenos, diferenciam-se em células dendríticas e migram para os linfonodos regionais, onde apresentam antígeno aos linfócitos T auxiliares CD4+. As células dendríticas são reconhecidas como as mais potentes células apresentadoras de antígenos na resposta imunológica mediada pelas células T *in vivo* (FISCHER et al., 1988; GASSON, 1991).

2) Aumento da expressão de antígenos de MHC de classe II, nas células apresentadoras de antígenos, que têm um papel importante na apresentação de antígenos aos linfócitos T CD4 auxiliares. A habilidade em estimular os linfócitos CD4 está relacionada com a densidade de moléculas de MHC de classe II, expressas na superfície das células apresentadoras de antígenos.

3) A ativação dos linfócitos CD4, através do receptor de célula T, é dependente de uma co-estimulação por ligantes na superfície das células apresentadoras de antígenos, entre os quais inclui-se a molécula B7 com um papel fundamental. O GM-CSF tem mostrado a capacidade de aumentar a expressão de B7 em células de Langerhans *in vitro* (FISCHER et al., 1988; GASSON, 1991).

4) Indução de inflamação local no sítio da injeção do GM-CSF tem sido verificada através de análise histológica de biópsias, apresentando acúmulo de neutrófilos e células mononucleares em muitos pacientes. Este acúmulo confirma os efeitos quimiotáticos do GM-CSF, os quais devem estar associados a sua habilidade de aumentar a expressão de

várias moléculas de adesão para leucócitos nas células endoteliais (JILG;SCHULER; ROMANI citados por LIN; JONES, 1997).

5) Apresenta atividade imunoestimulatória sobre macrófagos, levando a secreção de citocinas. Como consequência de sua atividade imunoestimulatória, o GM-CSF pode aumentar a resposta primária de anticorpos. Além disso, o GM-CSF aumenta a resposta dos linfócitos T mediada por IL-2, e pode ser útil na geração de um número expressivo de linfócitos T citotóxicos viáveis, ativados por esta citocina (GERHARTZ et al., 1993; DRANOFF et al., 1993).

Os efeitos imunestimulatórios do GM-CSF sobre a resposta imunológica à vacina anti-hepatite B (HbsAg) encontram-se hipotetizados na figura 1.

Pelo menos cinco diferentes métodos de uso do GM-CSF como um agente estimulador da imunidade têm sido descritos. Esses métodos incluem, portanto, o uso sistêmico (modulação hematopoiética/imunológica), uso regional (maturação de células dendríticas/células de Langerhans), uso local (ativação de células apresentadoras de antígenos), fusão protéica (molécula simples do GM-CSF/ativação de antígenos) e uso *ex vivo* (maturação de células dendríticas com adjuvante vacinal ou inserção do gene GM-CSF dentro de células malignas para amplificar a resposta vacinal).

Em estudos experimentais, camundongos foram imunizados com injeções subcutâneas de albumina sérica bovina (ASB), isoladamente (grupo controle) ou em combinação com injeções subcutâneas de GM-CSF. Títulos de anticorpos anti-ASB foram medidos no dia 14º após a imunização.

Os resultados do estudo demonstraram que o grupo controle não desenvolveu títulos detectáveis de anti-ASB. Entretanto, quando os camundongos receberam a dose única de ASB, seguida por um tratamento de 2 semanas de injeções subcutâneas de GM-CSF, começando no dia 0, títulos expressivos de anticorpos anti-ASB foram observados. Uma dose diária de 0.1µg de GM-CSF foi tão efetiva quanto uma dose de 2.5µg. Duas doses de ABS isoladas nos dias 0 e 7 induziram títulos de anti-ASB no dia 14 de 1.9+/-

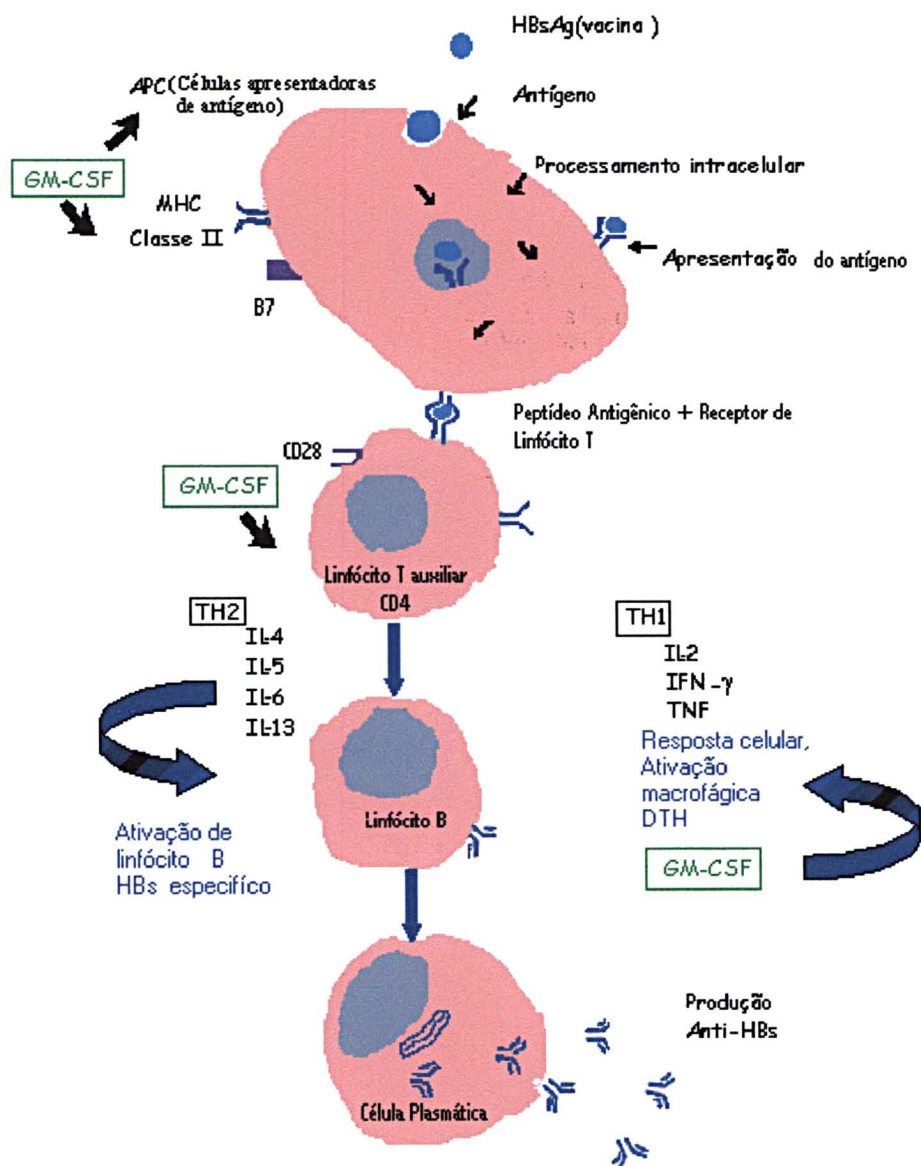
4.4 e 7.6 ± 7.3 mg/ml, respectivamente, quando a dose de ASB foi 100 e 500 μ g. A adiç3o de 2 doses semanais de GM-CSF associadas a ASB, como descrito acima, levou a um t3tulo significativamente maior de anti-ASB no d3cimo quarto dia (94.6 ± 40.7 e 152.7 ± 69.7 ng/ml, respectivamente). Assim, o GM-CSF demonstrou ter efeito imunoestimulador sobre as respostas prim3ria e secund3ria de anticorpos anti-ASB, quando administrado por duas semanas, imediatamente ap3s imunizaç3o (GRABBE et al., 1994).

Outra tentativa de se utilizar dos efeitos imunoestimuladores do GM-CSF foi a fus3o g3nica de GM-CSF ao linfoma de c3lulas B. Camundongos imunizados com prote3nas fusionadas produziram t3tulos muito elevados de anticorpos espec3ficos e tornaram-se protegidos contra subseqüentes est3mulaç3es com c3lulas que expressam o idiotipo do linfoma. O interessante 3 que injeç3es separadas do idiotipo e GM-CSF n3o resultaram num efeito protetor (TAYLOR-PAPADIMITRIOU; BALKWILL, 1993).

Em primatas, t3tulos aumentados de anti-IL-3 foram observados pela injeç3o subcut3nea simult3nea de IL-3 e GM-CSF, quando comparados com os animais que receberam somente IL-3. Al3m disso, a resposta antic3rpica a uma vacina anti c3ncer, direcionada contra os ant3genos de carboidratos-Y de Lewis, foi estudada em primatas que receberam uma dose 3nica do ant3geno combinada com uma s3rie de quatro injeç3es subcut3neas de GM-CSF. No grupo que recebeu quatro injeç3es de GM-CSF, a proporç3o de anticorpos contra os ant3genos tumorais mostrou-se aumentada em relaç3o 3 resposta total de anticorpos (TARR; LIN; JONES et al., 1994).

Estas descriç3es em modelos experimentais confirmam que o GM-CSF tem propriedades de adjuvante, que pode ter uso cl3nico. Recentemente, a efic3cia do GM-CSF como adjuvante a uma 3nica dose de vacina recombinante anti-hepatite B foi avaliada em indiv3duos saud3veis, com bons resultados (TARR et al., 1996). O GM-CSF afetou os t3tulos de anticorpos contra ant3genos externos HBs, levando a uma elevada resposta prim3ria de anticorpos anti-HBs.

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMATICA DA RESPOSTA IMUNOLOGICA HUMANA A VACINA ANTI-HEPATITE B (HBsAg) USANDO GM-CSF COMO ADJUVANTE



3 OBJETIVOS

- 1) Avaliação da resposta anticórpica à vacina recombinante anti- hepatite B, usando o GM-CSF como adjuvante vacinal em pacientes HIV soropositivos.
- 2) Avaliação da segurança e da tolerabilidade do GM-CSF em dose única de 20 microgramas combinada com a primeira dose de vacina recombinante anti- hepatite B.
- 3) Avaliação da imunogenicidade da vacina recombinante anti-hepatite B na dose de 40 microgramas em pacientes HIV positivos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Este estudo foi realizado no Ambulatório de Infectologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná durante o ano de 1999. Oitenta pacientes portadores de HIV, correspondendo a cerca de 5% dos pacientes atendidos, foram incluídos neste trabalho. Após os devidos esclarecimentos, todos os pacientes consentiram livremente em participar da pesquisa com assinatura do Termo de Consentimento.

Os 80 pacientes selecionados eram assintomáticos pertencentes ao grupo II de critérios diagnósticos para AIDS do CDC de 1993 (RECOMMENDATIONS, 1993), estavam em uso ou não de anti-retrovirais, tinham idade entre 18 a 35 anos (média 28 anos), de ambos os sexos, com ausência de infecções oportunistas e contagem de subpopulações de linfócitos CD4+ > 350mm³. Todos os pacientes apresentavam marcadores séricos negativos para hepatite B e ausência de vacinação contra hepatite B.

Foram excluídos os pacientes que apresentaram soropositividade de qualquer marcador para hepatite B, história de administração prévia de GM-CSF ou outra citocina, vacina contra hepatite B, ou qualquer condição clínica que contra-indicasse a administração de GM-CSF.

Os pacientes foram randomizados em dois grupos de 40: um grupo de estudo, que utilizou o GM-CSF como adjuvante mais a vacina recombinante anti-hepatite B (GM-CSF+HBVx), e um grupo controle, que recebeu a vacina anti-hepatite B mais placebo (HBVx + placebo).

O grupo de estudo (GM-CSF+HBVx) foi constituído de 22 pacientes do sexo masculino (55%) e 18 do sexo feminino (45%). O grupo controle (HBVx – placebo) foi constituído de 18 pacientes do sexo masculino (45%) e 22 do sexo feminino (55%). Em relação ao fator de risco sexual, 68% (15/22) dos pacientes masculinos eram homossexuais no grupo GM-CSF+HBVx e 77% (14/18) no grupo controle. As características demográficas referentes a

estes dois grupos encontram-se na Tabela 1. Todos os indivíduos participantes eram assintomáticos durante o estudo e 90% deles estavam em uso de terapêutica anti-retroviral com esquema de 2 ou 3 drogas.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

VARIÁVEIS	GM-CSF+ HBVx (n=40)	HBVx (n=40)	<i>P</i>
Média de idade	27,80	28,02	NS
Idade limite	18-35	18-35	NS
Homens	22	18	NS
Mulheres	18	22	NS
Homossexuais	15/22(68,18%)	14/18(77%)	NS
Marc. Hepatite B	Não reagentes	Não reagentes	NS

Teste t de Student

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Esquema de imunização e uso do GM-CSF como adjuvante

Os indivíduos foram randomizados em um estudo duplo cego, placebo controlado, ou para receber uma única dose de injeção intramuscular, na região do deltóide, de 20 µg de GM-CSF (Leucomax®) (Sandoz Pharma Ltd/Schering Plough Basel Suíça), ou 0,1 mL de água destilada, como placebo. Imediatamente, todos os indivíduos receberam a primeira dose de 40 microgramas de vacina recombinante contra hepatite B (Engerix B®, Smith-Kline Beecham, Nanterre – França).

