

# Terapêutica anti-retroviral na infecção a VIH

## (2ª parte)

Eugénio Teófilo\*

### Antagonista do TAT

O DNA do VIH apresenta nas suas duas extremidades de inserção uma região condensada de genes repetidos - o LTR («Long Terminal Repeat»). A proteína TAT («Trans-Activator of Transcription») é um produto do gene viral *tat* e actua numa área do LTR denominada TAR («TAT Responsive element»). Com a ligação a este receptor desencadeia-se a replicação maciça do vírus. Esta proteína exerce também a mesma acção no LTR do vírus JC, o implicado na LEMP (Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva); *in vitro* promove a proliferação de células endoteliais cubóides características do Sarcoma de Kaposi e ainda, a redução da multiplicação de linfócitos T dependente de anticorpos (talvez relacionada com a possibilidade do TAT transactivar a expressão celular de TNF-alfa e IL6, causando a produção disfuncional de citocinas que alterariam o sistema imunitário) <sup>85</sup>.

*In vitro*, alguns destes fármacos são também inibidores da RT (transcriptase reversa) o que permitiria um melhor controlo da replicação viral <sup>86</sup>.

Levantaram-se dúvidas quanto à possibilidade de outros compostos (produtos de outros genes) puderem tomar o papel do TAT, quando se procedesse à sua inibição.

### Ro 24-7429

Provém dum conjunto de substâncias derivadas das benzodiazepinas, apresentando *in vitro* actividade contra a infecção aguda e crónica; não foi observada resistência e observou-se sinergismo com a ZDV, o ddC e alguns inibidores da protease.

Os efeitos adversos verificados no rato abrangiam: SNC (sonolência), GI (estase e diarreia), nefrotoxicidade, alteração da coloração de vários tecidos (coloração amarela) <sup>87</sup>.

Devido à ineficácia demonstrada nos estudos de fase II (ACTG 213) planearam-se outros com doses mais altas (200 mg/8-8h), para averiguar o seu potencial benéfico

em doentes com Sarcoma de Kaposi; no entanto devido ao aparecimento de alguns efeitos adversos inesperados (vide supra) suspendeu-se a investigação deste fármaco, dada a sua inoperância na infecção a VIH. Presentemente decorre no Canadá um ensaio de fase I com um novo composto deste grupo, o **ALX40-4C**, em 40 voluntários.

### Inibidores da protease

O produto dos genes *gag* (proteínas da nucleocápside e core, p17, p24, p8 e p7) e *pol* (protease, RT e endonucleases - ribonuclease H e integrase) é uma proteína única extensa (poliproteína) que tem que ser cindida nas diferentes proteínas estruturais e reguladoras. Essa reacção é executada por uma enzima - a protease, codificada pelo genoma viral. Deste modo a protease é responsável pela regulação duma cascada de eventos proteolíticos que conduz a um virião maduro, capaz de infectar outra célula. Esta separação dos vários componentes da poliproteína efectua-se quando a partícula viral já está em protusão da membrana da célula <sup>87-98</sup>.

O conceito teórico para o uso terapêutico dos inibidores da protease é o de que ao impedir a individualização das proteínas virais, estruturais e reguladoras, não é possível formar-se um vírus maduro, capaz de infectar outras células. A confirmação desta hipótese foi efectuada por experiências *in vitro* nas quais se verificou que a adição daqueles fármacos a culturas de células infectadas com VIH causava o aparecimento de vírus extracelulares imaturos, sem «core», incapazes de infectar outras células.

São eficazes em concentrações nanomolares, várias vezes inferiores às concentrações que podem ser obtidas no plasma.

Os estudos *in vitro* revelaram ainda a capacidade de boa inibição da replicação viral dentro dos macrófagos, o que não sucede com a maioria dos inibidores da RT, com má penetração dentro destas células (que são um reservatório do vírus).

Farmacologicamente, podem-se agrupar os inibidores da protease em três categorias: os péptidos análogos do substrato, os compostos C2 simétricos, e os não péptidos <sup>96</sup>. A pesquisa tem-se centrado na produção de péptidos sintéticos com uma estrutura similar às zonas de clivagem das proteínas (portanto o substrato da enzima).

Na pesquisa destes fármacos têm surgido várias dificuldades, como a dificuldade de produção e fraco poder antiviral nas culturas de células; após a realização de ensaios clínicos de fase I e II observaram-se ainda problemas de farmacodinâmica (má absorção, interacções com outros fármacos e o aparecimento de resistência) e alguns efeitos adversos inesperados (nomeadamente toxicidade hepática).

Tem sido referida, com maior frequência, o aparecimento de resistência da protease a estes compostos demonstrada *in vitro* e *in vivo*; em alguns casos verificou-se a

\* Interno do Internato Complementar de Medicina Interna Serviço 3 do Hospital de Santo António dos Capuchos

existência de resistência cruzada entre diferentes fármacos (saquinavir, L524 e ABT- 538) <sup>99-104</sup>.

Desconhece-se qual o significado real deste tipo de resistência, pois algumas proteases mutantes seriam menos eficientes que a do vírus «selvagem», no entanto na maioria dos casos essa resistência implicava uma perda de poder antiviral com aumento do número de cópias circulantes do VIH (detecção do RNA viral por PCR).

Estão descritos padrões de resistência comuns a grupos de inibidores da protease; dentro dos possíveis mecanismos de alteração estrutural haveria: 1- mutações no centro activo da protease que interferissem directamente com a ligação do inibidor, 2- mutações fora do centro activo que interferissem indirectamente com a fixação do inibidor, 3- mutações que conduzissem a uma enzima mais eficiente e 4- mutações nos locais de acção da enzima que facilitassem a sua actuação <sup>102-104</sup>.

Do estudo das alterações estruturais da protease induzidas por vários destes inibidores identificaram-se certos locais onde a substituição de aminoácidos conduz ao aparecimento de resistência (as alterações mais relatadas têm sido nas posições 8, 48, 82 e 84). A substituição do aminoácido na posição 82 (val – ala / tir / fen) era capaz de conferir resistência a todos os sete inibidores testados <sup>102-104</sup>. Estes resultados levantam dúvidas quanto à eventual utilidade dos inibidores da protease em monoterapia tendo-se já iniciado ensaios em terapêutica combinada com inibidores da RT (ACTG 229) <sup>105</sup> e com vários destes compostos; nesta última possibilidade ter-se-ão que ter em conta os diversos padrões de resistência apresentados para não associar fármacos em que haja resistência cruzada (esta questão já existia com os inibidores da transcritase reversa, estando descrita a resistência cruzada entre o ddI e ddC). (ver *Terapêutica Combinada*)

## Péptidos análogos do substrato

O objectivo tem sido produzir péptidos análogos ao substrato da enzima, mas que ela não consiga degradar ficando não funcionante por ocupação do centro activo.

A maioria destes produtos tem grande vulnerabilidade às enzimas digestivas, o que gera má biodisponibilidade oral; são ainda alvo dum metabolismo hepatobiliar rápido (com consequente baixa da semivida plasmática).

Dos muitos compostos estudados <sup>96</sup> o mais importante (primeiro a ser utilizado no ser humano) é o Ro 31-8959 - saquinavir <sup>106</sup>.

## Saquinavir (Ro 31-8959)

Os estudos de citotoxicidade revelaram que a dose tóxica é 2000 vezes superior à concentração com actividade antiviral, o que confere um índice terapêutico muito bom. Trata-se do inibidor da protease que se encontra em fase mais avançada de estudo sendo a primeiro a entrar em ensaios de fase III (a decorrer presentemente nos

EUA e Europa em mais de 6000 voluntários). A dose testada na maioria dos ensaios clínicos (600 mg/8-8h) demonstrou um bom perfil toxicológico, mas a sua capacidade antiviral foi modesta (diminuição da carga viral em cerca de 90%) questionando-se se não estará a ser utilizado em doses subóptimas devido à má biodisponibilidade que o fármaco apresenta ( $\pm 4\%$ ). Estão em ensaio clínico doses mais altas (Thomas Merigan - Universidade de Stanford) atingindo os 3600 e 7200 mg/d (o dobro e o quadruplo da dose até agora utilizada) registando-se um efeito antiviral semelhante ao L-524 ( $\pm 98\%$ ).

Talvez a questão mais problemática relacionada com o saquinavir seja a dificuldade de produção (23 etapas de síntese) o que o torna muito caro, além de que a companhia produtora não dispõe de grande quantidade armazenada (como efectuar ensaios clínicos de grande escala com as doses mais altas?) <sup>106-109</sup>. Estão descritos vários tipos de resistência a este fármaco <sup>110-112</sup>.

Em Itália e EUA efectuaram-se já ensaios clínicos em terapêutica combinada com ZDV tendo-se registado sinergismo, evidenciado pela maior supressão da carga viral e aumento mais pronunciado e sustentado dos CD4+. No estudo efectuado nos EUA (ACTG 229) testou-se ainda a eficácia da terapêutica tripla (saquinavir + ZDV + ddC) sendo superior à dupla (saquinavir + ddC ou saquinavir + ZDV). Os resultados da associação do saquinavir em combinação tripla com ZDV e ddI apontam no mesmo sentido <sup>105,106,113</sup>.

