

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

Juliana Cristina da Silva

**“ESTUDO DAS ALTERAÇÕES LINFOCITÁRIAS CD4/CD8 E
CARGA VIRAL EM PACIENTES CO-INFECTADOS
HIV/*Mycobacterium tuberculosis* ASSOCIADAS A FREQUÊNCIA
DE MUTAÇÕES NA REGIÃO *POL* DO HIV-1.”**

ARARAQUARA

2007



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA



II

Juliana Cristina da Silva

**“ESTUDO DAS ALTERAÇÕES LINFOCITÁRIAS CD4/CD8 E CARGA VIRAL
EM PACIENTES CO-INFECTADOS HIV/*Mycobacterium tuberculosis*
ASSOCIADAS A FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES NA REGIÃO *POL* DO HIV-1”**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Campus de Araraquara, como pré-requisito para obtenção do título de mestre.

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO INÁCIO DA COSTA

ARARAQUARA

2007

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, **Francisco Ferreira da Silva** (*in memorian*) e **Maria José da Silva**, por todo amor, carinho, atenção, dedicação, compreensão e incentivo em cada passo da minha vida.

Ao meu querido irmão **Daniel Leonardo da Silva** (*in memorian*) pelo amor, carinho e companheirismo que sempre me dedicou.

Aos meus adoráveis amigos, aqueles de coração, pelo apoio, compreensão e conforto fornecidos nos momentos em que mais precisei.

E a uma pessoa muito querida, Elcy, pelo seu companheirismo e força nos momentos mais difíceis da minha vida e por todo seu carinho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa pela orientação, apoio,
confiança e amizade sempre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente á DEUS.

Aos meus verdadeiros amigos, Fabiana Cristina Donofrio, Ana Paula Munhoz, Ângela Yumico Mikawa e Oedem Paulo de Almeida Junior pela alegria da amizade, colaboração, carinho e incentivo, acima de tudo.

As minhas amigas de laboratório: Ana Cláudia, Luciana, Marisa, Ana Carolina e Michele Rocha pela ajuda, amizade e contribuição para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Virologia: Milton e Keila, que muito me ajudaram na elaboração desse trabalho.

Ao corpo clínico, enfermagem e assistentes do Serviço Especial de Saúde de Araraquara / SESA e do Hospital Nestor Goulart Reis de Américo Brasiliense, por todo o apoio e colaboração que prestaram.

Á Dr. Rosângela Rodrigues e a Cristina, do Laboratório de Retrovirologia do Instituto Adolfo Lutz / SP, pela atenção e carinho que me receberam e muito contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos meus pacientes que contribuíram diretamente para esse trabalho.

A professora Cleni, pelo carinho, amizade e atenção de sempre.

As minhas novas amigas do SESA: Marisa e Evaine.

Às meninas da portaria Angélica, Lúzia, Márcia e Rita pela amizade e carinho.

Aos docentes, pelos ensinamentos, ajuda e carinho.

Aos funcionários da Seção de Pós Graduação e Biblioteca, pela amizade e atenção.

À FAPESP, pela bolsa de mestrado concedida.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, agradeço de coração.

MUITO OBRIGADA!

**Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara.
Recebeu apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do
Estado de São Paulo – Processo: 05/52932-8).**

LISTA DE ABREVIATURAS

HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
ARV	Anti-retroviral
cDNA	DNA complementar
LTR	Long Terminal Repeat
ITRN	Inibidores da Transcriptase Reversa nucleosídeos
ITRNN	Inibidores da Transcriptase Reversa não nucleosídeos
IP	Inibidores da Protease
AZT	Zidovudina
3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
ddl	Didanosina
TDF	Tenofovir
d4T	Estavudina
EFV	Efavirenz
NVP	Nevirapina
ATV	Atazanavir
LPV	Lopinavir
RMP	Rifampicina
INH	Isoniazida
PZA	Pirazinamida
APV	Amprenavir
IDV	Indinavir
NFV	Nelfinavir
RTV	Ritonavir
SQV	Saquinavir
TCLE	Termo de Esclarecimento Livre e Esclarecido
FITC	Isotiocianato de Fluorescêina
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína Clorofilada de Peridina
TR	Transcriptase Reversa
PT	Protease

LISTA DE GRÁFICOS

1. Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo A e medianas das contagens de Linfócitos T CD4.	35
2. Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo A e medianas das contagens de Linfócitos T CD8.	35
3. Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo A e medianas das dosagens de Carga viral plasmática.	36
4. Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo B e medianas das contagens de Linfócitos T CD4.	37
5. Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo B e medianas das contagens de Linfócitos T CD8.	38
6. Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo B e medianas das dosagens de Carga viral plasmática.	38
7. Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo C e medianas das contagens de Linfócitos T CD4.	40
8. Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo C e medianas das contagens de Linfócitos T CD8.	40
9. Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo C e medianas das dosagens de Carga viral plasmática.	41
10. Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo D e medianas das contagens de Linfócitos T CD4.	42
11. Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo D e medianas das contagens de Linfócitos T CD8.	42
12. Perfil das medianas entre as variáveis CD4/CD8 nos grupos.	43
13. Perfil das medianas quanto à Carga viral Plasmática nos grupos analisados.	43
14. Frequência dos códons encontrados para a região da Transcriptase Reversa do HIV-1 no grupo A.	60
15. Frequência das mutações associadas à resistência para os Inibidores da Transcriptase Reversa no Grupo A.	61
16. Frequência dos códons encontrados para a região da Protease do HIV-1 no grupo A.	63
17. Frequência dos códons encontrados para a região da	63

Transcriptase reversa do HIV-1 no grupo C.

- | | |
|--|------------|
| 18. Frequência dos códons encontrados para a região da Protease do HIV-1 no grupo C. | 64 |
| 19. Perfil das frequências dos polimorfismos encontrados para a região da Protease entre os grupos. | 66 |
| 20. Perfil das frequências dos polimorfismos para a região da Transcriptase reversa nos grupos. | 67 |
| 21. Perfil dos pacientes do grupo A quanto a contagem de Linfócitos T CD4 no decorrer das três coletas. | 105 |
| 22. Perfil dos pacientes do grupo A quanto a contagem de Linfócitos T CD8 no decorrer das três coletas. | 105 |
| 23. Perfil dos pacientes do grupo A quanto a dosagem Carga Viral no decorrer das três coletas. | 106 |
| 24. Perfil dos pacientes do grupo B quanto a contagem de Linfócitos T CD4 no decorrer das três coletas. | 106 |
| 25. Perfil dos pacientes do grupo B quanto a contagem de Linfócitos T CD8 no decorrer das três coletas. | 107 |
| 26. Perfil dos pacientes do grupo B quanto a Carga Viral no decorrer das três coletas. | 107 |
| 27. Perfil dos pacientes do grupo C quanto a contagem de Linfócitos T CD4 no decorrer das três coletas. | 108 |
| 28. Perfil dos pacientes do grupo C quanto a contagem de Linfócitos TCD8 no decorrer das três coletas. | 108 |
| 29. Perfil dos pacientes do grupo C quanto a dosagem da Carga Viral no decorrer das três coletas. | 109 |
| 30. Perfil de pacientes do grupo D quanto a contagem de Linfócitos T CD4 no decorrer das três coletas. | 109 |
| 31. Perfil de pacientes do grupo D quanto a contagem de Linfócitos T CD8 no decorrer das três coletas. | 110 |
| 32. Perfil dos pacientes do grupo D quanto a dosagem da Carga Viral no decorrer das três coletas. | 110 |

LISTA DE QUADROS

1. Reação de PCR para a região <i>pol</i> do HIV-1	28
2. Reação de PCR para as regiões da RT e PT	29
3. Protocolo de sequenciamento para a região da Transcriptase reversa	31
4. Protocolo de sequenciamento para a região da Protease	31
5. Níveis de resistência para IP/ITRN/ITRNN no grupo A	72
6. Níveis de resistência para IP e ITRN/ITRNN no grupo C	73
7. Seqüências de primers utilizados para a realização do PCR e Sequenciamento.	91

LISTA DE FIGURAS

1. Estrutura do HIV-1	4
2. Esquema Ilustrativo do Ciclo Viral do HIV-1	6
3. Estrutura genômica do HIV-1	7
4. Locais de ação dos anti-retrovirais no vírus HIV-1	11
5. Perfil em gel de agarose 1% das bandas amplificadas por PCR a partir do cDNA-HIV	51
6. Perfil em gel de agarose 1% das bandas purificadas por PCR a partir do cDNA-HIV.	52
7. Alinhamento das seqüências nucleotídicas (Subtipo B) para a região da Transcriptase Reversa nos grupos analisados	101
8. Alinhamento das seqüências nucleotídicas (Subtipo B) para a região da Protease nos grupos analisados.	104
9. Alinhamento das seqüências de aminoácidos referentes ao Subtipo B para a região da Transcriptase Reversa no grupo A, e identificação das mutações e polimorfismos encontrados. Amarelo – mutação relacionada a ITRN; Vermelho – mutações relacionadas	55

a ITRNN; Verde – polimorfismos; X – quando surge 2 ou + aminoácidos.

10. Alinhamento das seqüências de aminoácidos referentes ao Subtipo B e Subtipo F para a região da Transcriptase Reversa no Grupo C, e identificação das mutações e polimorfismos encontrados. Amarelo – mutação relacionada a ITRN; Vermelho – mutações relacionadas a ITRNN; Verde - polimorfismos; X – quando surge 2 ou + aminoácidos. **56**

11. Alinhamento das seqüências de aminoácidos referente ao subtipo B para a região da Protease no grupo A, e identificação das mutações e polimorfismos encontrados. Amarelo – mutação relacionada á resistência; Azul – polimorfismos; X – quando surge 2 ou + aminoácidos **57**

12. Alinhamento das seqüências de aminoácidos referente aos Subtipo B e Subtipo F para a região da Protease no grupo C, e identificação das mutações e polimorfismos encontrados. Amarelo – mutação relacionada á resistência; Azul – polimorfismos; X – quando surge 2 ou + aminoácidos. **58**

LISTA DE TABELAS

1. Grupo de pacientes quanto a clínica e sexo	34
2. Associação terapêutica para o HIV no Grupo A	36
3. Associações terapêuticas para co-infectados	39
4. Variação de linfócitos T CD4 nos diferentes grupos	45
5. Variação da Carga Viral plasmática nos diferentes grupos	45
6. Perfil imunológico e virológico dos grupos frente ao esquema terapêutico	46
7. Perfil da carga viral dos pacientes selecionados nas 3 coletas	50
8. Perfil de mutações do grupo A para Transcriptase Reversa	92
9. Perfil de mutações do grupo A para Protease	94
10. Perfil de mutações do grupo C para Transcriptase Reversa	95
11. Perfil de mutações do grupo C para Protease	96
12. Frequência das posições relacionadas á resistência para os pacientes do Grupo A	62
13. Perfil das mutações frente ao tratamento adotado para o grupo A	68
14. Perfil das mutações frente ao tratamento adotado para o grupo C	71

RESUMO

Com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) em 1981, observou-se tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento um aumento do número de casos notificados de Tuberculose, principalmente em indivíduos infectados pelo HIV. Como agravante nos casos de co-infecção, existe a resistência aos anti-retrovirais, e uma das principais razões é a grande variabilidade genética do HIV. A genotipagem do HIV tornou-se uma ferramenta essencial para orientar e maximizar os benefícios do tratamento anti-retroviral dos pacientes HIV positivos. Neste estudo, pretendeu-se avaliar em um período de 6 meses os perfis imunológico e viral associados à frequência de mutações no gene “*pol*” do HIV-1 em pacientes co-infectados HIV-Tuberculose. A casuística compreendeu 33 indivíduos de ambos os sexos e faixa etária entre 12 e 63 anos. Quatro grupos foram estudados: Grupo A (n=19) HIV tratando com anti-retroviral; e co-infectados: Grupo B (n=7) tratando com anti-retroviral; Grupo C (n=4) tratando com tuberculostático e Grupo D (n=3) tratando com anti-retroviral e tuberculostático. O perfil imunológico foi avaliado pela determinação quantitativa de fenótipos CD3/CD4 e CD3/CD8 de linfócitos do sangue periférico; perfil viral foi determinado pela quantificação da viremia RNA-HIV-plasmática; e os polimorfismos na região genômica “*pol*” avaliado pelo sequenciamento de cDNA. No entanto, na avaliação das contagens de Linfócitos T CD4/CD8 realizada para comparar os grupos foi notada uma tendência de redução das medianas no grupo D, pacientes que realizam tratamento duplo. Os demais grupos apresentaram um perfil imunológico satisfatório ($CD4 > 400$ células/ μ l) e a relação CD4/CD8 mantida inferior a 1.0. Dentre esses, o grupo que melhor apresentou perfil imunológico foi o constituído por indivíduos co-infectados realizando tratamento somente com anti-retroviral, e quanto ao perfil viral, todos os grupos apresentaram baixa viremia plasmática (mediana < 25000 cópias/ml), e sendo encontrada dosagens sempre abaixo dos limites detectáveis nos grupos co-infectados tratando somente com anti-retroviral e tratamento duplo. Pelo sequenciamento foi observado a presença de um maior número de polimorfismos no grupo somente com HIV (não co-infectados): 19% para TR (Transcriptase reversa) e 24% para PT (Protease). Na sequência predita da Transcriptase reversa, as substituições de aminoácidos mais encontradas foram nas posições R211K e I235T ($>7\%$); e 13 relacionadas à resistência, sendo as mais frequentes: M41L/D, E44A/D, D67N, M184V, L210W e T215T (paciente: 28,6%). Na sequência predita da Protease, as posições mais frequentes foram N37D/C/S e L63T/A/P ($>12\%$), e a posição L10V, como supostamente relacionada à resistência. No entanto, no grupo dos pacientes co-infectados foram encontradas 15% para TR e 18% para PT, sendo as substituições de aminoácidos mais frequentes na posição: I202V, R211K e F214L (8%) para a região da RT, e I15V (12%) para a PT, e também a posição L10LV (pacientes: 50%). Entre as comparações realizadas para ambos os grupos analisados foram observados a presença de posições comuns, sendo as mais frequentes para a região da RT: 211, e para a PT: 15 e 37.

Embora com número reduzido de pacientes, conclui-se que a co-infecção parece influenciar o número de Linfócitos T CD4 e manter sob equilíbrio o perfil viral, além de delimitar a frequência do número de polimorfismos influenciando na seleção de populações virais.

ABSTRACT

With the outbreak of the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) in 1981, it was observed both in developed countries and in developing countries an increase in the number of known cases of Tuberculosis, mainly in HIV infected individuals. As an aggravation in the co-infection cases there is the anti-retroviral resistance, and one of the main reasons is the HIV great genetic variability. The HIV genotyping became an essential tool to guide and maximize the benefits of the anti-retroviral treatment of positive HIV patients. In this study, it was intended to evaluate in a period of 6 months the immunology and viral profiles associated with the frequency of mutations in the HIV-1 "*pol*" gene in HIV-Tuberculosis co-infected patients. The study involved 33 individuals of both the sexes and ages between 12 and 63 years. Four groups were studied: Group A (n=19) HIV only under treatment with anti-retroviral drugs; and co-infected: Group B (n=7) under treatment with anti-retroviral drugs; Group C (n=4) under treatment with tuberculostatic drugs and Group D (n=3) under treatment with anti-retroviral and tuberculostatic drugs. The immunology profile was evaluated by quantitative determination of phenotype CD3/CD4 and CD3/CD8 of peripheral blood lymphocytes; viral profile was determined by quantification of the RNA-HIV-plasmatic viremia; and the polymorphisms in the "*pol*" genomic region were evaluated by sequencing of cDNA. The results were evaluated by non parametric "t" test and ANOVA and the demonstrated median showed that there was not significant difference ($p>0,05$) among the parameters of CD4/CD8 and viral load in the different studied groups. However, in the Lymphocyte counting evaluation the T CD4/CD8 carried out to compare the groups it was noticed a median reduction trend in group D, patients under double treatment. The other groups presented a satisfactory immunology profile ($CD4>400$ cells/ μ l) and the relation CD4/CD8 was kept below 1.0. Amongst these, the group that presented better immunology profile was the constituted by co-infected individuals only under treatment with anti-retroviral, and regarding the viral profile, all the groups presented low plasmatic viremia (median < 25000 copies/ml), and being found concentrations always below the detectable limits in the co-infected groups only treated with anti-retroviral and double treatment. By analyzing the sequencing it was observed the presence of a larger number of polymorphisms in the group only with HIV (not co-infected): 19% for TR (reverse Transcriptase) and 24% for PT (Protease). In the predicted sequence of the reverse Transcriptase, the amino acid substitutions mostly found were in positions R211K and I235T (>7%); and 13 related to the resistance, being the most frequent: M41L/D, E44A/D, D67N, M184V, L210W and T215T (patient: 28.6%). In the predicted sequence of the Protease, the most frequent positions were N37D/C/S and L63T/A/P (>12%), and position L10V, as supposedly related to the resistance. However, in the group of co-infected patients it was found 15% for TR and 18% for PT, being the amino acid substitutions most frequent in the positions of RT: I202V, R211K and F214L (8%) and for PT: I15V (12%), and also position L10LV (patients: 50%). Among the

comparisons carried out for both the analyzed groups it was observed the presence of common positions, being the most frequent for the region RT: 211, and for PT: 15 and 37. Although with reduced number of patients, we concluded that the co-infection seems to influence the number of Lymphocytes T CD4 and keep the viral profile balanced, besides delimiting the frequency of the number of polymorphisms influencing the selection of viral populations.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos da Co-infecção HIV/<i>M. tuberculosis</i>	7
2 JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivos específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Formação dos Grupos de estudo	18
4.2 Recrutamento dos pacientes	19
4.3 Caracterização dos grupos	19
4.4 Acompanhamento Laboratorial	20
4.5 Processamento das amostras	20
4.6 Metodologia utilizada	21
4.6.1 Tipagem de Linfócitos T CD4/CD8	21
4.6.1.1 Amostras	22
4.6.1.2 Valores de Referência	22
4.6.2 Determinação da Viremia Plasmática – RNA viral	22
4.6.2.1 Preparação dos Precipitados	23
4.6.2.2 Lise dos Precipitados	23
4.6.2.3 Montagem das Placas	24
4.6.2.4 Hibridização das sondas de captura e sondas alvo	24
4.6.2.5 Hibridização do pré-amplificador e da sonda amplificadora	25
4.6.2.6 Hibridização da sonda marcada	25
4.6.2.7 Detecção da Luminescência produzida	25
4.6.2.8 Análise dos dados	25

4.6.2.9 Valores de Referência	25
4.6.3 Extração de RNA viral para Sequenciamento	26
4.6.4 Retrotranscrição (cDNA) – <i>Home made</i>	27
4.6.5 PCR (Região <i>pol</i>)	27
4.6.6 Purificação das amostras amplificadas	30
4.6.7 Reação de Sequenciamento	30
4.6.8 Precipitação Pós-Sequenciamento em placa	32
4.6.9 Analisador Genético ABI Prism 3100 (Applied Biosystems)	32
5. MÉTODO DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	33
6. RESULTADOS	34
6.1 Análise Individual dos grupos	34
Grupo A	34
Grupo B	37
Grupo C	39
Grupo D	41
6.2 Relação entre os grupos	43
6.3 Avaliação da contagem de Linfócitos T CD4 e quantificação viral dentre os esquemas terapêuticos adotados nos grupos.	47
7. Critérios de inclusão para o Sequenciamento	49
7.1 Identificação das amostras de HIV para análise por Sequenciamento de DNA	53
7.2 Identificação dos pontos de polimorfismos encontrados nos grupos	59
7.2.1 Grupo A	59
7.2.2 Grupo C	63
7.3 Avaliação das frequências entre os Grupos avaliados	65

7.4 Avaliação das frequências segundo a terapêutica adotada	68
8. DISCUSSÃO	73
9. CONCLUSÕES	79
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
11. APÊNDICE	91

1.INTRODUÇÃO

A identificação, em 1981, da síndrome da imunodeficiência adquirida, habitualmente conhecida como AIDS, tornou-se um marco na história humana. A epidemia da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da AIDS representa um fenômeno global, dinâmico e instável, cuja forma de ocorrência nas diferentes regiões do mundo depende, entre outros determinantes, do comportamento humano individual e coletivo. A AIDS destaca-se entre as enfermidades infecciosas emergentes pela grande magnitude e extensão dos danos causados às populações e, desde a sua origem, cada uma de suas características e repercussões tem sido exaustivamente discutida pela comunidade científica e pela sociedade em geral. A epidemia de AIDS mostra-se bastante complexa e configura-se como verdadeiro mosaico de subepidemias regionais (BRITO, A. M.; *et. al.* 2000). Mundialmente, a AIDS causou a morte de mais de 3 milhões de pessoas até 2003, e há uma estimativa de que 5 milhões de pessoas adquiram o vírus HIV, elevando para 40 milhões o número de pessoas que vivem com esse vírus em todo o mundo. Na África subsaariana, a região mais severamente acometida em todo o mundo, foram relatados mais de 3 milhões de novas infecções e, aproximadamente, 2,3 milhões de mortes causadas pela AIDS. Há uma estimativa de que em todos os dias do ano de 2003, 14 mil pessoas no mundo foram infectadas pelo HIV (UNAIDS/WHO, 2003).

Desde o início da década de 80, até setembro de 2003, o Ministério da Saúde notificou 277.154 casos de AIDS no Brasil. Desse total, 197.340 foram verificados em homens e 79.814 em mulheres. No ano de 2003, foram notificados 5.762 novos casos da epidemia e, desses, 3.693 foram verificados em homens e 2.069 em mulheres, mostrando que, atualmente, a epidemia cresce mais entre as

mulheres. Outro dado não menos preocupante é a crescente incidência da AIDS em relação à faixa etária de 13 a 19 anos em adolescentes do sexo feminino. Tal fato é explicado pelo início precoce da atividade sexual em relação aos adolescentes do sexo masculino, normalmente com homens com maior experiência sexual e mais expostos aos riscos de contaminação por Doença Sexualmente Transmissíveis e pela AIDS. Quanto às principais categorias de transmissão, entre os homens as relações sexuais respondem por 58% dos casos, com maior prevalência nas relações heterossexuais, que é de 24% (DST/AIDS, 2003). Ao se analisar dados mais recentes de AIDS no Brasil, deve-se levar em consideração a possibilidade de atrasos nas notificações, sobretudo nos anos de 2004, 2005 e 2006. Dos 433.067 casos notificados de AIDS até junho de 2006 (63% a mais que em 2003), 269.910 casos (62,3%) se concentram na região Sudeste, 77.639 casos (17,9%) na região Sul, 47.751 casos (11%) no Nordeste, 24.086 casos (5,6%) no Centro-Oeste e 13.681 casos (3,2%) no Norte. As maiores taxas de incidência ainda se concentram na região Sul, porém com uma provável desaceleração do crescimento nos anos mais recentes. A região Sudeste se mantém num processo de estabilização. Do total de casos notificados 67,2% foram do sexo masculino (290.917 casos) e 32,8% do feminino (142.138 casos). A razão de sexos vem diminuindo sistematicamente, passando de 15,1 homens por mulher em 1986, para 1,5 homens por mulher em 2005. O maior número de casos encontra-se na faixa etária dos 20 aos 49 anos, representando 85,9% dos casos masculinos e 81,5% dos casos femininos. As taxas de incidência mostram que manteve-se a redução entre os casos masculinos de 13 a 34 anos, já que as maiores taxas foram observadas em 1997 e 1998, e havendo um ligeiro crescimento entre os casos femininos. Nos indivíduos acima dos 35 anos, as taxas de incidência continuam crescendo, bem mais evidente entre as

mulheres de 40 a 49 anos, passando de 17,9 por 100.000 habitantes em 1998 para 27,9 por 100.000 habitantes em 2003. (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO AIDS E DST, 2006).

O HIV-1 foi isolado em 1983 de pacientes com AIDS pelos pesquisadores Luc Montaigner, na França e Robert Gallo, nos EUA, recebendo os nomes de LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus* ou Vírus Associado à Linfadenopatia) e HTLV-III (*Human T-Lymphotropic Virus* ou Vírus T-Linfotrópico Humano tipo III) respectivamente em ambos países. Em 1986 foi identificado um segundo agente etiológico, também retrovírus, com características semelhantes ao HIV-1, denominado HIV-2. Porém, nesse mesmo ano um comitê internacional recomendou o termo HIV (*Human Immunodeficiency Virus* ou Vírus da Imunodeficiência Humana) para denominá-lo, reconhecendo-o como capaz de infectar seres humanos (COFFIN *et. al.*; 1986).