As primeiras injeções contendo água destilada (placebo) ou GM-CSF (Leucomax®) foram preparadas pela serviço de dispensação da Farmácia do Hospital de Clínicas da UFPR. O placebo e a preparação contendo o GM-CSF eram indistinguíveis

para os pacientes e pesquisadores. Portanto, nem os pacientes nem os pesquisadores sabiam do conteúdo da injeção.

Todos os indivíduos receberam doses adicionais da vacina anti-hepatite B nos 28 e 180 dias após a primeira dose da vacina (esquema de vacinação de 0, 1 e 6 meses).

4.2.2 Avaliação laboratorial

Os indivíduos foram monitorados laboratorialmente através de hemograma, antes e após a administração da medicação em estudo, para avaliar possíveis alterações no número de leucócitos circulantes, assim como reações locais provenientes do uso do GM-CSF ou do antígeno vacinal. As amostras de sangue foram coletadas um dia antes e após 12 horas da aplicação do medicamento, no 28^o dia. Estas foram encaminhadas para o laboratório de Hematologia do Laboratório Geral do Hospital de Clínicas da UFPR, onde foram analisadas.

4.2.3. Determinação quantitativa dos anticorpos anti-HBs

A avaliação quantitativa dos anticorpos anti-HBs foi realizada no dia 28; 60 e 210 dias após a primeira dose da vacina anti-Hepatite B, através de um método de Enzimaímunoensaio de Micropartículas (MEIA), (AXSYM AUSAB – 7A39-20, ABBOTT® - Park IL, EUA). Este método é usado para a determinação quantitativa do anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (anti-HBs) em soro ou plasma humanos; sendo projetado para a determinação de anti-HBs, após a infecção ou vacinação pelo vírus da Hepatite B (HBV); as amostras com concentrações de anti-HBs menores que 10,0 mUI/mL são consideradas não-reativas pelo ensaio AXSYM AUSAB. As amostras com concentrações de anti-HBs maiores ou iguais 10,0 mUI/mL são consideradas reativas (HOLLINGER, 1986).

No final do sexto mês foi feita a pesquisa do anticorpo anti-HBc (IgG e IgM) utilizando o reagente AXSYM CO^{DF} (Abbott®), com o objetivo de afastar a possibilidade de contato com o vírus da hepatite B durante a realização do estudo. Estes

exames sorológicos foram realizados no Laboratório de Sorologia do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

4.2.4. Determinação das subpopulações de linfócitos CD4 e CD8

A determinação quantitativa das subpopulações de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ foi feita no momento da admissão e no final do 7º mês, através da técnica de citometria de fluxo por imunofluorescência direta (FACSVantage® Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), utilizando anticorpos monoclonais anti-CD8 FITC/CD4 RD1/CD3 PECY5 (CYTO-STAT TRICHROME® COULTER, Miami, Florida, EUA), CD45 FITC (Becton Dickinson), de acordo com as instruções do (GUIDELINES, 1994). Esta avaliação foi realizada no Laboratório de Imunofenotipagem do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

4.2.5 Determinação da carga viral

A determinação da carga viral plasmática do vírus HIV-1 de cada paciente foi realizada no momento da inclusão no estudo e no final do 7º mês, através do método NASBA (amplificação baseada na seqüência de ácidos nucleicos) (Organon-Teknika® HIV-1 RNA QT, Holanda), para a determinação do RNA do HIV-1, cujo limite de detecção é de 400 cópias/ml. Estes exames foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório Central do Estado (LACEN).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As taxas de soroproteção e soroconversão foram avaliadas pelo teste exato de Fisher. A diferença entre a média dos títulos de anti-HBs nos diferentes grupos foi determinada pela análise da variância (ANOVA). O teste do Qui-Quadrado foi empregado para comparação da contagem dos leucócitos entre os dias -1 e +1. Para determinar se havia influência na resposta vacinal quanto às variáveis, como sexo, idade, resultado de CD4,

carga viral, nos meses 0 e 7, foi empregada uma análise de regressão logística (KLENIBAUM, 1994). Nas comparações entre as médias de anti-HBs, verificadas nos momentos 28, 60 e 210 dias, e da carga viral nos momentos basal e no 7º mês entre os grupos, adotou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Para se avaliar as alterações das contagens de linfócitos CD4 e CD8 no momento basal e no 7º mês com a relação à resposta vacinal, adotou-se o teste t de Student para amostras independentes. A significância estatística foi estabelecida com $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

O número de indivíduos HIV positivos que apresentaram títulos de anticorpos reagentes (≥ 10.0 mUI/mL) à vacina recombinante anti-hepatite B, após 28 dias da aplicação da 1ª dose da vacina + GM-CSF ou placebo, foi de 12/40 (30%) no grupo HBVx+GM-CSF e de 6/40 (15%) no Grupo HBVx (Tabela 2). Estes resultados não apresentaram diferença estatisticamente significantes ($p=0.1691$).

Após 60 dias, observou-se uma taxa de soroconversão estatisticamente significativa nos indivíduos do grupo GM-CSF+ HBVx (25/40, 62.54%), quando comparados com o grupo controle HBVx (12/40, 30%) ($p<0,0074$), Tabela 3.

Após 210 dias, o percentual de soroconversão elevou-se para 72,5% (29/40) nos pacientes do grupo HBVx + GM-CSF, e para 60% (24/40) no grupo controle, não apresentando diferença significativa na taxa de soroconversão entre os dois grupos ($p=0.2349$), Tabela 4.

TABELA 2 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE SOROCONVERSÃO À VACINA RECOMBINANTE ANTI-HEPATITE B, USANDO O GM-CSF COMO ADJUVANTE VACINAL

Tempo 28 dias

Anti-HBs	GRUPOS		TOTAL
	HBVx	GM-CSF+ HBV	
Reagente	6 (15,0%)	12 (30,0%)	18
Não reagente	34 (85,0%)	28 (70,0%)	62
Total	40	40	80

$P=0,1691$ Teste exato de Fisher

TABELA 3 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE SOROCONVERSÃO À VACINA RECOMBINANTE ANTI-HEPATITE B, USANDO O GM-CSF COMO ADJUVANTE VACINAL

Tempo 60 dias

Anti-HBs	GRUPOS		TOTAL
	HBVx+	GM-CSF+ HBVx	
Reagente	12 (30,0%)	25 (62,5%)	37
Não reagente	28 (70,0%)	15 (37,5%)	43
Total	40	40	80

*P<0,0074 Teste exato de Fisher

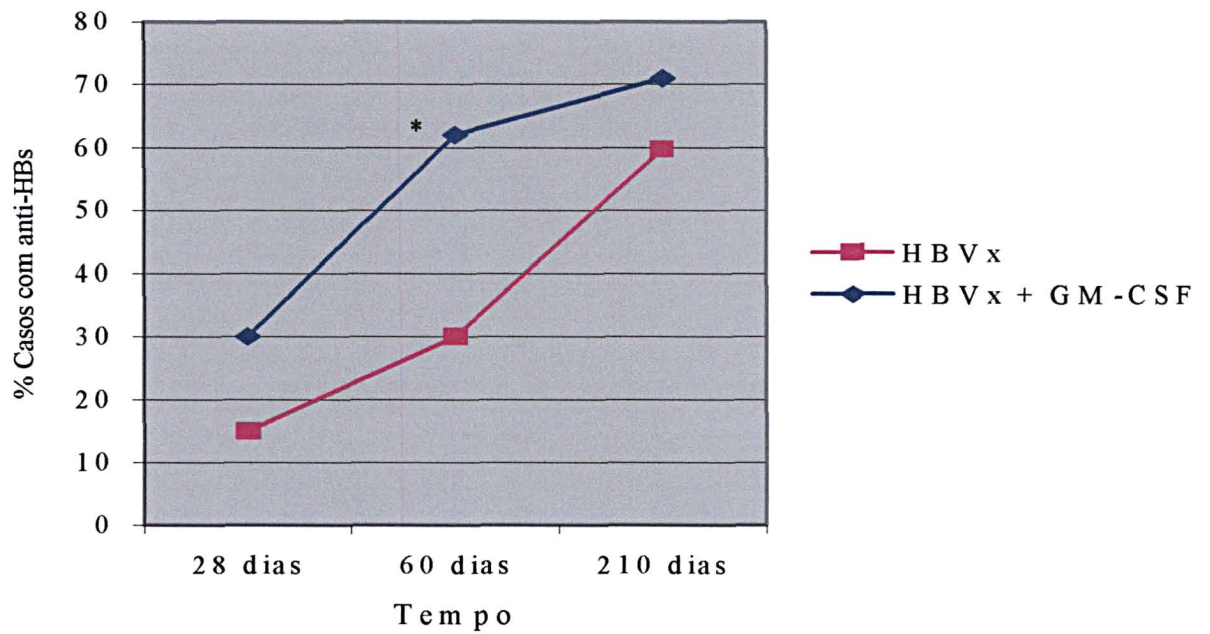
TABELA 4 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE SOROCONVERSÃO À VACINA RECOMBINANTE ANTI-HEPATITE B, USANDO O GM-CSF COMO ADJUVANTE VACINAL

Tempo 210 dias

ANTI-HBs	GRUPOS		TOTAL
	HBVx	HBVx+GM-CSF	
Reagente	24 (60,0%)	29 (72,5%)	53
Não reagente	16 (40,0%)	11 (27,5%)	27
Total	40	40	80

P=0,234 9 Teste exato de Fischer

GRÁFICO 1 - PERCENTUAL DE RESPOSTA ANTI-HBs DE ACORDO COM O ESQUEMA DE VACINAÇÃO (0,1 e 6 MESES) NOS GRUPOS HBV_x+GM-CSF e HBV_x

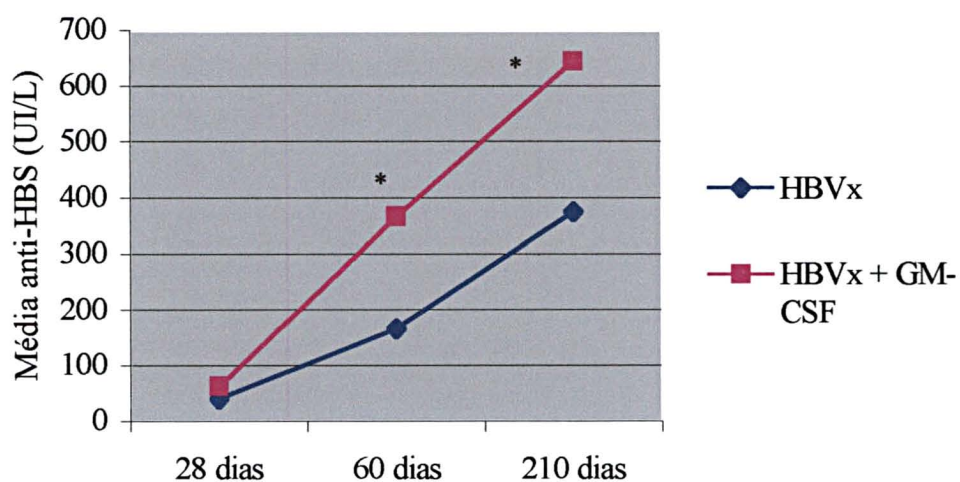


*p=0,0074

Em relação à taxa de soroproteção com títulos considerados protetores (títulos de anti-HBs ≥ 10 mUI/mL), avaliados nos momentos 28, 60 e 210 dias, observou-se os seguintes níveis de anti-HBs no grupo de estudo GM-CSF: 40,3mUI/mL, 366,1

mUI/mL e 644,78 mUI/mL, respectivamente. Enquanto que no grupo controle que recebeu vacina + placebo, estes níveis foram de: 62,4 mUI/mL, 166,4 mUI/ml e 375,00 mUI/mL, respectivamente. Nos momentos 60 e 210 dias observou-se um aumento estatisticamente significativo dos títulos de anticorpos anti-HBs, no grupo que recebeu o GM-CSF ($p=0,002$ para 60 dias e $p=0.004$ para 210 dias), Gráfico 2.

GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO DA MÉDIA DOS TÍTULOS DE ANTICORPO ANTI - HBs NOS GRUPOS HBV_x+GM-CSF E HBV_x



* $P < 0,002$ para 60 dias * $P < 0,004$ para 210 dias

TABELA 5 - AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DOS TÍTULOS DE ANTI-HBs E CARGA VIRAL

VARIÁVEL	GRUPO	MEDIANA	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	P
ANTI-HBs 28 DIAS	HBV _x +Placebo	1.0	1	1000	0.3425
ANTI-HBs 60 DIAS	HBV _x +GM-CSF	1.0	1	568	
ANTI-HBs 7 MESES	HBV _x +Placebo	1.0	1	1000	0.0022
	HBV _x +GM-CSF	19.7	1	1000	
	HBV _x +Placebo	1.0	1	1000	0.0045
	HBV _x +GM-CSF	1000.0	1	1000	

Teste t de Student

Nenhuma reação colateral significativa ao adjuvante GM-CSF ou ao antígeno vacinal foi observada no local da aplicação, ou relatada pelos participantes dos grupos estudados. Também não se observou nenhum efeito sistêmico, avaliado pelas alterações leucocitárias realizadas antes e 12 horas após a aplicação da droga em estudo, onde nenhuma diferença significativa na contagem de leucócitos foi observada em ambos os grupos. A pesquisa do marcador viral anti-HBc foi negativa em todos os participantes no final de 7 meses, demonstrando ausência de contato com vírus selvagem.

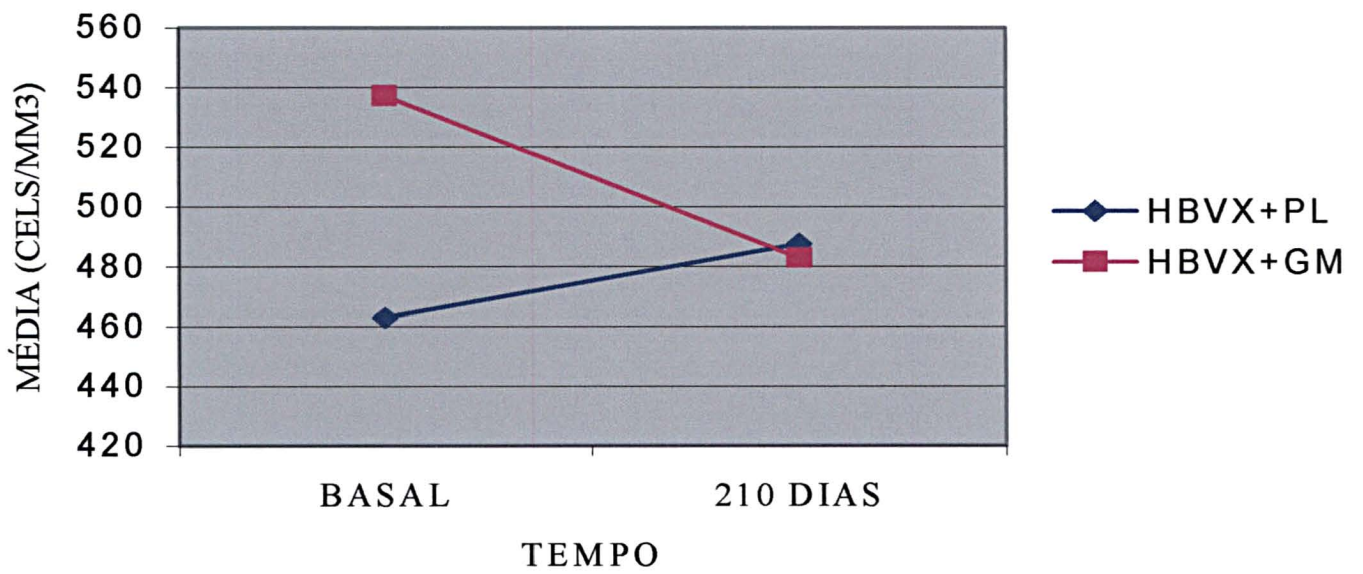
Quanto à contagem das subpopulações de linfócitos circulantes CD4 e CD8 positivos, estudadas no momento basal e após 7 meses da 1ª dose da vacina, não se observou nenhuma diferença significativa entre o grupo de estudo GM-CSF+ HBV_x e o grupo controle, Tabela 6, Gráfico 3.

TABELA 6 - AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DE LINFÓCITOS CD4 e CD8

VARIÁVEL	GRUPO	MÉDIA /DESVIO PADRÃO	<i>P</i>
CD4 NO MOMENTO 0	HBV _x	462.80± 88.0	0.5734
	HBV _x +GM	487.70± 263.5	
CD8 NO MOMENTO 0	HBV _x	957.50± 349.3	0.5532
	HBV _x +GM	1000.9± 300.6	
CD4 NO MOMENTO 7 MESES	HBV _x	537.02± 194.1	0.2045
	HBV _x +GM	82.95± 183.7	
CD8 NO MOMENTO 7 MESES	HBV _x	972.52± 524.4	0.9483
	HBV _x +GM	978.8 ± 325.7	

Teste t de Student

GRÁFICO 3- DISTRIBUIÇÃO DA MÉDIA DE LINFÓCITOS CD4 NOS TEMPOS BASAL E 210 DIAS



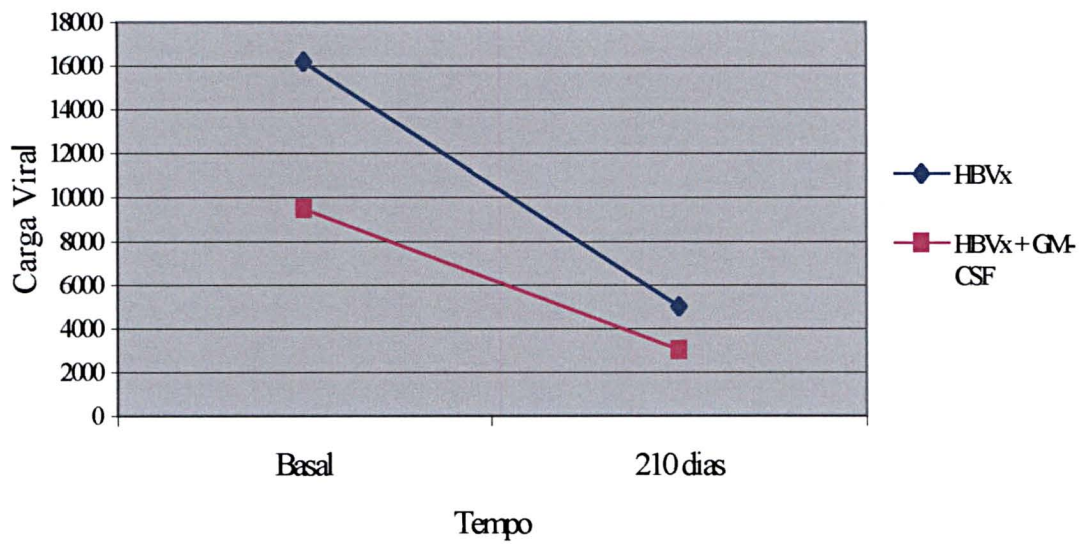
Não foram observadas também diferenças significantes em relação à carga viral, avaliada no momento basal e 7 meses após a 1ª dose da vacina, entre os grupos de estudo GM-CSF e controle (tabela 7), embora esta mostrou-se diminuída após uso da vacina recombinante anti-hepatite B em ambos os grupos, no final de 7 meses (Gráfico 4).

TABELA 7 - AVALIAÇÃO DA CARGA VIRAL (BASAL E 210 DIAS)

VARIÁVEL	GRUPO	MEDIANA	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	<i>p</i>
BASAL					
Carga Viral	HBV _x	5350.0	400	150000	0.1433
	HBV _x +GM	1010.0	400	66000	
210 DIAS					
Carga Viral	HBV _x	400.0	400	66500	0.7067
	HBV _x +GM	400.0	310	35000	

Teste t de Student

GRAFICO 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS MÉDIAS DAS CARGAS VIRAIS
NOS TEMPOS BASAL E 210 DIAS



Quando comparou-se a contagem de linfócitos CD4 e CD8 entre os pacientes reagentes (≥ 10.0 mUI/mL) ou não reagentes (< 10.0 mUI/mL) à vacina recombinante anti-hepatite B, observou-se que não houve diferença significativa entre os dois grupos de pacientes, Tabela 8.

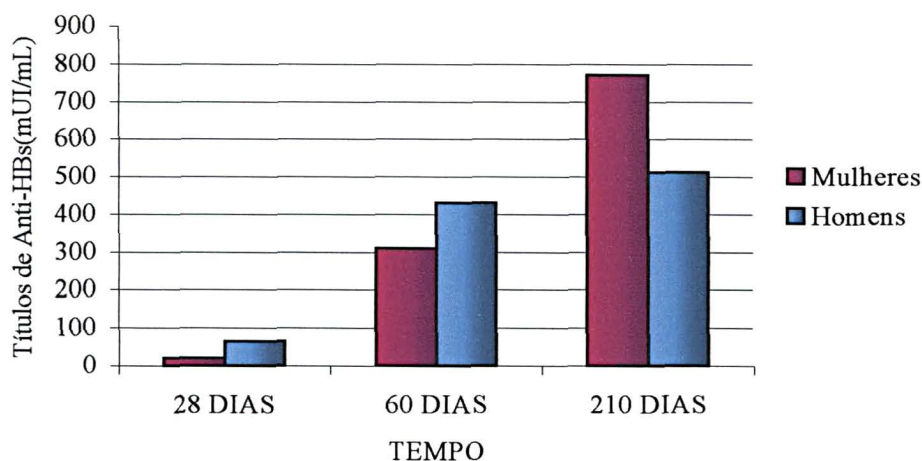
TABELA 8- AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DE LINFÓCITOS CD4 e CD8 NOS PACIENTES REAGENTES E NÃO REAGENTES À VACINA RECOMBINANTE ANTI-HEPATITE B

VARIÁVEL	GRUPO	MÉDIA \pm DP	P
CD4 NO MOMENTO 0	Reagente	500.86 \pm 233.6	0.0877
	Não reagente	434.77 \pm 103.0	
CD8 NO MOMENTO 0	Reagente	958.27 \pm 279.7	0.5041
	Não reagente	1012.3 \pm 387.7	
CD4 NO MOMENTO 7 MESES	Reagente	530.41 \pm 220.7	0.1750
	Não reagente	477.71 \pm 123.0	
CD8 NO MOMENTO 7 MESES	Reagente	974.00 \pm 395.1	0.9652
	Não reagente	978.39 \pm 495.7	

Teste t de Student DP= desvio padrão

A taxa de soroconversão entre as mulheres foi de 75% e a dos homens de 27,5% com $p < 0,005$. Com relação à média dos títulos de anti-HBs entre os pacientes do sexo feminino e masculino, observou-se um leve aumento dos títulos de anti-HBs nos homens, nos momentos 28 e 60 dias (63,63 e 430,22 mUI/mL, respectivamente), quando comparados com as mulheres (19,37 e 309,29 mUI/mL, respectivamente). No final dos 210 dias, as mulheres apresentaram títulos de anti-HBs mais elevados (769,99 mUI/mL) do que os homens (511,21 mUI/mL), entretanto estes resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (ANOVA $p=0.13$), Gráfico 5.

GRÁFICO 5- COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS TÍTULOS DE ANTI- HBs
EM RELAÇÃO AO SEXO



P=0,13(ANOVA) para 210 dias.