## L-735,524 (ou L-524)

É um isoester da hidroxietilamina. *In vitro* verificou-se uma redução do RNA viral no sangue periférico em 99%, transitória já que aos seis meses houve de novo aumento da mesma. Já se descreveram resistências, o que talvez seja facilitado por a concentração plasmática entre as administrações (4-4h) descer para os valores da IC90 (concentração de fármaco necessária para inibir 90% dos vírus) <sup>102-104, 106, 114</sup>. Num ensaio com 16 pessoas na dose 400 mg/6-6h houve redução para menos de um décimo da carga viral e aumentos de CD4+ entre 70-100, mas ao fim de 24 semanas os valores da carga viral tinham subido para 70%, embora se mantivesse o aumento dos CD4+, e melhoria dos valores hematológicos (PMN, plaquetas, hemoglobina) e do peso (aumento médio de 8-9 kg). Num outro ensaio com 70 voluntários (protocolo 006) com Agp24 positivo e CD4+ > 500 a 600 mg/6-6h, registou-se um decréscimo na carga viral entre 10 a 100 vezes (90 a 99%), que se manteve por 12 semanas, voltando aos valores basais às 24 semanas <sup>106</sup>. O aumento dos CD4+ foi na ordem dos 50-100 células, que também decresceram com o tempo. O único efeito adverso foi a elevação transitória da bilirrubina. As estirpes resistentes a este fármaco apresentavam também resistência a outros compostos desta classe <sup>102-104,114</sup>. Estão previstos novos ensaios, um

comparando L-525 (800 mg/8-h) + ZDV com ZDV em monoterapia, outro comparando L-524 à associação ZDV+ddI e um terceiro comparando doses maiores de L-524 (800, 1000 e 1200 mg/8-h) com a associação ZDV + 3TC. Iniciou-se também a sua associação ao ddI.

## Compostos C2 simétricos

A actividade destes compostos baseia-se na estrutura da protease ser um dímero simétrico em C2. Este tipo de fármacos têm uma porção simétrica ao centro activo da enzima ao qual se ligam fortemente impedindo o acesso do substrato natural.

Os compostos mais estudados e com ensaios clínicos são os Diois C2 simétricos, numa longa série: A-74704, A-77003, A-76928, A-75925, todos com má biodisponibilidade oral o que foi ultrapassado nas moléculas mais recentes, A-80164, A-80987. O membro mais recente desta família de compostos é o A-84538 (ABT-538).

Outros compostos desta classe são os inibidores do ácido fosfinico C2 simétricos, os diois da dihidroxipropilamina e os dímeros C2 simétricos derivados da penicilina <sup>96</sup>.

## ABT-538 (A-84538)

Com os dados disponíveis trata-se do inibidor da protease mais potente até agora sintetizado. Apresentado inicialmente em Outubro de 94 na ICAAC (Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy) e posteriormente em Novembro, em Glasgow (International Congress on Drug Therapy in VIH Infection) parece possuir um efeito anti-retroviral impressionante ( diminuição da carga viral em 99.1% - diminuiu 113 vezes) e boa biodisponibilidade oral (80%); é instável, necessitando de refrigeração permanente na sua forma actual de suspensão oral <sup>115</sup>. Dos ensaios de fase II já decorridos nas doses estudadas (600 →1200 mg/d) os efeitos adversos registados foram a diarreia (75% dos voluntários) e a elevação das transaminases em três casos embora com história prévia de hepatite viral. O valor inicial dos linfócitos CD4+ variava entre 91 e 173, tendo ocorrido aumento de 300% em média, mais pronunciados nas dosagens mais altas ocorrendo aqui aumentos de 300-400 linfócitos CD4+ e diminuições da carga viral de 99.8% (decrecendo 560 vezes relativamente ao valor basal) às 12 semanas.

Surgiu resistência que parece ser devida a mutações nas mesmas posições da protease que causam resistência ao L-524, mas diferentes das do saquinavir <sup>102-104</sup>.

## Inibidores da protease não peptídicos

Alguns destes compostos têm sido descobertos pela pesquisa de bases de dados que contêm de vários milhares de moléculas. Encontraram-se pequena moléculas não péptidicas como o haloperidol, só que as concentrações

antivirais deste último são 1000 vezes superiores às suas concentrações antipsicóticas.

Novas moléculas em estudo são o XM-323, que pertence a uma nova classe de inibidores da protease denominada ureias cíclicas e os compostos U-96988 e U-103017 <sup>96,116</sup>.

## Inibidores da integrase e alfa-glicosidades

A **integrase** é mais uma enzima viral, codificada pelo gene *pol* e que é indispensável para a inserção do provirus no genoma celular; por consequência a inactivação desta enzima tornaria impossível a infecção celular eficaz <sup>117</sup>.

A estrutura da enzima e do seu centro catalítico já foram determinados, apresentando semelhanças com as enzimas celulares RNAase H e mutransposase.

Estão identificadas três classes de compostos com actividade anti-integrase: moléculas fixadoras de DNA, compostos aromáticos poli-hidroxiados e vários nucleótidos (nomeadamente o derivado oxidado do ATP, o 2',3'-dialdeído-ATP). Apesar desta enzima, ao contrário das outras, existir em ínfimas quantidades intracelulares, e por isso ser mais facilmente neutralizada, persistem alguns obstáculos: a integrase só é necessária para actuar durante um pequeno período do ciclo viral, dado ser uma enzima viral é possível que surjam mutações e se criem resistências.

As **alfa-glicosidases** são enzimas celulares que após a tradução do RNAm viral para proteínas procedem à sua glicosilação (adição de moléculas de hidratos de carbono à estrutura proteica) que é indispensável para o funcionamento de muitas proteínas. Inibindo a sua actividade poder-se-á impedir a formação de vírus maduros.

Em ensaio clínico de fase I encontra-se o **SC-48334**, (N-Butil-Desoxirojimidina), inibidor da alfa-glicosidase I, tendo sido bem tolerado registando-se melhoria dos marcadores laboratoriais de progressão (linfócitos CD4+ e Agp24) <sup>118</sup>.

## Terapêutica imunomoduladora

### Interferões

São glicoproteínas descobertas em 1957, que são capazes de induzir uma resistência não específica às infecções virais. O aparecimento da tecnologia do DNA recombinante permitiu a sua produção em grande escala <sup>119</sup>.

O estímulo comum para a produção celular de interferões inclui: vírus, bactérias, RNA bicatenários (de cadeia dupla) e mediadores proteicos tais como TNF, Interleucina-2 e os factores de crescimento.

Primeiramente foram classificados por célula de origem como leucocitário, fibroblástico e linfocitário ou imune, depois surgiu a designação IFN-alfa, IFN-beta e IFN-gama

A classificação mais recente agrupa os interferões de acordo com os receptores para que têm afinidade, assim o alfa e beta pertencem ao tipo I (receptor codificado pelo gene localizado no cromossoma 21) e o interferão gama ao tipo II (receptor codificado pelo gene localizado no cromossoma 6).

O estímulo mais potente para a produção de interferão é a introdução na célula de RNA de cadeia dupla (que pode corresponder a um vírus ou não). Geralmente o estímulo é viral, mas as bactérias, os protozoários e as células tumorais são capazes da mesma indução. Um destes estímulos activa uma proteinoquinase que é o inductor directo por desrepressão dos genes dos IFNs.

Uma vez produzido o IFN não actua intracelularmente, sendo conduzido, dentro de vesículas, para o meio extracelular onde se irá ligar aos receptores membranares das células alvo. Uma vez efectuada esta interacção o complexo IFN-R é interiorizado e conduzido ao núcleo da célula onde exerce o seu efeito em pontos específicos de actuação: codão de iniciação de transcrição, codões de iniciação de tradução (RNAt) e locais de clivagem <sup>120-122</sup>.

Dum modo sucinto: IFN → R de superfície celular → sinal intracelular → proteínas específicas → prot. reguladas pelo IFN → 1- indução de um estado antiviral, 2- inibição do crescimento celular, 3- imunomodulação e 4- regulação da expressão de oncogénios <sup>120</sup>.

### **Indução de proteínas reguladoras**

Estão descritas três destas proteínas reguladoras induzidas pelos IFNs: a *Mx* (produzida pelos IFNs tipo 1, interfere com a exocitose celular conduzindo à disrupção da produção e montagem de vírus -confere resistência aos vírus influenza), a *2',5'-oligoadenilato sintetase* (é uma via enzimática induzida durante as infecções a vírus RNA, composta por três enzimas que provocam a degradação do RNA viral; protege as células selectivamente das infecções por picornavírus) e *Pl/elf-2 proteina quinase* (induzida pelo IFN tipo I em presença de vírus RNA de cadeia simples ou dupla, causa a inibição da síntese proteica, por fosforilação do elf-2 um factor de iniciação de síntese proteica - vários vírus conseguiram ultrapassar esta barreira nomeadamente os adenovírus e VIH) <sup>120</sup>.

### **Indução de antígenios do complexo major de histocompatibilidade (MHC)**

São glicoproteínas de superfície envolvidas na apresentação do antígeno às células T Os IFNs podem aumentar a concentração do MHC I e o IFN gama também do MHC II. Deste modo pode-se melhorar a resposta celular contra os vírus, por aumento da probabilidade de reconhecimento de antígenios virais por parte dos linfócitos T <sup>120</sup>.

### **Ações imunomoduladoras do IFN**

O IFN-gama estimula a actividade citotóxica das linfócitos T e NK, a maturação dos linfócitos B e dos macrófa-

gos e a produção de IL-1 por estes últimos. A IL-1 por sua vez activa o crescimento e a diferenciação dos linfócitos B e T, participa na produção de mediadores da inflamação, estimula a deslocação dos neutrófilos para o compartimento periférico, bem como a sua activação e induz a resposta febril <sup>120</sup>.