O HIV-1 é o tipo mais virulento e o principal responsável pela pandemia da AIDS, ao passo que o HIV-2 seja aparentemente menos patogênico e encontrado quase que exclusivamente no Oeste da África. (GRANT & CHOC, 2001). O HIV-1 apresenta uma enorme variabilidade genética, resultado de sua elevada taxa de mutação, responsável por originar inúmeras variantes ou subtipos. Essas variantes são diferenciadas através de análises que envolvem estudos das seqüências genéticas, principalmente de regiões que correspondam aos genes *gag*, *pol* e *env*. Assim, é possível subdividir o HIV-1 em três grupos: M (*main* ou *major*), O (*outlier*) e N (nem M, nem O). O grupo M engloba a maioria dos vírus HIV-1, com diversos subtipos associados (A1, A2, B,C, D, F1, F2, G, H, J e K) e formas recombinantes circulantes (CRFs) (ROBERTSON, *et al*, 2000).

Os retrovírus, pertencentes à família *Retroviridae* e subfamília *Lentivirinae*, são vírus de RNA que através da enzima DNA-polimerase RNA-dependente

(transcriptase reversa – RT) são capazes de copiar seu genoma de RNA em uma dupla fita de DNA e integrar-se ao genoma da célula hospedeira. O HIV é um vírus de aproximadamente 100 nm de diâmetro, envelopado, apresentando em sua superfície uma membrana lipídica oriunda da membrana da célula hospedeira, duas glicoproteínas (gp 41 e gp 120), uma matriz proteica, formada pela proteína p17 e o capsídeo viral de forma cônica composto pela proteína p24. Dentro do capsídeo viral encontram-se o tRNA e as enzimas necessárias para os primeiros eventos da replicação viral.

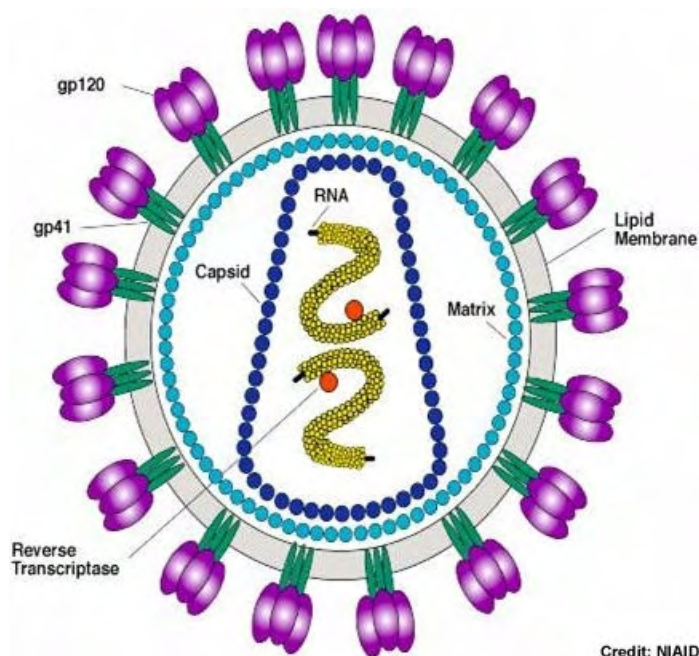


FIGURA 1 – Estrutura do HIV-1.

O início da infecção ocorre mediante a ligação da partícula viral, através das glicoproteínas de superfície gp41 e gp120 á receptores específicos na célula alvo. O principal co-receptor para o HIV-1 é o CD4, uma imunoglobulina (Ig) expressa na superfície de células T e macrófagos primários. No entanto, somente a interação gp120-CD4 não seria suficiente para promover a entrada do vírus na célula alvo, necessitando de receptores essenciais (quimiocinas) para o seu

reconhecimento. Para as duas maiores classes do HIV-1, as que apresentam tropismo por células T (T-trópicos) e as que apresentam tropismo por macrófagos (M-trópicos), diferem quanto a esses receptores envolvidos no reconhecimento viral, de modo que os vírus M-trópicos, que não possuem capacidade de formar sincícios, utilizam-se dos receptores CCR5 para a integração com a célula, enquanto que os T-trópicos, formadores de sincícios, necessitam dos receptores CXCR4 (PEÇANHA, E. P. *et. al.*; 2002).

A proteína gp120, após ligação á membrana celular, dissocia-se da gp 41, que passa por modificações conformacionais que promovem a fusão vírus-célula, permitindo a entrada do capsídeo viral na célula (LU, M. & KIM, P. S.; 1997). Após a fusão, o capsídeo viral rompe-se no citoplasma liberando o RNA genômico e enzimas virais, necessárias para a etapa da transcrição reversa. A transcriptase reversa (RT) promove a síntese de uma cópia de DNA de fita dupla, catalisando as reações de polimerização de DNA dependente de RNA e dependente de DNA, além de clivar a porção de RNA do híbrido RNA-DNA durante o processo. Um complexo nucleoproteico é transportado para o núcleo da célula hospedeira em um processo mediado pela *vpr*, onde através da ação de uma enzima denominada integrase, resultará numa integração estável do cDNA do genoma viral no DNA cromossômico (pró-vírus) (KATZ, R. A. & SKALKKA, A. M., 1994).

Uma vez que o pró-vírus esteja integrado no DNA hospedeiro, proteínas celulares e virais controlam a expressão gênica do HIV. Os RNAs virais transcritos são expressos a partir do promotor localizado 5' LTR e a proteína acessória *Tat* aumenta a velocidade de transcrição. O conjunto de RNAs transcritos são transportados para o citoplasma, onde serão traduzidos e constituirão novas partículas virais em um processo regulado pela *Rev*. Os vírions são montados próximo à membrana celular na forma de partículas imaturas

composta de um envelope glicoproteico, RNA genômico e poliproteínas virais. Após ou durante o “brotamento” as partículas virais passam por uma modificação morfológica conhecida como “maturação”, que consiste na clivagem das poliproteínas *gag* e *gag-pol* pela protease viral, produzindo enzimas e proteínas estruturais do capsídeo. O processamento das poliproteínas nos vírions completa o ciclo replicativo do HIV, de forma que os vírions maduros tornam-se capazes de infectar um linfócito adjacente (VAISHNAV, Y. N. & WONG-STAAAL, 1991) (PUGLISI, J. D. *et. al.*; 1992) (HOPE, T. J.; 1997) (GONDA, M. A. *et. al.*; 1985) (KAPLAN, A. H. *et. al.*; 1994).

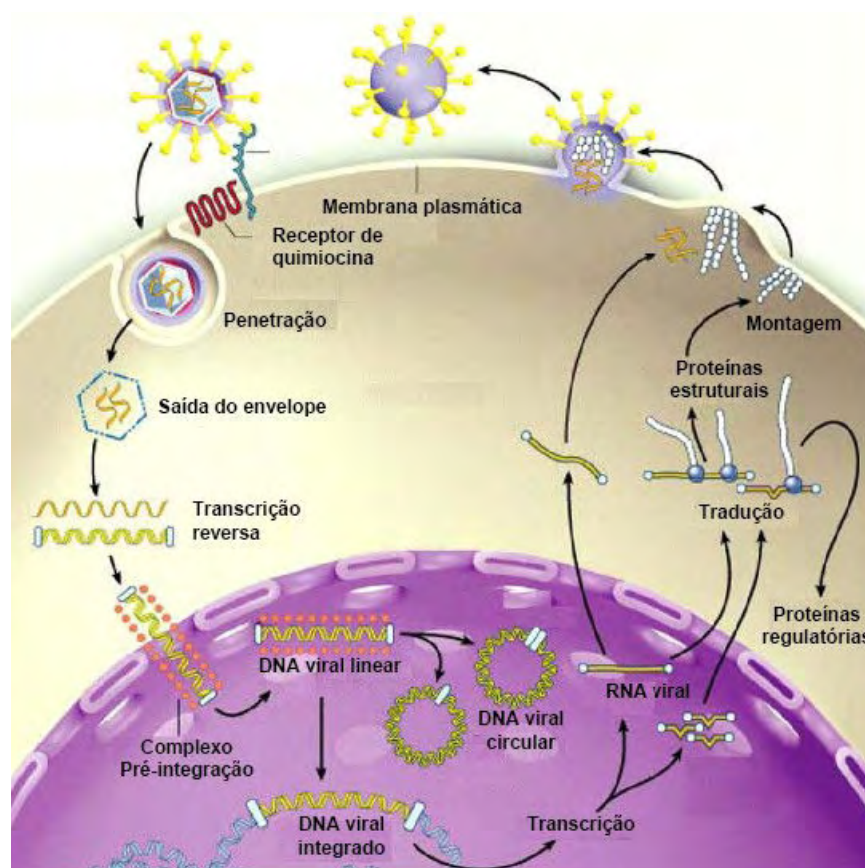


FIGURA 2- Esquema Ilustrativo do Ciclo Viral do HIV-1.

O genoma do HIV-1 é constituído de nove genes e duas regiões LTR (*Long Terminal Repeats*), onde estão presentes elementos de controle para integração,

transcrição e poliadenilação dos RNA mensageiros. Os genes podem ser divididos em dois grupos: os que codificam proteínas não-estruturais (*tat*, *nef*, *rev*, *vif*, *vpu*, *vpr*), e os que codificam proteínas estruturais (*gag*, *pol*, *env*).

O gene *gag* codifica a matriz proteica (MA ou p17), o capsídeo viral (CA ou p24) e as proteínas nucleares (NC ou p6 e p7). O gene *pol* (polimerase) codifica as enzimas transcriptase reversa (RT ou p51/p66) que também possui a atividade de Rnase H, a protease (PR ou p10) e a integrase (IN ou p32). O gene *env* (envelope) codifica uma proteína inicial de 160 Kd que é clivada, dando origem á proteína de transmembrana (TM ou gp41) e a proteína de superfície (SU ou gp120).

Os genes não-estruturais podem ser subdivididos em regulatórios (*tat* e *rev*) que são necessários para replicação viral *in vitro*, e os genes acessórios (*vif*, *vpu*, *vpr* e *nef*) não sendo essenciais.

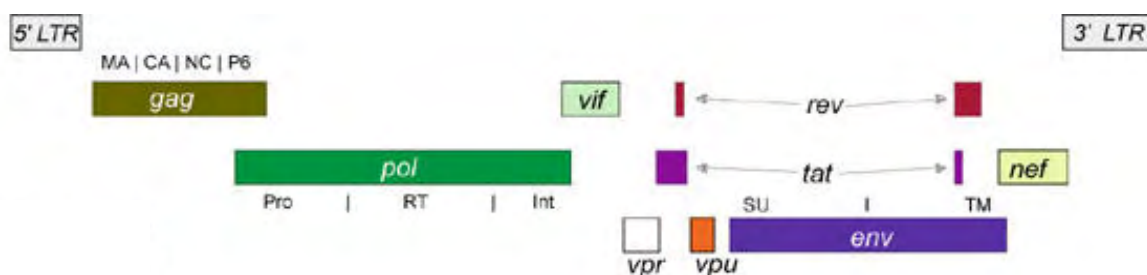


FIGURA 3 – Estrutura genômica do HIV-1 (WIGG, 2002 – adaptado de Levy, JÁ. HIV and the pathogenesis of AIDS, 1994).

1.1 ASPECTOS DA CO-INFECÇÃO HIV-*M. tuberculosis*

Por debilitar o sistema imune do hospedeiro, o HIV confere ao indivíduo infectado maior vulnerabilidade às infecções oportunistas. Nesse aspecto, pode-

se dizer que a tuberculose e o HIV estão intimamente relacionados desde a emergência da AIDS, uma vez que a infecção por este vírus contribuiu para um aumento significativo na incidência da tuberculose (AIDSCAP, 1996; RAVIGLIONE, M. C., *et. al.* 1992). Com o uso disseminado da terapia anti-retroviral combinada potente, a tuberculose sofreu profundas transformações, com mudanças na ocorrência e no prognóstico das complicações oportunistas mais comuns (II Consenso Brasileiro de Tuberculose /Diretrizes Brasileiras para Tuberculose, 2004). Por produzir um declínio progressivo na imunidade mediada por células, o HIV altera a patogênese da tuberculose, aumentando o risco de desenvolvimento da doença em pacientes co-infectados, levando freqüentemente ao comprometimento extrapulmonar e às manifestações radiográficas atípicas (AIDSCAP, 1996). Apesar das infecções pelo HIV e *Mycobacterium tuberculosis* serem tratadas e até prevenidas, suas incidências têm aumentado nos países em desenvolvimento, nos quais a infecção pelo HIV e a tuberculose são endêmicas e os recursos limitados. Mundialmente, a tuberculose é a infecção mais comum entre pacientes soro-positivos para o HIV, e a causa de morte mais freqüente entre os pacientes com AIDS (RAVIGLIONE, M. D.; *et. al.*, 1995). A infecção pelo *M. tuberculosis* pode ocorrer quando um indivíduo inala partículas contendo esses bacilos, que ao atingirem os alvéolos pulmonares podem ser fagocitados pelos macrófagos alveolares. Nos casos em que os bacilos sobrevivem à ação fagocítica, estes podem se disseminar, por via hematogênica, para outras áreas do corpo (EDWARDS & KIRKPATRICK, 1986). Em indivíduos soro-positivos para o HIV há um maior risco para o rápido desenvolvimento da infecção, uma vez que o vírus interfere na habilidade do hospedeiro em conter a infecção pelo *M. tuberculosis* (MELTZER, M. S.; 1990).

O indivíduo infectado pelo HIV (HIV+) é 25 vezes mais susceptível à tuberculose em relação aos não infectados (HIV-) (KERR-PONTES, L. R. S. *et al.*, 1997) e o risco de morte em pacientes co-infectados pelo HIV e pelo *M. tuberculosis* é duas vezes maior que em pacientes HIV+ sem TB (LAGRANGE, P. H. *et al.*, 2000). Em indivíduos não infectados pelo HIV, o risco de desenvolver TB ativa é de 5 a 10% durante toda a vida, contra 10% ao ano entre is infectados (OSTROFF, S. M. & LEDUC, J. W., 2000).

A infecção pelo HIV pode ter um efeito indireto na incidência da tuberculose pelo aumento da transmissão do *Mycobacterium tuberculosis*, com conseqüências negativas para ambas as pessoas infectadas HIV-positivas e HIV-negativas (SONENBERG, P. *et al.*, 2004; ODHIAMBO, J. A. *et al.*, 1999).

Com o advento da terapia anti-retroviral potente, as manifestações clínicas decorrentes da infecção pelo HIV-1 tornaram-se menos frequentes e houve uma melhora substancial do prognóstico e da qualidade de vida dos indivíduos que vivem com o vírus. No entanto, a resistência viral, a toxicidade das drogas e a necessidade de elevada adesão ao tratamento permanecem como importantes barreiras ao sucesso prolongado da terapia. O principal objetivo da terapia anti-retroviral é, através da inibição da replicação viral, retardar a progressão da imunodeficiência e restaurar, tanto quanto possível, a imunidade, aumentando o tempo e a qualidade de vida da pessoa que vive com HIV ou AIDS.

A terapia anti-retroviral não trata-se de uma emergência, não devendo ser iniciada antes que as devidas avaliações clínicas e laboratoriais sejam realizadas para determinar o grau de imunodeficiência existente e o risco de progressão. O início é recomendado para pacientes com manifestações clínicas associadas ao HIV, independentemente da contagem de linfócitos T CD4+ e da carga viral plasmática, e para aqueles com contagem de linfócitos T CD4+ abaixo de 200/

mm³, independentemente da presença de sintomas ou da magnitude da carga viral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Atualmente, dezesseis drogas anti-retrovirais são aprovadas para o tratamento da infecção pelo HIV tipo 1: sete são inibidores da transcriptase reversa nucleosídicos (ITRN), seis são inibidores de protease (PIs), e três são inibidores da transcriptase reversa não nucleosídicos (ITRNN). Os ITRNs comportam-se como substratos alternativos da enzima transcriptase reversa, competindo com os nucleosídeos fisiológicos. A incorporação de análogos nucleosídicos modificados aborta a síntese de DNA viral, pela interrupção das ligações fosfodiésteres durante o crescimento da cadeia de DNA (5'→3'). Os análogos nucleosídicos convertem-se em metabólitos ativos após a endocitose, quando são fosforilados a trifosfatos (DE MENDOZA, C. *et. al.*, 2002). Ao contrário dos ITRNs, os ITRNNs, atuam sobre a transcriptase reversa, de forma não competitiva, ligando-se nas proximidades do sítio ativo e, assim, interferindo com a ação polimerizadora da transcriptase (DE MENDOZA, C. *et. al.*, 2002).

A transcriptase reversa apresenta um domínio catalítico, denominado domínio “palma”, que apresenta dois sítios de ligação que podem ser considerados alvos para intervenção quimioterápica, sendo o sítio de ligação do substrato, local de atuação dos inibidores de RT nucleosídeos (ITRN) e um sítio de ligação alostérico, onde atuam os inibidores de RT não nucleosídeos (ITRNN) (DE CLERCQ, E., 1998). Consistem em um heterodímero composto por 2 subunidades – p66 e p51, de forma que esta é composta pelos primeiros 450 aminoácidos do gene RT, e a p66, por sua vez, compõem todos os 560 aminoácidos codificados pelo mesmo gene.

A protease do HIV, uma aspartato-protease, desempenha sua atividade enzimática sobre o substrato poliprotéico viral *gag-pol* transformando-o em

subunidades funcionais. A inibição desta protease previne a fragmentação proteolítica e a maturação das partículas virais (*virions*). O conhecimento da estrutura molecular desta protease possibilitou o desenho do seu primeiro inibidor, no início dos anos 90 (DEEKS, S.G. *et. al.*, 1997).

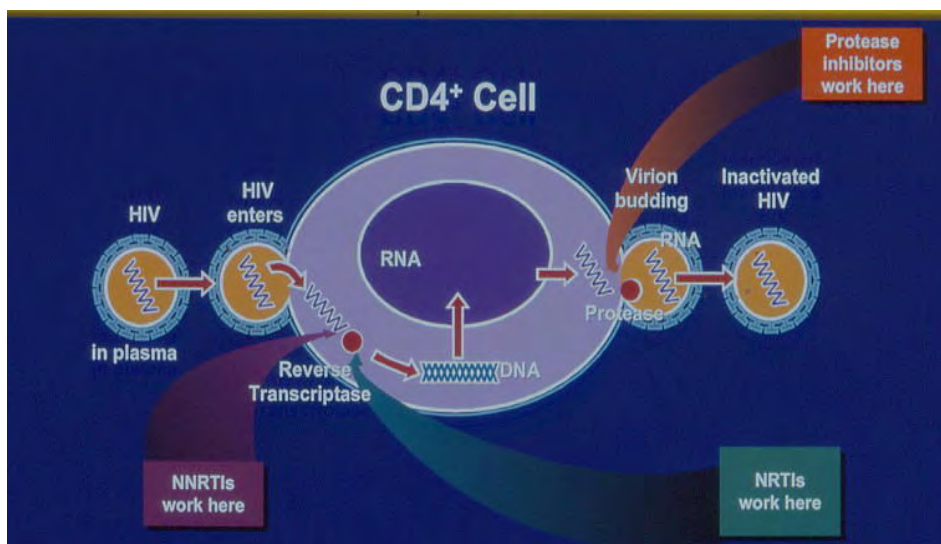


FIGURA 4 – Locais de ação dos anti-retrovirais no vírus HIV-1.

Em indivíduos infectados pelo HIV, mas virgem de tratamento anti-retroviral, a combinação de três ou mais drogas de classes diferentes pode prolongar a supressão viral e proporcionar a reconstituição imunológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Além da terapia anti-retroviral, quimioprofilaxia para infecções oportunistas, como pneumocistose e toxoplasmose, deve ser indicada sempre que a contagem de linfócitos T CD4+ estiver próxima ou inferior a $200/\text{mm}^3$ ou quando houver condição clínica sugestiva de imunodeficiência associada ao HIV.

A terapia inicial sempre deve incluir 3 drogas: dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN) associados a um inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo (ITRNN) ou a um inibidor da

protease (IP). Esquemas duplos, apenas com dois ITRN, são contra-indicados. A associação zidovudina/lamivudina (AZT/3TC) foi considerada a dupla de análogos de nucleosídeos de primeira escolha para compor o esquema triplo inicial. Nos casos de intolerância ao AZT, os ITRN abacavir (ABC), didanosina (ddI) ou tenofovir (TDF) passaram a ser as alternativas para substituição desse anti-retrovirais, sempre combinados com a lamivudina. A estavudina (d4T) passou a ser a última opção para substituir o AZT, devido ao acúmulo de dados científicos e clínicos confirmando a forte associação entre o uso de d4T e o desenvolvimento de lipoatrofia e dislipidemia. Quanto aos ITRNN, exceto em gestantes, o efavirenz (EFZ) é considerado preferencial à nevirapina (NVP) devido à elevada potência, comprovada eficácia em longo prazo e ao menor risco de efeitos adversos sérios. Dentre os IP, o atazanavir (ATV) e o lopinavir (LPV) potencializados com ritonavir (ATV/r e LPV/r) foram considerados como opções preferenciais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A avaliação da resposta ao tratamento tem como parâmetros a redução da carga viral e o aumento do número de linfócitos T CD4+. Embora um dos principais objetivos da terapia seja a obtenção de carga viral indetectável dentro de um período de seis meses, deve-se considerar como resultado positivo uma grande redução nos seus valores (maior que 1 log u 90% da carga viral inicial nas primeiras quatro a seis semanas: ou maior que 2 log ou 99%, após 12 a 16 semanas).

O constante desenvolvimento de resistência aos fármacos anti-retrovirais (SHAFER, R. W., 2002) é a principal razão da falência terapêutica no tratamento da infecção pelo HIV-1. A resistência viral baseia-se normalmente na análise das regiões da protease e transcriptase reversa, que podem conferir resistência a componentes específicos (PEDUZZI, C. *et. al.*, 2002). Na existência de

resistência às várias classes de anti-retrovirais, os regimes terapêuticos alternativos tornam-se limitados. O rápido desenvolvimento de variantes resistentes é devido à grande variabilidade genética do HIV num indivíduo infectado – aproximadamente 10 milhões de novas partículas são produzidas e liberadas das células infectadas, todos os dias, havendo uma alta taxa de erros de transcrição da transcriptase reversa (RT) do HIV e a ausência de mecanismos eficientes de reparo durante os estágios de replicação do genoma viral (MANSKY, L. M.; 1998). Isto leva à produção de novas variantes virais (quasispécies) (SHAFER, R. W.; 2002).

A resistência aos IPs normalmente desenvolve-se lentamente, sendo resultante do acúmulo de mutações. Para os IPs, é feita uma distinção entre as mutações, considerando-as como maiores e menores. As mutações maiores, localizadas dentro do sítio ativo da enzima, reduzem a capacidade de ligação dos inibidores usualmente conferindo resistências às drogas e aumentando sua susceptibilidade, enquanto que as mutações menores, ao contrário, apenas determinam uma redução da atividade enzimática, podendo melhorar o fitness viral (SHAFER, R. W.; 2002) (ROSINA, M. *et. al.*; 2000) (WILSON, J. W. *et. al.*; 2000) (ALEMAN, S. *et. al.*; 2002) (HIRSCH, M. S. *et. al.*; 1998) (ARENS, M.; 2001) (HIRSCH, M. S. *et. al.*; 2000). As mutações menores localizam-se fora do sítio ativo da enzima e, normalmente, ocorrem após uma mutação maior, resultando em resistência clínica (DEEKS, S. G. *et. al.*, 1997).

As mutações referentes à região da transcriptase reversa normalmente são identificadas nas duas classes: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN) e inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN). Muitos ITRN podem ter sua atividade reduzida devido a uma mutação pontual no gene da transcriptase reversa ou um número de

mutações na transcriptase reversa pode conferir uma resistência significativa a outros ITRN. Para os ITRNN, a resistência pode ser conferida por simples mutações pontuais na região da transcriptase reversa (CERQUEIRA, D. M. *et. al.*; 2004). As chamadas mutações de ponto ou pontuais, envolvem modificação em um único par de bases do DNA transcrito a partir do RNA genômico viral, podendo essa alteração ser uma substituição, uma inserção ou, menos comum, uma deleção. As substituições são o tipo mais comuns de mutação, denominando-se transição quando há a substituição de uma purina por outra purina ou de uma pirimidina por outra pirimidina, e transversão quando uma purina é substituída por uma pirimidina e vice-versa. A resistência às drogas anti-retrovirais depende da facilidade para a aquisição de uma mutação ou de um grupo de mutações, e do efeito dessas mutações de resistência na susceptibilidade da droga.