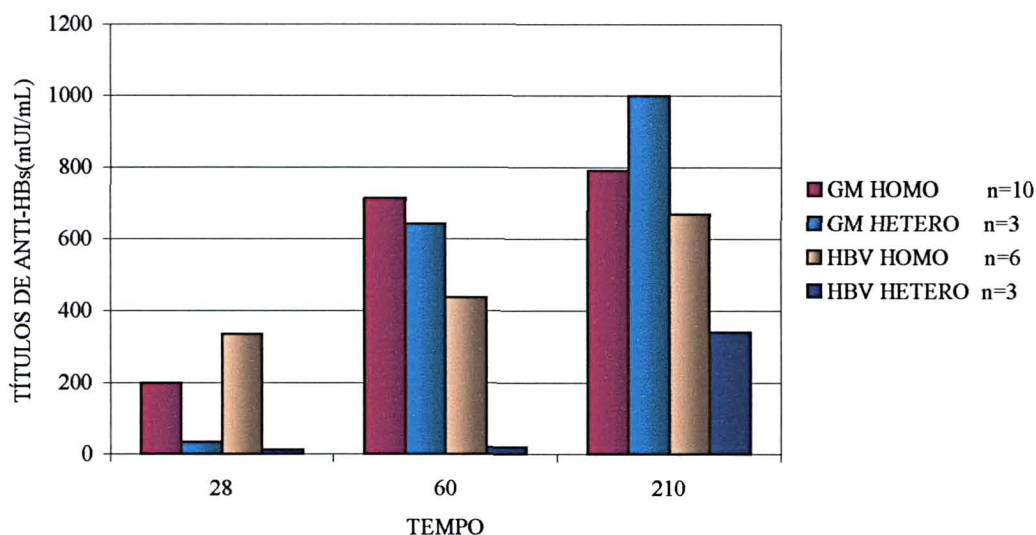
Quando considerou-se o fator de risco sexual, observou-se que a taxa de soroconversão à vacina recombinante anti-hepatite B entre os homossexuais e heterossexuais masculinos não apresentou diferença significativa (55.17% nos homossexuais e 63.64% nos heterossexuais, $p=ns$). A média dos títulos de anti-HBs entre os homossexuais masculinos do grupo de estudo GM-CSF foi maior quando comparada com a observada nos homossexuais do grupo controle nos momentos 60 e 210 dias (791.25 e 715.39 mUI/mL *versus* 438.48 e 671.67 mUI/mL, respectivamente). Entre os homens heterossexuais do grupo que usou GM-CSF, observou-se uma elevação nas médias dos títulos de anti-HBs nos três momentos 28, 60 e 210 dias, quando comparados

com os heterossexuais do grupo controle (33.4; 644.0 e 1000.0 mUI/mL *versus* 12.4; 20.8 e 340.0 mUI/mL, respectivamente), estes resultados entretanto não apresentaram resultados estatisticamente significantes, Gráfico 6.

Quando comparou-se a média dos títulos de anti-HBs analisada nos momentos 28, 60 e 210 dias, entre os pacientes homo e heterossexuais masculinos do grupos GM-CSF e controle, não se observou diferença estatisticamente significativa entre as mesmas $p=0.16$ (ANOVA) para o momento 210 dias, (GRÁFICO 6).

GRÁFICO 6 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS TÍTULOS DE ANTI-HBs NO GRUPO HBVx+GM-CSF EM RELAÇÃO AO FATOR DE RISCO

P=0,16 (ANOVA) PARA O MOMENTO 210 DIAS



6 DISCUSSÃO

A prevenção da hepatite B em pacientes infectados pelo HIV é essencial, pela alta taxa de progressão da infecção pelo HVB para cronicidade (WEBER et al., 1985; HADLER, 1988), podendo desenvolver cirrose, insuficiência hepática e/ou hepatocarcinoma, assim como aumentar o risco de transmissão do vírus HBV, seja pela via sexual ou sangüínea (HOLLINGER et al., 1989).

Sabe-se que os esquemas de vacinação contra hepatite B nessa população, utilizando vacina derivada de plasma ou recombinante, têm mostrado resultados subótimos, e que a revacinação não tem modificado muito o resultado inicial. Contudo, 50% a 70% das pessoas HIV infectadas respondem à vacina anti-hepatite B e mantêm títulos protetores por 6 a 7 anos (HADLER, 1987).

No presente estudo, o efeito de uma única dose do GM-CSF, aplicada concomitantemente com a primeira dose da vacina recombinante anti-hepatite B, mostrou-se eficaz ao aumentar a resposta primária de anticorpos anti-HBs em indivíduos imunodeprimidos.

O grupo que usou o GM-CSF como adjuvante vacinal alcançou altos títulos protetores de anti-HBs (40,0 mUI/mL, 366,54 mUI/mL e 644,78 mUI/mL, nos momentos 28, 60 e 210 dias, respectivamente), quando comparados com os títulos de anticorpos anti-HBs do grupo controle (62,4 mUI/mL, 166,47 mUI/mL e 375,02 mUI/mL, nos momentos 28, 60 e 210 dias, respectivamente, sendo $p < 0,005$ nos momentos 60 e 210 dias).

A dose do GM-CSF usada neste estudo foi determinada com base nos resultados obtidos em três estudos prévios controlados. No primeiro estudo realizado por TARR et al. (1996), utilizou-se o GM-CSF com o objetivo de aumentar a resposta primária de anticorpos em indivíduos saudáveis. Os autores utilizaram uma única dose da vacina recombinante anti-hepatite B (Engerix®), combinada a três doses de GM-CSF (20,40 e 80µg) e distintas vias de administração (intradérmica, subcutânea e intramuscular).

Concluiu-se que a dose de 20µg GM-CSF intramuscular ou subcutânea foi mais efetiva, e que altos títulos de anticorpos anti-HBs foram obtidos mais precocemente do que as doses de 40 e 80µg. Além disso, os autores não observaram efeitos colaterais pelo emprego do GM-CSF.

No segundo estudo, HASAN et al. (1999) utilizaram o GM-CSF em doses maiores, de 80 a 250µg, associadas à vacina recombinante anti-hepatite B administrada nos intervalos 0, 1 e 6 meses, sendo o GM-CSF utilizado concomitantemente com as duas primeiras doses de vacina. O resultado desse estudo não apresentou diferenças significativas em relação às taxas de soroconversão e soroproteção entre os indivíduos que usaram o GM-CSF mais vacina, e o grupo controle que usou apenas a vacina; sugerindo que o GM-CSF não apresentou atividade adjuvante vacinal nas doses utilizadas e os efeitos adversos foram mis freqüentes neste estudo.

O terceiro estudo foi realizado em pacientes renais crônicos os quais apresentam resposta subótima à vacina contra hepatite B. KAPPOOR et al. (1999) avaliaram 15 pacientes com insuficiência renal, utilizando o GM-CSF ou placebo como adjuvante vacinal na dose de 3µg kg⁻¹ mais 40µg de vacina recombinante anti-hepatite B. No final de 7 meses, 44% dos pacientes do grupo controle desenvolveram anticorpos anti-HBs > 10 mUI/mL, enquanto 100% dos pacientes do grupo de estudo (GM-CSF) mostraram-se protegidos, com títulos protetores de anticorpos anti-HBs > 70 mUI/mL no mesmo período.

Recentemente, LOONEY et al. (2001) utilizaram o GM-CSF em doses de 80 a 250 µg num estudo duplo cego placebo controlado, em 45 indivíduos idosos saudáveis (média 74 anos) e um grupo controle de 37 jovens saudáveis (média 28 anos). Neste estudo, demonstrou-se uma significativa redução nas taxas de soroconversão e soroproteção nos indivíduos idosos (42%), quando comparados com os controles jovens (95%). Os autores especulam que a falha do efeito adjuvante do GM-CSF nesse estudo seja devido ao método da administração, ou da dose empregada.

Em resumo, os resultados dos estudos feitos por TARR et al. (1996) e KAPOOR et al. (1999) demonstraram claramente que o uso do GM-CSF como imunomodulador aumentou a eficácia da vacina recombinante anti-hepatite B em indivíduos saudáveis e renais crônicos.

No presente estudo, o uso de 20µg de GM-CSF, administrado intramuscular com a 1ª dose da vacina recombinante anti-hepatite B, mostrou-se seguro e eficaz, com ausência de efeitos locais e sistêmicos, não só ao GM-CSF como ao antígeno vacinal (HBsAg). Além disso, esta dose aumentou precocemente os títulos de anticorpos protetores. É relatado que a proteção dada pela vacina anti-hepatite B é proporcional aos títulos anticorpos alcançados (HOLLINGER et al. citados por LEROUX-ROELS, 1993).

BIGGAR et al. (1987) documentaram que os indivíduos infectados pelo HIV apresentam acelerada perda de anticorpos anti-HBs, adquiridos através de vacinação. Com a progressão da doença pelo HIV, a proteção contra novas infecções está reduzida devido à destruição de linfócitos, incluindo os linfócitos de memória. Portanto, é necessário que altas taxas de anticorpos anti-HBs sejam alcançada precocemente nesta população.

O Comitê de Práticas de Imunização do CDC (ACIP-CDC), (RECOMMENDATIONS, 1993) dos EUA, recomenda o esquema vacinal anti-hepatite B de 3 doses de 20µg, seguidas de 2 ou 3 doses adicionais para os indivíduos que não soroconverteram com títulos protetores (≥ 10.0 mUI/mL).

Estabelecemos no presente estudo o uso de dose dupla ou 40µg da vacina recombinante anti-hepatite B (Engerix B®) no esquema 0, 1 e 6 meses, com a finalidade de analisar a imunogenicidade da vacina recombinante da hepatite B em dose dupla, e a repercussão sobre as taxas de soroconversão e soroproteção em pacientes HIV positivos. Em trabalho anterior SASAKI et al. (1998) observaram um taxa de soroconversão de 46% em 22 indivíduos HIV(+), com média de títulos de anticorpos anti-HBs $> 70,8$ mUI/mL, utilizando-se 20 µg de Engerix B® por via intramuscular no esquema 0,1 e 6

meses. No grupo controle de 20 indivíduos hígidos (HIV-), a taxa de soroproteção foi de 100%, com uma média de títulos protetores anti-HBs de 960 mUI/mL.

No presente trabalho, a taxa de soroproteção do grupo que utilizou apenas a vacina recombinante na dose de 40 µg foi de 60%, com média de títulos de anticorpos anti-HBs de 375,02mUI/mL, após a 3ª dose da vacina (Gráfico 2). Estes resultados sugerem que a imunogenicidade a altas doses de vacina contra hepatite B parece ser mais eficaz do que doses simples, isto também observado por SCOLFARO et al. (1996). Estes autores demonstraram, em crianças HIV positivas, que doses maiores da vacina recombinante contra hepatite B foram mais eficazes na obtenção de altos títulos protetores de anticorpos vacinais, quando comparados com o grupo controle que recebeu dose simples.

A resposta de anticorpos à vacina anti-hepatite B tem sido associada à contagem de linfócitos CD4. Pacientes com contagem de CD4 <100 cels/mm³ têm menor chance de responder a vacina (KROON et al., 1994). A progressão da infecção pelo HIV leva à diminuição do número e função dos linfócitos T-CD4, prejudicando a imunidade mediada por células. Há também evidência da disfunção dos linfócitos B com hipergamaglobulinemia e desaparecimento de células de memória (CD⁴⁵R0), podendo explicar a falta de resposta imunológica à imunização primária nestes indivíduos (VILMER et al. citados por ROUSSEAU; DELMONT, 2000).

Recentes estudos têm relatado dados conflitantes quanto ao valor preditivo do CD4 na resposta vacinal. Dois estudos têm demonstrado uma resposta diminuída à vacina contra influenza, porém não ao toxóide tetânico ou à vacina anti-pneumocócica em pacientes HIV + com baixa contagem de linfócitos CD4 circulantes (KROON et al., 1994; COLLIER, 1988). KVON (1994) não observou influência na resposta anticórpica à vacina anti-pneumocócica em relação à contagem de linfócitos CD4 nos indivíduos HIV + e HIV-. HUANG et al. (1987) observaram que a resposta anticórpica à vacina contra hepatite B entre usuários de drogas encontrou-se diminuída, tanto nos indivíduos HIV+ como HIV- e que a relação de linfócitos CD4 /CD8 não influenciou a resposta vacinal. No presente estudo, todos os participantes da pesquisa

apresentavam $CD4 > 350$ células/ mm^3 por ocasião da admissão ao protocolo. Também não se observou nenhuma diferença significativa na média de linfócitos CD4 e CD8 entre os indivíduos respondedores à vacina recombinante anti-HBV, e os não respondedores (Tabela 8).

Outro aspecto interessante é que todos os indivíduos estavam assintomáticos por ocasião da aplicação da vacina e que 90% deles estavam em uso de tratamento anti-retroviral, com esquemas de 2 ou 3 drogas. COLLIER; COOMBS; SCHOENFELD (1996); LIN e ANDRIEU (2000) admitem que ocorre uma melhora do sistema imunológico com a introdução da terapêutica anti-retroviral na maioria dos pacientes HIV+, caracterizada por uma recuperação quantitativa e funcional dos linfócitos CD4. Os resultados aqui obtidos sugerem que a contagem de linfócitos CD4 e CD8 não influenciou a resposta anticórpica à vacina recombinante anti-hepatite B, embora este assunto devesse ser melhor avaliado em estudos posteriores.