## **Interferão-alfa**

O IFN-alfa compreende 22 subtipos sendo produzido directamente na circulação sanguínea por vários tipos de leucócitos activados, em resposta a estímulos virais ou mitogénios; a sua produção está dependente duma família de 24 genes, aparentemente dos quais 9 são pseudogenes e só os outros 15 funcionantes, situada no cromossoma 9. O seu código genético não possui «intrões», o que poderá ser importante para a sua expressão durante uma infecção viral, pois não são necessários os mecanismos de excisão de «intrões» («splicing»), que poderiam estar comprometidos nas células infectadas <sup>119-121</sup>.

É resistente a um pH de 2 e é instável a 56°C.

Os efeitos antivirais do IFN-alfa (bem como no Sarcoma de Kaposi) só ocorrem em doentes que possuem um sistema imunitário relativamente íntegro (CD4+ > 400) e só após terapêutica prolongada com doses altas <sup>122,123</sup>.

Em culturas de células cronicamente infectadas com o VIH o uso do IFN-alfa resultou na supressão da produção (montagem e libertação) de partículas virais completas. A microscopia electrónica mostrou que nestas células tratadas com interferão se acumulavam partículas víricas pré-formadas junto à membrana celular, (no entanto há um efeito «rebound» em que se se parar a administração do interferão todas estas partículas acumuladas são libertadas para o exterior) <sup>122-125</sup>.

Nos indivíduos com infecção pelo VIH têm-se registado um aumento da produção de interferão endógeno (dependente do aumento do TNF-alfa?) o que conduziria a uma diminuição dos receptores de membrana para o IFN-alfa nas células mononucleares do sangue periférico, justificando em parte a pior resposta ao interferão exógeno nos doentes com doença a VIH avançada (descrita como resistência endógena ao IFN-alfa) <sup>125-127</sup>.

As doses usadas variam entre 1 a 15 MUI/sc/dia ou três vezes por semana. Os efeitos clínicos demonstraram-se nalguns ensaios pela diminuição das infecções oportunistas na doença avançada <sup>127</sup> e pela diminuição da carga viral, bem como de alguns marcadores laboratoriais de progressão (AgP24 e CD4+) <sup>128,129</sup>.

Os efeitos adversos mais frequentes são os da síndrome gripal (febre, calafrios, fadiga, anorexia) que surgem na quase totalidade dos doentes tratados com as doses mais altas, estes tipo de efeitos pode ser melhorado com a administração ao deitar do interferão conjuntamente com paracetamol ou AINEs. Outros sistemas de órgãos afectados são o gastrointestinal (náuseas, vômitos, diarreia,

hepatite) o sistema nervoso central (sonolência, confusão, ansiedade e depressão) o hematopoiético (citopenias, nomeadamente neutropénia) e o cardiovascular (é raro mas potencialmente perigoso; doença prévia e uso de citostáticos aumentam o risco: arritmias, isquémia, EAM e cardiomiopatias). Nos macacos o IFN-alfa é abortivo <sup>129</sup>.

Dado actuar na fase tardia do ciclo de replicação viral, é um bom candidato para terapêutica combinada com os inibidores da RT (habitualmente utilizado com a ZDV).

Alguns autores expressaram algum receio pelo uso de doses baixas de IFN-alfa em associação com a ZDV, pois além eventualmente ineficaz poderia estar associado a um aumento do risco de neurotoxicidade <sup>130</sup>.

Foi testada em ensaios clínicos a formulação oral do IFN-alfa, mas a falta de biodisponibilidade oral comprometeu essa forma de terapêutica <sup>131</sup>.

### Interferão-beta

O IFN-beta compreende cerca de 5 subtipos (varia segundo os autores) é produzido por fibroblastos do tecido conjuntivo em resposta a estímulos virais ou a polinucleósidos sintéticos; encontra-se dependente de genes situados nos cromossomas 2, 5, 9 e eventualmente 12. É farmacodinamicamente idêntico ao IFN-alfa mas apresenta uma capacidade de difusão muito menor, o que implica o atingimento de concentrações locais muito elevadas o que conferiria boa resistência antivírica às células adjacentes <sup>119, 120</sup>.

### Interferão-gama

O IFN-gama não apresenta quaisquer subtipos, interage com um receptor próprio e é produzido por linfócitos T activados e por células NK, em resposta a antigénios e mitogénios; em geral a sua produção desencadeia-se só depois da actuação dos componentes específicos do sistema imunitário. Possui uma actividade antivírica 500 vezes menor que os do tipo I, mas possui, em contrapartida, actividade imunomoduladora citolítica mais marcada.

Tal como os outros IFNs, induz a síntese de IL-1 e de TNF, mas apresenta sinergismo com o TNF-alfa na potenciação de expressão de moléculas do MHC tipo II e com o TNF-beta na inibição do crescimento celular. O IFN-actua ainda nos linfócitos TH2, induzindo a produção de IL-4 e IL-10 <sup>119,120</sup>.

A nível dos macrófagos aumenta o seu poder microbicida e a expressão de moléculas do MHC II.

Nas células B condiciona não só alterações quantitativas, como também qualitativas na classe de anticorpos produzida.

Está a ser ensaiado na terapêutica de algumas infecções oportunistas (leishmaniose e toxoplasmose) e outro dos potenciais usos será no tratamento das micobacterioses nomeadamente nas infecções por MAC (Complexo *Mycobacterium avium-intracellulare*) <sup>119,120,131</sup>.

### Interleucina 2

A IL-2 *in vitro* estimula a proliferação dos linfócitos CD4+ e activa as células CD8+ citotóxicas supressoras, que desempenham um papel importante no controlo da replicação do VIH dentro dos linfócitos CD4+.

Esta molécula recombinante apresenta baixa semividua plasmática tendo sido associada à do polietileno glicol (PEG), o que resultou num aumento considerável da semividua.

Num estudo utilizando esta associação houve não só melhoria dos marcadores de progressão laboratoriais mas também aumento da actividade específica para o VIH dos linfócitos T citotóxicos.

Nas doses mais altas (1.5 MUI/quinzenal) surgiu toxicidade marcada: febre, diarreia, exantemas cutâneos, neutropénia e trombocitopénia e casos esporádicos de «capillary leak syndrome»; nos ensaios com doses mais baixas (36000 U/ bissemanal) houve uma diminuição marcada da toxicidade e aumento significativo da actividade dos NK e dos linfócitos activados <sup>133,134</sup>.

O último estudo publicado refere-se a um ensaio feito no NIAID (National Institute for Allergy and Infectious Diseases) em que se administrou IL-2 em ciclos periódicos de infusões contínuas (infusão contínua endovenosa de cinco dias, de oito em oito semanas). Os resultados preliminares parecem ser favoráveis para os voluntários com CD4+ > 200 cel/microl, em que ocorreu aumento substancial destas células (três casos descritos em que se mantiveram acima dos 1000 há mais de três anos) o que no entanto não se verificou nas pessoas com infecção mais avançada <sup>135</sup>.

Uma dúvida que permanece é qual será o papel da IL-2 na replicação do VIH, uma vez já foi demonstrada a sua capacidade de a potenciar e uma vez que estimula a replicação dos linfócitos CD4+ e os activa, aumentando o número de células que poderão ser infectadas. Nos indivíduos com mais de 200 células CD4+/ microl não houve aumento global da carga viral, medição do RNA viral por PCR, o que já não aconteceu nas pessoas com infecção mais avançada (CD4+ <200) em que se observou um aumento do número de cópias de VIH no sangue. Uma das explicações possíveis é de que na fase avançada da infecção diminui significativamente o número de células CD8+ capazes de suprimir a replicação do VIH (dentro dos linfócitos CD4+) e portanto a administração de IL-2 não aumentaria grandemente o seu número e actividade daquelas células, pelo que o efeito mais pronunciado seria o do aumento da replicação viral; nos estadios mais precoces como ainda haveria muitos linfócitos CD8+ estes seriam estimulados activados e multiplicar-se-iam de modo a controlar o eventual aumento da replicação viral <sup>136</sup>.

De qualquer forma não está demonstrado que o aumento do número de linfócitos CD4+ seja clinicamente relevante, pois estas novas células poderão ser disfuncionais,

uma vez que se tem verificado que voluntários submetidos a tratamento com IL-2 desenvolveram doenças oportunistas para valores inesperadamente altos de células CD4+ (pneumocistoses com CD4+ > 400/ml) <sup>135</sup>.

Também não se sabe se o aumento de linfócitos CD4+ detectado no sangue periférico corresponde a uma maior produção ou apenas à sua deslocação dos órgãos linfóides onde habitualmente se encontra mais de 95% destas células.

Estes resultados foram obtidos em conjunto com terapêutica anti-retroviral (ZDV) e pensa-se que usando fármacos mais potentes se possa obter uma melhor resposta. Está previsto um estudo associando a IL-2 ao inibidor da protease L-524 que possui um efeito antiviral inicial muito potente (redução da carga viral podendo atingir os 99%) <sup>135</sup>.

### Moduladores do TNF-alfa

O Factor de Necrose Tumoral alfa (TNF-alfa) para além de aumentar a produção do VIH foi associado: à caquexia associada à SIDA (síndrome de emaciação), à hipertrigliceridemia que estes doentes muitas vezes apresentam (inibe a LPL hepática diminuindo a clearance das quilomicra e VLDL), à desmielinização do SNC e por estimular a produção de astrócitos poderá contribuir para a gliose reactiva do Complexo Demencial associado à SIDA (ADC) <sup>137</sup>.