Na tuberculose, a rifampicina é atualmente considerada como uma das principais drogas para o tratamento, sendo que os esquemas que a utilizam adequadamente apresentam taxa de sucesso terapêutico da ordem de 90% a 95%. O uso concomitante da rifampicina (RMP) com a maioria dos IP e/ ou ITRNN promove importante interação farmacológica no sistema microssomal hepático, podendo provocar redução significativa dos níveis séricos desses anti-retrovirais e, conseqüentemente, aumentando o risco de desenvolvimento da resistência do HIV ao esquema anti-retroviral em uso e de toxicidade hepática (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). O uso de esquemas alternativos para o tratamento da tuberculose sem rifampicina, apesar de eficaz, sob o ponto de vista bacteriológico, tem se mostrado com efetividade terapêutica global reduzida; pela maior complexidade do esquema, maior dificuldade de adesão ao uso de medicação injetável (estreptomicina) e pelo tempo mais prolongado de

tratamento. Em ambas as situações expostas pode existir prejuízo para o paciente co-infectado, tanto pela não utilização de IP e/ou ITRNN no esquema anti-retroviral, como pela não inclusão da rifampicina no esquema antituberculose (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2000).

Estudos farmacocinéticos sugerem que a RMP pode ser utilizada concomitantemente com alguns anti-retrovirais em pacientes co-infectados HIV-Tuberculose, desde que os mesmos sejam tratados com esquemas que contenham efavirenz (ITRNN) ou ritonavir (IP) associado ao saquinavir (IP), sem necessidade de ajuste nas dosagens habituais (VELDKAMP, A. I. et. al.; 1999). Recomenda-se que o uso dessas associações, em pacientes co-infectados HIV-Tuberculose, seja feito de forma criteriosa, com a orientação e/ou supervisão de profissional médico com experiência no tratamento de ambas as doenças e com cuidadoso acompanhamento clínico-laboratorial. Neste caso, deve-se ter especial atenção para a possibilidade de falha no tratamento da tuberculose, falha no tratamento anti-retroviral, reações paradoxais da tuberculose e efeitos colaterais e/ou tóxicos, específicos ou sinérgicos, causados pela associação das drogas anti-retrovirais e tuberculostáticas utilizadas nessa situação (TUSET, M. et. al.; 2000).

Apesar de ser considerada uma doença freqüentemente resultante de reativação endógena, a ocorrência da tuberculose com padrão clínico-radiológico (acometimento apical) não caracteriza necessariamente comprometimento significativo da imunidade ou falha da terapia anti-retroviral. O uso de esquema anti-retroviral não compatível com RMP poderá sofrer modificações para possibilitar o tratamento da tuberculose e da infecção pelo HIV com esquemas potentes, não evidenciando, dessa forma, a mudança, uma falha terapêutica ao esquema anti-retroviral anteriormente em uso, e sim uma adequação deste último

ao esquema anti-tuberculose. A adesão adequada aos esquemas tuberculostáticos e anti-retrovirais, tomados de forma concomitante, é um grande desafio para o paciente, devido à elevada quantidade de comprimidos/cápsulas a serem ingeridos diariamente, e à ocorrência de efeitos colaterais, particularmente nas primeiras semanas do tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

2.JUSTIFICATIVA

Com base na dificuldade do tratamento das infecções causadas pelo HIV e na associação das co-infecções relacionadas, pretendeu-se analisar num período de tempo os parâmetros imunológicos e virais envolvidos na co-infecção. E paralelo a esses dados, a análise genotípica dos grupos envolvidos.

Devido a essa associação nos tratamentos com as co-infecções, houve um crescente aumento no número de estudos sobre resistência aos anti-retrovirais (DE GRUTOLLA, V. *et. al.*; 2000) (DEMETER, L. *et. al.*; 2001) (HANNA, G. J. *et. al.*; 2001).

O perfil genotípico dos pacientes envolvidos foi analisado através do teste de genotipagem, que segundo estudos, mostram que conferiram melhor resposta ao tratamento e controle da infecção aos pacientes submetidos a esse tratamento (BAXTER, J. D. *et. al.*; 2000) (CINGOLANI, A. *et. al.*; 2002) (COHEN, C. J. *et. al.*; 2002) (DURANT, J. *et. al.*; 1999).

O teste de genotipagem é o método mais comumente utilizado para a detecção de resistência em isolados de HIV e o que tem aplicações mais simples através do seqüenciamento de genes dos vírus isolados de amostras clínicas.. São também vantajosos por poderem identificar mutações transitórias que podem não causar resistência à droga, mas que indicam a presença de pressão seletiva

da droga (BAXTER, J. D. *et. al.*; 2000) (CINGOLANI, A. *et. al.*; 2002) (DURANT, J. *et. al.*; 1999).

A resistência do vírus ao medicamento tem sido o maior desafio em termos de sucesso ao longo da terapia. De qualquer modo, a informação genotípica pode orientar o redirecionamento da terapia anti-retroviral (RODRIGUES, R. *et. al.* ; 2005).

Os pacientes que receberam informação sobre a existência de mutações antes da terapêutica anti-retroviral e que alteraram o seu esquema de tratamento, tiveram uma significativa diminuição na carga viral, quando comparados aos pacientes cujo tratamento foi alterado sem conhecimento do perfil de resistência.

Em função da inexistência desses dados na região e por se tratar de um problema que atinge a população mundial, os resultados desse estudo possibilitarão uma maior compreensão sobre a problemática da resistência e da falha terapêutica anti-retroviral, especialmente em pacientes co-infectados com tuberculose.

3.OBJETIVO

O presente estudo tem por objetivo geral analisar de forma descritiva, as alterações imunológica e viral de pacientes co-infectados HIV/*Mycobacterium tuberculosis* na região, e também, uma avaliação pelo teste de genotipagem para o HIV. Neste sentido serão analisados: sob esquema terapêutico duplo (anti-retroviral e tuberculostático); esquema simples (anti-retroviral ou tuberculostático), bem como em pacientes submetidos, exclusivamente, ao tratamento anti-HIV, ou seja, não co-infectados por *M. tuberculosis*. Assim, será possível acompanhar e discutir, através dos perfis, a relação imunológica dos pacientes na co-infecção, e

a relação viral, inclusive analisando a indução de resistência e presença de mutações.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a quantificação viral e imunológica dentre os pacientes, e entre os grupos analisados;
- Verificar se há diferenças entre os pacientes co-infectados HIV/TB e pacientes HIV+, considerando os parâmetros de CD4 e Carga viral;
- Avaliar os perfis imunológico e viral frente aos esquemas terapêuticos adotados;
- Quanto ao perfil viral, avaliar através da genotipagem, a presença de mutações que possam estar associadas à resistência aos ARV, e verificar se existem diferenças entre os grupos analisados;
- Avaliar a frequência das mutações da região genômica da protease e da transcriptase reversa do HIV – 1, associadas ao tratamento ARV;
- Verificar a frequência de outros polimorfismos não associados à resistência aos ARV.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

O grupo de estudo, a princípio, deveria ser constituído somente por pacientes internos do Hospital Nestor Goulart Reis – Américo Brasiliense/SP. Devido às dificuldades posteriormente encontradas na constituição dos grupos, que satisfizessem o critério de inclusão, foi necessário buscarmos outra parceria com o Serviço Especial de Saúde de Araraquara – SESA da Faculdade de Saúde

Pública da USP, no sentido de preenchermos os requisitos mínimos do protocolo de pesquisa.

4.2 RECRUTAMENTO DOS PACIENTES

O convite para a participação neste projeto foi feito diretamente ao paciente, onde lhe foi exposto o propósito da pesquisa, bem como seus benefícios e garantias, e, mediante seu aceite, o preenchimento do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS

O grupo de estudo, bem como os critérios de inclusão, consistiram em pacientes soropositivos para HIV, apresentando ou não tuberculose, de ambos os sexos, e idades variadas.

Quatro grupos de estudo foram compostos:

Grupo A: pacientes HIV fazendo uso ou não de ARV;

Grupo B: pacientes co-infectados *M.tuberculosis/HIV* ou com história pregressa de tuberculose, mas em tratamento apenas com ARV;

Grupo C: pacientes co-infectados sendo tratados apenas com tuberculostáticos;

Grupo D: pacientes co-infectados sendo tratados com ARV e tuberculostático.

Cada paciente foi identificado dentro de seu grupo por número, ou seja: A1, B1, C1, D1 e assim, sucessivamente.

Foi realizado um acompanhamento clínico e laboratorial desses pacientes, junto aos respectivos lugares, SESA, Hospital Nestor Goulart Reis e UNESP.

4.4 ACOMPANHAMENTO LABORATORIAL

O acompanhamento dos pacientes foi realizado, inicialmente, através de prontuários e, no caso dos co-infectados, a baciloscopia para pesquisa de BAAR.

Todos os pacientes tiveram suas amostras de sangue avaliadas quanto da carga viral do HIV no plasma, realizada através da técnica do bDNA, HIV-1 RNA 3.0 / Bayer e também pela determinação quantitativa de linfócitos CD3+CD4+/CD8+, por citometria de fluxo, ambos realizados em nosso laboratório (Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular – Referência Regional em DST/AIDS, participante das Redes de Laboratórios de CD4/CD8 e Carga Viral do Programa Nacional DST/HIV/AIDS da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde.

A Genotipagem foi realizada em parceria com a Dra. Rosângela Rodrigues, Pesquisadora e Coordenadora do Laboratório de Retrovírus do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo.

4.5. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue periférico foram colhidas com anticoagulante EDTA no próprio ambiente hospitalar e no Posto de Saúde, e levadas ao Laboratório Prof. Antônio Longo FCFAR – UNESP imediatamente após a coleta, seguindo as normas de biossegurança.

A coleta foi realizada em 3 tubos de coleta á vácuo ® (5 ml), sendo um dirigido à tipagem de linfócitos, outro dirigido à determinação da carga viral, e um destinado à genotipagem.

A amostra dirigida a tipagem de linfócitos foi processada imediatamente, utilizando-se o sangue total. As amostras destinadas à dosagem da carga viral

foram conservadas no gelo, e processadas dentro de um intervalo de 3 horas, sob condições estéreis em fluxo laminar, devidamente esterilizado com hipoclorito a 0,5% deixando-se agir por 30 min, acrescido de 10 minutos de luz U.V., maneira adotada pelo Ministério da Saúde para Biologia Molecular.

A separação do plasma foi realizada por meio de centrifugação a 1500 x *g* durante 15 minutos e as amostras que foram armazenadas para genotipagem também foram manipuladas nas mesmas circunstâncias. Em ambas, utilizou-se 1 mL de plasma, armazenados em “eppendorf” esterilizados e identificados com as letras para cada paciente (segundo o grupo), e mantidos em freezer a – 80°C.

Os protocolos para obtenção do cDNA, bem como o PCR foram realizados segundo as especificações adotadas no Instituto Adolfo Lutz/SP para a realização da técnica de sequenciamento.

A técnica utilizada para o sequenciamento foi realizada segundo as especificações do ViroSeq HIV-1 Genotyping system (Celera Diagnostics, Alameda, Calif.).

4.6 METODOLOGIA UTILIZADA

4.6.1 TIPAGEM DE LINFÓCITOS T CD4/CD8

A tipagem linfocitária seguiu os procedimentos padronizados para a detecção dos fenótipos CD3/CD4 e CD3/CD8, através do método de Citometria de Fluxo no sistema BD FACSCalibur (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, Califórnia-USA).

Para a realização da técnica utilizou-se os seguintes fluorocromos: CD4 – FITC (Isotiociano de Fluoresceína), CD8 – PE (Ficoeritrina) e CD3 – PerCP (Proteína clorofilada de peridinina).

4.6.1.1 AMOSTRAS

Para cada paciente utilizou-se um “*trucount*” tubo identificado com o nome e o número da amostra. Pipetou-se 20 μL do BD Tritest – CD4-FITC/ CD8-PE/ CD3-PerCP no tubo, seguido de 50 μL de sangue total do paciente, homogeneizando-se e incubando por 15 minutos no escuro.

Decorrido esse tempo, pipetou-se 450 μL de Facslysing Solution 1/10, homogeneizando-se e incubando-se por mais 15 minutos no escuro. A partir daí, as amostras já podiam ser lidas pelo aparelho.

4.6.1.2 VALORES DE REFERÊNCIA

Os valores referem-se a uma contagem absoluta de CD3+, apresentando como valores normais de 690 a 2540 células/ μL , CD3+CD4+ (410 a 1590 células/ μL) e CD3+CD8+ (190 a 1140 células/ μL).

4.6.2 DETERMINAÇÃO DA VIREMIA PLASMÁTICA – RNA-HIV

A quantificação viral foi realizada segundo as especificações dos sistema VERSANT @ Ensaio HIV-1 3.0 (bDNA) – Bayer, usando o System 340 b DNA Analyser BAYER.

O procedimento baseou-se na preparação do precipitado viral, a hibridação das sondas e na detecção da luminescência produzida. Para o manuseio das

amostras foi necessário a utilização de uma cabine de Segurança Biológica Classe II.

4.6.2.1 PREPARAÇÃO DOS PRECIPITADOS

Foram adicionados 50 μ L de solução precipitante (partículas de poliestireno inerte em solução tamponada com azida sódica < 0,1% e outros preservantes) em cada tubo de 1,5 mL. Às amostras após serem descongeladas foram adicionadas 1 mL de plasma em cada tubo já previamente identificado, e mantidos no gelo até centrifugação. Centrifugou-se a 23500 x g por 1 hora entre 2 e 8 ° C.

Terminada a centrifugação, o rotor foi transferido para a cabine de segurança antes mesmo de aberto. O sobrenadante foi aspirado, deixando aproximadamente 20 μ L no tubo. Esse precipitado foi então congelado a – 80°C por no mínimo 30 minutos.

4.6.2.2 LISE DOS PRECIPITADOS

Para a lise dos precipitados, certificou-se de que a temperatura do banho seco estivesse a 63 °C e o volume do reagente de trabalho de lise foi preparado de acordo com o número de amostras.

Os precipitados foram descongelados à temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 120 μ L do reagente de trabalho de lise (solução de proteinase K com azida sódica < 0,1% e outros preservantes) em cada tubo, agitando-se no vórtex por 5 a 10 segundos.

Em seguida, os tubos foram colocados no banho seco a 63°C durante 2 horas.

4.6.2.3 MONTAGEM DAS PLACAS

Colocou-se as tiras dos poços de captura numa placa e foi criada uma planilha de identificação pela ordem na placa e nome do paciente.

4.6.2.4 HIBRIDIZAÇÃO DAS SONDAS DE CAPTURA E SONDAS

ALVO

Passado às 2 horas, os tubos foram retirados do calor seco e resfriados a temperatura ambiente por 10 minutos. Transferiu-se 100 µL de cada tubo para o respectivo micropoço na placa, seguindo o diagrama de identificação. As sondas de captura e sondas alvos são oligonucleotídeos sintéticos em solução tamponada com azida sódica < 0,1%.

Com o luminômetro preparado, colocou-se as placas na bandeja, vedou-se com um bloco selante e a incubação foi de 16 a 18 horas (*“overnight”*).

4.6.2.5 HIBRIDIZAÇÃO DO PRÉ-AMPLIFICADOR E DA SONDA

AMPLIFICADORA

O instrumento lava e aspira os reagentes dos micropoços automaticamente após cada incubação. Foram utilizadas soluções de lavagem A e B para o procedimento e baseavam-se em soluções tamponadas contendo azida sódica 0,1%. O diluente do pré-amplificador/amplificador (solução protéica tamponada com azida sódica < 0,1%), o sulfato de dextran (solução de sulfato de dextran a 40% contendo azida sódica < 0,1%), e o diluente da sonda marcada (idem ao pré-amplificador) foram colocados em banho-maria a 37°C por no mínimo 10 minutos. O volume preparado para as reações variou de acordo com o número de amostras.

O ciclo de resfriamento/lavagem durou aproximadamente 15 minutos. Após a exposição das placas, adicionou-se 100 μ L do reagente de trabalho do pré-amplificador em cada micropoço e incubou-se por mais 30 minutos, novamente sendo seguida por um ciclo de resfriamento/lavagem.

Terminado o tempo de incubação, adicionou-se 100 μ L do reagente de trabalho de amplificação em cada micropoço, e iniciou-se uma nova incubação por mais 30 minutos, seguida por um ciclo de resfriamento/lavagem.

4.6.2.6 HIBRIDIZAÇÃO DA SONDA MARCADA

Logo após a exposição das placas, adicionaram-se 100 μ L do reagente de trabalho de marcação (oligonucleotídeos sintéticos marcados com enzimas em solução tamponada contendo azida sódica < 0,1%) em cada micropoço, seguido de um período de incubação de 45 minutos, e novamente outro ciclo de resfriamento/lavagem.

4.6.2.7 DETECÇÃO DA LUMINESCÊNCIA PRODUZIDA

Terminada a incubação, adicionou-se 80 μ L do reagente de trabalho do substrato (substrato quimioluminescente – Lumi-PhosPlus) em cada micropoço, e mais uma vez, iniciou-se uma incubação de 30 minutos.

4.6.2.8 ANÁLISE DOS DADOS

Durante a incubação do substrato, o Software Bayer de Gerenciamento de dados (DMS) foi preparado para receber os dados do luminômetro.

Correu-se, paralelamente, 6 padrões com valores diferentes de carga viral para cada teste a fim de se produzir uma curva padrão. Esta curva foi utilizada para calcular a carga viral de cada amostra.

4.6.2.9 VALORES DE REFERÊNCIA

Foram definidos os seguintes limites de quantificação: valores abaixo do limite de quantificação sendo inferiores a 50 cópias/mL de RNA do HIV-1; valores acima dos limites de quantificação sendo superiores a 500.000 cópias/mL de RNA do HIV-1; e o intervalo entre 50 e 500.000 cópias/mL de RNA do HIV-1.

4.6.3 EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL PARA SEQÜENCIAMENTO

Para a técnica de extração de RNA Viral de plasma utilizou-se o Kit QIAGEN RNA Blood Mini Kit, e, para garantir uma melhor concentração viral, centrifugou-se as amostras a 14000 x g por 2 horas a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, deixando o sedimento com aproximadamente 200 µL.

Foram identificados os tubos de 1,5 ml, tubos coletores que vem com a coluna de sílica (A), tubos para lavagens (B, C, D), e tubos de eluição para recuperar o RNA extraído. Pipetou-se 560 µL do tampão AVL/RNA carreador no tubo de 1,5 ml e adicionou-se 140 µL de plasma, levando ao vórtex por 15 segundos e incubando à temperatura ambiente por 10 minutos.

Passado o tempo, procedeu-se uma rápida centrifugação a 14000 x g nos tubos para remover as gotas da parede e tampa, e adicionaram-se 560 µL de etanol 96-100% na amostra, levando ao vórtex por 15 segundos.

Foram transferidos 630 µL dessa solução para os tubos já identificados (A) contendo as colunas de sílica acoplada. Centrifugou-se a 6000 x g por 1 minuto.

Em seguida, acoplou-se a coluna a um outro tubo coletor (B) já previamente identificado e descartou-se o anterior contendo o filtrado.

Transferiu-se novamente 630 μ L da solução restante para a coluna de sílica acoplada ao tubo e centrifuga-se a 6000 x *g* por mais 1 minuto. Passado esse tempo, acoplou-se a coluna de sílica ao tubo coletor C e descartou-se o tubo B contendo o filtrado.

Adicionou-se 500 μ L do tampão AW1 e centrifugado a 6000 x *g* por 1 minuto. Em seguida, acoplou-se a coluna de sílica ao tubo coletor D, descartando o tubo coletor C contendo o filtrado, e adicionou-se 500 μ L do tampão AW2, e então, centrifugando-se a 20000 x *g* por 3 minutos.

A partir daí, acoplou-se a coluna em um tubo de eluição, descartando o tubo coletor contendo o filtrado, e adicionou-se 60 μ L do tampão AVE à temperatura ambiente, incubando-se por 1 minuto. Por fim, centrifugou-se a 6000 x *g* por 1 minuto e congelou-se o RNA extraído a -70°C.

4.6.4 RETROTRANSCRIÇÃO (cDNA) – HOME MADE

Para a realização da técnica de retrotranscrição, primeiro foi feito o “mix”, contendo um tampão (5x), DTT (0,1M), o inibidor de RNase (10U/ μ L), e a enzima Superscript III (200U/ μ L). Os volumes utilizados foram calculados segundo o número de amostras.

Adicionou-se 2 μ L de Random Hexameros 150 ng/ μ L nos tubos já previamente identificados, seguido de 1 μ L de dNTPs a 10 mM. Em seguida, adicionou-se 10,5 μ L de RNA extraído, e levou-se para aquecer a 65°C por 5 minutos. Passado esse tempo, incubou-se no gelo por 5 minutos, dando-se um “spin” e voltando ao gelo.

Logo após, foram pipetados 6,5 µL do mix inicialmente preparado em cada tubo, e aquecidos a 25°C por 5 minutos. Decorrido esse tempo, aqueceu-se a 50°C por 1 hora, e em seguida, inativou-se a reação por aquecimento a 70°C por 15 minutos. O cDNA foi guardado a - 20°C.

4.6.5 PCR (REGIÃO *POL*)

Foram realizadas 3 reações de polimerase em cadeia (PCR) nas amostras utilizando 6 “*primers*”, sendo eles: K1 e K2 (1,2kb) – polimerase; F1 e F2 (0,8 kb) – transcriptase reversa e; DP10 e DP11 (0,4kb) – protease.

No quadro abaixo segue os protocolos utilizados e os respectivos tempos de ciclagem:

QUADRO 1 – Reação de PCR para a região *pol* do HIV-1.

1º PCR – Polimerase (1,2kb)	1 amostra (µL)	Nº de amostras (x24)
Buffer 10X	5	120
MgCl ₂ 50Mm	2,5	60
DNTP 10mM	2	48
Primer K1 10pM	1,5	36
Primer K2 10pM	1,5	36
Taq	0,25	6
H ₂ O	32,25	774
Amostra	5	120
Total	50	

O programa de ciclagem no termociclador para a **região *pol*** baseou-se em **35 ciclos**, com as seguintes especificações:

94°C por 3min.;

35 X : 94°C por 30s; 55°C por 30 s.; 72°C por 2min.;

72°C por 10 min.;

4°C∞.

A partir do produto da 1ª PCR realizou-se a 2ª PCR (*Nested*), amplificando as regiões da transcriptase reversa e a protease. No quadro abaixo segue os protocolos e os respectivos tempos de ciclagem:

QUADRO 2 – Reação de PCR para as regiões da RT e PT.

2º PCR – Transcriptase Reversa (0,8kb)	2º PCR – Protease (0,4kb)	1 amostra (µL)	Nº de amostras (x24)
Buffer 10X	Buffer 10X	5	120
MgCl ₂ 50Mm	MgCl ₂ 50mM	2,5	60
DNTP 10mM	DNTP 10mM	2	48
Primer F1 10 µM	Primer DP10 10 µM	1	24
Primer F2 10 µM	Primer DP11 10 µM	1	24
Taq	Taq	0,25	6
H ₂ O	H ₂ O	36,25	870
Produto da 1º PCR	Produto da 1º PCR	2	48
Total	Total	50	

Os programas de ciclagem térmicas para a **transcriptase reversa** e **protease** foram de **35** e **25** ciclos, respectivamente, conforme as seguintes especificações:

Transcriptase reversa

94°C por 3 min.;

35 X : 94°C por 1 min.; 55°C por 30 s; 72°C por 1 min. e 30 s;

72°C por 10 s;

4°C ∞.

Protease

94°C por 3 min.;

25 X : 94°C por 30 s; 55°C por 30 s; 72°C por 1 min.;

72°C por 10 min.;

4°C ∞.

Terminado os tempos de ciclagem, preparou-se um gel de agarose 1% para visualização das amostras que foram amplificadas.