Sabe-se que a ativação do sistema imunológico aumenta a replicação do HIV, (KEHRL; FAUCCI, 1983; O'BRIEN et al., 1995; STANLEY et al., 1996; CHEESEMAN; DAVARO; ELLISON, 1996). Algumas vacinas como as utilizadas contra influenza, tétano e *S. pneumonia* provocam uma elevação dramática da carga viral. Após dois a sete dias da administração do antígeno vacinal, observou-se uma variação na carga viral de cerca 0,2 mais ou menos 0,3 \log_{10} de cópias de RNA do HIV/ml, persistindo por sete a oito semanas, porém sem afetar a contagem de linfócitos CD4. Sabe-se que os linfócitos T- ativados expressam a molécula CD_{25}^+ diferente dos linfócitos não-ativados CD_{25}^- . O HIV no interior dos linfócitos T- CD_{25}^+ está sob a forma de provírus e, quando estimulado, aumenta a carga viral. Entretanto, a estimulação antigênica do sistema imunológico pelas vacinas rotineiras parece não afetar significativamente a replicação do HIV e a progressão da infecção (FOCACCIA; SANTOS, 1999).

No presente estudo, a carga viral foi monitorada no momento basal e aos 7 meses, não apresentando nenhuma diferença significativa na média da carga viral sérica entre os

grupos estudados, após o uso da vacina recombinante anti-hepatite B. Observou-se inclusive uma discreta diminuição da carga viral sérica no grupo que usou GM-CSF no final de 7 meses, o que pode ser atribuído ao uso da terapêutica anti-retroviral (Tabela 7). Isto também foi observado por (BRICHACEK et al., 1996) e REY et al. (2000), num esquema de vacinação de seis doses de vacina contra hepatite B em 20 pacientes infectados pelo HIV, que não resultou em efeito significativo sobre a carga viral.

Em relação ao fator de risco homossexual neste trabalho, 72,5% (29/40) dos homens participantes do estudo eram homossexuais. A taxa de soroconversão entre os homossexuais foi de 55.17% e dos homens heterossexuais de 63.64% ($p=ns$); também a média dos títulos de anticorpos protetores não apresentou diferença significativa entre os homens homossexuais e heterossexuais de ambos os grupos (Gráfico 6). Entretanto, deve-se considerar que o número de homens heterossexuais incluídos na amostras foi pequeno (11/40 27.5%) para se inferir uma conclusão definitiva.

Diferentes estudos têm demonstrado que a resposta à vacinação contra hepatite B apresentou-se diminuída em homossexuais (CARNE et al., 1987; HADLER, 1988; KEET et al, 1992).

Sabe-se que os homens homossexuais são considerados população de alto risco para a infecção pelo HBV. Nos estudos iniciais sobre a imunogenicidade da vacina anti-hepatite B demonstrou-se eficácia na obtenção de títulos protetores neste grupo de indivíduos. A pandemia pelo vírus da imunodeficiência humana tem dificultado o controle da prevenção da hepatite B nestes indivíduos, os quais adquirem a infecção pelo HIV antes do HBV. COLLIER et al. (1988) demonstraram claramente o impacto da infecção pelo HIV sobre resposta primária à vacina anti-hepatite B em homossexuais HIV+. Sendo que a taxa de soroconversão à vacina anti-hepatite B foi de 70% nos homossexuais HIV(+) e de 90% nos homossexuais HIV negativos.

Uma metanálise do Centro de Controle de Doenças do EUA, sobre a eficácia da vacina anti-hepatite B em homossexuais HIV positivos e HIV negativos, indicou que a resposta anticórpica à vacina anti-hepatite B foi prejudicada pela presença da infecção

pelo HIV(HADLER et al., 1986; PERILLO ; REGENSTEIN; ROADMAN, 1986; HADLER et al., 1987).

Outro aspecto interessante observado por HADLER et al. (1987) é que o risco do homossexual portador de HIV não respondedor à vacina anti-hepatite B se tornar portador crônico é muito maior quando comparado com os homossexuais sem a infecção pelo HIV (31% nos HIV+ e e 10% nos HIV-). No mesmo estudo, os indivíduos homossexuais HIV(+), respondedores à vacina anti-hepatite B, apresentaram excelentes níveis de proteção com altos títulos de anticorpos que permaneceram por 7 anos.

Embora seja registrado na literatura que o sexo feminino apresente melhor resposta anticórpica à vacina anti-hepatite B, a qual é atribuída a fatores hormonais (HOLLINGER, 1989; WONG et al., 1996) neste estudo não foi verificado qualquer diferença significativa quando ao sexo em relação à imunogenicidade pela vacina recombinante anti- hepatite B (Gráfico 5).

Entre os vários fatores que interferem na resposta à vacina anti- hepatite B, inclui-se a idade. DENIS (1984) estudou a resposta vacinal anti-hepatite B em indivíduos idosos, de ambos os sexos, com idade entre 60 e 90 anos, observando uma taxa de soroconversão que variou de 69.2% a 45.7%, respectivamente.

Sabe-se que a resposta imunológica a antígenos T dependentes sofre alterações com a idade, que pode estar relacionada com a diminuição de linfócitos T auxiliares (CD4+CD45RA+), considerados linfócitos virgens, que têm um importante papel na resposta primária de anticorpos à vacina anti-hepatite B, (LOONEY et al., 2001). Estes autores observaram que os indivíduos idosos não respondedores à vacina anti-hepatite B apresentaram uma percentagem diminuída de células CD4 virgens (CD4+CD45RA+), quando comparados com os idosos respondedores e com pessoas jovens.

Os pacientes HIV positivos, incluídos neste estudo, eram todos jovens com média de idade de 28 anos (18- 37 anos), sendo que a média da idade era semelhante entre os grupos GM-CSF e controle. Não se observou nenhuma diferença significativa na resposta anticórpica anti-HBs relacionada com a idade entre os indivíduos estudados,

embora o grupo que usou GM-CSF apresentasse uma melhor resposta. Embora não se quantificasse neste estudo o número de linfócitos (CD4+CD45RA+) nos indivíduos HIV+, sabe-se que com a progressão da doença pelo HIV, há uma diminuição tanto dos linfócitos virgens CD4+CD45RA+, como os de memória CD4+CD45R)+ devido a destruição linfocitária (LOONEY et al., 2001).

Os resultados deste trabalho permitiram concluir que a imunodeficiência causada pelo vírus HIV contribuiu para a hiporresponsividade à vacina anti-hepatite B; e que o GM-CSF uma citocina imunoestimuladora, se mostrou com potencial de adjuvante vacinal seguro e eficaz em pacientes HIV positivos. Além disso, o GM-CSF demonstrou tolerabilidade e eficácia quando usado na dose de 20µg concomitantemente com a 1ª dose de vacina recombinante anti-hepatite B nestes pacientes. Portanto, estudos adicionais sobre a utilização do GM-CSF como adjuvante vacinal em pacientes imunodeprimidos devem ser encorajados.

7 CONCLUSÕES

- 1 - O GM-CSF usado como adjuvante vacinal, concomitantemente com a primeira dose de vacina anti-hepatite B, demonstrou ser bem tolerado e eficaz.
- 2 - A taxa de soroconversão no momento 60 dias foi significativamente maior no grupo GM-CSF quando comparada ao grupo controle ($p < 0.0074$), embora no final dos 210 dias esta não apresentou diferença entre os grupos.
- 3 - A taxa de soroproteção (títulos de anti-HBs) nos momentos 60 e 210 dias, após a primeira dose da vacina, foi significativamente maior no grupo que utilizou GM-CSF do que no grupo controle ($p < 0,001$).
- 4 - Dose dupla da vacina recombinante anti-hepatite B mostrou-se mais eficaz do que dose simples, quando usada em pacientes HIV positivos.
- 5 - A contagem de linfócitos circulantes CD4+ e CD8+ não influenciou nas taxas de soroconversão e soroproteção à vacina recombinante anti-hepatite B, nos grupos estudados ($p = ns$).
- 6 - A utilização da vacina recombinante anti-hepatite B nos pacientes HIV positivos não apresentou alteração na média da carga viral nos momentos basal e 7 meses ($p = ns$).
- 7- Não se observou diferenças significativas em relação à idade e ao gênero, quanto a imunogenicidade à vacina recombinante anti - hepatite B nos pacientes HIV positivos.

REFERÊNCIAS

- ALPERT, C.A. et al. Genetic predictors of nonresponse to hepatitis B vaccine. **N.Engl. J. Med.**, Boston, v.321, p.708-712, 1989.
- ANDRÉ, F.E. Summary of safety and efficacy data on a yeast-derived hepatitis B vaccine. **Am. J. Med.**, New York v.87, supl.3A, p.145-205, 1989.
- ARRAZOLA M.P. ; JUANEZ, J.R. ; RAMOS, J.T. ; ARAGON, A. J. ; GARCIA DE CODES, A. Hepatitis B vaccination in infants of mothers infected with human immunodeficiency virus. **J. Med. Virol.**, New York, v.45, p.339-341, 1995.
- BIGGAR, R.J, GOERDERT, R.J. ; HOOFNAGLE, J. Accelerated loss of antibody to hepatitis B surface antigen among immunodeficient homosexual men infected with HIV. **N. Engl J Med.**, Boston, v.316, n.10, p.630-631, 1987.
- BODSWORTH, N.J. ; COOPER, D.A. ; DONOVAN, B. The influence of human immunodeficiency virus type 1 infection on the development of the hepatitis B virus carrier state. **JID**, v. 1, p. 1138-1140, 1991.
- BORTOLOTTI, F. ; CRIVELLARO, C. ; PORNARO, E. ; REALDI, G. Hepatitis B in a nonresponder to hepatitis B vaccine. **Infection**, Munchen, v.16, p.119-120, 1988.
- BRICHACEK, B. ; SWINDELLS, C. ; JANOFF, N. ; PIRUCCELLO, S. ; STEVENSON, M. Increased plasma human immunodeficiency virus type I. Burden followin antigenic challenge with pneumococcal vaccine. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.174, p.1191-1199, 1996.
- BRUGUERA, M. ; CREMADES, M. ; RODICIO, J.J. ; ALCAZAR, J.M. ; OLIVER, A. ; DEL RIO, S. ; ESTEBAN-MUR, R. Immunogenicity of a yeast-derived hepatitis B vaccine in hemodialysis patients. **Am. J. Med.** New York, v.87, supl. 3A, p.30S-32S, 1989.
- CARNE, C.A.; WELLER, I.V.D.; WAITE, J. ; BRIGGS, M. ; PEARCE, F. ; ADLER, M.W. ; TEDDER, R.S. Impaired responsiveness of homossexual men with antibodies to plasma derived hepatitis B vaccine. **BMJ**, London, v.294, p.866-868, 1987.
- CHEDID, L. Adjuvants of immunity. **Ann. Inst. Pasteur Immunol.** , Paris, v.136D, p.283-291, 1985.

CHEESEMAN, S.H. ; DAVARO, R.E. ; ELLISON III, R.T. Hepatitis B vaccination and plasma HIV-1 RNA. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.334, p.1272, 1996.

COLLIER, A.C. ; COOMBS, R.W. ; SCHOENFELD, D.A. Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine and zalcitabine. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.334, n.16, p.1011-1017, 1996

COLLIER, A.C. ; COREY, L. ; MURPHY, V.L. ; HANDSFIELD, H.H. Antibody to human immunodeficiency virus (HIV) and suboptimal response to hepatitis B vaccination. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v.109, p.101-105, 1988.

CUPPS, T.R. ; GERIN, J.L. ; PURCELL, R.H. ; GOLDSMITH, P.K. ; FAUCI, A.S. *In vitro* antigen-induced antibody responses to hepatitis B surface antigen in men: kinetic and cellular requirements. *J. Clin. Invest.*, Philadelphia, v.74, p.1204-1213, 1984.

DENIS, F. Hepatitis B vaccination in the elderly (letter) . *J. Infect. Dis.* Chicago, v.149, p.1019, 1984.

DONATI, D. ; GASTALDI, L. Controlled trial of thymopentin in hemodialysis patients who fail to respond to hepatitis B vaccination. *Nephron* , Basel, v.50, p.133-136, 1988.

DRAKE, J. H. ; PARMELY, S. ; BRITON, G. Loss of hepatitis B antibody in human immunodeficiency virus- positive hemophilic patients. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, Baltimore, v.6, p.1051-1054, 1987.

DRANOFF, G. ; JAFFEE, D. ; LAZENBY, A. ; GOLUMBAR, K.P. ; LEVISKY, H. ; BROSE, K. ; JACKSON, V. ; HAMADA, H. ; PARDOLL, D. ; MULLIGAN, R.C. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Washington, v.90, p.3539-3543, 1993.

DUMANN, H. ; MEUER, S.C. ; RENSCHIN, G. ; KUHNER, H. Influence of thymopentin on antibody response, and monocyte and T cell function in hemodialysis patients who fail to respond to hepatitis B vaccination. *Nephron*, Basel, v.55, p.136-140, 1990.