Vários compostos inibem a produção do TNF alfa, dois dos mais usados e testados são a **pentoxifilina e a talidomida** <sup>138</sup>. Estes compostos não têm efeito directo sobre o VIH e o seu uso não tem sido relacionado com melhoria dos marcadores laboratoriais de progressão (é possível que a talidomida melhore a imunidade celular), mas sim com a melhoria sintomática dos indivíduos em fase de infecção avançada (nomeadamente o aumento de peso). Outros compostos deste grupo são a **L-carnitina, os Beta-carotenos e BRL 61063** <sup>18,19,139-141</sup>.

### Terapêutica genética

No sentido lato, a ideia básica da terapêutica genética é introduzir genes que expressem proteínas que possam substituir outras deficitárias, inibir o funcionamento celular anómalo ou regular a expressão de outros genes <sup>142</sup>.

Dado que as doenças provocadas por vírus (nomeadamente os vírus lentos) são doenças genéticas adquiridas a sua patogenicidade poderia ser diminuída ou eliminada se se pudesse inactivar as proteínas que produzem ou impedir a sua replicação.

Várias técnicas têm sido ensaiadas destacando-se entre outras: injeções de DNA directamente nas células, auto-transplantes de medula com injeção posterior de linfócitos T citotóxicos modificados com reactividade específica para o VIH; genes CD4 ou de proteínas transdominantes (funcionariam como os CD4sr); introdução de genes *env/rev* por vectores retrovirais em fibroblastos autólo-

gos (que assim produziriam grandes quantidades das proteínas do invólucro); sensibilização de linfócitos T citotóxicos para destruírem células infectadas com o VIH (introduzir os genes da porção extramembranar do CD4 de modo que a proteína pudesse ser expressada por estes linfócitos que assim poderiam reconhecer células com a gpl20 à superfície e destruí-las) e alterações do CD4 de modo a capturar a gp 120 intracelularmente <sup>21,72, 142</sup>. RNA «decoys» são moléculas de RNA expressas intracelularmente com a função de se ligarem ao RNA viral e assim impedir a sua expressão. Dois dos locais alvo são o RRE (REV responsive element) e o TAR (TAT responsive element). Uma preocupação é a de que estes elementos se possam fixar a factores celulares e assim provocarem toxicidade <sup>142</sup>.

**RNA «antisense» (ou oligonucleótidos «antisense»)** o objectivo é o de impedir a expressão de genes. O RNA «antisense» (RNA complementar) não é mais do que uma cadeia de RNA complementar a uma determinada cadeia de RNAm e que com ela se pode hibridizar, impedindo assim a expressão dos genes que aquela cadeia de RNAm transporta (demonstrado *in vitro* pela inibição de certos genes celulares após a introdução nas células deste tipo de RNA) <sup>143</sup>. Da mesma forma verificou-se a presença de RNA «antisense» para o transcrito do vírus herpes simplex, no ganglio do trigémio com infecção latente. Esta técnica foi também usada na tentativa de inibir a expressão de genes virais (VIH, adenovírus, vírus do Sarcoma de Rous e HTLV-I), mas apenas com sucesso parcial, pois não foi possível a inibição total.

De facto, quanto maior for a molécula de RNA «antisense» usada, maior será a probabilidade de inibição cruzada (ou seja inibir a expressão viral de diferentes estirpes de VIH), mas também quanto maior for a molécula de RNA mais difícil será a sua entrada na célula; o ideal seria então produzir o RNA «antisense» *in loco* o que poderia ser conseguido usando retrovírus como vector <sup>144,145</sup>.

**Ribozimas** são moléculas de RNA com funções catalíticas para o RNA, podendo reconhecer e clivar vários genes virais, inactivando-os deste modo.

**Proteínas Mutantes Transdominantes** são proteínas recombinantes do VIH alteradas, que se ligariam aos mesmos receptores mas não os activariam (inibição por competição). Os exemplos mais avançados são as proteínas transdominantes do REV (RevM10) e do TAT do VIH-2 (R81-84A) <sup>146</sup>.

**Toxinas Intracelulares** (ver também *Agentes Que Actuam Na Fase Extracelular*) trata-se de juntar moléculas que são capazes de reconhecer produtos virais e assim células infectadas, com compostos tóxicos. Outra abordagem é a da inserção de genes codificando moléculas deletérias para a célula <sup>142</sup>.

**Sistemas Transdutores de Genes** têm por base o uso de vectores retrovirais nos quais se inseriram genes antivirais que bloqueariam a acção dos produtos virais ou

então que poderiam desencadear o «suicídio» das células infectadas <sup>142</sup>.

**Expansão Ex Vivo de Linfócitos:** expansão de células CD8+, procede-se à separação dos linfócitos T, por linfaferese, nas fases mais precoces da infecção, estimulando-as *in vitro* a produzir actividade citotóxica para componentes virais e reinfundindo-as numa fase mais avançada; expansão de células CD4+, após manipulação *in vitro* poderiam ser tornadas resistentes à infecção pelo VIH e administradas novamente ao doente <sup>147,148</sup>.

## Vacinas terapêuticas

Têm como objectivo produzir uma resposta imunitária no seropositivo de modo a, senão erradicar a infecção, pelo menos alterar o seu curso desfavorável <sup>149-158</sup>.

A transmissão sexual é a via principal de infecção, daí que uma vacina para ser eficaz tenha que assegurar a protecção endovenosa e das mucosas e permitir a destruição tanto de vírus livre como vírus dentro de células infectadas.

Embora a estimulação da imunidade celular seja essencial para a eficácia duma vacina há que ter em conta que as células T efectoras podem ser prejudiciais, como se demonstra pela sua actividade aumentada no lavado broncoalveolar, na alveolite linfocitária e no LCR de indivíduos com perturbações neurológicas. No entanto, o grau de citotoxicidade dos linfócitos T é importante porque continua a ser a resposta apresentada pelas pessoas que tiveram contacto com o vírus mas não se infectaram. Os anticorpos neutralizantes parecem ser importantes na diminuição da transmissão vertical, mas a citotoxicidade parece surgir mais precocemente. As vacinas terapêuticas podem estimular a resposta imune dos indivíduos seropositivos, mas desconhece-se ainda qual o seu significado clínico <sup>152,153,159</sup>. Os modelos usados para a síntese das vacinas repartem-se por três tipos:<sup>150</sup>

1 – em 1986, Zagury inoculou seropositivos com células autólogas mortas em paraformaldeído, com vírus inactivado à superfície, não houve resposta clínica, mas quando lhe associou terapêutica imunomoduladora com IFN-alfa obteve ressurgimento da imunidade celular, revelada pela restauração da hipersensibilidade retardada, proliferação das células T activadas e actividade T citotóxica. Houve ainda estabilização dos linfócitos CD4+. Aparentemente seria útil para os doentes com imunodeficiência avançada.

2 – em 1987 Salk construiu uma vacina de vírus morto sem invólucro, com o adjuvante de Freund incompleto. Os voluntários tinham infecção pelo VIH avançada e a estirpe viral utilizada era Zairiana. Não houve alteração dos títulos de anticorpos anti-VIH (anti-p24, anti-RT), mas houve recuperação da hipersensibilidade retardada (reversão da anergia cutânea) em alguns doentes, nos quais

houve diminuição da incidência de infecções oportunistas <sup>160</sup>.

3 – devido à sua importância no controlo de outras infecções virais e à sua exiguidade na infecção pelo VIH, vários autores iniciaram investigações para a produção de vacinas utilizando as proteínas do invólucro (gpl60, gpl20, gp41). Redfield em 1989 iniciou os ensaios com gpl60 recombinante, obtendo evidência de imunogenicidade em 93% dos vacinados (com melhores respostas nos voluntários com CD4+ > 400/ml); posteriormente outros autores iniciaram a sua associação à terapêutica anti-retroviral, mas sem melhoria aparente de imunogenicidade. A vacina terapêutica da qual se adquiriu mais experiência é a gpl60, tendo sido bem tolerada nos ensaios de fase I (2 anos de seguimento), com ou sem ZDV, havendo estabilização dos linfócitos CD4+ (para as pessoas com sistema imune pouco atingido - CD4+ > 400 cel/microl) <sup>159,161-163</sup>. Há ainda referência à indução de respostas citotóxicas restritas ao MHC tipo I (CD8+) e II (CD4+). A associação desta vacina com outra de proteínas do invólucro induziria células de memória específicas para as proteínas do invólucro. Nem todos os autores concordam com estes achados.

4 – mais recentemente surgiram as vacinas anti-idiotipo, de que é exemplo a IOT4, derivada dum anticorpo com afinidade para o receptor CD4+, os anticorpos contra os IOT4 produzidos pela imunização tem reactividade cruzada com a gpl20 do VIH, conseguindo a sua neutralização *in vitro*. Nos estudos de fase II houve ressurgimento de reacção de hipersensibilidade retardada e aumento do número de células CD4+ variando entre 15-120% <sup>164,165</sup>.

5 – o tipo de intervenção mais recente neste campo, tem sido feita com vectores retrovirais onde se inseriam proteínas do VIH (core - p17; rev). Alguns doentes com SIDA foram autotransfundidos com células contendo vectores recombinantes do vírus vacinia contendo genes *env*, *pol* e *gag*, tendo-se obtido uma diminuição do número de infecções oportunistas. A utilização de vectores permitiria a introdução de grandes quantidades de imunogénios dentro do hospedeiro. Destacam-se como potenciais vectores <sup>96,150</sup>: **vírus:** poxvírus (vaccinia e apipoxvírus), adenovírus <sup>4,7</sup> (permitem a administração oral, possibilidade de indução de imunidade das mucosas), quimeras de poliovírus, retrovírus, VIH atenuado (com múltiplas deleções, daí sem poder patogénico); **bactérias:** BCG, salmonellas atenuadas e E. coli; **não replicantes:** ag HBs e HBc do HBV; **compostos «vírus like»:** partículas Ty <sup>160,166,167</sup>.