4.6.6 PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS

Para a purificação foi utilizado o “*Kit Concert Rapid PCR Purification System*” GibcoBRL (Life Technologies). Foram adicionados aos produtos amplificados 400 µL da solução H1 (concentrated guanidine hydrochloride, EDTA, Tris-HCl, e isopropanol) e transferidos para coluna, sendo centrifugados a 12000 x *g* por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado, e adicionou-se 700 µL da solução H2 (NaCl, EDTA, e Tris-Cl). Centrifugou-se a 12000 x *g* por mais 1 minuto, descartando o sobrenadante. Novamente foi centrifugado para retirar o excesso da solução H2, e em seguida, transferindo-se a coluna para outro tubo e adicionou-se 50 µL do tampão TE aquecido (10 mM – Tris-HCl, 0,1 mM EDTA). Incubou-se em temperatura ambiente por 1 minuto, e centrifugou-se a 12000 x *g* por 2 minutos.

Para a verificação das amostras purificadas preparou-se um gel de agarose 1%, inserindo na corrida um DNA Mass Ladder (Life Technologies) que foi utilizado para quantificação do DNA purificado.

4.6.7 REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO

O volume de reação do seqüenciamento foi baseada na quantificação do DNA purificado, que variou de acordo com a intensidade das bandas no gel.

Foram utilizados 4 “*primers*”, sendo eles: **DP11 e DP16** - protease e **F1 e F2** - transcriptase reversa. Nos quadros abaixo seguem os protocolos utilizados e o tempo de ciclagem da reação.

QUADRO 3 – Protocolo de sequenciamento para a região da Transcriptase reversa.

F1	F2	1 amostra (µL)	Nº de amostras (x19)
Big Dye	Big Dye	4	76
Seq Buffer 2,5 X	Seq Buffer 2,5X	4	76
Primer F1 (1pM/µL)	Primer F2 (1pM/µL)	6,4	121,60
Amostra (9,5-10 ng)	Amostra(9,5-10 ng)		1
H ₂ O qsp	H ₂ O qsp	4,6	87,40
Total	Total	20	

QUADRO 4 – Protocolo de sequenciamento para a região da Protease.

DP16	DP11	1 amostra (µL)	Nº de amostras (x18)
Big Dye	Big Dye	2	36
Seq Buffer 2,5 X	Seq Buffer 2,5 X	6	108
Primer DP16 (1pM/µL)	Primer DP11 (1pM/µL)	6,4	115,2
Amostra 5 ng	Amostra 5 ng		1
H ₂ O qsp	H ₂ O qsp	4,6	82,8
Total	Total	20	

O programa de ciclagem para o Kit Big Dye foi de 25 ciclos, conforme as seguintes especificações:

96°C por 10 s;

50°C por 5 s;

60°C por 4 min.;

4°C ∞.

4.6.8 PRECIPITAÇÃO PÓS-SEQÜENCIAMENTO EM PLACA

Terminado o tempo de ciclagem do Kit Big Dye, aplicou-se 80 µL de isopropanol 75% em cada amostra, selou-se a placa e levou-se ao vórtex. A placa de 96-well permaneceu em repouso no interior da centrífuga fechada, em temperatura ambiente por 15 minutos.

Em seguida, centrifugou-se por 45 minutos a 1990 x g, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, invertendo-se a placa sob um papel absorvente, e aplicando-se um pulso na centrífuga de aceleração e desaceleração mínima. Secou-se o “*pellet*” no termociclador a 94°C não deixando passar de 4 minutos. A placa foi embrulhada em papel alumínio e armazenada em freezer - 20°C.

Para sequenciar, ressuspendeu-se o sedimento em 10µL de formamida Hi-Di, e colocou-se as placas no analisador genético ABI Prism 3100.

4.6.9 ANALISADOR GENÉTICO ABI PRISM 3100 (APPLIED BIOSYSTEMS).

As placas contendo as amostras identificadas obedeceram a uma disposição segundo os “*primers*” utilizados, que no caso foram os seguintes: DP11 e DP16 (protease), F1 e F2 (transcriptase reversa).

As seqüências obtidas foram enviadas para um computador conectado ao aparelho seqüenciador, gerando-se cromatogramas. Esses cromatogramas foram analisados por um “*software*” chamado *Sequencher*, onde os dados foram editados manualmente para cada paciente, analisando-se os possíveis pontos de mistura (de bases), e convertidos em seqüências de DNA. Para análise do perfil de mutação foi utilizado o site “Stanford HIV RT and Protease Sequence Database”.

5. MÉTODO DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos pela imunofenotipagem de linfócitos T CD4/CD8 e dosagem da carga viral foram diretamente relacionados entre si, e comparados frente ao esquema de tratamento adotado para os diferentes grupos de estudo.

A contagem de linfócitos T CD4/CD8 e a viremia plasmática foram acompanhados a cada 2 meses, ou conforme foi possível o agendamento das coletas. Foram avaliadas as medianas entre e dentre os grupos analisados, e para a verificação das freqüências foram utilizadas tabelas de contingências. Devido ao número reduzido de pacientes não foi possível aplicar análises estatísticas.

O seqüenciamento foi realizado somente nas amostras que possuíram carga viral em níveis detectáveis, segundo a sensibilidade do teste (ESHLEMAN, S. H. *et. al.*; 2005), e nas amostras abaixo do limite de detecção foram realizadas tentativas de extração, retrotranscrição e amplificação por PCR, porém, sem sucesso.

Através do resultado do seqüenciamento, foi realizada a análise do perfil de resistência e presença de mutação. Os “contigs” foram interpretados pelo site “Stanford HIV RT and Protease Sequence Database” (HIV db: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm) de onde foram obtidos os Laudos. O alinhamento das seqüências obtidas foi realizado segundo o programa “Bioedit Sequence Alignment Editor” (ClustalW Multiple alignment) e comparadas com seqüências selvagens obtidas do Genbank, acesso número K03455 (Subtipo B) e AF005494 (Subtipo F). As seqüências foram traduzidas por ferramentas do mesmo programa e apontadas as mutações e/ou polimorfismos encontrados para os grupos, e entre eles.

6. RESULTADOS

Os resultados apresentados foram obtidos com um total de 33 pacientes, sendo 14 mulheres e 19 homens, com uma média de idade de 37,5 anos (Tabela 1).

TABELA 1 - Grupo de pacientes quanto a clínica e sexo.

POPULAÇÃO	Nº ESTUDADO	SEXO	
		FEMININO	MASCULINO
HIV	19	53%	47%
COINFECÇÃO*	14	29%	71%
TOTAL	33	42%	58%

Co-infecção: HIV-*M. tuberculosis*.

6.1 ANÁLISE INDIVIDUAL DOS GRUPOS

GRUPO A

No grupo A (n=19), sendo 10 mulheres e 9 homens, com faixa etária de 12 a 59 anos, com e sem tratamento.

Três pacientes sem tratamento (16%) apresentaram médias da contagem de Linfócitos T CD4 de 596 células/ μ L e viremia-HIV de 23829 cópias/mL. Dezesesseis pacientes sob tratamento (84%): ITRN (inibidores da transcriptase reversa nucleosídeo) (12,5%); ITRN + ITRNN (inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos) (68,7%) e ITRN + IP (inibidores da protease) (18,7%). A associação de anti-retrovirais mais freqüente foi ITRN + ITRNN (68,7%). Nenhuma das associações de inibidores de protease recomendada pelo Ministério da Saúde (Atazanavir e o Lopinavir potencializados com Ritonavir) foi adotada pelo corpo clínico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Foi observado que as medianas não variaram entre as coletas, conforme representado pela contagem de Linfócitos TCD4/CD8 e viremia nos Gráficos 1, 2 e 3. O perfil de cada paciente encontra-se representado nos gráficos 21, 22 e 23 no apêndice.

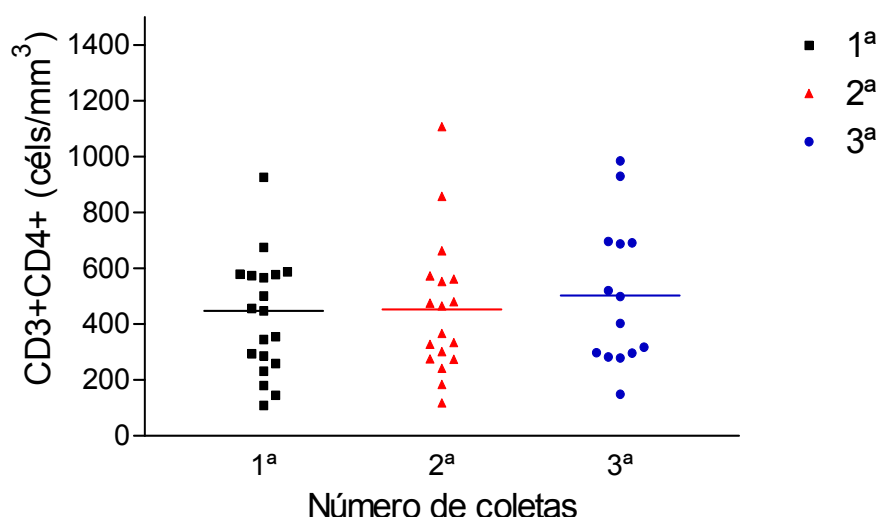


GRÁFICO 1 – Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo A e medianas das contagens de Linfócitos T CD4.

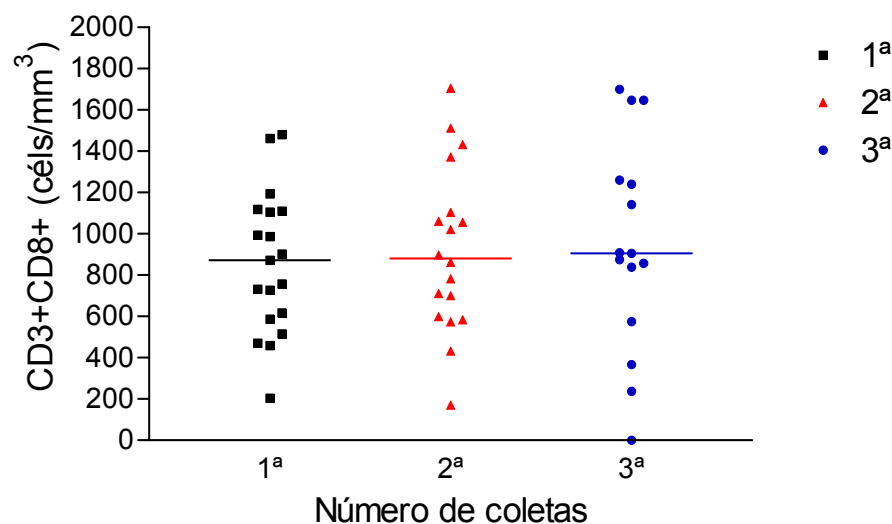


GRÁFICO 2 – Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo A e medianas das contagens de Linfócitos T CD8.

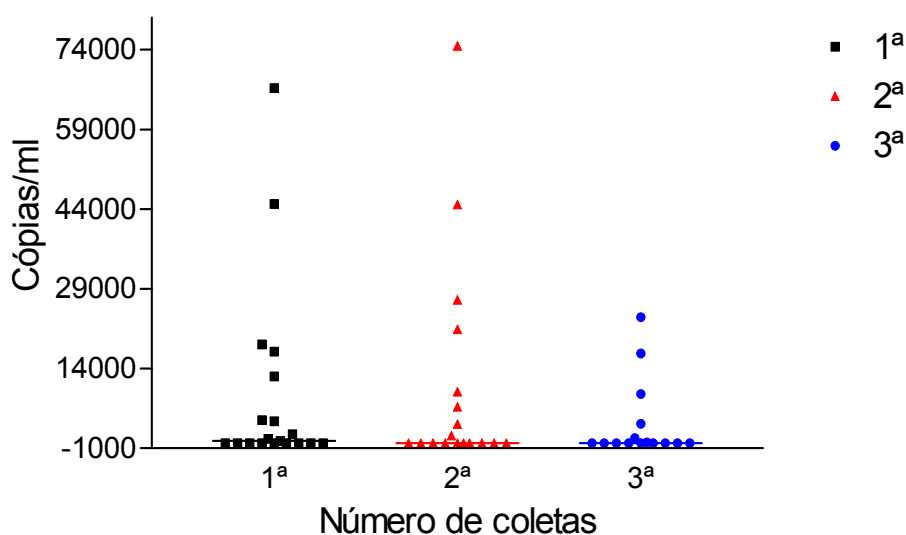


GRÁFICO 3- Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo A e medianas das dosagens de Carga viral plasmática.

Entre os 19 pacientes deste grupo, 14 (73,7%) realizaram todas as 3 coletas; enquanto 4 (21%) fizeram 2 coletas e apenas 1 (5,3%) com uma coleta.

Os medicamentos mais utilizados no esquema terapêutico foram:

Zidovudina, Lamivudina, Estavudina, Nevirapina, Efavirenz, Nelfinavir, Biovir e Tenofovir segundo constam na tabela 2.

TABELA 2 – Associação terapêutica para o HIV.

Associações	Medicamentos
ITRN	✓ Zidovudina
ITRN + ITRNN	✓ Lamivudina + Estavudina + Nevirapina
	✓ Zidovudina + Nevirapina (ou Efavirenz)
	✓ Lamivudina + Estavudina + Efavirenz
	✓ Lamivudina + Efavirenz + Biovir
ITRN + IP	✓ Zidovudina + Lamivudina
	✓ Tenofovir + Lamivudina + Zidovudina
	✓ Estavudina + Lamivudina + Nelfinavir
	✓ Zidovudina + Nelfinavir
	✓ Biovir + Lamivudina + Nelfinavir + Zidovudina

GRUPO B

No grupo **B** (n=7), sendo 4 homens e 3 mulheres, com faixa etária entre 43 a 63 anos, e a associação terapêutica mais freqüente foi com ITRN + IP (57%).

Nesses pacientes não foi possível o acompanhamento pela baciloscopia, visto que se tratavam de indivíduos com cura/alta para tuberculose no passado.

Devido ao número reduzido de pacientes não foi possível observar diferenças entre as medianas referentes às coletas, como demonstrado nos

gráficos 4, 5 e 6 representados pelas contagens de Linfócitos T CD4/CD8 e viremia. O perfil de cada paciente se encontra nos gráficos 24, 25 e 26 no apêndice.

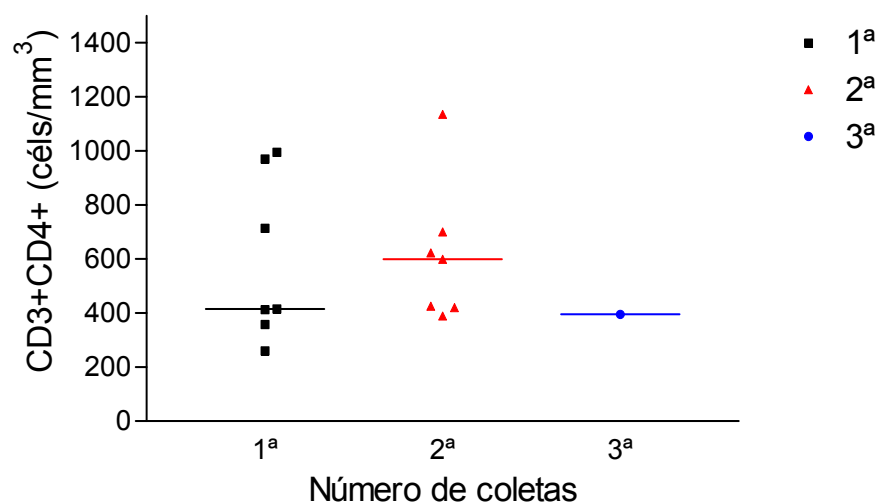


GRÁFICO 4 – Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo B e medianas das contagens de Linfócitos T CD4.

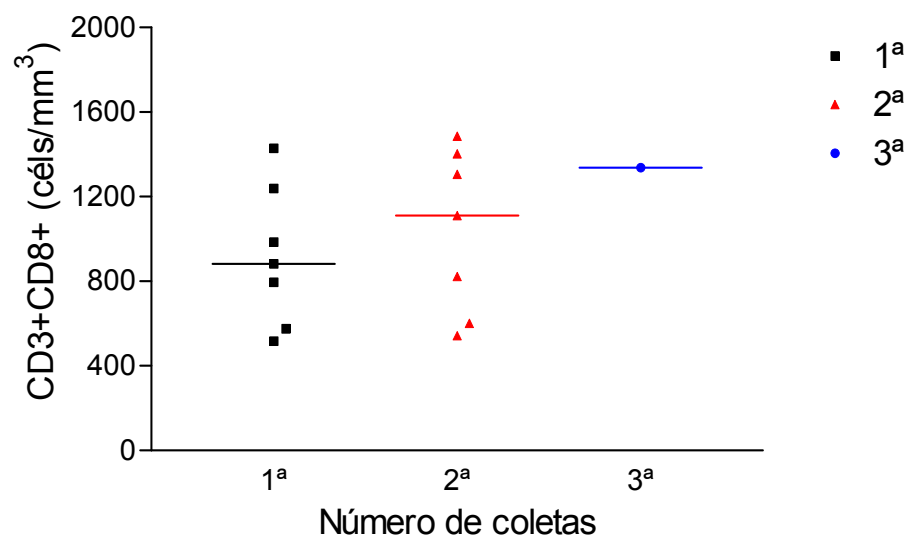


GRÁFICO 5 - Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo B e medianas das contagens de Linfócitos T CD8.

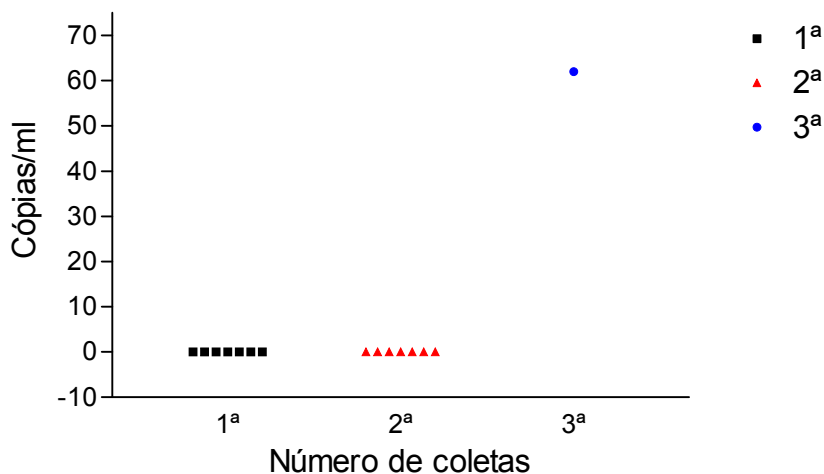


GRÁFICO 6 - Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo B e medianas das dosagens de Carga viral plasmática.

Entre os 7 pacientes deste grupo, apenas 1(14,3%) realizou todas as 3 coletas; enquanto que 6 (85,7%) fizeram 2 coletas. Referente à dosagem da viremia foi observado que todos encontraram-se abaixo do limite de detecção do teste em ambas as coletas.

Os medicamentos mais utilizados no esquema terapêutico foram: Zidovudina, Indinavir, Atazanavir, Ritonavir, Lamivudina, Efavirenz, Estavudina, Saquinavir e Tenofovir. As associações mais freqüentes encontram-se descritas na Tabela 3.

TABELA 3 - Associações terapêuticas para co-infectados.

Associações	Medicamentos
IP + ITRN	✓ Zidovudina + Indinavir ✓ Atazanavir + Ritonavir + Lamivudina (ou Tenofovir) ✓ Estavudina + Ritonavir + Saquinavir + Lamivudina ✓ Efavirenz + Zidovudina
ITRN + ITRNN	✓ Zidovudina + Lamivudina + Efavirenz

GRUPO C

O grupo C (n=4), todos do sexo masculino, com faixa etária entre os 19 a 42 anos. Devido ao número reduzido de pacientes não foram observadas diferenças entre as medianas no decorrer das coletas, conforme demonstrado nos gráficos 7, 8 e 9 que representam, respectivamente, as contagens de Linfócitos T CD4/CD8 e Carga Viral. O perfil de cada paciente encontra-se nos gráficos 27, 28 e 29 em apêndice.

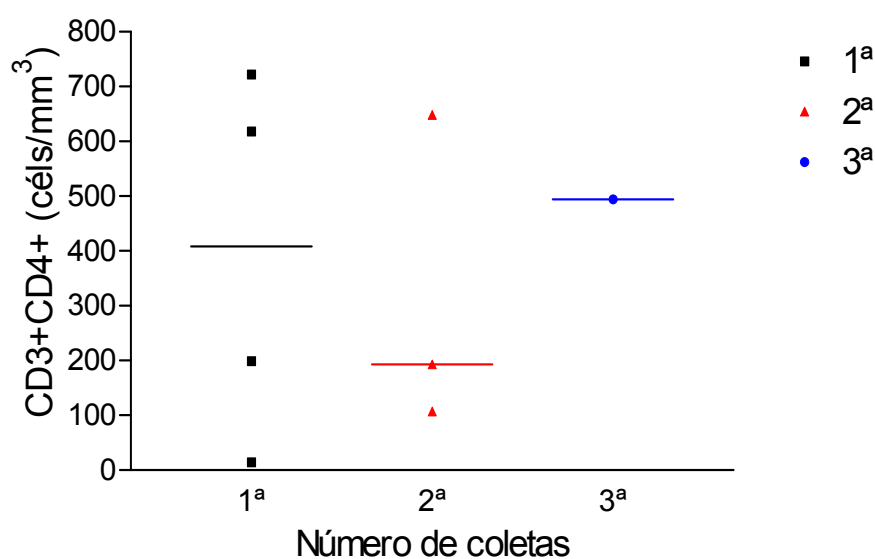


GRÁFICO 7 – Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo C e medianas das contagens de Linfócitos T CD4.

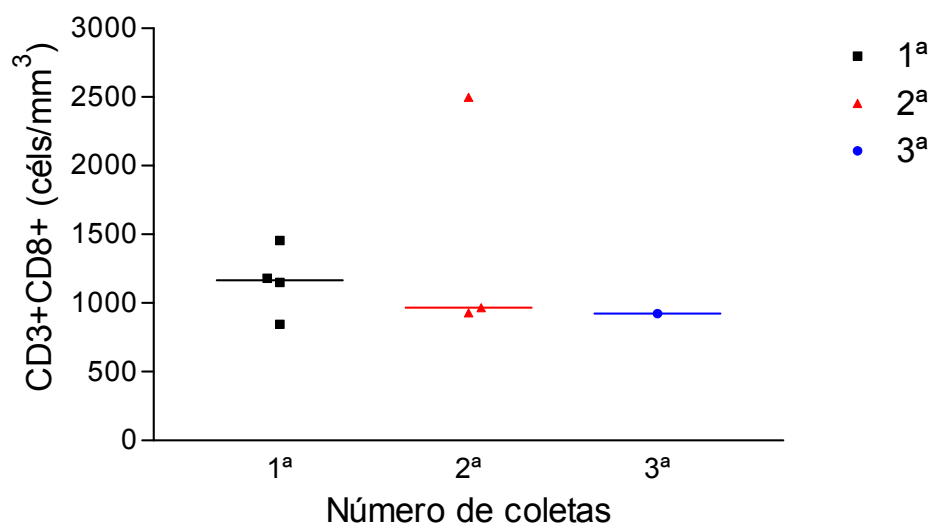


GRÁFICO 8 – Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo C e medianas das contagens de Linfócitos T CD8.

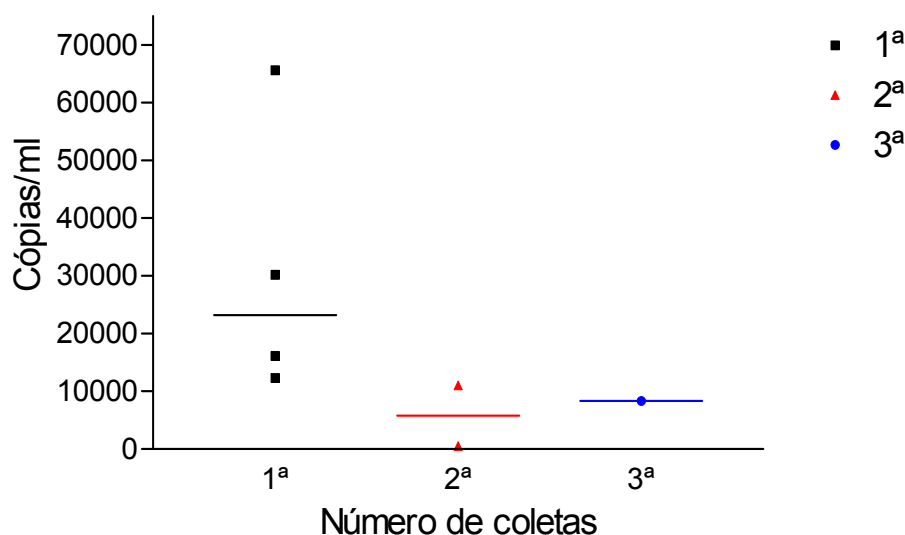


GRÁFICO 9 - Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo C e medianas das dosagens de Carga viral plasmática.