EGEA, E. ; IGLESIAS, A. ; SALAZAR, M. ; MONIMOTO, C. ; KRUSKALL, M. S. ; AWDEH, Z. ; SCHLOSSMAN, S.F. ; ALPER, C.A. ; YUNIS, E.S. The cellular basis for lack of antibody response to hepatitis B vaccine in humans. *J. Exp. Med.*, New York, v.173, p.531-538, 1991.

ERVO, R.F.P. ; MAGNI, S. ; CAVATORTA, F. Evaluation of treatments for the vaccination against hepatitis B+thymopentine. **Nephron**, Basel, v.61, p.371-372, 1992.

FISCHER H.G., ; FROSC S., ; RESKE K., ; RESKE-KUNZ A . B. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates macrophages derived from bone marrow cultures to synthesis of MHC class II molecules and to augmented antigen presentation function. **J. Immunol.**, Baltimore, v.141, p.3882-3888, 1988.

FOCACCIA, R. ; SANTOS, E.B. Imunizações de rotina em HIV/AIDS In: VERONESI, R. ; FOCACCIA, R. ; LOMAR, A.V. (Ed.). **Retroviroses humanas HIV/AIDS**. São Paulo : Atheneu, 1999. p.409-412.

GASSON, J.C. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Blood** , Dulluth, v. 77, p.1131-1145, 1991.

GERHARTZ, H.H. ; ENGELHARD, M. ; MEUSERS, P. ; BRITTINGER, S. ; WILMANN, W. ; SCHLIMOK, S. ; HUHN, D. ; MUSCH, R. Randomized, double-blind, placebo- controlled, phase III study of recombinant human granulocyte-macrophage colony- stimulating factor as adjunct to induction treatment of high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas. **Blood** , Dulluth, v.82, p.2329-2339, 1993.

GOILAV, C. ; PIOT, P. Vaccination against hepatitis B in homosexual men: a review. **Am. J. Med.**, New York, v.87, suppl., p.21S-25S, 1989.

GRABBE, S. ; BRUVERS, ; BEISSERT, S. ; GRANSTEIN, R.D. Interferon- γ inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. **J. Leukoc. Biol.**, New York, v.55, p.695-701, 1994.

GROB, P.J. ; BINSWANGER, U. ; ZARUBA, K. ; JOLLER-BLUMBERG, A. ; ABPLANALP, A. ; HERWIG, W. ; ISELIN, H. ;DESCOEUDRES, C. Immunogenicity of a hepatitis B subunit vaccine in hemodialysis and renal transplant patients. **Antiviral Res.**, Amsterdam, v.3, p.43-52,1983.

GROB, P.J. ; BINSWANGER, U. BLUMBERG, A. ; GLOOR, H.J. ; HARRY, A. ; HERWIG, W. Thymopentin as adjuvant to hepatitis B vaccinations. Results from three double-blind studies. **Surv. Immunol. Res.**, v.4, p.107-115, 1985.

GUIDELINES for the performance of CD4+ T-cell determinations in persons with immunodeficiency virus (HIV) infection. **MMWR**, Atlanta, v.43, n.RR3, p.1-21, 1994.

HADLER, S.C. ; FRANCIS, D.P. ; MAYNARD, J.E ; THOMPSON, S.E ; JUDSON, F.N; ECHEMBERG,D.F. ; OSTROW, D.G. ; O'MALLEY, P.M. ; PENLEY, K.A ; ALTMAN, N.L. ; BRAFF, E. ; SHIPMAN, G. F. ; COLEMAN, P.J. ; MANDEL, E.J. Long-term immunogenicity and efficacy of hepatitis B vaccine in homosexual men. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.315, p.209-214, 1986.

HADLER, S.C. Hepatitis B prevention and human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Ann. Intern. Med.** ,Philadelphia, v.109, p.92-94, 1988.

HADLER , S.C. ; JUDSON, F.N. ; O'MALLEY, P.M. ; ALTMAN, N.L. ;PENLEY, K. ; BUCHBINDER, S. ; SCHABLE, C.A.; COLEMAN, P.J. ; OSTROW, D.N. ; FRANCIS, D.P. Outcome of hepatitis B infection in homossexual men and its relation to prior human immunodeficiency virus infection. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.163, p.454-459, 1991.

HADLER, S.C. Effect of prior human immunodeficiency virus infection on the outcome of hepatitis B virus infection (abstract). **J. Med. Virol.**, New York, v.21, p.87A ,1987.

HASAN, M.S. ; AGOSTI, J.M. ; REYNOLDS, K.K. ; TANZMAN, E. ; TREANOR, J.J. ; EVANS, T.G. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor as Adjuvant for hepatitis B vaccination of health adults. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.180 , p.2023, 1999.

HEATH, A . W. et al. Interferon- γ as an adjuvant in immunocompromised mice. **Immunology**, Oxford, v.37, p.520-524, 1989.

HILMAN, G.G. Growth and major histocompatibility antigen expression regulation by IL-4, interferon-gamma (IFN- γ) and tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) on human renal cell carcinoma. **Clin. Exp. Immunol.**, New York, v.265, p.476-483, 1994.

HOLLINGER, F.B. Factors influencing the immune response to hepatitis B vaccine B, booster dose guideline, and vaccine protocol recommendations. **Am. J. Med.**, New York., v.87 , supl. 3A, p.365-406, 1989.

HORVATH, J. ; RAFFANTS, S.P. Clinical aspects of the interaction between human immunodeficiency virus and the hepatotropic viruses. **Clin. Inf. Dis.**, Chicago, v.18, p.339-348, 1994.

HUANG, L. ; RUBEN, F.L. ; RINALDO JR, C.R. ; KINGSLEY, L. ; LYTER, D.W. ; HO, M. Antibody response after influenza and pneumococcal immunization in hiv-infected homosexual men. **JAMA**, Chicago, v.257, n.15, p.2047-2050, 1987.

JACOBSON, I.M.; JAFFERS, G. ;JULES, L. ; DIENSTAG, J.L. ; NINA, E. ; TOLKOFF-RUBIN, N.E. ; COSIMI, A.B. ; DELMONICO, F. ; WATKINS, E. ; HINKLE, C. ; O'ROURKE, S. ; RUSSELL, P.S. ; JRUBIN, R.H. Immunogenicity of hepatitis B vaccine in renal transplant recipients. *Transplantation*, Baltimore, v.39, p.393-395, 1985.

JILG. W. ; SCHMIDT, M. ; DEINHARDT, F. Impfversagen nach hepatitis B-impfung. *Dtsch. Med. Wochenschr*, Stuttgart, v.115, p.1545-1548, 1990.

KAPOOR, D. S.R. ; AGGARW, A.L. ; SLINGH, N.P. ; THAKUR, V. ; SARIN, K. Granulocyte macrophage colony –stimulating factor enhance the efficacy of hepatitis B virus vaccine in previously unvaccinated haemodialysis patients. *J. Viral Hepatol.*, Oxford, v.6, p.405-409, 1999.

KEHRL, J.H. ; FAUCI, A.S. Activation of human B lymphocytes after immunization with pneumococcal polysaccharides. *J.Clin. Investig.*, New York, v.71, p.1032-1040, 1983.

KEET, I.P.M. ; VAN DOORNUM, G. ; SAFARY, A. ; COUTINHO, R.A. Insufficient response to hepatitis B vaccination in HIV-positive homosexual men. *AIDS*, Philadelphia, v.6, n.5, p.509, 1992.

KLEINBAUM, D. G. *Logistic regression: a self learning text*. New York : Springer-Verlag, 1994.

KROGSGAARD K, et al. The influence of HTLV-III infection on the natural history of hepatitis B virus infection in male homosexual HbsAg carriers. *Hepatology*, Philadelphia, v.7, p.37-41, 1987.

KROON, F.P. ; DISSEL, J.T. ; JONG, J.R. ; FURTH, R. Antibody response to influenza, tetanus and pneumococcal vaccines in HIV seropositive individuals in relation to the number of CD4 lymphocytes. *AIDS*, Philadelphia, v.8, p.469-476, 1994.

KRUSKALL, M.S. ; ALPER, C.A. ; AWDETH, Z. ; YUNIS, E.J. ; MARCUS-BAGLEY, D. The immune response to hepatitis B vaccine in human inheritance patterns in families. *J. Exp. Med.*, New York, v.175, p.495-502, 1992.

KVON, F.P. et al. Antibody response to influenza, tetanus and pneumococcal vaccines in HIV. Soropositives individune in relation to the number of CD4 lymphocyt. *AIDS*, Philadelphia, v.8, p.465-476, 1994.

LEROUX-ROELS, G. Nonresponsiveness to hepatitis B vaccine. In: HEPATOCITE : International hepatitis update. Chester : ADIS International, 1993 p.1-10.

LIN, R. ; JONES, T.C. Vaccine adjuvants a new hope for effective immunizations **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v.1, p.106-122, 1997.

LOONEY, R.J. ; HASAN, M.S. ; GOFFIN, D. ; CAMPBELL, D. ; FALSEY, A.R. ; KOLASSA, J. ; AGOSTI, J.M. ; ABRAHAM, G.N. ; EVANS, T.G. Hepatitis B immunization of healthy elderly adults : relationship between naive CD4+ T cells and primary immune response and evaluation of GM-CSF as an adjuvant. **J. Clin. Immunol.**, New York, v.21, p.30-36, 2001.

LU, W. ; ANDRIEU, J.M. HIV protease inhibitors restore impaired T-cell proliferative response in vivo and vitro: a viral-suppression-independe mechanism. **Blood**, Dulluth, v.96, n.1, p.250-258, 2000.

MELAPPIONI , M. ; BALDASCARI, M. ; BALDINI, S. ; RADICIONI, R. ; PANICHI, N. ; SALDINI, S. Use of immunomodulators (Thymopentin) in hepatitis B vaccine in elderly patients undergoing chronic hemodialysis. **Nephron**, Basel, v.61, p.358-359, 1992.

MEUER, S.C. ; DUMANN, H. ; MEYER, K.H. ; KUHLE, H. Low-dose interleukin- 2 induces systemic immune responses against HbsAg in immunodeficient non-responders to hepatitis B. **Lancet**, London, v.1, p.15-18, 1989.

MILICH, D.R. ; LEROUX-ROELS, G.G ; CHISANI, F.V. Genetic regulation of the immune response to hepatitis B surface antigen (HBsAg). II. Qualitative characteristics of the humoral immune response to the a, d and y determinants of HBsAg. **J. Immunol.**, Baltimore, v.130, p.1395-1400, 1983.

MILICH, D.R. ; LEROUX-ROELS, G.G. ; LOVIE, R.E ; CHISANI, F.V. Genetic regulation of the immune response to hepatitis B surface antigen (HBsAg). IV. Distinct H-2 linked Ir genes control antibody response to differents HbsAg determinants on the same molecule and map to the I-A and I-C subregions. **J. Exp. Med.**, New York, v.159, p.41-46, 1984.

MILICH, D.R. et al. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell- Independent and a T-cell-dependent antigen. **Science**, Washington, v.234, p.1399-1401, 1986.

MOK, J.Q. ; DE ROSSI, A. ; ADES, A.E. ; GIAQUINTO, C. ; GROSCH-WORNER, I. ; PECKHAM, C.S. Infants born to mother seropositive for human immunodeficiency virus. **Lancet**, London, v.1, p.1164-1167, 1987.

NAGAFUCHI, S. Reversal by intradermal hepatitis B vaccination of nonresponsiveness to HbsAg. **Lancet**, London, p.1522-1523, 1987.

NELSON, K.E. The influence of human immunodeficiency virus (HIV) infection on antibody responses to influenza vaccines. **Ann. Int. Med.**, Philadelphia, v.109, p.383-388, 1980.

NOWICKI, M.J. ; TONG, M.J. ; BOHMAN, R.E. Alterations in the immune response of nonresponsiveness to hepatitis B vaccine. **J. Infect. Dis.** Chicago, v.152, p.1245-1248, 1980.

PERRILLO R.P., ; REGENSTEIN, F.G. ; ROADMAN, S.T. Chronic hepatitis B in asymptomatic homosexual men with antibody to human immunodeficiency virus. **Ann Intern Med.** Philadelphia, V.105, p.382-383, 1986.

O' BRIEN, W.A. ; GROVIT-FERBAS, K. ; NAMAZI, A. ; OVACK-DERZIC, S.; WANG, H.J. ; PARK, J. ; YERAMIAN, C. ; MAO, S.H. ; ZACK, J.A. Human immunodeficiency virus-type 1 replication can be increased in peripheral blood of seropositive patients after influenza vaccination. **Blood**, Dulluth, v.86, n.3, p.1082-1089, 1995.