A eficácia duma vacina depende não só do tipo de imunogénio usado (proteínas recombinantes do invólucro ou core, anti-idiotipo, ou vírus recombinantes), mas também da dose usada, estadio da infecção do hospedeiro e frequência de administração (por exemplo a gpl60 não demonstrou imunogenicidade com três administrações, mas

sim com seis). Outros pontos importantes são a estirpe de vírus utilizada ( a estirpe LAI é produzida apenas em laboratório, enquanto que as estirpes MN e SF2 são as predominantes nos infectados da Europa e EUA. Descobriu-se se há reactividade cruzada entre estirpes ou não); o sistema de expressão (células de insectos ou de mamíferos e fungos) e os adjuvantes (compostos de alumínio são mais potentes que o alumínio isolado)

## Terapêutica combinada

### Terapêutica convergente

Dado que nenhum inibidor da RT suprime totalmente a replicação viral e que ao fim de um período variável de tempo deixa de haver eficácia clínica por surgimento de estirpes resistentes, a associação de compostos tem por objectivo impedir, ou atrasar esse fenómeno. A utilização de fármacos com efeitos adversos distintos permite diminuir o risco de toxicidade grave <sup>168-178</sup>.

A terapêutica combinada convergente pressupõe a utilização de vários fármacos com actuação no mesmo ponto do ciclo de replicação viral e pode ser subdividida em simultânea (dois inibidores ao mesmo tempo), ou alternada (alternando ciclos de diferentes inibidores), esta última é menos eficaz <sup>21,72,179,180</sup>.

A associação mais frequentemente utilizada é a de dois inibidores da RT análogos dos nucleósidos (ZDV + ddI, ZDV + ddC...). Pretende-se maximizar as particularidades de cada composto: por exemplo a ZDV penetra melhor nas células de divisão mais rápida (linfócitos), enquanto o ddI penetra melhor em células com menor potencial de divisão (monócitos-macrófagos). Estão descritos antagonismos nestas combinações, os mais importantes são a ZDV com o d4T (estavudina), que competem pela mesma via para serem activados e o ddI e ddC que possuem efeitos adversos semelhantes (com risco aumentado de pancreatite e neuropatia) <sup>181-188</sup>.

O aparecimento de formas lipossómicas (ddI e ddC) vem permitir maior semi-vida, penetração celular e menor citotoxicidade destes fármacos <sup>189,190</sup>.

Vários ensaios clínicos têm demonstrado que a associação de dois ou mais inibidores da RT permite uma diminuição sustida da progressão dos marcadores laboratoriais de doença. Os resultados de um ensaio numa amostra do MACS (Multicenter AIDS Cohort Study) demonstrou um decréscimo de 34% no risco de morte nos doentes que faziam terapêutica combinada versus os que permaneciam em monoterapia <sup>181</sup>.

Outra opção é a associação dum análogo dos nucleósidos (geralmente tem sido a zidovudina) com um não nucleósido (neveripina, compostos L, atevirdina, delavirdina, lovirida, foscarnet...), pois regista-se uma diminuição do aparecimento de resistências a estes últimos <sup>191-193</sup>.

Com grande difusão mediática foi a associação da ZDV com a lamivudina (3TC) um nucleósido análogo da citosina e que leva ao rápido desenvolvimento de resistência por mutação na posição 184 do gene pol, que conduz à substituição do aminoácido na mesma posição da RT; esta mutação é subtractiva com a mutação na posição 215 da RT para a ZDV <sup>194-196</sup>. Perante uma mutação na posição 184 um vírus que tivesse adquirido a mutação que confere alta resistência à ZDV, na posição 215, passa a ser sensível a esta última. Este resultado foi demonstrado primeiro *in vitro* o que causou algum ceticismo, uma vez que o mesmo já tinha acontecido com a didanosina (ddI) em que o surgimento da mutação na posição 74 que conferia resistência ao ddI, tornava um vírus mutante na posição 215 sensível à ZDV, só que *in vivo* esta «protecção» não foi muito clara, se bem que a associação dos dois fármacos pareça ser benéfica em termos de marcadores de progressão. Em Glasgow (Novembro de 94) foram apresentados os resultados de dois estudos europeus da associação ZDV + 3TC em doentes com e sem exposição prévia à ZDV. Relativamente à redução de carga viral e aumento de linfócitos CD4+ houve vantagem marcada da associação ao fim de 48 semanas, comparativamente à monoterapia com ZDV. No entanto, dado o pequeno número de voluntários em que foi analisada a carga viral (20%) os resultados são um pouco duvidosos. Na National Conference on Human Retroviruses and Related Infections, Washington, Fevereiro 95, foram apresentados novos dados acerca desta combinação, confirmando-se os resultados anteriores nas pessoas sem tratamento prévio com ZDV e infecção menos avançada (com diminuição da carga viral em 90% e aumentos de CD4+ na ordem das 50 células às 24 semanas). Quanto aos obtidos com os doentes com tratamento prévio com ZDV e com infecção mais avançada os resultados não foram coincidentes, sendo sobreponíveis aos da associação ZDV+ddC.

Com a profusão de inibidores da protease prevê-se para breve a terapêutica combinada convergente com dois, ou mais fármacos desta classe; para isso tem-se estudado o padrão de resistência da protease a estes compostos, de modo a associar fármacos com perfis de resistência diferentes (implicam a necessidade de mais mutações na protease para que haja resistência). Dado que alguns destes novos compostos possuem um poder antiviral muito marcado (diminuem a carga viral entre 98-99%) ao reduzir o número de vírus em replicação diminuem a possibilidade de surgir novas resistências <sup>102-104</sup>.

### Terapêutica divergente

Tem como princípio tentar inactivar várias etapas do ciclo de vida viral ao mesmo tempo. Para tal utilizam-se fármacos que actuam em diferentes etapas do ciclo de replicação do VIH <sup>197</sup>.



Presentemente as que se usam com mais frequência utilizam um inibidor da RT com o IFN-alfa, ou o aciclovir<sup>198-201</sup>. Encontram-se em ensaios clínicos de fase I/II várias outras em que se associa a ZDV com inibidores da protease (saquinavir), timopentina, timostimulina pentoxifilina, gpl60 e CD4-Pe40 (imunotoxina)<sup>72,202-209</sup>. O conhecimento da existência de cofactores que poderão ser importantes na replicação viral, tem sido importante na utilização de alguns fármacos como o aciclovir. Vários organismos têm sido implicados na activação do VIH dum modo directo, ou indirecto por citoquinas (IL1, IL3, IL4, IL6, TNF alfa, TNF beta) ou por transactivadores (NF κB)<sup>18,19,210</sup>. Os vírus do grupo herpes (EBV, HSV, CMV), outros retrovírus HTLV-I e o *Mycoplasma fermentans* possuem esta potencialidade.

Cada vez mais importante parece ser o papel do HHV6 (Herpesvírus humano tipo 6) que aumenta a expressão membranar de receptores CD4 em várias células e que ao infectar os linfócitos CD8+ conduz à desrepressão do gene do receptor CD4, que assim passa a ser expresso à superfície destas células. Deste modo estes linfócitos passarão a ser passíveis de infecção pelo VIH<sup>210</sup>.

O CMV é outro cofactor desde há muito salientado como importante na evolução da infecção a VIH; vários estudos em hemofílicos demonstraram que os que não apresentavam anticorpos para o CMV na altura da seroconversão para o VIH tinham uma sobrevida maior do que os que possuíam IgG para o CMV durante a seroconversão. *In vitro* verificou-se que as células infectadas pelo CMV expressam na membrana o receptor para a porção Fc das IgG, uma porta de entrada para o VIH.

O aumento da sobrevida nos doentes em terapêutica combinada ZDV + aciclovir tem sido alvo de opiniões divergentes. O último estudo publicado, enquanto se aguarda os resultados dos ACTG 063 e 204, relativo à utilização de aciclovir em doses altas (3200 mg/d) em conjunto com a zidovudina, sugere diminuição de mortalidade que variava entre 26-34%. Os dados referem-se ao MACS (Multi-center AIDS Cohort Study) e os autores referem a eficácia do aciclovir só nos doentes com imunossupressão avançada; a quase totalidade da amostra apresentava serologia positiva para o vírus herpes simplex, desconhece-se qual a eficácia nas populações não infectadas com este vírus<sup>210,211</sup>.

Um fármaco já bem conhecido e ultimamente transposto para o campo da terapêutica antiretroviral é a **hidroxiureia**. Este composto actua como capturador de radicais livres e inibe ainda a enzima *ribonucleotido difosfato reductase* que permite a passagem dos ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos, as unidades de formação do DNA. Ao diminuir a disponibilidade dos desoxirribonucleótidos a hidroxiureia aumenta a disponibilidade dos didesoxirribonucleósidos (ZDV, ddI, ddC e afins). Em França (Centre Leon Bernard, Lyon) *Malley et al*<sup>213</sup> demonstraram

grande sinergismo na terapêutica combinada de hidroxiureia e ddI (que está relacionado com a diminuição marcada do dATP intracelular, o nucleótido fisiológico que compete com o ddATP a forma activa do ddI). A equipa de Gallo<sup>214</sup> demonstrou uma supressão da replicação superior a 99% (atingindo mesmo a inibição completa, > 99.9%) em células mononucleares do sangue periférico infectadas. A dose de fármaco eficaz nos macrófagos é inferior à necessária para actuar nos linfócitos. Dada a boa eficácia nos macrófagos, conjuntamente com a boa penetração da barreira hematoencefálica, a hidroxiureia + ddI surge como boa terapêutica investigacional da doença neurológica associada ao VIH. Encontra-se em execução um ensaio de fase II em França com doses entre 500-1000 mg/12-12h + ddI 200 mg/12-12h. As vantagens imediatas da hidroxiureia são o seu uso clínico há cerca de trinta anos, conferindo um bom conhecimento da sua toxicidade (mielotoxicidade, raramente grave; não é imunossupressora), o baixo custo e a inibição duma enzima celular, pelo que a habitual resistência por mutação viral não será problema.