Foi observado entre os 4 pacientes deste grupo que somente um indivíduo realizou todas as coletas (25%), seguidos de 1 paciente com duas coletas (25%) e o restante (50%) apenas com a primeira.

Os medicamentos mais utilizados no esquema terapêutico foram: Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina composto e Rifaldin.

GRUPO D

O grupo D (n=3), 2 homens e 1 mulher, com faixa etária variando entre 36 a 49 anos, com formas de tratamento diferenciadas; dois deles com *M.tuberculosis* resistente, sendo adotado o esquema terapêutico de “reserva”: Amicacina, Floctati, Etambutol, Pirizidona, Metronidazol, além de Efavirenz e Biovir para HIV. Outro paciente, com Rifampicina e Isoniazida, além de Efavirenz, Zidovudina + Lamivudina.

Como também relatado nos grupos anteriores (B e C), não foi possível observar diferenças entre as medianas no decorrer das coletas, conforme demonstrados nos gráficos 10 e 11, respectivamente, que representam as contagens de Linfócitos T CD4 e Linfócitos TCD8. O perfil de cada paciente se encontra demonstrado nos gráficos (Apêndice 30, 31 e 32).

Neste grupo todos os pacientes apresentaram a carga viral plasmática abaixo do limite de detecção do teste.

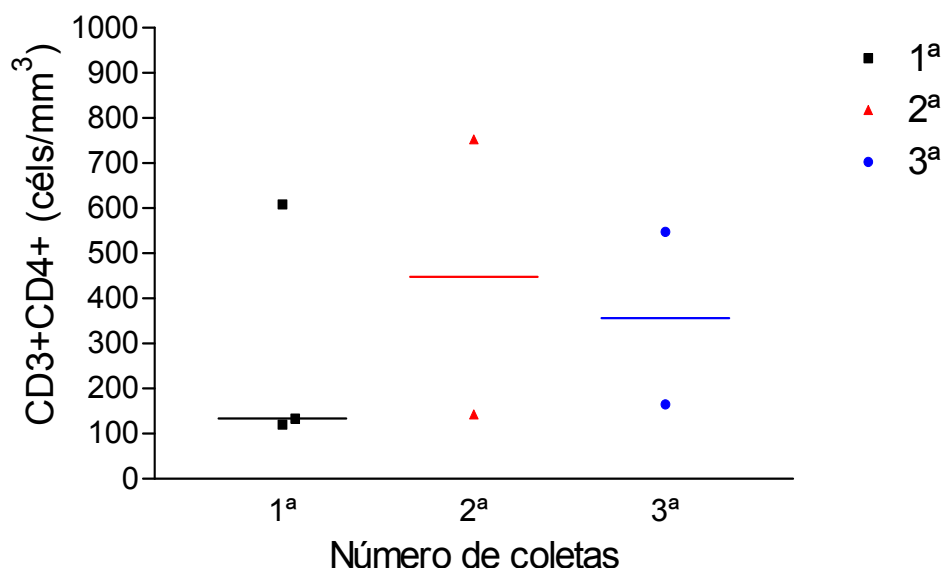


GRÁFICO 10 - Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo D e medianas das contagens de Linfócitos T CD4.

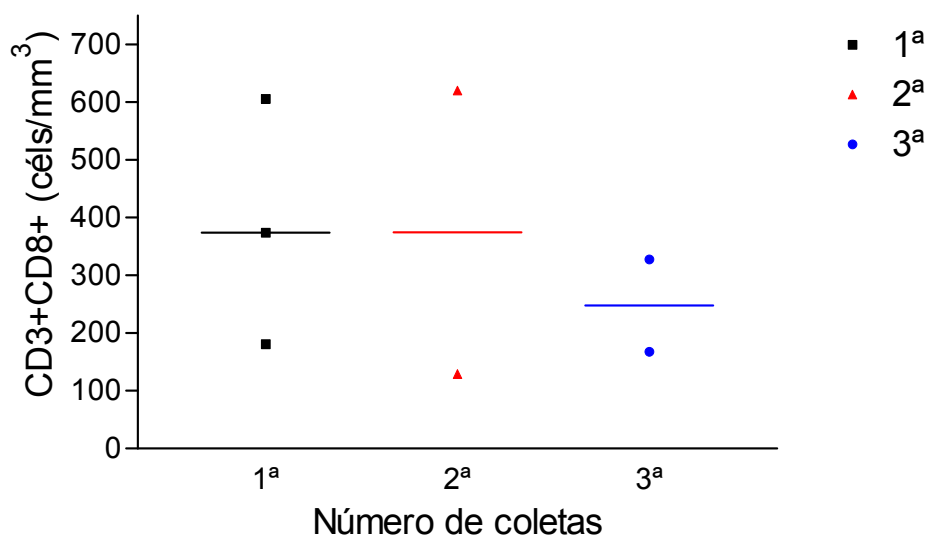


GRÁFICO 11 - Distribuição do número de coletas realizadas por indivíduos no Grupo D e medianas das contagens de Linfócitos T CD8.

6.2 RELAÇÃO ENTRE OS GRUPOS

Os gráficos 12 e 13 mostram os perfis das medianas das contagens de Linfócitos T CD4/CD8 e a dosagem da Carga Viral avaliados nos diferentes grupos. .

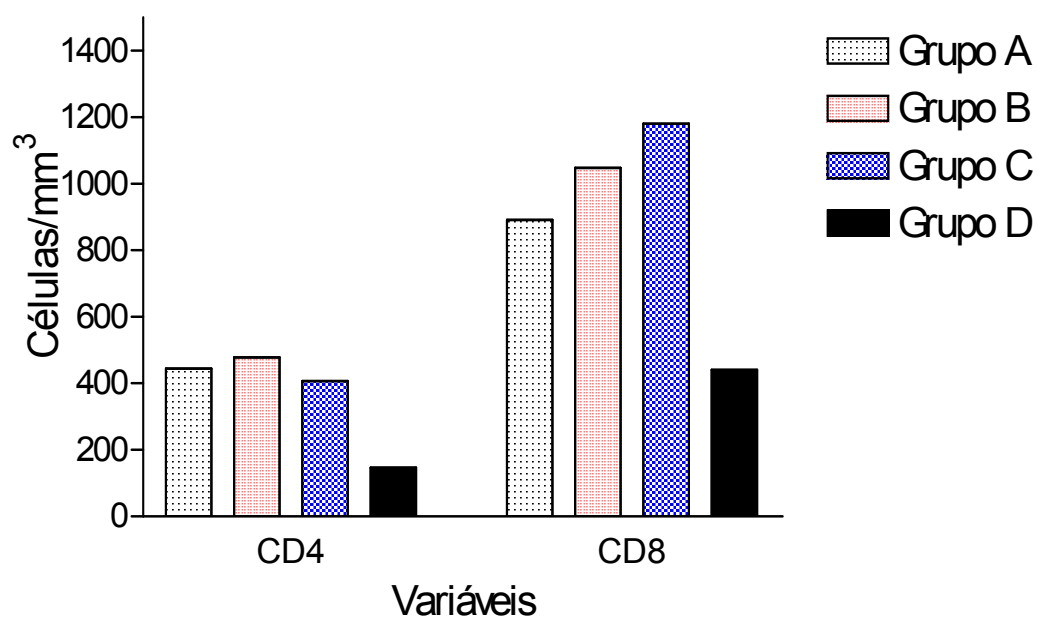


GRÁFICO 12 - Perfil das medianas entre as variáveis CD4/CD8 nos grupos.

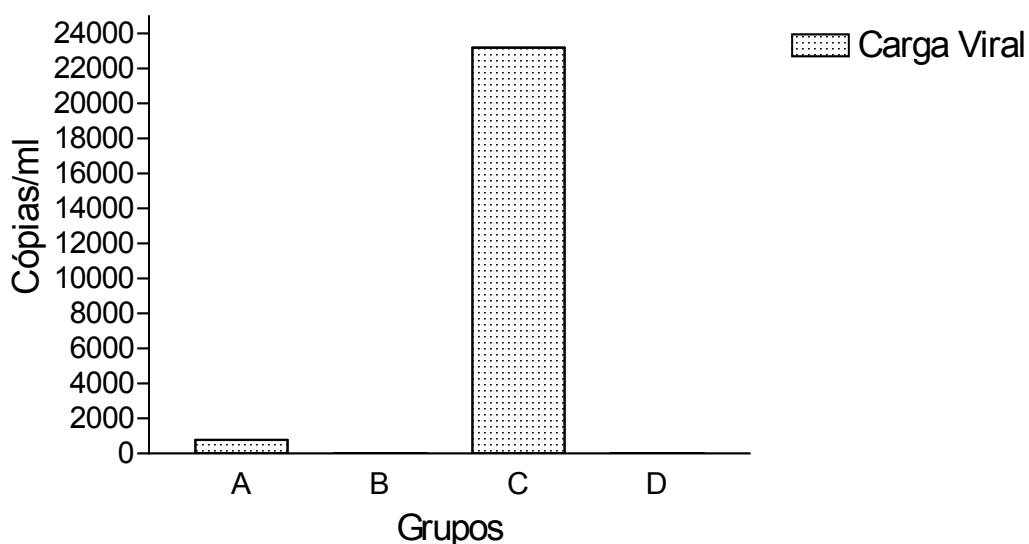


GRÁFICO 13 - Perfil das medianas quanto à Carga viral Plasmática nos grupos analisados.

De modo geral, os grupos apresentaram um perfil imunológico satisfatório ($CD3/CD4 > 400$ células/ mm^3), exceto o grupo D com contagem de linfócito T $CD4 < 200$ céls/ mm^3 . A contagem de linfócitos T $CD8$ esteve dentro da normalidade (410-1590 células/ mm^3) em todos os grupos, conservando sempre a inversão da relação $CD4/CD8$ ($< 0,7$).

O grupo B apresentou um melhor perfil imunológico ($CD3/CD4 = 478$ células/ mm^3), conforme pode-se observar pelas medianas. Este grupo foi constituído de pacientes co-infectados que realizavam apenas o tratamento com anti-retroviral.

Os pacientes co-infectados, com tratamento a base de tuberculostáticos (grupo C e D) apresentaram contagens menores quando comparadas aos outros grupos (Gráfico 12). As contagens de Linfócitos T $CD8$ foram mais elevadas no grupo C (medianas $CD3/CD8 = 1181$ células/ mm^3). Observa-se um melhor equilíbrio (*set point*) na quantificação viral entre as coletas realizadas (Gráfico 9). O grupo D, co-infectados com tratamento duplo, apresentou contagens inferiores

de linfócitos T CD8 (medianas CD3/CD8= 440 células/mm³), porém com quantificação viral abaixo dos limites detectáveis.

Quanto ao perfil virológico foi observado que o grupo B e o D apresentaram carga viral abaixo dos limites de detecção (<50cópias/mL) em todas as coletas, e, os grupos A e C apresentaram carga viral detectáveis (médias: Grupo A= 9335 cópias/mL e Grupo C= 22520 cópias/mL), mesmo apresentando um perfil imunológico satisfatório (médias de CD3/CD4: Grupo A= 450 células/mm³ e Grupo C= 374 células/mm³).

As Tabelas 4 e 5, mostram os valores obtidos, individualmente, das contagens de Linfócitos T CD4 e da Carga Viral plasmática, para os diferentes grupos.

TABELA 4 – Estratificação das contagens de linfócitos T CD4 nos diferentes grupos.

Grupos	Nº de pacientes	CD4 abaixo de 200 céls	CD4 acima de 500 céls	CD4 entre 200 e 500 céls
A	19	2 (10,5%)	7 (36,9%)	10 (52,6%)
B	7	0	3 (42,8%)	4 (57,2%)
C	4	2 (50%)	2 (50%)	0
D	3	2 (66,6%%)	1(33,3%)	0

TABELA 5 – Estratificação da Carga Viral plasmática nos diferentes grupos.

Grupos	Nº de pacientes	Carga viral <Lim. Min.	Carga Viral >500.000 cópias	Carga viral > Lim. Min. e < 500.000 cópias
A	19	8 (42,1%)	0	11 (57,9%)
B	7	6 (85,7%)	0	1(14,3%)
C	4	0	0	4 (100%)
D	3	3 (100%)	0	0

Para a avaliação da resposta terapêutica adotada, os grupos foram reorganizados segundo os esquemas preconizados pelos médicos responsáveis pela assistência clínica e avaliados segundo a Contagem de Linfócitos T CD4 e a Carga Viral plasmática, conforme mostra a tabela 6.

TABELA 6 - Perfil imunológico e virológico dos grupos frente ao esquema terapêutico.

PACIENTES	ESQUEMAS TERAPÊUTICOS (nº de pacientes)	MEDIANAS CD4 (Células/mm3)	MEDIANAS CARGA VIRAL (Cópias/mL)
GRUPO A	<i>Sem tratamento</i> (3)	505	18570
	ITRN (2)	661,3	35380
	ITRN+ITRNN (11)	287	<50*
	ITRN+IP (3)	588	771
GRUPO B	ITRN+ITRNN (3)	420,5	< 50*
	ITRN+IP (4)	573,5	< 50*
GRUPO C	Rifampicina, Pirazinamida, Isoniazida (2)	407	30680
	Rifampicina (ou composto) e Pirazinamida (2)	354,3	13590
GRUPO D	Esquema de Reserva/ ITRN+ITRNN (2)	376	< 50*
	Rifampicina, Pirazinamida, Isoniazida / ITRN+ITRNN (1)	120	< 50*

(*) Inferior ao Limite de Detecção (50 cópias/mL).

Pela análise dos dados expressos na tabela 6, sugere-se que a terapêutica adotada foi satisfatória. Os pacientes do grupo A que apresentaram menor

redução na carga viral estavam sob tratamento com ITRN+ITRNN (<50 cópias/ml). Este esquema terapêutico também foi observado entre os pacientes do grupo B (42%) que demonstraram resultados abaixo dos limites de detecção.

Os pacientes do grupo C tiveram suas contagens de linfócitos T CD4 satisfatórias (mediana= 407 células/mm³), porém, a viremia permaneceu em níveis detectáveis e inferior a 37000 cópias/mL. A baciloscopia foi negativa para BAAR para todos os pacientes, sugerindo um esquema terapêutico favorável.

Os pacientes do grupo D apresentaram as menores contagens de Linfócitos T CD4 (mediana= 147 células/mm³) e com a carga viral indetectável em todas as coletas realizadas. A análise da baciloscopia indicou, apenas para um paciente, a presença de positividade (++) logo no início do acompanhamento e aumento da positividade (+++) no final do período que compreendeu este estudo; sugerindo uma possível falha do esquema tuberculostático. Nos demais pacientes, a baciloscopia foi negativa para BAAR.

6.3. AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DE LINFÓCITOS T CD4 E QUANTIFICAÇÃO VIRAL DENTRE OS ESQUEMAS TERAPÊUTICOS ADOTADOS NOS GRUPOS.

Com base nos gráficos apresentados no apêndice, pode-se avaliar o perfil imunológico e viral no decorrer das coletas, considerando as formas de tratamentos adotadas dentre os grupos.

Entre os pacientes do grupo A foi possível classificar as formas de tratamento adotadas pelo corpo clínico, como sendo: ITRN, ITRN+ITRNN, ITRN+IP e sem tratamento.

Pela contagem de linfócitos T CD4 no decorrer do acompanhamento (1ª a 3ª coleta) nesses indivíduos, observou-se que entre os pacientes que realizavam

tratamentos com ITRN+ITRNN, àqueles que apresentaram um aumento gradativo do número de células foram os que utilizavam as seguintes associações: lamivudina, estavudina e nevirapina (A5); lamivudina, estavudina e efavirenz (A9); lamivudina, efavirenz e Kaletra (A11); zidovudina, lamivudina, nevirapina e efavirenz (A12); tenofovir, lamivudina, efavirenz, zidovudina e estavudina (A14) e lamivudina, tenofovir, efavirenz e zidovudina (A18)(54% - 6/11). Mais de 60% desses pacientes mantiveram os níveis de viremia abaixo dos limites de detecção.

No grupo composto pela associação ITRN+IP, apesar de reduzido o número de pacientes (n=3), observou-se que houve um aumento da contagem de células nos indivíduos utilizando: zidovudina e nelfinavir (A16); Biovir, lamivudina, nelfinavir e zidovudina (A17)(66% - 2/3). Quanto à viremia foi observado níveis abaixo dos limites de detecção até, aproximadamente, 1600 cópias/ml.

Dentre os 19 pacientes compostos pelo grupo A, aquele que apresentou e manteve o maior número de linfócitos T CD4 ($> 900 \text{ céls/mm}^3$) foi o pertencente ao grupo dos ITRN, apesar de ser constituído por apenas 2 indivíduos. Fazia uso de .zidovudina (A19). Neste paciente a viremia manteve-se abaixo dos limites detectáveis durante as coletas, e chegando a aproximadamente 75000 cópias/ml para o outro integrante do grupo.

Esse mesmo perfil de aumento gradativo das contagens de CD4 da primeira para a última coleta também foram observadas nos pacientes sem tratamento (A1, A3 e A4). Neste observou-se que a viremia variou de aproximadamente 4000 a 45000 cópias/ml.

Entre os pacientes do grupo B foram classificadas as seguintes formas de tratamentos: ITRN+ITRNN e ITRN+IP.

Os indivíduos pertencentes ao sub-grupo dos ITRN+ITRNN, e que faziam uso de efavirenz + zidovudina (B3); zidovudina, lamivudina + efavirenz (B4, B7),

realizaram somente duas coletas, apesar de ter-se verificado um aumento da contagem de linfócitos T CD4. No decorrer das coletas, a viremia manteve-se abaixo dos limites de detecção para todos os pacientes.

Os indivíduos que faziam uso da associação ITRN+IP (57%) realizaram todas as coletas, exceto um paciente. Nesse sub-grupo, apesar dos pacientes manter-se acima de 350 células/mm³, não foi observado o aumento da contagem de linfócitos T CD4, como vinha sendo acompanhado (B1, B2, B5), exceto para um paciente (B6). No entanto, a viremia manteve-se abaixo dos limites de detecção. O esquema em uso foi composto por: Zidovudina e Indinavir; Atazanavir, Ritonavir e Lamivudina; Estavudina, Ritonavir, Saquinavir e Lamivudina; e por fim, Atazanavir, Ritonavir e Tenofovir.

Os pacientes do grupo C faziam uso apenas de tuberculostático (Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida; Rifampicina composto). No geral, apenas 1 indivíduo realizou todas as coletas, seguido de 2 pacientes com 2 coletas, e 1 paciente com apenas 1 coleta. Não foi observado aumento da contagem de linfócitos T CD4, exceto para um paciente (C2), permanecendo todos com viremia detectável. O mesmo foi observado para os pacientes do grupo D quanto ao CD4, utilizando ITRN+ITRNN, efavirenz e biovir, associados ao Esquema 1 e de reserva. No entanto, a viremia foi mantida em níveis abaixo dos limites detectáveis em todas as coletas.

Paralelo à essa avaliação viral e imunológica realizada dentre e entre os grupos, foi possível selecionar dois grupos para a realização da genotipagem.

7. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO PARA O SEQÜENCIAMENTO

Foram selecionados 13 pacientes que se enquadravam no critério de inclusão devido à sensibilidade do teste exigir níveis de carga viral detectáveis (ESHLEMAN, S. H.; 2005). Sendo assim, foram selecionados 9 pacientes pertencentes ao grupo A, e 4 pacientes pertencentes ao grupo C. Todos apresentando 1, 2 ou 3 coletas, conforme Tabela 7.

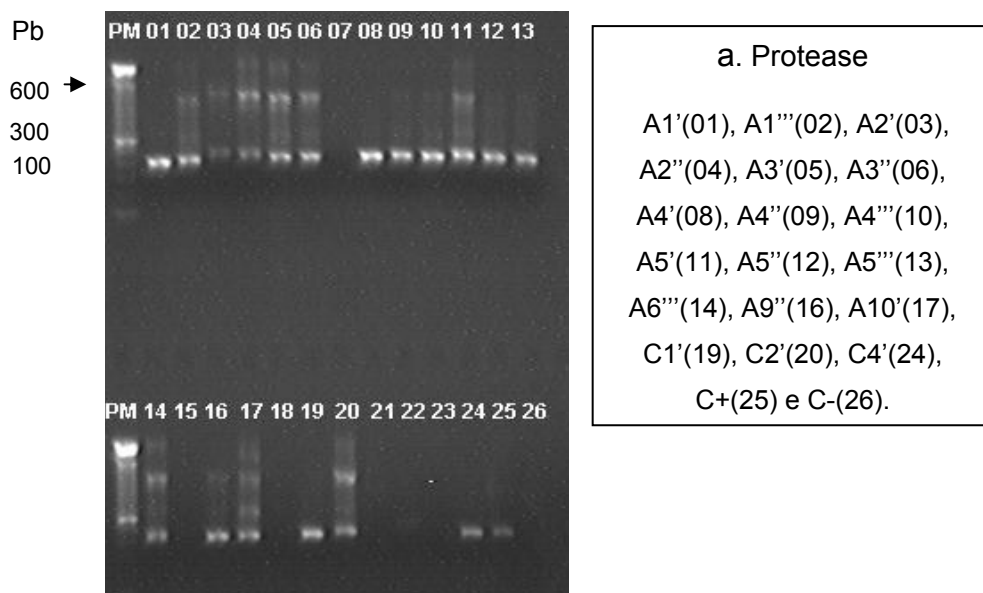
TABELA 7 – Perfil da carga viral dos pacientes selecionados nas 3 coletas.

PACIENTES	1º COLETA (')	2ºCOLETA ('')	3ºCOLETA ('''')
A1 1118/1119	44982	–	44843
A2 1120/1121	66807	74719	–
A3 1122/1123/1124	4067	9631	3632
A4 1125/1126/1127	18574	26944	16881
A5 1128/1129/1130	17170	21361	9259
A6 1131	–	3530	23701
A9 1132/1133	4272	6824	–
A10 1134	12507	–	–
A16 1135	1646	–	–
C1 1136	30244	–	–
C2 1137	16555	–	–
C3 1139	12346	11021	8330
C4 1141	65669	–	–

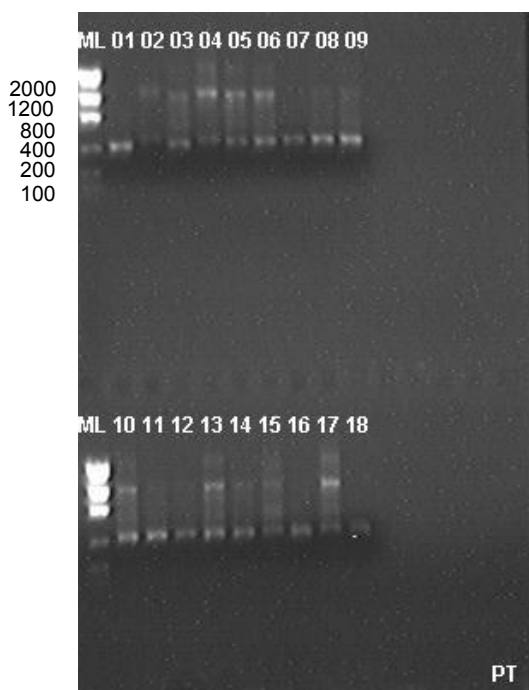
– Não houve coleta ou paciente apresentando dosagem de carga viral abaixo do limite de detecção.

Foi realizada a extração de RNA, a retrotranscrição (cDNA) e a PCR de todos os pacientes selecionados (cada paciente com seu número de coletas). No entanto, foi possível amplificar, utilizando os “*primers*” de interesse 18 amostras, sendo cerca de 99pb da sequência da protease e 245pb da sequência da transcriptase reversa (Quadro 8).

A partir das amostras positivas, realizou-se a purificação de cada produto amplificado e a quantificação de ácidos nucleicos por comparação com os padrões de 100 pares de base (Figura 5).