ODAKA, N. Comparative immunogenicity of plasma and recombinant hepatitis B virus vaccines in homosexual men. **JAMA**, Chicago, v.260 p.3635-3637, 1988.

QUIROGA, J.A. ; CASTILHO, I. ; PORRES, J.C. ; SANTOS CASADO ; SAEZ, F. ; MARTINEZ, M.G. ; GOMES, M. ; INGLADA, L. ; SANCHES-SILICIA, L. ; MORA, A.; GALIANA, F. ; BARRIL, G. ; CARREÑO, V. Recombinant g-interferon as adjuvant to hepatitis B vaccine in hemodialysis patients. **Hepatology**, Philadelphia, v.12, p.661-663, 1990.

RECOMMENDATIONS OF THE ADVISORY COMMITTEE ON IMMUNIZATION PRACTICES. MMWR. (ACIP): Use of vaccines and immune globulins in persons with altered immunocompetence. **MMWR**, Atlanta, v.42, p.1-12, 1993.

REY, D. ; KRANTZ, V. ; PARTISANI, M. ; SCHMIDT, M.P. ; LIBBRECHT, E. ; WENDLING, M.J. ; VETTER, D. Increasing the number of hepatitis B vaccine infections

augments anti-HBs response rate in HIV-infected patients : effects on HIV-1 viral load. **Vaccine**, Kidlington, v.18, n.13, p.1161-1165, 2000.

ROUSSEAU, M.C. ; DELMONT, J.M.J. Vaccination and HIV: a review of the literature. **Vaccine**, Kidlington, v18, p.825-831, 2000.

RUMI, M. ; COLOMBO, M. ; ROMEO, R. ; BOSCHINI, A. ; ZANETTI, A. ; GRINGERI, A. ; MANNUCCI, M. Suboptimal response to hepatitis B vaccine in drug users. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.151, p.574-578, 1991.

SASAKI, M.G.M.; MELLO, R.S.; SICILLIANO, R.F.; WANG, L. Response of HIV/AIDS patient to hepatitis B recombinant vaccine. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador , v.2, p.236-240, 1998.

SCOLFARO, C. ; FIAMMENGO, P. ; BALBO, L. ; MADON, E. ; TONO, P.A. Hepatitis B vaccination in HIV-1 – infected children: double efficacy doubling the paediatric dose. **AIDS**, Philadelphia, v.10, p.1169-1170, 1996.

STANLEY, S.K. ; OSTROWSKI, M.A. ; JUSTMENTE, J.S. ; GANTT, K. ; HEDAYATH, S. ; MANNIX, R.N. ; ROCHER, R.N. ; SCHWARTZENTRUBER, D.J. ; FOX, C.H. ; FAUCCI, A.S. Effect of immunization with a common recall antigen on viral expression in patients infected with HIV type 1. **N. Engl. J. Med.** Boston, v.334, p.1222-1230, 1996.

STEVENS, C.E. ; ALTER, H.J. ; TAYLOR, P.E. ; ZANG, E.A. ; HARLEY, E.J. ; SZMUNESS, N. Hepatitis B vaccine in patients receiving hemodialysis: immunogenicity and efficacy. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.311, p.496-501, 1984.

TARR, P.E. ; LIN, R. ; JONES, T.C. Vaccine adjuvancy. In: MARTY, M. (Ed.). **Manual of GM-CSF**. Oxford : Blackwell Science, 1996. p.219-232.

TARR, P.E. ; LIN, R. ; MUELLER, E.A. ; KOVARIK, J.M. ; GUILLAUME, M. ; JONES, T.C. Evaluation of tolerability and antibody response after recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM- CSF) and a single dose of hepatitis B vaccine. **Vaccine**, Kidlington, v.14, n.13, p.1199-1204, 1996.

TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. ; BALKWIL, F. Cancer fusion potential for vaccines. **Nature**, London, v.362, p.695, 1993

TURK, J.L. ; PARKER, D. Granuloma formation in normal guinea pigs infected intradermal with aluminum and zirconium compounds. **J. Invest. Dermatol.**, Cambridge v. 68, p.336-340, 1977.

WALKER, M. Genetics of anti-HBs responsiveness. I. HLA-DR7 and non-responsiveness to hepatitis vaccination. **Transfusion** , Bethesda, v.21, p.601, 1981.

WATANABE, H. ; MATSUSHITA, S. ; KAMIKAWAJI, N. ; HIRAYAMA, K. ; OKUMURA, M. Immune suppression gene on HLA Bw54-Dr4-DRw53 haplotype controls nonresponsiveness in human to hepatitis B surface antigen via CD8⁺ suppressor T cells. **Hum. Immunol.**, New York, v.22, p.9-17, 1988.

WATANABE, H. ; OKUMURA, M. ; HIRAYAMA, K. ; SASAZUKI, T. HLA Bw54-DR4-DRw53-DQw4 haplotype controls nonresponsiveness to hepatitis B surface antigen via CD8⁺-positive suppressor T cells. **Tiss. Antig.**, Copenhagen, v.36, p.69-74,1990.

WEBER, D. J. ;. RUTALA, W.A. ; SAMSA, G.P. ; SANTIMAW, R.N. ; LEMON, S.M. Obesity as a predictor of poor antibody response to hepatitis B plasma vaccine. **JAMA**, Chicago, v.254, n.3, p.189, 1985.

WEISSMANN, J.Y. ; TSUCHIYOSE, M.M. ; TONE, M.J. ; CO, R. ; CHIN, K. ; ETTENGER, R.B. Lack of response to recombinant hepatitis B vaccine in nonresponders to the plasma vaccine. **JAMA**, Chicago, v.260, n.12, p.1734-1738,1988.

WISMANS, P. ; HATTUM, J. ; STELLING, T. ; POEL, J. ;GAST, G.C. Effect of supplementary vaccination in healthy non-responders to hepatitis B vaccination. **Hepato-gastroenterol.**, Athens, v.35, p.78-79, 1988.

WONG, E.K. ; BODSWORTH N, J. ; SLADE, M.A. ; MULJALL, B.P. ; DONOVAN, B. Response to hepatitis B vaccination in primary care setting : influence of HIV infection , CD4 lymphocyte count and vaccination schedule. **Int. J. STD AIDS**, London, v.7, p.490-494, 1996.

YASUMURA, S. ; SHIMIZU, Y. ; YASUYAMA, T. ; HIROKIO, O. ; OKADA, K. ; TISUKISHIRO, T. ; TSUCHIDA, T. ; HIGUCHI, K. ; WATANABE, A. Intradermal hepatitis B virus vaccination for low-or non-responded health-care workers. **Acta Med.**, Okayama, v.45, p.457-459, 1991.

ZARUBA,K. ; GROB, P.J. ; BOLLA, K. Thymopentin as adjuvant therapy to hepatitis B vaccination in formerly non-o hyporesponding hemodialysis patients. **Surv. Immunol. Res.**, v.4, p.102-106, 1985.

APÊNDICES

PROTOCOLO DE VACINAÇÃO - GMCSF

PRONTUÁRIO.....	PROTOCOLO.....
DATA.....	
NOME:.....	
IDADE(<i>entre 18 e 35 anos</i>).....	
ENDEREÇO.....	
...FONE:	
RES:.....	COMERCIAL:.....
...RECADO.....	COM:.....
.....	
DATA	DE
DIAGNÓSTICO.....	LOCAL.....

1. DIAGNÓSTICO DE HIV: ELISA1() ELISA2 () WB () OUTROS _____

2. CATEGORIAS DE EXPOSIÇÃO: *Usuário de Drogas E.V.(não incluir)

() Heterossexual () Homossexual () Bissexual () Transfusão

Data:..... Local.....

3. SOROLOGIA PARA HEPATITE (N ou P):

() AntiHBs () Anti HBc () HBsAg () História prévia de hepatite

4. EXPOSIÇÃO PRÉVIA AO GM-CSF: ()sim ()não

PESO..... ALTURA..... *Variação máxima de 20% do peso ideal

5.MEDICAÇÃO:.....

6. TABAGISMO: () Não ()Sim

7. ETILISMO: Etilistas crônicos devem ser excluídos: () Não () Sim

8. AUSÊNCIA DE SINTOMAS ()sim ()não

9.VACINAÇÃO: 1º DOSE..... 2º DOSE.....3ºDOSE.....

9 AVALIAÇÃO:

	Dia 0	Dia 4	Dia 8	Dia 28	Mês 7
HEMOGRAMA	Hb..... VG..... Leu..... Eos..... Linf..... Seg..... Mono..... Plaq.....	Hb..... VG..... Leu..... Eos..... Linf..... Seg..... Mono..... Plaq.....	Hb..... VG..... Leu..... Eos..... Linf..... Seg..... Mono..... Plaq.....	Hb..... VG..... Leu..... Eos..... Linf..... Seg..... Mono..... Plaq.....	
CD4 (<i>acima de 350</i>)					
CD8					
CARGA VIRAL					
ANTI- HBs					
anti- Hbc (final)					
EFEITOS COLATERAIS					
OBS:					

APÊNDICE I

Hospital de clínicas - UFPR/ Curitiba

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Hospital de clínicas - UFPR/ Curitiba

Título do estudo: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTICORPICA`A VACINA RECOMBINATE ANTI-HEPATITE B, UTILIZANDO O GM- CSF COMO ADJUVANTE VACINAL EM PACIENTES HIV POSITIVOS

Finalidade do Estudo:

Você participará de um estudo sobre o efeito da associação entre GM-CSF com a vacina recombinante para hepatite B no tratamento profilático contra hepatite B em pacientes com HIV. Os pacientes HIV+ apresentam de uma maneira geral uma resposta menor do que a população em geral a esta vacina. Foi demonstrado que o uso do GMCSF junto com a vacina aumenta a resposta vacinal em pacientes saudáveis, e nosso objetivo é verificar se esta estratégia de vacinação é útil e pode melhorar a resposta dos pacientes com HIV.

Riscos do Estudo:

Sua participação neste estudo envolve riscos: Dor local, inflamação, febrícula, mal estar, dor de cabeça, náuseas e / ou vômitos, artralgia e mialgia são reações que podem acontecer com o uso do GM- CSF. O GM- CSF já foi utilizado em pacientes com AIDS, associado a outras drogas e ao AZT. Nenhuma reação tóxica que envolva risco de vida foi observada nestes pacientes.

Custos e Compensações:

Não haverá custos adicionais para você caso se disponha a participar deste estudo. Também não haverá nenhuma compensação financeira pela sua participação neste estudo.

Confidencialidade:

Qualquer informação obtida neste estudo e que possa identificar você permanecerá confidencial. Somente a equipe médica responsável pelo estudo poderá ter acesso aos prontuários médicos relacionados com este estudo.

Participação é Voluntária:

Sua participação neste estudo é completamente voluntária. Você pode se recusar a participar ou retirar-se do estudo a qualquer momento. Quaisquer novos dados que possam afetar sua vontade de continuar nesse estudo lhe serão comunicados.

Perguntas:

Se tiver dúvidas, por favor pergunte e faremos o possível para responder. Se tiver perguntas adicionais no futuro poderá contactar com a Dra Maria das Graças Sasaki no telefone (041)360-1869.

“Eu discuti satisfatoriamente este estudo com o meu médico assistente. Entendo que minha participação é voluntária e que posso retirar-me do estudo a qualquer momento sem restrições. Li o acima exposto e concordei em entrar neste estudo de pesquisa. Assinando este formulário não abro mão dos meus direitos legais.

Eu fui informado de que caso venha a entender que tenha sido prejudicado de alguma forma por minha participação no estudo eu posso contactar o Investigador Principal, Dra MARIA DAS GRAÇAS SASSAKI no telefone 041 362 2028, de tal forma que possa revisar o assunto e identificar os recursos médicos que possam estar disponíveis para mim e recebi uma cópia deste formulário de termo de consentimento.”

.....
Participante	Data
.....
Dra. Maria das Graças Sasaki	Data

1.14 Termo de responsabilidade do pesquisador

Eu, Maria das Graças da Mota Silveira Sasaki matrícula nº 124583, do quadro da UFPR, médico CRM nº 5454, autor da pesquisa “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTICÓRPICA À VACINA RECOMBINANTE ANTI- HEPATITE B UTILIZANDO O GM-CSF COMO ADJUVANTE VACINAL EM PACIENTES HIV+”, realizada no Hospital de Clínicas da UFPR, no período de julho de 1997 a julho de 1999, declaro-me responsável pelo correto cumprimento do protocolo descrito, e, caso algum sujeito da

pesquisa seja excluído, garantirei a continuidade do tratamento e acompanhamento ambulatorial pelo Sistema Único de Saúde.