Vários ensaios clínicos testam presentemente os potenciais benefícios que a adição de diferentes fármacos (por vezes em doses mais reduzidas do que na monoterapia) poderão trazer, não só em termos de eficácia, como também em redução de toxicidade<sup>215-223</sup>.

## Conclusão

Desde o início da síndrome que a quantidade e qualidade de vida dos infectados com o VIH tem melhorado, senão pelo uso de retrovirais pelo menos pela instituição de profilaxias. Neste campo o aparecimento de novos compostos (penciclovir, famciclovir e atovaquona) bem como formulações orais de ganciclovir e do foscarnet poderão permitir uma melhor qualidade de vida e menor dependência física das instituições de cuidados de saúde.

Termino com um excerto da comunicação que A. Pinching efectuou em Milão (Quarta Conferência Europeia sobre os Aspectos Clínicos e tratamento da Infecção a VIH - Março 1994) na abertura da sessão sobre terapêutica antiretroviral: «...possuímos mais e novos compostos e potenciais combinações, marcadores cada vez mais relevantes e, acima de tudo, uma experiência comum de como prosseguir com o dolorosamente lento processo de descobrir como fazer melhor. Os primeiros anos deram-nos um progresso real. A dimensão relativamente modesta desse progresso não deverá ser vista como um fracasso, mas apenas reflectir a magnitude do problema que enfrentamos e as limitações dos agentes terapêuticos de que dispomos presentemente. Realismo e o sentimento mútuo de como beneficiar da experiência entretanto adquirida, permitirá colher grandes compensações às pessoas afectadas por este desafio devastador.»

## Bibliografia

85. Gaynor R. Cellular transcription factors involved in the regulation of VIH-1 gene expression. *AIDS* 1992;6:347-364.
86. Hsu M-C et al. Inhibition of HIV replication in acute and chronic infection in vitro by a TAT antagonist. *Science* 1991; 213 :1-3
87. Bragman Keith. Tat Antagonist; Personal Communication. *AIDS and Medication: 3rd European Meeting on: Trials, Drugs and Medication*. Berlin 1993
88. Kempf D. HIV protease as a therapeutic agent. *PAACnotes* 1993;April: 143-145
89. Lambert DM et al. Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors irreversibly block infectivity of purified virions from chronically infected cells. *Antimicrob Agents Chemothera* 1992;36(5):982-988
90. Tyagi SC. Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 protease. *Biochem Cellbiol* 1992;70(5):309-315
91. Martin JA. Recent advances in the design of HIV proteinase inhibitors. *Antiviral Res* 1992;17(4):265-278
92. Graves BJ et al. The three-dimensional x-ray crystal structure of HIV-1 protease complexed with a hydroxyethylene inhibitor. *Adv Exp Med Biol* 1991;306:455-460
93. Schram HJ et al. Inhibition of HIV-1 protease by short peptides derived from the terminal segments of the protease. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184(2):980-985
94. Debouck C. The HIV-1 protease as a therapeutic target for AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992;8(2): 153-164.
95. Wainberg M. New Anti-virals. Comunicação oral 1.1.1, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection, Novembro 1994.
96. HIV protease inhibitors, *AIDS Therapies* 1992:1-13
97. Robins T, Plattner J. HIV Protease inhibitors: their anti-HIV activity and potential role in treatment. *J AIDS* 1993;6:172
98. DeNoon DJ. US Trial of protease inhibitor set to begin. *AIDS Weekly* 1992; Nov 16:3
99. Otto MJ et al. In vitro isolation and identification of human immunodeficiency virus (HIV) variants with reduced sensitivity to C-2 symmetrical inhibitors of HIV type 1 protease. *Proc Nat Acad Sci USA* 1993;90(16):7543-7547
100. El-Farrash M, Kuroda M, Harada S. HIV-1 Mutation to Escape the Effect of Protease Inhibitors in vitro Impaired its Infectivity and Cytopathogenicity. Poster 6, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection, Novembro 1994.
101. Moyle G. Proteinase Inhibitors. In: *Resistance to Antiretroviral Compounds*. Ed: Mediscript 1994.
102. Boucher C, Larder B. Resistance to Protease Inhibitors. In: *Viral Variation and Therapeutic Strategies in HIV Infection*. Ed: Meditech Media 1994.
103. Barry D. Triple Combinations and Future Research Directions. *AIDS Care* 1994; 1: 28-31.
104. Chang H. Highlights From the Third International HIV Drug Resistance Workshop. *AIDS Care* 1994;1: 32-35.
105. National Institute of Allergy and Infectious Diseases: ACTG 229 Executive Summary: Antiviral Trial of Combination Therapy. Maio 1994.
106. GMHC Treatment Issues. Protease Inhibitors: overview and analysis 1994;8(2):1-8
107. Roberts NA. HIV proteinase inhibitor Ro 31-8959: an update on its biological properties. 1992 ICAAC symposium abstract
108. Bragman K. Personal communication: *AIDS and Medication: 3rd European Meeting on: Trials, Drugs and Medication*. Berlin 1993
109. Kitchen V, Skinner C, Lane E, et al. Long Term Follow-up of the Phase I/II Study of Saquinavir, in Asymptomatic or Mildly Symptomatic HIV Infection. Comunicação oral 11.3, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection Novembro 1994.
110. Ives K, Galpin S, Foxall R, et al. Resistance to Saquinavir (Ro3 1-8959) Occurs During Patient Treatment. Poster 1, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
111. Duncan I, Jacobsen H, Hanggi M, et al. Genotypic Characterization of HIV-1 from Patients after Prolonged Treatment With the Proteinase Inhibitor Saquinavir. Poster 5, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
112. Massimo A, Ercoli L, Sarmati L, et al. Characterization of HIV Drug Sensitivity during Antiretroviral treatment With a Proteinase Inhibitor (Ro-3 1-8959 - Saquinavir) Alone or in Combination With Zidovudine. Comunicação oral 5.7, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
113. Johnson V. Combination Therapy: More Effective Control of HIV Type 1?. *AIDS Res Hum Retrov* 1994; 10: 907-912.
114. Emini E, Deutsch P, Schleif W, et al. Clinical Development of HIV-1 Resistance to the Viral Protease Inhibitor L-735,524. Comunicação oral 11.5, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
115. Danner S, Cooper D, Gudiol F, et al. Safety, Pharmacokinetics and Virological/Immunological Efficacy of ABT-538, a HIV-Protease Inhibitor. A Randomised, Placebo Controlled Phase I/II Study. Comunicação oral 11.2, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
116. Winslow D, Mayers D, Scarnati H, et al. In vitro Susceptibility of Clinical Isolates of HIV-1 to XM323, a Non-Peptidyl HIV Protease Inhibitor. *AIDS* 1994; 8: 753-756.
117. Lipford J, Worland ST, Farret CM, et al. Nucleotide Binding by the HIV-1 Integrase Protein in vitro. *J AIDS* 1994; 7: 1215-1223.
118. Fischl M, Resnick L, Coombs R, et al. The safety and Efficacy of Combination N- Butyl-Deoxyrojomycin (SC-48334) and ZDV in Patients with HIV Infection and 200- 500 CD4 mm<sup>3</sup>. *J AIDS* 1994; 7: 139-147.
119. Austin J, Wood K. Cytokines Mediating Inflammatory and Effector Functions. In: *Principles of Cellular and Molecular Immunology*; 1993: 572-578. Ed: Oxford University Press.
120. Kurz, Fujinami. Immune response to viral infection in Virus and Bone Marrow. 1994
121. Walker RE, Lane HC. Interferon- $\alpha$  in HIV Infection in de Vita ed *AIDS: etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention* 1992, JB Lippincott.
122. Lane HC et al. Interferon- $\alpha$  in patients with asymptomatic human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Int Med* 1990; 112(11): 805-811
123. Krown SE. Interferon and other biologic agents for the treatment of Kaposi's Sarcoma. *Hematology/Oncology Clin NorAm* 1991; 5(2): 311-322.
124. Ho DD et al. Recombinant interferon alfa-A suppresses HTLV-III replication in vitro. *Lancet* 1985; 1: 602-604.
125. Buimovivi-Klein E, Lange M, Klein RJ et al. Long-term follow-up of serum- interferon and its acid stability in a group of homosexual men. *AIDS Res* 1986; 2: 99.
126. Preble OT, Rook AH, Steis R et al. Interferon-induced 2',5'-oligoadenylate synthetase during interferon alpha therapy in homosexual men with Kaposi's sarcoma. Marked deficiency in biochemical response in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *J Inf Dis* 1985; 152: 457.