Pb

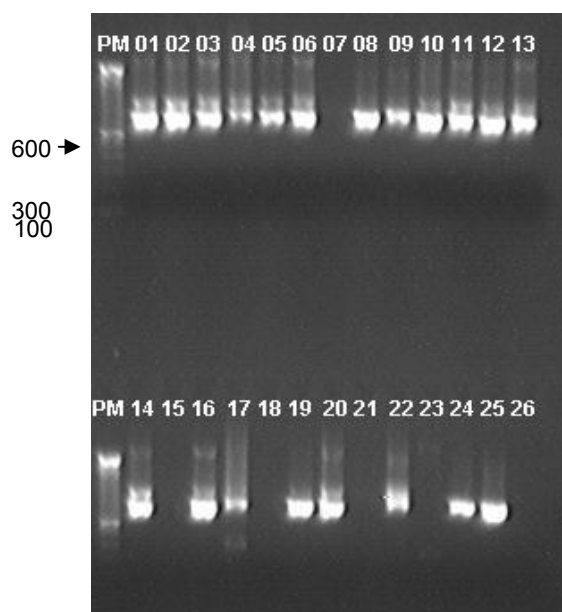


b. Protease

A1'(01), A1'''(02), A2'(03),
A2''(04), A3'(05), A3''(06),
A4'(07), A4''(08), A4'''(9),
A5'(10), A5''(11), A5'''(12),
A6'''(13), A9''(14), A10'(15),
C1'(16), C2'(17) e C4'(18).

Figura 5a e b. Perfil em gel de agarose 1% das bandas amplificadas por PCR a partir do cDNA-HIV e purificadas para a região da Protease. Identificação das amostras/pacientes por poço de aplicação.

Pb



a. Transcriptase Reversa

A1'(01); A1'''(02); A2'(03);
A2''(04), A3'(05); A3''(06);
A4'(08); A4''(09), A4'''(10),
A5'(11), A5''(12), A5'''(13),
A6'''(14), A9''(16),
A10'(17), C1'(19), C2'(20),
C3''(22), C4'(24), C+(25) e
C-(26).

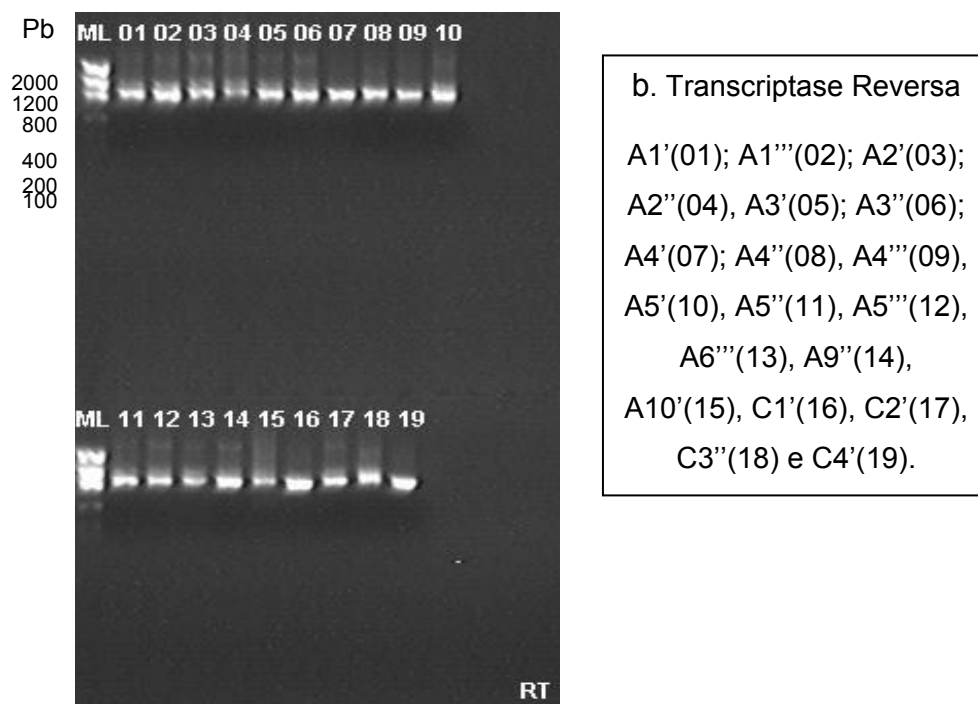


Figura 6 a e b. Perfil em gel de agarose 1% das bandas amplificadas por PCR a partir do cDNA-HIV e purificadas para a região da Transcriptase reversa. Identificação das amostras/pacientes por poço de aplicação.

7.1 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE HIV PARA ANÁLISE POR SEQUENCIAMENTO DE DNA

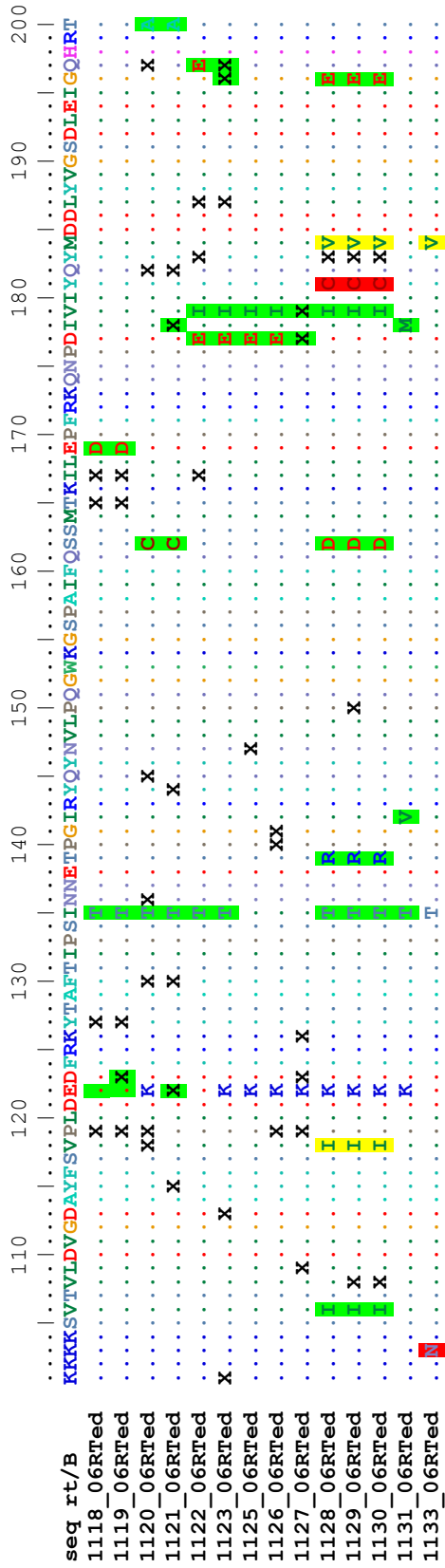
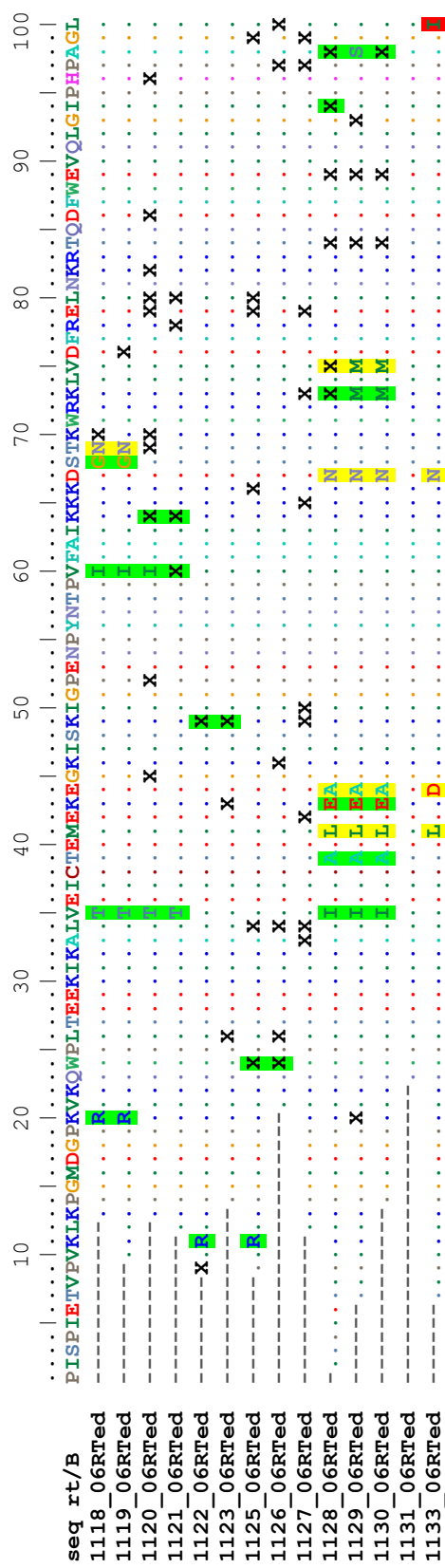
O sequenciamento da região viral *pol* correspondente ao gene da transcriptase reversa e protease foi realizado conforme descrito no item 4.5.7 de Material e métodos e a análise da sequência conduzida no banco de dados da “Stanford HIV RT and Protease Sequence Database”.

As Tabelas 8, 9, 10 e 11 do Apêndice mostram os resultados das análises das sequências dos pacientes do grupo A e Grupo C interpretados pelo HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm apresentando as principais

mutações encontradas relacionadas ou não com a resistência para as regiões da Transcriptase Reversa e Protease.

Com base nesses dados foi possível caracterizar, segundo os subtipos virais, as principais posições envolvidas em cada grupo avaliado, bem como definir aquelas que poderiam ou não estar relacionadas á resistência (segundo dados obtidos dos Laudos Standford).

Foram realizados os alinhamentos das seqüências nucleotídicas dos pacientes, em ambas regiões (RT/PT) e comparadas com uma seqüência consenso para o Subtipo B (região *pol*) e Subtipo F, conforme mostrado nas figuras 7 e 8 no apêndice. Com o alinhamento das seqüências traduzidas identificou-se os códons para cada região do gene *pol*, segundo os laudos obtidos pelo “Standford HIV RT and Protease Sequence Database”, e demonstrados nas figuras 9, 10, 11 e 12.



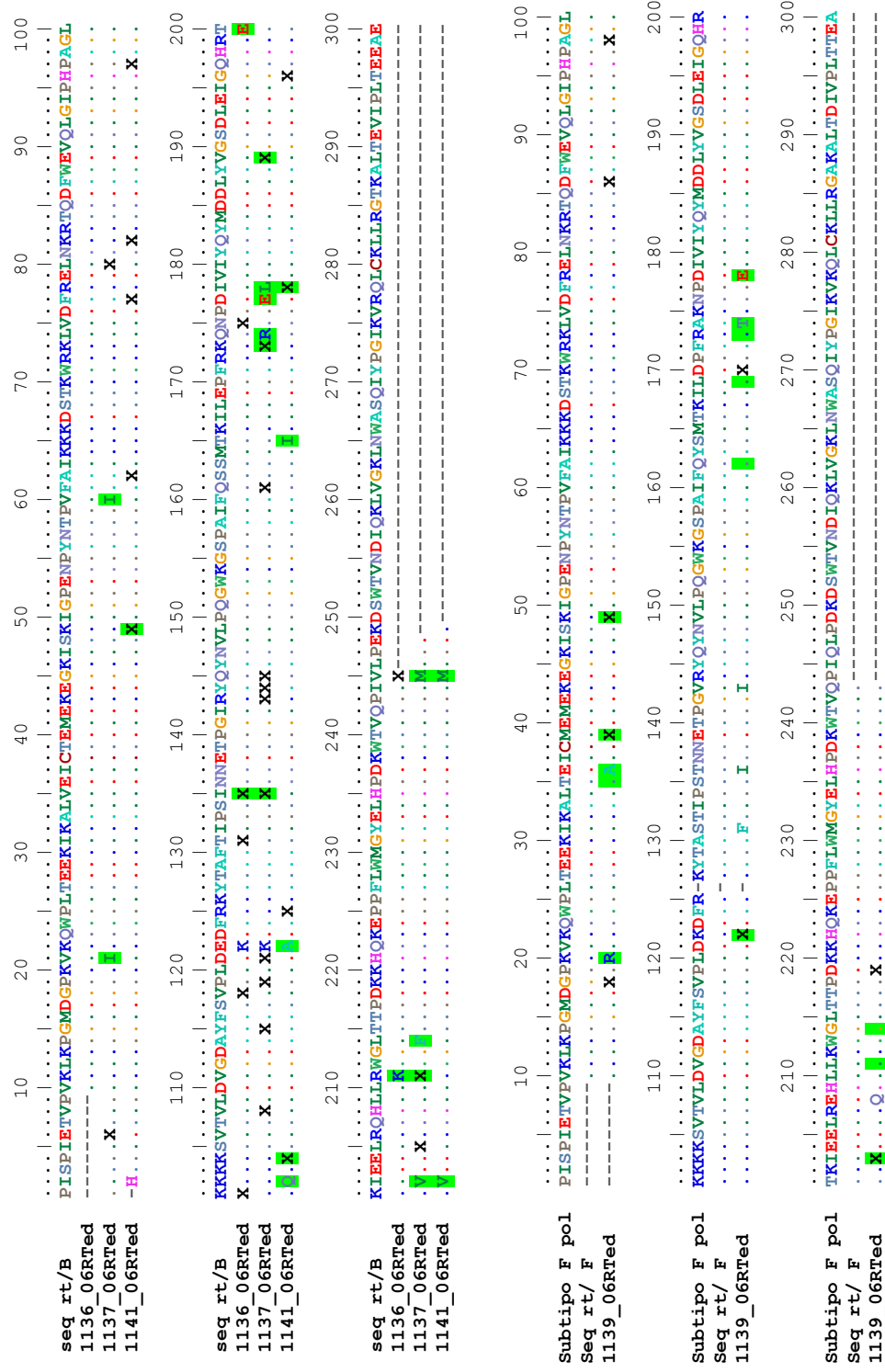


FIGURA 10 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos referentes ao Subtipo B e Subtipo F para a região da Transcriptase Reversa no Grupo C, e identificação das mutações e polimorfismos encontrados. Amarelo – mutação relacionada a ITRN; Vermelho – mutações relacionadas a ITRNN; Verde - polimorfismos; X – quando surge 2 ou + aminoácidos.

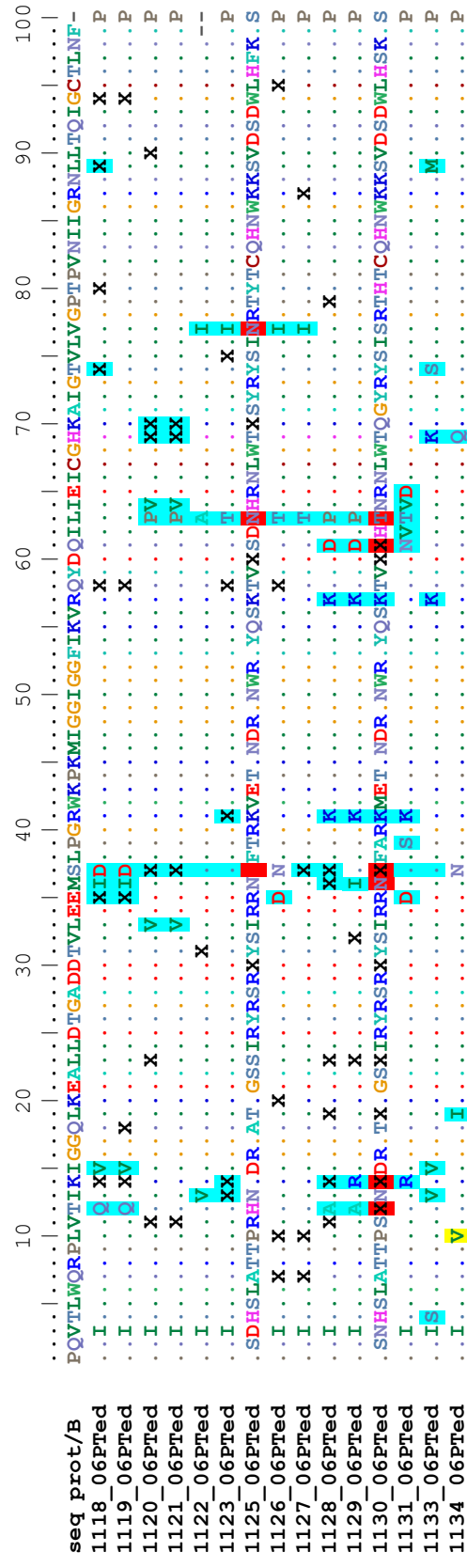


FIGURA 11 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos referente ao subtipo B para a região da Protease no grupo A, e identificação das mutações e polimorfismos encontrados. Amarelo – mutação relacionada à resistência; Azul – polimorfismos; X – quando surge 2 ou + aminoácidos.

7.2 – IDENTIFICAÇÃO DOS PONTOS DE POLIMORFISMOS ENCONTRADOS NOS GRUPOS

7.2.1 – GRUPO A

O sequenciamento da região da Transcriptase reversa originou 14 seqüências dispostas em 7 pacientes. O total de polimorfismos encontrados nessas seqüências foram 162 posições, sendo 48 posições diferentes (sejam mutações principais ou acesssórias), e com esses dados foi possível avaliar as posições mais freqüentes encontradas no grupo, conforme mostrado no gráfico 14.

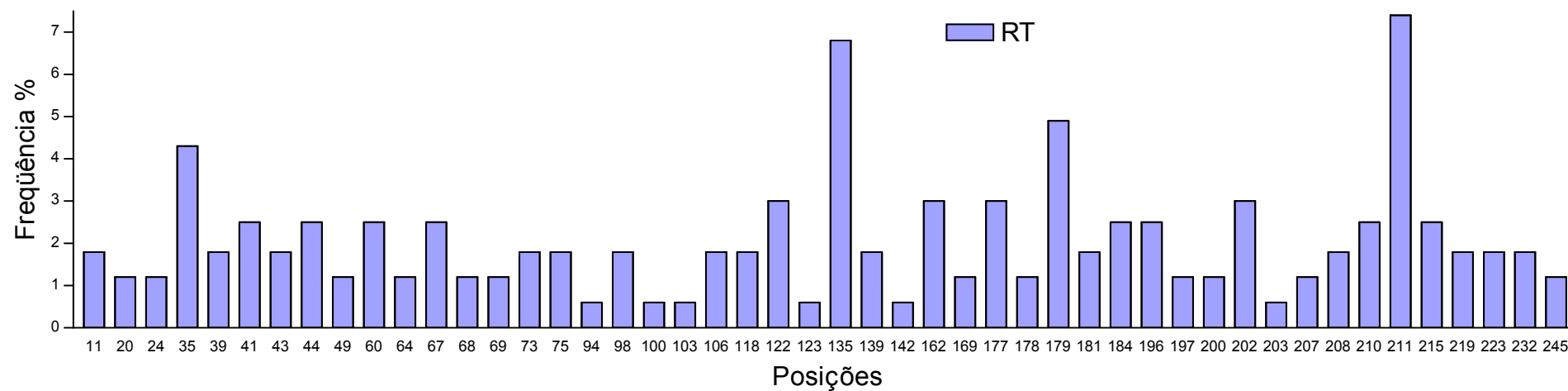


GRÁFICO 14 - Frequência dos códons referentes ao Subtipo B para a região da Transcriptase Reversa do HIV-1 no grupo A.

O gráfico 15 mostra que do total de polimorfismos encontrados (48 posições diferentes) foi avaliado aqueles que ocorreram em sítios conhecidos por estarem associados com resistência a drogas para o subtipo B.

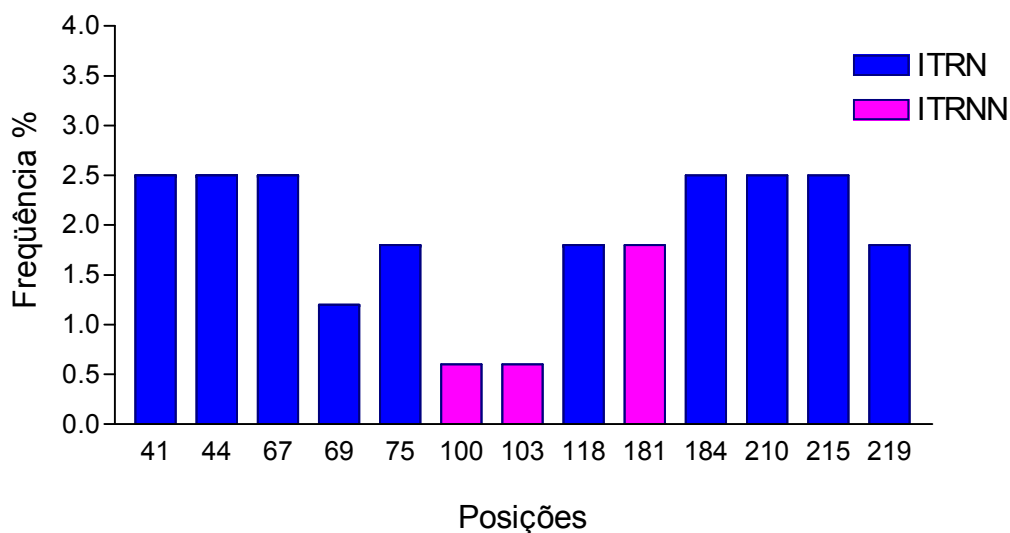


GRÁFICO 15 – Frequência das mutações associadas á resistência para os Inibidores da Transcriptase Reversa no Grupo A.

Foram observadas mutações principais relacionadas aos Inibidores da Transcriptase Reversa para os ITRN (análogos) e ITRNN (não análogos). Para os ITRNS observou-se um maior número de posições quando comparados aos ITRNNs, e dessa forma pode-se avaliar a frequência das mesmas por pacientes, a fim de se determinar quais os pontos mais freqüentes entre eles, conforme mostra a tabela 12.

TABELA 12 – Frequência das posições associadas á resistência para os pacientes do Grupo A.

POSIÇÃO	FREQÜÊNCIA POR PACIENTE (%)
41,44,67, 184,210,215	28,6(2/7)
75, 118,181, 219	14,3(1/7)
69	14,3(1/7)
100, 103	14,3(1/7)

Nesse grupo foi encontrado pacientes com diferentes números de coletas realizadas, sendo 2 pacientes com apenas uma coleta, 3 pacientes com duas coletas e 2 pacientes com 3 coletas. Com relação a esses, foi observado que houve algumas alterações pontuais dos polimorfismos encontrados no decorrer das coletas, verificando a presença de mutações como V75IMV, K73KM, K223EKQ, A98AS e W24RW. Essas alterações foram observadas, quase sempre em uma das coletas, não permanecendo nas demais, o que pode-se associar ao tratamento que vem sendo adotado.

Através do sequenciamento da região da Protease obteve-se um total de polimorfismos encontrados com 87 posições, sendo 24 posições diferentes, e com esses dados foi possível avaliar a frequência das posições mais encontradas, conforme mostra o gráfico 16.

Do total de polimorfismos encontrados apenas a posição 10 (mutação menor) está relacionada à resistência a drogas.

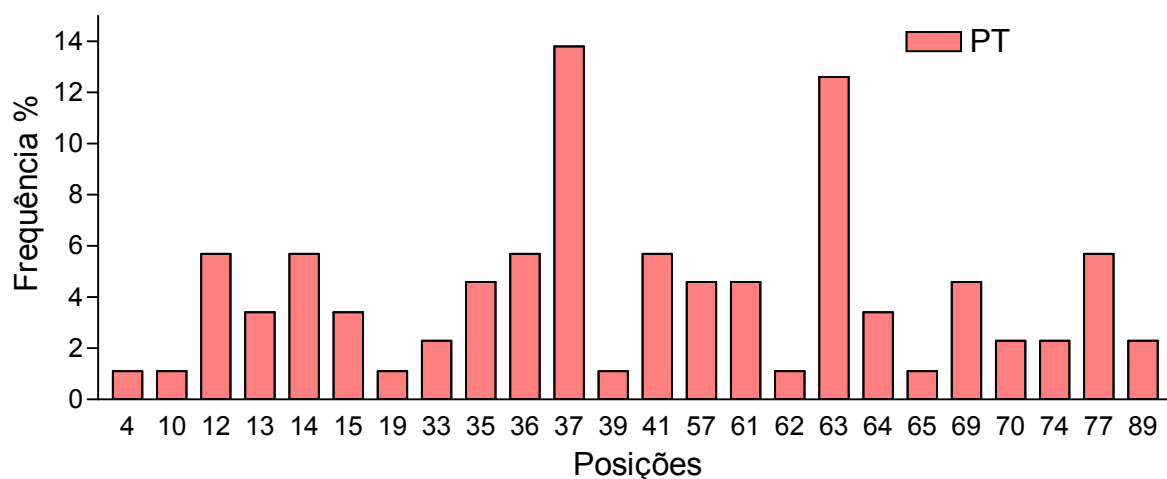


GRÁFICO 16 - Frequência dos códons referentes ao Subtipo B para a região da Protease do HIV-1 no grupo A.