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E RESULTADOS OBTIDOS NOS PACIENTES DO GRUPO GM-CSF+HBVx												
CASO	IDADE	SEXO	F.R	CD4-CD8	CD4-CD8 7m	CDC	Anti-HBs 28d	Anti-HBs60d	Anti-HBs 210d	Anti-HBc	CV-7M	ARV
1	20	M	HET	300-700	560-890	II	N-REAG	N-REAG	N-REAG**	N-REAG	460	2ITRN
2	35	F	HET	468-825	484-825	II	N-REAG	N-REAG	N-REAG**	N-REAG	limite*	2ITRN
3	25	F	HET	1555-587	500-940	II	N-REAG	15mU/ml	>1000	N-REAG	limite*	n-usa
4	18	M	HOM	450-820	360-1100	II	N-REAG	N-REAG	10,5mU/ml	N-REAG	3.000	2ITRN
5	25	F	HET	350-700	350-700	II	29,7 mU/ml	>1000	>1000	N-REAG	limite*	2NITRN
6	32	M	HOM	439-1422	447-1302	II	N-REAG	N-REAG	N-REAG**	N-REAG	5.300	2ITRN+1 IP
7	35	M	BIS	350-1149	290-965	II	N-REAG	>1000	>1000	N-REAG	310	2ITRN+1 IP
8	24	F	HET	320-960	404-980	II	N-REAG	20,4mU/ml	>1000	N-REAG	limite*	2ITRN+1 IP
9	21	F	HET	1281-1026	1281-1020	II	N-REAG	10mU/ml	>1000	N-REAG	limite*	n-usa
10	35	F	HET	402-1020	402-1020	II	35,54mU/ml	136,5mU/ml	>1000	N-REAG	limite*	2ITRN
11	26	F	HET	368-980	368-980	II	N-REAG	322,5mU/ml	>1000	N-REAG	5.000	2ITRN
12	34	M	HET	520-1030	560-1090	II	23,4mU/ml	>1000	>1000	N-REAG	800	n-usa
13	34	M	HOM	317-1387	300-1800	II	N-REAG	N-REAG	N-REAG**	N-REAG	3.000	2ITRN
14	23	F	HET	817-1718	650-490	II	10mU/ml	320mU/ml	>1000	N-REAG	limite*	n-usa
15	31	M	HET	522-1030	522-1030	II	43,4mU/ml	350mU/ml	>1000	N-REAG	6.900	n-usa
16	27	F	HET	280-800	312-807	II	147,5mU/ml	>1000	>1000	N-REAG	limite*	2ITRN+1 IP
17	24	F	HET	350-1350	360-790	II	N-REAG	N-REAG	N-REAG**	N-REAG	limite*	2ITRN+1 IP
18	25	F	HET	350-960	650-490	II	43,4	197,3MU/ML	>1000MU/ML	N-REAG	limite*	2ITRN
19	35	F	HET	528-570	588-570	II	N-REAG	N-REAG	N-REAG**	N-REAG	4.400	n-usa

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E RESULTADOS OBTIDOS NOS PACIENTES DO GRUPO GM-CSF+HBVx													
CASO	IDADE	SEXO	F.R	CD4-CD8	CD4-CD8 7m	CDC	Anti-HBs 28d	Anti-HBs60d	Anti-HBs 210d	Anti-HBc	CV-7M	ARV	
20	34	F	HET	300-484	414-666	II	N-REAG	N-REAG	N-REAG**	N-REAG	830	2ITRN+1 IP	
21	24	M	HOM	378-1200	445-1023	II	14,7mU/ml	320mU/ml	>1000	N-REAG	limite*	2ITRN+1 IP	
22	32	M	HOM	737-841	361-1475	II	N-REAG	10mU/ml	23,4mU/ml	N-REAG	limite*	n-usa	
23	26	M	HOM	530-1050	560-980	II	13,8 mU/ml	>1000	>1000	N-REAG	limite*	n-usa	
24	28	F	HET	389-1319	590-1442	II	N-REAG	756,6mU/ml	>1000	N-REAG	30.000	2ITRN	
25	24	F	HET	360-1440	460-1328	II	N-REAG	N-REAG	267,9mU/ml	N-REAG	2.000	2ITRN+1 IP	
26	23	M	BIS	300-1217	315-1217	II	568 mU/ml	>1000	>1000	N-REAG	limite*	2ITRN	
27	27	M	HOM	298-930	460-1130	II	197,0mU/ml	>1000	>1000	N-REAG	limite*	2ITRN+1 IP	
28	32	F	HET	348-779	560-480	II	N-REAG	>1000	>1000	N-REAG	limite*	2ITRN	
29	24	F	HET	1037-983	880-1220	II	N-REAG	320,6mU/ml	>1000	N-REAG	limite*	n-usa	
30	29	M	BIS	512- 905	551-905	II	N-REAG	N-REAG	120mu/ml	N-REAG	3.400	n-usa	
31	27	M	HOM	398-930	460-1130	II	197,0mU/ml	>1000MU/ML	>1000MU/ML	N-REAG	limite*	2ITRN+1 IP	
32	25	M	HOM	399-981	650/340	II	N/REAG	N/REAG	N/REAG	N/REAG	limite*	2ITRN+1 IP	
33	35	M	HOM	350-827	307-1169	II	N-REAG	N-REAG	N-REAG**	N-REAG	35.000	2ITRN+1 IP	
34	34	M	HOM	350-1913	198-1535	II	N-REAG	>1000MU/ML	>1000MU/ML	N-REAG	2.900	2ITRN+1 IP	
35	25	F	HET	470-1030	570-930	II	N-REAG	>10,0MU/ML	>1000MU/ML	N-REAG	limite*	2ITRN	
36	28	M	HOM	660-591	475-980	II	N-REAG	N-REAG	N-REAG**	N-REAG	abaixo	2ITRN	
37	18	F	HET	393-866	450-770	II	N/REAG 04	36,9mu/ml	>1000mu/ml	N-REAG	limite*	2ITRN	
38	23	F	HET	356-1117	450-1030	II	N/REAG 06	10,0mu/ml	1000mu/ml	N/REAG	limite*	2ITRN	
39	35	F	HET	382-855	460-589	II	N/REAG	N/REAG	10mU/ml	N/Reg	limite*	2ITRN+1 IP	
40	30	F	HET	399/754	530-1030	II	N/REAG	N/REAG	1779mu/ml	N/REAG	limite*	2ITRN+1 IP	

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E RESULTADOS OBTIDOS NOS PACIENTES DO GRUPO HBVx												
CASO	IDADE	SEXO	F.R.	CD4-CD8	CD4-CD8F	CDC	Anti-HBs 28d	Anti-HBs60d	Anti-HBs7m	Anti-HBc7m	C.V.- F	ARV
1	32	M	HET	400 -820	500 850	II	15,4mU/ml	20,8mU/ml	>1000	NEG	LIMIT	2ITRN
2	27	F	HET	400-920	600 480	II	Ñ REAG	>1000	>1000	NEG	LIMIT	2ITRN
3	35	F	HET	577 499	1530 830	II	Ñ REAG	Ñ REAG	>1000	NEG	LIMIT	Ñ USA
4	34	M	HOM	571 1017	356 896	II	Ñ REAG	Ñ REAG	Ñ REAG	NEG	LIMIT	2ITRN
5	35	F	HET	408 913	434 1225	II	Ñ REAG	Ñ REAG	359mU/ml	NEG	LIMIT	2ITRN
6	35	M	HOM	498 1058	560 830	II	Ñ REAG	Ñ REAG	>1000	NEG	LIMIT	2ITRN
7	25	M	HOM	311 700	400 900	II	1,54	10mU/ml	20mU/ml	NEG	LIMIT	2ITRN
8	22	F	HET	549 489	650 480	II	>1000	>1000	>1000	NEG	LIMIT	2ITRN
9	21	M	HOM	396 369	750 380	II	1,38	546,0mU/ml	>1000	NEG	LIMIT	2ITRN
10	30	M	HET	411 930	800 470	II	Ñ REAG	Ñ REAG	Ñ REAG	NEG	LIMIT	2ITRN
11	19	F	HET	560 1090	560 1090	II	34,65mU/ml	136,5mU/ml	>1000	NEG	4.000	Ñ USA
12	32	M	HET	455 675	580 450	II	Ñ REAG	Ñ REAG	10mU/ml	NEG	66500	2TRN+1 IP
13	31	M	HOM	326 840	450 670	II	Ñ REAG	Ñ REAG	Ñ REAG	NEG	800	2ITRN
14	35	M	HOM	350 960	555 860	II	Ñ REAG	197,9mU/ml	>1000	NEG	LIMIT	2TRN+1 IP
15	31	M	HOM	358 770	450 740	II	Ñ REAG	Ñ REAG	Ñ REAG	NEG	LIMIT	2ITRN
16	22	F	HET	521 1089	521 1089	II	15,7mU/ml	>1000	>1000	NEG	LIMIT	2ITRN
17	35	F	HET	350 780	460 980	II	Ñ REAG	9,7	>1000	NEG	1000	2ITRN
18	22	F	HET	350 960	380 930	II	Ñ REAG	Ñ REAG	Ñ REAG	NEG	LIMIT	2TRN+1 IP
19	29	F	HET	498 1738	498 1738	II	Ñ REAG	Ñ REAG	Ñ REAG	NEG	LIMIT	2ITRN

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E RESULTADOS OBTIDOS NOS PACIENTE NO GRUPO HBVx												
CASO	IDADE	SEXO	F.R.	CD4-CD8	CD4-CD8F	CDC	Anti-HBs 28d	Anti-HBs60d	Anti-HBs7m	Anti-HBc7m	C.V.- F	ARV
20	23	F	HET	550 2832	550 2832	II	43,4mU/ml	>1000	>1000	NEG	7000	Ñ USA
21	30	M	HET	736 704	540/793	II	Ñ REAG	Ñ REAG	Ñ REAG	NEG	8000	Ñ USA
22	31	M	HOM	436 712	436 712	II	Ñ REAG	Ñ REAG	Ñ REAG	NEG	1500	Ñ USA
23	35	F	HET	300 700	360 1230	II	Ñ REAG	Ñ REAG	Ñ REAG	NEG	410	2ITRN
24	25	F	HET	500 830	470/980	II	Ñ REAG	Ñ REAG	497.0	NEG	1.000	2TRN+1 IP
25	27	M	HOM	423 1526	541 1504	II	Ñ REAG	Ñ REAG	Ñ REAG	NEG	15.000	2ITRN
26	32	M	HOM	481/908	485/1033	II	Ñ REAG	N~REAG	N~REAG	NEG	7000	2ITRN
27	23	M	HOM	430-712	670-960	II	Ñ REAG	Ñ REAG	Ñ REAG	NEG	4000	2ITRN
28	23	M	HET	576/555	650/750	II	Ñ REAG	Ñ REAG	10mU/ml	NEG	LIMIT	2ITRN
28	34	M	HOM	442/1617	360/520	II	Ñ REAG	Ñ REAG	N/REAG	NEG	LIMIT	2ITRN
30	30	F	HET	350/473	460/380	II	Ñ REAG	N REAG	N REAG	NEG	LIMIT	2ITRN
31	28	M	HET	559/1252	660/830	II	Ñ REAG	Ñ REAG	N/REAG	NEG	500	2ITRN
32	35	M	HET	609-1407	550/2832	II	Ñ REAG	Ñ REAG	REAGENTE	NEG	500	2ITRN
33	32	M	HET	450/1090	609/1407	II	Ñ REAG	N/REAG	N/REAG	NEG	LIMIT	2ITRN
34	20	F	HET	440/15266 30	303/624	II	Ñ REAG	Ñ REAG	197,0mu/ml	NEG	LIMIT	2ITRN
35	23	F	HET	659-758	550/1029	II	Ñ REAG	Ñ REAG	N/REAG	NEG	7.500	Ñ USA
36	26	M	HOM	460/980	500/908	II	>1000MUL	>1000MUL	>1000MUL	NEG	LIMIT	2ITRN
37	21	F	HET	520/1089	460-1100	II	Ñ REAG	Ñ REAG	10mU/ml	NEG	LIMIT	Ñ USA
38	23	M	HOM	484/960	488/979	II	Ñ REAG	Ñ REAG	10mU/ml	NEG	7100	Ñ USA
39	23	F	HET	350/730	380/870	II	Ñ REAG	Ñ REAG	Ñ REAG	NEG	<400	2ITRN
40	25	F	HET	383-2074	430/830	II	Ñ REAG	N/REAG	RN/REAG	NEG	LIMIT	2ITRN