127. Edlin BR et al. In-vitro resistance to zidovudine and alpha-interferon in HIV isolates from patients: Correlations with treatment duration and response. *Ann. Int. Med* 1992; 117: 437-460.
128. Poli G, Orenstein JM, Kinter et al. Interferon-alpha but not AZT suppresses HIV expression in chronically infected cell lines. *Science* 1989; 244: 575.
129. Spiegel RJ. The alpha-interferons: Clinical overview. *Semin Oncol* 1987; 14 (suppl 2): 1.
130. Brockmeyer NH, Keller A, Seemann U et al. Two Year Double-blind Randomized Trial of Zidovudine Alone or in Combination with Low Dose Interferon- Alpha or Interferon-Beta; resumo P248 - 4th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection, Milão. Março 94
131. Kaiser G, Jaeger H, Birkmann J, Poppinger J et al. Low-dose oral natural interferon-a in 29 patients with HIV infection: a double-blind, randomized, placebo- controlled trial. *AIDS* 1992; 6: 563-569.
132. de-Gorgolas M, Castrillo JM, Fernandez-Guerrero ML et al. Visceral Leishmaniasis in patients with AIDS: report of three cases treated with INF gamma. *Clin Inf Dis* 1993;17(1):56-58
133. McMahon DK et al. A phase I study of subcutaneous recombinant interleukin-2 in patients with advanced HIV disease while on zidovudine. *AIDS* 1994; 8: 59-66.
134. Wood R, Montoya JG, Kundu SK et al. Safety and efficacy of polyethylene glycol-modified interleukin -2 and zidovudine in human immunodeficiency virus type 1 infection: a phase I/II study. *J Inf Dis* 1993; 167(3): 519-525.
135. Kovacs J, Baseler M, Dewar R, et al. Increases in CD4 T Lymphocytes with Intermittent Courses of Interleukin-2 in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection. *N Engl J Med* 1995; 332: 567-575.
136. Klimas N, Patarca R, Walling J, et al. Clinical and Immunological Changes in AIDS Patients following Adoptive Therapy with Activated Autologous CD8 T-Cells and Interleukin-2 Infusion. *AIDS* 1994; 8: 1073-1082.
137. Lahdevirta J, Maury CPJ, Teppo AM et al. Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 1988; 85: 289-291.
138. Dezube BJ, Pardee AB, Chapman B et al. Pentoxifylline (Trental) decreases tumor necrosis factor (TNF) and HIV replication in patients with AIDS. VII International Conference on AIDS, Amsterdam 1992 (Abstract MoB0019).
139. Johnston MI, Hoth DF. Present status and future prospects for HIV therapies. *Science* 1993; 260: 1286-1293.
140. Mitsuyasu R. Cytokine Therapies for HIV Infection. Comunicação oral 16.1. 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
141. Goldstein D, Tomkinson E, Couldwell D, et al. Phase I AIB Trial, of Imiquimod, an Oral Interferon Inducer in Asymptomatic HIV Positive Individuals. Comunicação oral 16.2, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection, Novembro 1994.
142. Bridges S, Sarver N. Gene Therapy and Immune Restoration for HIV Disease. *Lancet* 1995; 345: 427-432.
143. Rhodes A, James W. Inhibition of heterologous strains of HIV by antisense RNA. *AIDS* 1991; 5: 145-152.
144. Boyd MT, Schulz TF. Antisense RNA to treat HIV infections. *AIDS* 1991; 5: 225-226
145. Sereni D, Katlama C, Gouyette A, et al. Phase I Study of Single Intravenous and Subcutaneous Ascending Doses of GEM 91 in HIV Positive Asymptomatic Volunteers. Poster 57, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
146. Echetebe C, Rhim H, Herrmann C, et al. Construction and Characterization of a Potent HIV-2 Tat Transdominant Mutant Protein. *J AIDS* 1994; 7: 655-664.
147. Van Luzen J, Schmitz J, Dewgler K, et al. High Yields of CD4+ and CD8+ T- Lymphocytes can be Obtained by Lymphapheresis an ex vivo Propagation for Autologous Adoptive Immunotherapy of HIV Infection. Poster 44, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
148. Van Lunzen J, Schmitz T, Dengler K, et al. High Yields of CD4+ and CD8+ T- Lymphocytes Can Be Obtained by Lymphapheresis and Ex vivo Propagation for Autologous Adoptive Immunotherapy of HIV-Infection; resumo 048 - 4th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection, Milão. Março 1994.
149. Sandstrom E. Therapeutic Vaccines. Comunicação oral 15.2, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection, Novembro 1994.
150. Bix D, Redfield R. Therapeutic HIV Vaccines: Concept, Current Status, and Future Directions. In: *Textbook of AIDS Medicine*; 1994: 693-711. Ed. Williams & Wilkin.
151. Lederman M. Host-Directed and Immune-Based Therapies for Human Immunodeficiency Virus Infection. *Ann Intern Med* 1994; 121: 218-222.
152. Wahren B, Persson C, Levi M, et al. Changing T-Cell Immunity in HIV. Vaccination. Comunicação oral 15.3, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
153. Girard MP, Shearer GM. Vaccines and immunology: Overview. *AIDS* 1993; 7(sup.1): S115-S116.
154. Clerici M. Cell mediated immunity in HIV infection. *AIDS* 1993; 7(sup. 1): S135- S140.
155. Fast PE, Walker MC. Human trials of experimental AIDS vaccines. *AIDS* 1993; 7(sup. 1): S147-S160.
156. Sneller MC, Immunologic approaches to the therapy of HIV- 1 infection. *Ann NY Acad Science* 1993; 685: 687-696.
157. Adams SE, Paoletti E. Use of new vectors for the development of vaccines. *AIDS* 1993; 7(sup 1): S141-S146.
158. Haynes BF. Scientific and social issues of human immunodeficiency virus vaccine development. *Science* 1993; 260: 1279-1286.
159. Wahren B, Bratt G, Rensson C, et al. Improved Cell-Mediated Immune Responses in HIV-1 Infected Asymptomatic Individuals after Immunization With Envelope Glycoprotein gp160. *J AIDS* 1994; 7: 220-229.
160. Peters B, Cheingsong-Popov R, Donegan D, et al. A Pilot Phase II Study of the Tolerance and Safety of HIV p17/p24:Ty-VLP ((p24-VLP) in Asymptomatic HIV Seropositive Subjects. Comunicação oral 15.4, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
161. Bratt G, Ericksson L, Sandstrom E et al. A 25 Months report on a Study of GP160 Vaccine in Asymptomatic HIV Carriers; resumo P308 - 4th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection, Milão - Março 94
162. Biselli R, Loomis L, Bono V, et al. Immunization of HIV-1 Infected Patients with RGP160: Modulation of Anti-RGP120 Antibody Spectrotype. *J AIDS* 1994; 7: 1016- 1024
163. Pontesilli O, Alario C, Carlesimo M et al. Immunological Assessment of Recipients of Immunotherapy with Recombinant GP160, in Association or not with AZT; resumo P310 - 4th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection, Milão - Março 94
164. Sutor GC, Lang S, Jurkiewicz E et al. Anti-CD4 Idiotype Vaccination in Early stage HIV Disease; resumo 049 - 4th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection, Milão - Março 94