7.2.2 – GRUPO C

O sequenciamento da região da Transcriptase Reversa referentes ao Subtipo B originou 3 seqüências dispostas em 3 pacientes. O total de pontos de polimorfismos encontrados nessas seqüências somaram-se 23 posições, sendo 18 posições diferentes, e dessa forma foi possível avaliar as posições mais freqüentes segundo o número de repetições, conforme mostra o gráfico 17.

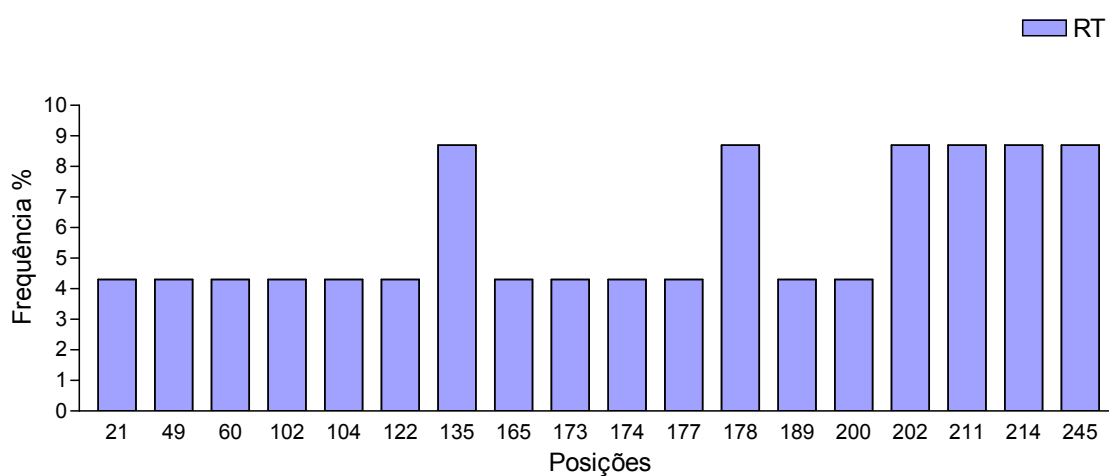


GRÁFICO 17 - Frequência dos códons referentes ao Subtipo B para a região da Transcriptase reversa do HIV-1 no grupo C.

Nos pacientes desse grupo foi possível observar algumas alterações pontuais dos polimorfismos, como T39AT, K49KR, D86DN, K104KR, K122EK, I135IT, E169DN, K173KT, I178IL, I202IT e R211KR.

Não foi observado pontos de mutações nos sítios associados com resistência á drogas para a região da Transcriptase Reversa no referido subtipo, apenas sendo detectados pontos de polimorfismos não necessariamente ligados á resistência.

O sequenciamento da região da Protease (n=2) mostrou um total de 14 posições polimórficas, em 11 posições diferentes, das quais foram avaliadas as freqüências segundo ao número de repetições que ocorreram, conforme mostra gráfico 18.

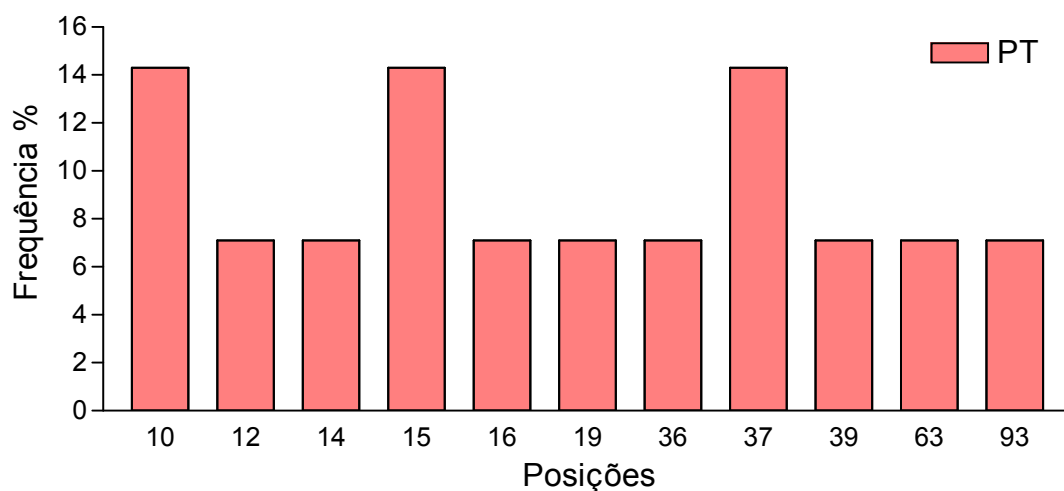


GRÁFICO 18 - Frequência dos códons referentes ao Subtipo B para a região da Protease do HIV-1 no grupo C.

De forma semelhante ao grupo A, os pontos polimórficos encontrados na região da Protease, relacionados à resistência, somente ocorreram para a posição 10.

Dentre este grupo obteve-se duas seqüências referentes ao Subtipo F, uma para região da Transcriptase reversa e a outra, para a Protease, ambas em

pacientes distintos. Foram observadas as seguintes posições, para a região da Transcriptase reversa: 20, 35, 36, 39, 49, 86, 122, 162, 169, 173, 174, 202 e 211; e Protease: 15, 19, 35, 36, 41, 57, 61, 65, 72, 89 e 93.

7.3 – AVALIAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ENTRE OS GRUPOS AVALIADOS.

No grupo A, constituído por seqüências referentes ao Subtipo B, foi observada a presença de um maior número de códons para a região da Transcriptase Reversa do HIV-1 quando comparados ao grupo C (co-infecção). Com relação aos inibidores para essa região, o Grupo A foi o único a apresentar posições relacionadas à resistência, o que não foi observado no outro grupo.

Na co-infecção, o grupo com tratamento tuberculostático, observou maior frequência de mutações para a região da Protease (posição 10), embora o número de pacientes tenha sido reduzido. Tal situação pode sugerir que existe uma tendência nos tratamentos com tuberculostático em selecionar este tipo de mutação (Gráficos 18 e 19), necessitando para isso de estudos com uma população maior.

Para ambas as regiões do gene *pol*, seja a Transcriptase Reversa ou Protease, observou-se que algumas posições foram comuns nos grupos, sendo referentes ao mesmo subtipo (B), embora com frequências calculadas com base no número de amostras. Para a região da Transcriptase reversa, nas seqüências de Subtipo B, foram observados os seguintes pontos de mutação: 49, 60, 122, 135, 177, 178, 200, 202, 211 e 245. Desses, pode-se avaliar segundo o número de repetições que ocorreram, que a posição 211 e 245 foram as mais freqüente entre os grupos, seguidas das posições 122, 177, 202, 60, 245, 178, 49 e 200 e para o grupo A, e 202, 245, 178, 49, 60, 122, 177 e 200 para o grupo C. Como

não foram observadas posições relacionadas à resistência para o grupo C, não foi possível fazer associações.

Para a região da Protease, nas seqüências compostas pelo Subtipo B, foram observadas as seguintes mutações por posição: 10, 12, 14, 15, 19, 36, 37, 39 e 63. Dessas, também foi possível se avaliar segundo o número de repetições que ocorreram, que a posição mais freqüente entre os grupos foi a 37. Na seqüência observou-se as posições 63, 12, 14, 36, 15, 19, 39 e 10 para o grupo A, e 10, 15, 12, 14, 19, 36, 39 e 63 para o grupo C. Foram observados em ambos os grupos a presença da posição 10, como associada á resistência aos inibidores.

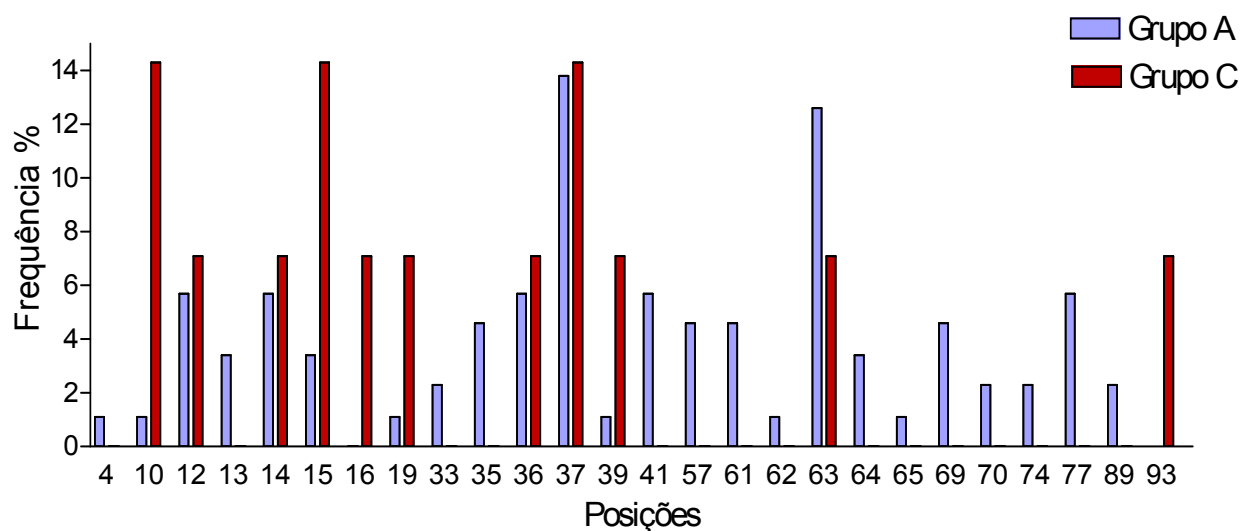


GRÁFICO 19 - Perfil das freqüências dos códons referentes ao Subtipo B para a região da Protease entre os grupos.

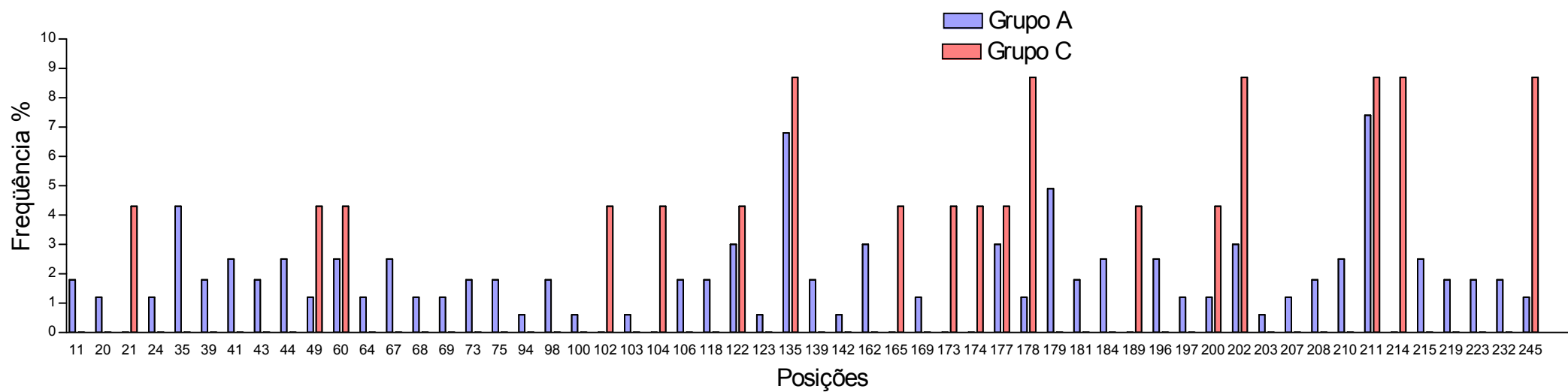


GRÁFICO 20 – Perfil das frequências dos códons referentes ao Subtipo B para a região da Transcriptase reversa nos grupos.

Para as seqüências pertencentes ao Subtipo F não foi possível fazer comparações pelo fato de serem apenas 1 seqüência para cada região (Transcriptase reversa e Protease), sendo apenas demonstrados os polimorfismos encontrados.

7.4 – AVALIAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS SEGUNDO A TERAPÊUTICA ADOTADA

Considerando o tratamento preconizado no Hospital Nestor Goulart Reis e do Serviço Especial de Saúde, pôde se avaliar os perfis das mutações apresentadas pelos pacientes. Foram avaliadas as mutações principais que estiveram presentes nas regiões da Transcriptase Reversa e Protease para cada grupo, bem como o sexo e os subtipos mais encontrados.

A tabela 13 mostra os perfis das mutações diante dos esquemas terapêuticos.

TABELA 13 - Perfil das mutações frente ao tratamento adotado para o grupo A.

PACIENTES	SEXO	TRATAMENTO ADOTADO	MUTAÇÕES RT	MUTAÇÕES PT	SUBTIPO
A1'	F	Sem tratamento	T69N	-	B
A1'''	F	Sem tratamento	T69N	-	B
A2'	F	AZT	-	-	B
A2''	F	AZT	-	-	B
A3'	F	Sem tratamento	-	-	B
A3''	F	Sem tratamento	-	-	B
A4'	M	Sem	-	-	B

		tratamento			
A4''	M	Sem tratamento	-	-	B
A4'''	M	Sem tratamento	-	-	B
A5'	F	3TC, d4T, NVP	M41L, E44A, D67N, V75IMV, V118I, M184V, L210W, T215T, K219N e Y181C	-	B, D
A5''	F	3TC, d4T, NVP	M41L, E44A, D67N, V75IMV, V118I, M184V, L210W, T215T, K219N e Y181C	-	B, D
A5'''	F	3TC, d4T, NVP	M41L, E44A, D67N, V75IMV, V118I, M184V, L210W, T215T, K219N e Y181C	-	B, D

A6''	F	AZT, NVP	-	-	B, D
A9''	M	3TC, d4T, EFZ	M41L, E44D, D67N, M184V, L210W, T215Y e L100I, K103N	-	B
A10'	F	D4T, 3TC,NVP, AZT	*	L10V	B

*Não foi possível realizar o seqüenciamento essa região.

Fonte: Algoritmo de Standford.

Com referência aos inibidores da Transcriptase Reversa (ITRN/ITRNN) observou-se no paciente que não estava sob uso de medicação, a mutação T69N, que apesar de tratar-se de uma mutação adicional relacionada aos ITRN, seu efeito na susceptibilidade da droga ainda não é conhecido.

Nos pacientes que realizavam tratamento foram encontradas as mutações M41L, T215Y, que juntas podem conferir altos níveis de resistência ao AZT e d4T, e baixos níveis aos ddl, ABC e TDF. As mutações como E44D causam baixos níveis de resistência ao 3TC e provavelmente para cada dos outros ITRN quando presente com V118I, o qual pode causar baixos níveis de resistência ao 3TC e possivelmente para outros ITRN quando presente com E44A/D. A mutação M184V causa altos níveis de resistência ao 3TC e FTC, baixos níveis in vitro de resistência ao ddl e ABC. A Y181C causa altos níveis de resistência a NVP de DLV e baixos níveis ao EFV. Já a L100I* causa resistência intermediária ao EFV e DLV, e baixos níveis a NVP. A T215Y/F causa resistência ao AZT e D4T e limita o fitness para o ABC, ddl e TDF particularmente quando ocorrem em combinações com M41L e L210W. A K103N causa altos níveis de resistência a

NVP, DLV, e EFV. Referentes aos inibidores da Protease (IP) a única mutação menor encontrada foi a L10V (I/F/R) que é relacionada á resistência quando presente com outras mutações (Laudos Standford).

A tabela 14 mostra o perfil das mutações diante os esquemas terapêuticos para o grupo C.

TABELA 14– Perfil das mutações frente ao tratamento adotado pelo grupo C.

PACIENTES	SEXO	TRATAMENTO ADOTADO	MUTAÇÕES RT	MUTAÇÕES PT	SUBTIPO
C1'	M	RFM, INH, PZA	-	-	B , F
C2'	M	RFM, PZA	-	L10LV	B
C3'	M	RFM composto, PZA	-	*	F
C4'	M	RFM, INH, PZA	-	L10LV	B

*Não foi possível realizar o seqüenciamento essa região.

Fonte: Algoritmo de Standford.

Os pacientes do grupo A que estavam realizando tratamento e que apresentaram as mutações acima relacionadas encontraram-se resistentes a quase todos os medicamentos administrados.

Entre os subtipos encontrados no grupo A, o mais freqüente foi o subtipo B (75%) seguido do BD (25%). No grupo C, o subtipo mais freqüente foi o B (50%), seguido do BF (25%) e F (25%). Esses resultados condizem com o subtipo mais prevalente para nossa região segundo vários estudos.

Através dos laudos puderam ser avaliados os níveis de resistência às drogas: sensibilidade, resistência intermediária, baixos níveis de resistência e altos níveis de resistência; tanto para os ITRN/ITRNN como para os IP, conforme mostram os quadros 5 e 6.

QUADRO 5 - Níveis de resistência para IP/ITRN/ITRNN do grupo A.

IP									ITRN/ITRNN									
Amostras	ATV	DRV	FPV	IDV	LPV	NFV	SQV	TPV	3TC	ABC	AZT	D4T	DDI	FTC	TDF	DLV	EFV	NVP
1118	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LR	LR	S	S	S	S	S
1119	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LR	LR	S	S	S	S	S
1120	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1121	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1122	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1123	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1125	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1126	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1127	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1128	S	S	S	S	S	S	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	HR	IR	HR	LR	HR
1129	S	S	S	S	S	S	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	HR	IR	HR	LR	HR
1130	S	S	S	S	S	S	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	HR	IR	HR	LR	HR
1131	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1133	S	S	S	S	S	S	S	S	HR	HR	HR	HR	IR	HR	IR	HR	HR	HR
1134	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

S: Susceptible; IR: Intermediate resistance; LR: Low-level resistance; HR: High-level resistance

ATV: Atazanavir; DRV: Darunavir ; FPV: Fosamprenavir; IDV: Indinavir; LPV: Lopinavir; NFV: Nelfinavir; SQV: Saquinavir, TPV:Tipranavir 3TC: Lamivudina, ABC: Abacavir; AZT: Zidovudina; D4T: Estavudina; DDI: Didanosina; FTC: Entricitabina; TDF: Tenofovir; DLV: Delavirdina; EFV: Efavirenz; NVPNevirapina.

Em relação aos Inibidores da Transcriptase Reversa, sejam ITRN ou ITRNN, observou-se que aproximadamente 43% (3/7) dos pacientes apresentaram algum nível de resistência para as drogas testadas (3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC, TDF, DLV, EFV e NVP). Desses, 28,6% (2/7) apresentaram altos níveis de resistência para 3TC, ABC, AZT, D4T , DLV, NVP, DDI (14,3% - (1/7) e EFV (14,3%) - (1/7), o que condiz com algumas das mutações

apresentadas pelos respectivos pacientes, como T69N, V118I, M184V, T215Y, A98G, L100I, K103N, Y181C, entre outras. Quanto aos IP, ocorreram 100% de susceptibilidade.

QUADRO 6 -Níveis de resistência para IP e ITRN/ITRNN no grupo C.

	IP								ITRN/ITRNN									
Amostras	ATV	DRV	FPV	IDV	LPV	NFV	SQV	TPV	3TC	ABC	AZT	D4T	DDI	FTC	TDF	DLV	EFV	NVP
1136	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LR	LR	S	S	S	S	S
1137	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LR	LR	S	S	S	S	S
1139	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1141	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S: Susceptible; IR: Intermediate resistance; LR: Low-level resistance; HR: High-level resistance

ATV: Atazanavir; DRV: Darunavir ; FPV: Fosamprenavir; IDV: Indinavir; LPV: Lopinavir; NFV: Nelfinavir; SQV: Saquinavir, TPV: Tipranavir 3TC: Lamivudina, ABC: Abacavir; AZT: Zidovudina; D4T: Estavudina; DDI: Didanosina; FTC: Entricitabina; TDF: Tenofovir; DLV: Delavirdina EFV: Efavirenz; NVP: Nevirapina.

Em relação aos ITRN ou ITRNN, observou-se que 50% (2/4) dos pacientes apresentaram um baixo nível de resistência para D4T e DDI, embora não tenha sido encontrado nenhuma mutação associada á resistência nesse grupo. Referente aos IPs, não foi observado nenhum nível de resistência às drogas testadas, como também foi visto para o grupo A.

8. DISCUSSÃO

Ao longo do tempo, observou-se um decréscimo na incidência da co-infecção HIV/*M. tuberculosis* devido á evolução do próprio diagnóstico da AIDS não ser mais baseado no critério Caracas, e sim em testes laboratoriais, mais precisos e com maior rapidez. Em estudo realizado no período de 1991-2000, as regiões dentro do Estado de São Paulo que apresentaram maiores incidências de tuberculose em casos de AIDS foram verificadas em Santos, Franco da Rocha e Osasco, induzindo uma idéia de que a tuberculose trata-se de uma doença importante nas regiões de alta concentração demográfica. Nesse estudo observou-se que a DIR VII, referente ao município de Araraquara, encontrou-se em 17º lugar (25%), no ranking das incidências totais de Tuberculose em casos de Aids (RODRIGUES-JR, A. L. *et. al.*; 2006).

Segundo dados coletados na Secretaria de Saúde de Araraquara, através do SINAN, que atendem cerca de 15 municípios vizinhos, observou-se a frequência por município de residência (Araraquara) e ano diagnóstico de casos notificados para Aids com notificação apresentando tuberculose pulmonar no período de 1986 a 2006, e foram encontrados um total de 178 pacientes, sendo 143 mortos, 1 paciente ignorado, e somente 34 vivos. Com base em tais valores não foi possível abranger o número de pacientes pretendido no início do trabalho (SECRETARIA DA SAÚDE DE ARARAQUARA, 2006).

Com o acompanhamento laboratorial realizado através da contagem de Linfócitos T CD4, Linfócitos T CD8 (como principal marcador prognóstico de evolução da infecção pelo HIV) e a dosagem da Carga viral, foi possível monitorar o tratamento proposto pelo corpo clínico, onde a avaliação da resposta ao tratamento possui como parâmetros a redução da carga viral e o aumento do

número de Linfócitos T CD4 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Dessa forma, pode-se realizar um acompanhamento do perfil imunológico e virológico dos pacientes, verificando-se possíveis falhas terapêuticas e/ou desenvolvimento de resistência por parte dos vírus circulantes.

Segundo consta na literatura, a tuberculose altera o desenvolvimento da infecção pelo HIV, diminuindo a contagem de células T CD4 e aumentando o número de replicação viral (viremia)(MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Na população avaliada observou-se que nem sempre a viremia elevada era acompanhada pelo número reduzido de linfócitos T CD4. Esse fato foi possível ser visto em alguns pacientes do grupo A e do grupo C, tratados somente com anti-retroviral e tuberculostático, respectivamente, onde os pacientes apresentavam contagens de linfócitos T CD4 em níveis satisfatórios e carga viral detectável (Tabela 6). Foi observado que a carga viral no grupo C permaneceu sem variação entre as coletas, fato esse observado no gráfico 12, e que o grupo C apresentou melhor perfil de Linfócitos T CD8. Foram observados também casos em que as contagens de linfócitos T CD4 apresentavam-se reduzidos e a viremia indetectável. Esse achado tornou-se mais interessante por tratar-se de pacientes do grupo D, sob tratamento com anti-retroviral e tuberculostático, sugerindo que, mesmo com todas as dificuldades nos tratamentos, esses pacientes co-infectados reagem de uma maneira satisfatória, apresentando uma forma de tratamento adequada.

Essa resposta discordante entre contagem de linfócitos T CD4 e determinação de carga viral, com a diminuição ou elevação de ambos, não é raro de ocorrer. Segundo o Ministério da Saúde, nesses casos o tratamento deve ser mantido para que se possa observar a evolução destes parâmetros antes que sejam realizadas mudanças nos esquemas terapêuticos. Os pacientes com ótima

resposta virológica podem não apresentar elevação da contagem de linfócitos T CD4 devido ao esgotamento de sua capacidade de regeneração imunológica, mais freqüentes quando a contagem basal de linfócitos T CD4 é muito baixa e nos casos de pacientes idosos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Foi observado que mesmo com a presença da co-infecção, o perfil imunológico dos pacientes manteve-se em níveis favoráveis, permitindo um controle adequado da infecção pelo HIV-1. No que diz respeito a viremia, observou-se que também houve uma resposta favorável, visto que em alguns casos não houve aumento da replicação viral, ou seja, o tratamento foi adequado a ponto de manter a viremia em equilíbrio, e em outros, esta manteve-se em níveis indetectáveis. Portanto, esses resultados mostraram-se positivos quando referindo-se ao tratamento adotado.