165. Sutor G-C, Lang S, Jurkiewics E, et al. Anti-CD4 Idiotype Vaccination in HIV Disease. Poster 115, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection, Novembro 1994.
166. Ziegner U, Peters G, Jolly D, et al. Cytotoxic T-Lymphocyte Induction in HIV- 1 Infected Asymptomatic Patients Immunized with Retrovector-transduced Autologous Fibroblasts Expressing HIV-IIIIB Env/rev Proteins. AIDS 1995; 9: 43-50.
167. Sarobe P, Lasarte J, Golvano J, et al. Induction of Neutralizing Antibodies Against Human Immunodeficiency Virus Type I Using Synthetic Peptide Constructs Containing an Immunodominant T-Helper Cell Determinant from vpr. J AIDS 1994; 7: 835-840.
168. Cooper D. Clinical implications of combination therapy. Personal communication at Aspects of Antiviral Combination Therapy in HIV Management; Mar 1993; Vienna
169. Fiddian AP. Future Combinations Regimens. Personal communication at Aspects of Antiviral Combination Therapy in HIV Management; Mar 1993; Vienna
170. Sande M. Wich Antiviral and When?. Comunicação oral 3 . 1 , 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection, Novembro 1994.
171. Fischl M. Efficacy and Toxicities of Combination Antiretroviral Therapies. Comunicação oral 7.2, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection, Novembro 1994.
172. Harrigan P, Kemp S, Kinghom I, et al. A Placebo Controlled Trial of AZT Alone or in Combination With ddI or ddC: Viral Load and Drug Resistance. Poster 7, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
173. Montaner Julio S, Srour L, et al. The Short-Term Safety and laboratory Marker Effect of ZDV+ddI vs. ZDV+ddC in Subjects with CD4 Cells 50-350/uL. A Randomised Comparative Trial with an Open Arm. Poster 24, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
174. Wainberg M, Montaner J, Rachlis A, et al. Long Term Follow-up of a Double Blind Study of ddI versus Continued AZT Among Individuals with CD4s 200- 500/mm<sup>3</sup>. Poster 25, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection, Novembro 1994.
175. Mauss S, Armbrrecht C, Adams O, et al. Efficacy and Tolerance of ddI+ZDV versus ddC+ZDV in Patients with Rapid Progression of HIV Infection under treatment with ZDV. Poster 27, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection, Novembro 1994.
176. Gensollen S, Mars M, Bongrand M, et al. A Comparative Trial Between AZT+ddI and Maintenance of AZT or ddI in HIV Infected Patients. Poster 28, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection, Novembro 1994.
177. National Institute of Allergy and Infectious Diseases: ACTG 155, Executive Summary: The Effectiveness of AZT Alone, ddC Alone or AZT/ddC Combination Is Similar Overall for Patients with HIV Advanced Disease, Junho 1993.
178. Fischl M, Stanley K, Collier A, et al. Combination and Monotherapy with Zidovudine and Zalcitabine in Patients with Advanced HIV Disease. Ann Int Med 1995; 122: 24-32.
179. Skowron G, Bozzette SA, Lim L et al. Alternating and intermittent regimens of zidovudine and dideoxycytidine in patients with AIDS or AIDS-related complex. Ann Int Med. 1993;118:321-1330.
180. Yarchoan R et al. A randomized pilot study of alternating or simultaneous zidovudine and didanosine therapy in patients with symptomatic human immunodeficiency virus infection. J Infect Dis, 1994;169:9-17.
181. Graham N, Saah J, Park L, Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). Survival in ZDV-Experienced Patients: Combination Antiretroviral Therapy Vs. ddI/ddC Monotherapy Vs. Continued ZDV Monotherapy. Comunicação oral 7.4, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection, Novembro 1994.
182. Spruance SL, Pavia AT, Peterson D et al. Didanosine compared with continuation of zidovudine in HIV-infected patients with signs of clinical deterioration while receiving zidovudine. Ann Int Med. 1994; 120: 360-368.
183. Kahn JO, Lagakos SW, Richman DD et al. A controlled trial comparing continued zidovudine with didanosine in human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med 1992; 327: 581-587.
184. Collier AC et al. Combination therapy with zidovudine and didanosine compared with zidovudine alone in HIV-1 infection. Ann.Int. Med. 1993; 119: 786-793.
185. Fischl MA, Olson RM, Follansbe SE et al. Zalcitabine compared with zidovudine in patients with advanced HIV-1 infection who received previous zidovudine therapy. Ann Int Med 1993; 118: 762-769.
186. Meng TC et al. Combination therapy with zidovudine and dideoxycytidine in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. Ann Int Med 1992; 116: 13-20.
187. Schooley R and The Wellcome Resistance Study Collaborative Group. Trial of ZDV/DDI VS ZDV/DDC VS ZDV in HIV Infected Patients With CD4 Cell Counts Less Than 300: Preliminary Results; resumo 052 - 4th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection, Milão. Março 1994.
188. Mauss S, armbrrecht C, Adams O et al. Combination Therapy DDI + ZDV VS. DDC + ZDV in Patients With Rapid Progression of HIV Infection Under Treatment With ZDV; resumo 038 - 4th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection. Milão. Março 1994.
189. Désormeaux A, Harvie P, Perron S, et al. Antiviral Efficacy, Intracellular Uptake and Pharmacokinetics of Free and Liposome-encapsulated 2',3'-dideoxyinosine. AIDS 1994; 8: 1545-1554.
190. Makabi-Panzu B, Lessard C, Beauchamp D, et al. Uptake and Binding of Liposomal 2',3' Dideoxycytidine by Raw 264.7 Cells: A Three-Step Process. J AIDS 1995; 8: 227-235.
191. Carr A, Vella S, de Jong M et al. Nevirapine Added to Zidovudine in Nucleoside Experienced p24 Positive Patients Compared with Continued Zidovudine Monotherapy. resumo P269 - 4th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection. Milão. Março 1994.
192. Cheeseman S, Havlir D, McLaughlin M, et al. Phase I/II Evaluation of Nevirapine Alone and in Combination with Zidovudine for Infection with Human Immunodeficiency Virus. J AIDS 1995; 8: 141-150.
193. Larder BA. 3'-Azido-3'-deoxythymidine resistance suppressed by a mutation conferring human immunodeficiency virus type 1 resistance to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother. 1992; 36(12): 2664-2669.
194. Katlama C, The European Lamivudine HIV Working Group. Combination 3TC (Lamivudine)/ZDV (Zidovudine) Vs. ZDV Monotherapy in ZDV-naive HIV- 1 Positive Patients With CD4 Cells 100-400/ml. Comunicação oral 7.5, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
195. Staszewski S, The European Lamivudine Working Group. Combination 3TC (Lamivudine)/ZDV (Zidovudine) Vs. ZDV Monotherapy in ZDV Pre-treated HIV-1 Positive Patients With CD4 Cells 100-400/ml. Comunicação oral 7.6, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.

196. Harrigan P, Kemp S, Kinghorn I, et al. Antiviral Potency of AZT + 3TC Combination Therapy in vivo Supports in vitro Virological Observations. Poster 8, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
197. Rusconi S, Merrill DP, Mazzulli T et al. Inhibition of Viral Replication in HIV-1 Infected Monocyte/Macrophages by Combination Therapies, resumo 047 - 4th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection. Milão. Março 1994.
198. Mazzotti R, Di Toro MT. Tolerance and Efficacy of Zidovudine and Interferon- Alpha 2b in HIV Infected Patients, resumo P3 15 - 4th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection. Milão. Março 1994.
199. Aembrecht C, Mauss S, Manegold C et al. Combination Therapy with Zidovudine and Low dose Alpha-Interferon in HIV Seropositive Patients; resumo P249 - 4th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection. Milão. Março 1994.
200. Krown SE et al. Interferon-alfa with zidovudine: safety, tolerance and clinical and virological effects in patients with Kaposi sarcoma associated with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Ann Int Med* 1990; 112: 812-821.
201. Edlin BR et al. Zidovudine alpha interferon combination therapy in patients with advanced HIV infection: biphasic response of p24 antigen and quantitative PCR. *J Infect Dis.* 1992; 165: 743-748.
202. Barbarini G, Grisorio B, Garavelli G, et al. Zidovudine plus Thymostimulin: a Controlled Study on 200 Asymptomatic HIV+ Subjects. Poster 23, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
203. Maggiolo F, Taras A, Pravettoni MG et al. Preliminary Experience With THF in HIV Positive Patients, resumo P3 11 - 4th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection. Milão. Março 1994.
204. Mauro S, Cariti G, Comito G, et al. AZT + Timopentine Versus AZT in Asymptomatic at High Risk of developing AIDS (AR); resumo P312 - 4th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection. Milão. Março 1994.
205. Dinatale F, Ferraro G, Guerri M et al. Zidovudine VS. Zidovudine- Thymostimulin Association in the Treatment of HIV Infected Patients; resumo P313 - 4th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection. Milão. Março 1994.
206. Luke DR, McCreedy BJ, Sarnosky TP et al. Phase I/II study of pentoxifylline with zidovudine on HIV-1 growth in AIDS patients. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1993; 31(7): 343-350.
207. Pilsudski R, Aiuti F, Pontesilli O et al, Evaluation of the Effects of Active Immunotherapy with Recombinant GP 160 in Association or not with AZT, in HIV- Infected Individuals with CD4+ Counts > 400 and < 600 cells/mm<sup>3</sup>; resumo P309 - 4th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection. Milão. Março 1994.
208. Goldstein G, Conant M, Beall G, et al. Safety and Efficacy of Thymopentin in Zidovudine (AZT)-treated Asymptomatic Subjects with 200-400 Cells/ml: A Double- Blind Placebo-Controlled Trial. *J AIDS* 1994; 8: 279-288.
209. Meng T-C, Fischl M, Cheeseman S, et al. Combination Therapy with Recombinant Human soluble CD4-Immunoglobulin G and Zidovudine in Patients with HIV Infection: A Phase I Study. *J AIDS* 1995; 8: 152-160.
210. Griffiths P. Cofactors and Mechanisms of Action. Personal communication at Aspects of Antiviral Combination Therapy in HIV Management. Vienna. Março 1993.
211. Gazzard B, Cooper D, Stevens J, et al. The Effect of Acyclovir Cotherapy on survival in Advanced HIV Disease. Comunicação oral 17.2, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
212. Stein D, Graham N, Park L, et al. The Effect of the Interaction of Acyclovir with Zidovudine on Progression to AIDS and Survival, (Analysis of the Data in the Multicenter AIDS Cohort Study). *Ann Int Med* 1994; 121: 100-108.
213. Malley S, Grange J, Hamed-Sangari F, et al. Suppression of HIV Production in Resting Lymphocytes by Combining Didanosine and Hydroxamate Compounds. *Lancet* 1994; 343: 1292.
214. Lori F, Malykh A, Cara A, et al. Hydroxyurea as an Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus-Type 1 Replication. *Science* 1994; 266: 801-805.
215. Johnson VA. New Developments in Antiretroviral Therapy for HIV Infection, pag: 82-86, in Volberding and Jacobson ed. *AIDS Clinical Review* 1992.
216. Schooley R. Therapy: new developments. *European AIDS Treatment News* 1994; 2(5): 7-9.
217. Chow YK, Hirsch MS, Merrill DP et al. Use of evolutionary limitations of HIV-1 multidrug resistance to optimize therapy. *Nature* 1993; 361(6413): 650-654.
218. Richman D. HIV Drug Resistance. Comunicação oral 3.2, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
219. Larder B. The Influence of Combination Therapy on HIV-1 Viral Load and Drug Resistance. Comunicação oral 5.1, 2nd International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Novembro 1994.
220. Yarchoan R, Mitsuya H, Broder S. Challenges in the Therapy of HIV Infection. *Immunology Today* 1993; 14: 303-309.
221. Havlir D, Richman D. Antiretroviral Therapy. *Current Opinion in Infectious Diseases* 1995; 8: 66-73.
222. Sachs M. Antiretroviral Chemotherapy of Human Immunodeficiency Virus Infections Other Than with Azidothymidine. *Arch Intern Med* 1992; 152: 485-499.
223. Johnson VA et al. Two drug combinations of zidovudine, didanosine and recombinant interferon-alfa. A inhibit replication of zidovudine resistant human immunodeficiency virus type 1 synergistically in vitro. *J. Inf Dis.* 1991; 164: 646-655.