Entre os grupos selecionados para a realização do teste de genotipagem, foram avaliados somente aqueles pacientes que participaram da seleção, independente do número de coletas.

Segundo objetivo do estudo, também foram avaliadas as freqüências de mutações na região *pol* (gene da transcriptase reversa e protease) de indivíduos co-infectados frente ao esquema terapêutico adotado para as amostras (coletas) que encontraram-se disponíveis, e observou-se que os pacientes do grupo C (co-infecção) não apresentaram mutações associadas à resistência nas regiões da Transcriptase Reversa (ITRN/ITRNN) quando comparados com os pacientes do grupo A (somente com HIV) para a mesma região. Dentre as amostras o subtipo mais prevalente foi o B, resultado que condiz com o subtipo mais freqüente observado no Brasil segundo estudos já realizados (BRINDEIRO, P. A. *et. al.*; 2002) (DUMANS, A. T. *et. al.*; 2002) (MARTÍNEZ, A. M. B. *et. al.*; 2002) (TANURI, A. *et. al.*; 2002). Outros dois subtipos discordantes também encontrados para as

regiões genômicas avaliadas foram os recombinantes B/D, B/F e F. Segundo estudos, mosaicos como B/F, B/C e B/D também são reportados em nosso país (DUMANS, A. T. *et. al.*; 2002) (SABINO, E. C. *et. al.*; 1996) (TANURI, A. *et. al.*; 1999).

Os subtipos do HIV diferem um do outro por 10 a 12% em seus nucleotídeos e 5 a 6 % em seus aminoácidos para as regiões da Transcriptase reversa e Protease. Essas diferenças podem influenciar o espectro das mutações que desenvolvem-se durante a pressão seletiva da droga (KANTOR, R. *et. al.*, 2005).

As mutações associadas aos ITRN/ITRNN mais freqüentes no grupo que realizaram tratamentos somente com anti-retroviral (A) foram: T69N (1,2% - geral / 14,28% - por paciente), M41L (2,5% / 28,5%), E44A (2,5% / 28,5%), D67N (2,5% / 28,5%), V751MV (1,8% / 14,28%), V118I (1,8% / 14,28%), M184V 2,5% / 28,5%), L210W (2,5% / 28,5%), T215Y (2,5% / 28,5%), K219N (1,8% / 14,28%) e Y181C (1,8% / 14,28%), L100I (0,6% / 14,28%), K103N (0,6% / 14,28%). A única mutação encontrada relacionada à região da protease foi a L10V (1,1% / 12,5%).

Em estudos anteriores, como Kantor, R. *et. al.*, em 2005, já relatou mutações associadas à resistência encontradas no Subtipo B nas seguintes posições, para ITRN: 41, 44, 62, 65, 67, 69, 70, 74, 75, 77, 115, 116, 118, 151, 184, 210, 215 e 219; para ITRNN: 98, 100, 101, 103, 106, 108, 179, 181, 188, 190, 225, 227, 230, 236 e 238; e para IP: 10, 20, 24, 30, 32, 33, 36, 46, 47, 48, 50, 53, 54, 63, 71, 73, 77, 82, 84, 88, 90 e 93. Nesse mesmo trabalho também foram citados os polimorfismos encontrados em nossas amostras para o Subtipo F: (sendo para a Transcriptase reversa: 35, 39, 49, 162, 169, 173, 174 e para Protease: 15, 19, 35, 36, 41, 57, 60, 61, 65, 72 e 89).

Outros polimorfismos encontrados para a região da protease associados à mutações acessórias descritas em outros trabalhos foram: M36I, L63P, V77I, e para a região da Transcriptase Reversa, quanto aos ITRN: M41L, M44D, D67N, V118I, M184V, L210W, T215Y/F, K219N; ITRNN: L100I, K103N E Y181C, além de outros polimorfismos como V35T, A98G/S, K122E, I135T/V, S162C, E169D, D177G/E, T200R/A/I, I202V, R211K (CERQUEIRA, D. M. *et. al.*, 2004) (BAHIA, F. *et. al.*, 2004) (CERQUEIRA, D. M. *et. al.*, 2004).

A mutação encontrada no grupo dos pacientes co-infectados pode estar associada aos medicamentos que podem ter sido administrados a esses pacientes no passado, como o próprio inibidor da protease, ou também à aquisição de um vírus já mutante.

A mutação (secundária) referente à região da protease mais freqüentemente encontrada em ambos os Grupo foi a L10V/LV, também observada em outros estudos (DUMANS, A. T. *et. al.*, 2002) (CERQUEIRA, D. M. *et. al.*, 2004).

Portanto, nossos resultados condizem com mutações e polimorfismos já citados em outros trabalhos, no que referem-se ao mesmo subtipo.

9. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, embora com um número reduzido de pacientes por grupo, é possível concluir que:

- Os grupos de estudos apresentaram um perfil imunológico e viral bastante razoável, considerando os diferentes tratamentos instituídos.
- Em alguns casos a co-infecção parece atuar de forma sinérgica com o tratamento antiretroviral, mantendo sob equilíbrio a carga viral e favorecendo o aumento dos linfócitos CD3+CD4+.
- O tratamento para tuberculose concomitante ao anti-retroviral parece não regenerar, em alguns casos, a população linfocitária.
- A análise do polimorfismo da região *pol* do Subtipo B permite identificar maior frequência de mutações por posição no grupo não co-infectado.
- O esquema terapêutico preconizado pode ter contribuído para a presença de mutações associadas à resistência aos ITRN/ITRNN.
- A maior frequência de mutações pontuais na região da protease para o Subtipo B esteve associada à co-infecção; podendo sugerir que ou esses pacientes ou foram infectados com vírus apresentando estas mutações ou a co-infecção influencia a seleção de tais populações virais.

10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDS Control and Prevention (AIDSCAP) Project of Family Health Internal, the Francois-Xavier Bagnoud Center of Public Health and Human Rights of the Harvard School of Public Health, UNAIDS. **The Status and Trends of the Global HIV/AIDS Pandemic**, 1996.

ALEMAN, S.; SÖDERBÄRG, K.; VISCO-COMANDINI, U.; SITBON, G.; SÖNNERBORG, A.; Drug resistance at low viraemia in HIV-1 infected patients with antiretroviral combination therapy. **AIDS**, 16:1039-1044, 2002.

ARENS, M. Clinically relevant sequence-based genotyping of HBV, HCV, CMV, and HIV. **J. Clin. Virol.**, 22:11-29, 2001.

BAHIA, F.; PEDROSO, C.; NETTO, E. M.; FIGUEIREDO, R.; NETO, L. P.; BRITES, C. Evaluation of the Genotypic Pattern of HIV-1 Resistance in AIDS Patients Failing Antiretroviral Therapy. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 8(4):281-289, 2004.

BAXTER, J. D.; MAYERS, D.L.; WENTWORTH, D. N. A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. **Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS**, v. 14, 83-93, 2000.

BRINDEIRO, P. A.; BRINDEIRO, R. M.; MORTENSEN, C.; HERTOGS, K.; DE VROEY, V.; RUBINI, N. P.; SION, F. S.; DE AS C. A. MACHADO, D. M.; SUCCI, R. C.; TANURI, A. Testing genotypic and phenotypic resistance in human immunodeficiency vírus type 1 isolates of clade B and other clades from children failing antiretroviral therapy. **J. Clin. Microbiol.** 40(12):45 12-9,2002.

BRITO, A. M.; CASTILHO, E. A.; SZWARCOWALD, C. L. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. **Rev. Soc. Bras. Méd. Tropical**, v.34, 207-217, 2000.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO AIDS E DST, 2006. Acessado em Junho, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Notice to Readers: Update for the use of rifabutin or rifampicin for the treatment and prevention of the tuberculosis among HIV-infected patients taking protease inhibitors or nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. **MMWR**, v.49, 185-189, 2000.

CERQUEIRA, D. M.; AMORIN, R. M. S.; SILVA, R. R.; CAMARA, G. N.L.; BRÍGIDO, M. M.; MARTINS, C. R. F. Antiretroviral Resistance and Genetic Diversity of Human Immunodeficiency Vírus Type 1 Isolates from the Federal District, Central Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 99(8):877-882, December, 2004.

CERQUEIRA, D. M.; RAMALHO, E. D.; OLIVEIRA, C. P.; SILVA, R. R.; FRANCHINI, M.; FELIPE, M. S. S.; MARTINS, C. R. F. HIV-1 Subtypes and

mutations associated to antiretroviral drug resistance in human isolates from central Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 35:187-192, 2004.

CINGOLANI, A.; ANTINORI, A.; RIZZO, M. G. Usefulness of monitoring HIV drug resistance and the adherence in individuals failing highly active antiretroviral therapy: a randomized study. **AIDS**, v. 16, 369-379, 2002.

COHEN, C. J.; HUNT, S. S.; SENSON, M.; FARTHING, C. A randomized trial assessing the impact of phenotypic resistance testing on antiretroviral therapy. **AIDS**, v. 16, 579-588, 2002.

COFFIN, J. M.; HAASE, A.; LEVY, J. A.; MONTAGNER, L.; OROSZLAN, S.; TEICH, N.; TEMIN, H.; TOYOSHIMA, K.; VARMUS, H.; VOGT, P.; WEISS, R. A.; What to call the AIDS virus? **Nature**. 321: 10, 1986.

II Consenso Brasileiro de Tuberculose /Diretrizes Brasileiras para Tuberculose, 2004.

DE CLERCQ, E.; **Collect. Czech. Chem. Commun.** 1998, 93,449.

DEEKS, S. G.; SMITH, M.; HOLODNIY, M.; KAHN, J. O. HIV-1 protease inhibitors. A review for clinicians. **JAMA**, v. 277, 145-53, 1997.

DE GRUTOLLA, V.; DIX, L.; D'AQUILA, R.T.; HOLDER, D. The relation Between baseline HIV drug resistance and response to antiretroviral therapy: reanalysis of

retrospective and prospective studies using standardized data analysis plan.

Antivir. Ther., v. 5, 41-48, 2000.

DE MENDOZA, C.; GALLEG0, O.; SORIANO, V. Mechanisms of resistance to antiretroviral drugs – Clinical Implications. **AIDS Rev.**, 64-82, 2002.

DEMETER, L.; HAUBRICH, R. Phenotypic and genotypic resistance assays: methodology, reliability, and interpretations. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 26, 3-9, 2001.

DUMANS, A. T.; SOARES, M. A.; PIENIAZEK, D.; KALISH, M. L.; VROEY, V. D.; HERTOQS, K.; TANURI, A. Prevalence of Protease and Reverse Transcriptase Drug Resistance Mutations over Time in Drug-Naïve Human Immunodeficiency Virus Type 1-Positive Individuals in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 46(9):3075-3079,2002.

DURANT, J.; CLEVENBERG, P. Drug resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. **Lancet**, v. 353, 2195-2199, 1999.

EDWARDS, D.; KIRKPATRICK, G. H. The immunology of mycobacterial diseases. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 134, 1062-1071, 1986.

ESHLEMAN, S. H.; CRUTCHER, G.; PETRAUSKENE, O.; KUNSTMAN, K.; CUNNINGHAM, S. P.; TREVINO, C.; DAVIS, C.; KENNEDY, J.; FAIRMAN, J.; FOLEY, B.; KOP, J. Sensitivity and Specificity of the ViroSeq Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Genotyping System for Detection of HIV-1

Drug Resistance Mutations by Use of an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer.

Journal of Clinical Microbiology Feb. 2005, p. 813-817.

GRANT, A. D.; COHC, K. M. D. ABC of AIDS – HIV infection and AIDS in the developing world. **BMJ**. 322: 1475-1478, 2001.

GONDA, M. A.; WONG-STAAAL, F.; GALLO, R. C.; CLEMENTES, J. E.; NARAYAN, O.; GILDEN, R. V.; **Science**, 227, 173, 1985.

HANNA, G.J.; D'AQUILA, R.T. Clinical use of genotypic and phenotypic drug resistance testing for monitor antiretroviral chemotherapy. **Clin. Inf. Dis.**, v. 32, 774-782, 2001.

HIRSCH, M. S.; CONWAY, B.; D'AQUILA, R. T.; JOHNSON, V. A.; BRUN-VÉZINET, F.; CLOTET, B.; DEMETER, L. M.; HAMMER, S. M.; JACOBSEN, D. M.; KURITZKES, D. R.; LOVEDAY, C.; MELLORS, J. W.; VELLA, S.; RICHMAN, D. D. Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adults With HIV Infection. **JAMA**, 279(24): 1984-1991, 1998.

HIRSCH, M. S.; BRUN-VÉZINET, F.; D'AQUILA, R. T.; HAMMER, S. M.; JOHNSON, V. A.; KURITZKES, D. R.; LOVEDAY, C.; MELLORS, J. W.; CLOTET, B.; CONWAY, B.; DEMETER, L. M.; VELLA, S.; JACOBSEN, D. M.; RICHMAN, D. D. Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adult HIV-1 Infection. **JAMA**, 283(18):2417-2426, 2000.

HOPE, T. J.; **Chem. Biol.** 4, 335, 1997.

KANTOR, R.; KATZENSTEIN, D. A.; EFRON, B.; CARVALHO, A. P.; WYNHOVEN, B.; CANE, P.; CLARKE, J.; SIRIVICHAYAKUL, S.; SOARES, M. A.; SNOECK, J.; PILLARY, C.; RUDICH, H.; RODRIGUES, R.; HOLGUIN, A.; ARIYOSHI, K.; BOUZAS, M. H.; CAHN, P.; SUGIURA, W.; SORIANO, V.; BRIGIDO, L. F.; GROSSMAN, Z.; MORRIS, L.; VANDAMME, A. M.; TANURI, A.; PHANUPHAK, P.; WEBER, J. N.; PILLARY, D.; HARRIGAN, R.; CAMACHO, R.; SCHAPIRO, J. M.; SHAFER, R. W. Impact of HIV-1 Subtype and Antiretroviral Therapy on Protease and Reverse Transcriptase Genotype: Results of a Global Collaboration. **PLoS MEDICINE**. 2(4): e 112, 2005.

KAPLAN, A. H.; MANCHESTER, M.; SWANSTROM, R.; **J. Virol. Methods**, 68, 6782, 1994.

KATZ, R. A.; SKALKA, A. M.; **Annu. Rev. Biochem.** 63, 7178, 1994.

KERR-PONTES, L. R. S., OLIVEIRA, F. A. S., FREIRE, C. A. M. Tuberculose associada á Aids: situação de região do Nordeste brasileiro. **Rer. Saúde Pública**. 31(4):323-9, 1997.

LAGRANGE, P. H., WAGNIER, A., HERRMAN, J. L. Mycobacteriosis in the compromised host. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 95 Supll 1:163-70, 2000.

LU, M.; KIM, P. S.; **J. Biochem. Struct. Dynamic**. 15, 465, 1997.

MANSKY, L. M. Retroviruses mutation rates and their role in genetic variation. **J. Gen. Virol.** 79:1337-1345, 1998.

MARTÍNEZ, A. M. B.; BARBOSA, E. F.; FERREIRA, P. C. P.; CARDOSO, F. A.; SILVEIRA, J.; SASSI, G.; SILVA, C. M.; MENDONÇA-SIGNORINI, V.; ANTUNES, C. M. F. Molecular epidemiology of HIV-1 in Rio Grande, RS, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 35(5):471-476,2002.

MELTZER, M. S.; SKILLMAN, D. R; GOMATOS, P. J.; KALTER D. C., GENDELMAN, H. E. Role of mononuclear phagocytes in the pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 8, 169-194, 1990.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Atualização das recomendações para o tratamento da co-infecção HIV-Tuberculose em adultos e adolescentes, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV (versão preliminar), 2006.

ODHIAMBO, J.A.; BORGDORFF, M.W.; KIARNBIH, F.M., et al. Tuberculosis and the HIV epidemic: increasing annual risk of tuberculous infection in Kenya, 1986-1996. **Am J. Public Health** 1999; **89**:1078-82.

OSTROFF, S. M.; LEDUC, J. W. Global epidemiology of infectious diseases. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. Principles and practice of infectious diseases. 5 th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; p. 167-78, 2000.

PEÇANHA, E. P.; ANTUNES, O. A. C.; TANURI, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. **Quim. Nova**, Vol 25, nº 6B, 1108-1116, 2002.

PEDUZZI, C.; PIEROTTI, P.; VENTURI, G.; ROMANO, L.; MAZZOTTA, F.; ZAZZI, M. Performance of an in-house genotypic antiretroviral resistance assay in patients pretreated with multiple human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase inhibitors. **J. Clin. Virol.** 25:57-62, 2002.

Programa Nacional DST/AIDS. Dados e pesquisa sobre AIDS, 2003. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>. Acesso em 14 de abril de 2004.

PUGLISI, J. D.; TAN, R. Y.; CALNA, B. J.; FRANKEL, A. D.; **Science**, 257, 76, 1992.

RAVIGLIONE, M. C.; NARAIN, J. P.; KOCHI A. HIV-associated tuberculosis in developing countries: clinical features, diagnosis, and treatment. **Bull WHO**, v. 70, 515-526, 1992.

RAVIGLIONE, M. D.; SNIDER, D.E.; KOCHI, A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. **JAMA**, v.273, 220-226, 1995.

ROBERTSON, D. L.; ANDERSON, J. P.; BRADAC, J. A.; CARR, J. K.; FOLEY, B.; FUNKHOUSER, R. K.; GAO, F.; HAHN, B. H.; KALISH, M. L.; KUIKEN, C.; LEARN, G. H.; LEITNER, T.; MCCUTCHAN, F.; OSMANOR, S.; PEETERS, M.;

PIENIAZEK, D.; SALMINEN, M.; SHARP, P. M.; WOLINSKY, S.; KORBER, B. HIV-1 nomenclature proposal. **Science**. 288, 55-57, 2000.

RODRIGUES, R.; VAZQUEZ, C. M. P.; COLARES, J. K.; CUSTODIO, R. M.; FILHO, F. B.; SOUZA, L. R. ; GIANNA, M. C.; MARQUES, C. C. A.; BRIGIDO, L. F. M. Antiretroviral resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 infected patients enrolled in genotype testing at the Central Public Health Laboratory, São Paulo, Brazil: preliminary results. **Mem Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, Vol. 100(1): 97-102, February 2005

RODRIGUES-JR, A. L.; RUFFINO-NETTO, A.; CASTILHO, E.A. Distribuição espacial da co-infecção *M. tuberculosis*/HIV no Estado de São Paulo, 1991-2001. **Rev. Saúde Pública** 2006: 40(2):265-70.

ROSINA, M.; MICHELI, V.; BESANA, S.; TOIA, C.; GISMONDO, M. R.; CARGNEL, A. Genotyping in HIV drug resistance mutations: epidemiology in 145 patients. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 16:435-440,2000.

SABINO, E. C.; DIAZ, R. S.; BRIGIDO, L. F.; LEARN, G. H.; MULLINS, J. L.; REINGOLD, A. L.; DUARTE, A. J.; MAYER, A.; BUSCH, M. P. Distribution of HIV-1 subtypes seen in na AIDS clinic in São Paulo City, Brazil. **AIDS**, 10:1579-1584, 1996.

SHAFER, R. W. Genotypic testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 drug resistance. **Clin. Mic. Reviews**, v. 15, 247-277, 2002.

SONENBERG, P.; GLYNN, J.R.; FIELDING, K.; MURRAY, J.; GODFREY-FAUSSETT, P.; SHEARER, S. HIV and pulmonary tuberculosis: the impact goes beyond those infected with HIV. **AIDS 2004**; 18: 675-62.

TANURI, A.; SWANSON, P.; DEVARE, S.; BERRO, O. J.; SAVEDRA, A.; COSTA, L. J.; TELLES, J. G.; BRINDEIRO, R.; SCHABLE, C.; PIENIAZEK, D.; RAYFIELD, M. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, 20:60-66, 1999.

TANURI, A.; CARIDEA, E.; DANTAS, M. C.; MORGADO, M. G.; MELLO, D. L. C.; BORGES, S.; TAVARES, M.; FERREIRA, S. B.; SANTORO-LOPES, G.; MARTINS, C. R. F.; ESTEVES, A. L. C.; DIAZ, R. S.; ANDREO, S. M. S.; FERREIRA, L. A. P.; RODRIGUES, R.; REUTER, T.; CAVALCANTI, A. M. S.; OLIVEIRA, S. M.; BARBOSA, H. B.; TEIXEIRA, P. R.; CHEQUER, P. N. Prevalence of mutations related to HIV-1 antiretroviral resistance in Brazilian patients failing HAART. **J. Clin. Virol.**, 25:39-46, 2002.

TUSET, M.; MIRÓ, J.M.; CODINA, C. Interacciones entre los antirretrovirales y los fármacos utilizados en tratamiento de la tuberculosis. **Enfermedades emergentes**, v. 02, 16-32, 2000.

UNAIDS/WHO, 2003. AIDS Epidemic Update. December, 2003. Disponível em: <http://www.unaids.org>. Acesso em 14 abril de 2004.

VAISHNAV, Y. N.; WONG-STAAAL, **Annu. Rev. Biochem.** 60, 577, 1991.

VELDKAMP, A. I.; HOETELMANS, M. W.; BEINJINEN, J. H. Ritonavir enables combined therapy with rifampin and saquinavir. **Clin. Inf. Dis.**, v. 29, 1586, 1999.

WIGG, M. D. Vírus da Imunodeficiência Humana. In: Santos NOS, Romanos M. T. V., WIGG, M. D. Introdução á Virologia Humana. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 183-97, 2002.

WILSON, J. W.; BEAN, P.; ROBINS, T.; GRAZIANO, F.; PERSING, D. H. Comparative Evaluation of Three Human Immunodeficiency Virus Genotyping Systems: the HIV-GenotypR Method, the HIV PRT GeneChip Assay, and the HIV-1 RT Line Probe Assay. **J. Clin. Microbiol.**, 38(8): 3022-3028, 2000.

11. APÊNDICE

QUADRO 7 - Seqüências de primers utilizados para a realização do PCR e Sequenciamento

Primer	Sequence (5' 3')	Gene	Localização
K1	CAGAGCCAACAGCCCCACCA	Pol	2147-2166
K2	TTTCCCCACTAACTTCTGTATGTCATTGACA	Pol	3338-3308
DP10	TAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCG	Pt	2198-2223
DP 11	CCATTCCTGGCTTTAATTTTACTGGTA	Pt	2598-2572
F1	GTTGACTCAGATTGGTTGCAC	Rt	2519-2539
F2	GTATGTCATTGACAGTCCAGC	Rt	3321-3301
DP 16	CCTCAAATCACTCTTTGGCAAC	Pt	2253-2274
DP 17	AAAATTTAAAGTGCAGCCAAT	Pt	3260-3280

TABELA 8 – Perfil de mutações do grupo A para Transcriptase Reversa

PACIENTES	ITRN	ITRNN	POLIMORFISMOS
A1'	T69N	-	K20R, V35T, V60I, S68G, K122E, I135T, E169D
A1'''	T69N	-	K20R, V35T, V60I, S68G, K122E, D123DN, I135T, E169D
A2'	-	-	V35T, V60I, K64KR, I135T, S162C, T200A, E203DE, Q207A, R211K
A2''	-	-	L33V, N37CS, L63P, I64V, H69HQ, K70KT
A3'	-	-	K11R, K49KR, K122E, I135T, D177E, V179I, Q197E, I202V, R211K
A3''	-	-	K49KR, I135T, D177E, V179I, G196EG, Q197EQ, I202V, R211K, V245M
A4'	-	-	K11R, W24RW, D177E, V177E, V179I, I202V, R211K, V245M
A4''	-	-	W24RW, D177E, V179I, I202V, R211K
A4'''	-	-	K11R, D177E, V179I, I202V, R211K
A5'	M41L, E44A, D67N, V75IMV, V118I, M184V, L210W, T215Y, K219N	Y181C	V135I, T39A, K43E, K73KM, I94IL, A98AS, I135T, T139R, S162D, V179I, G196E, H208Y, R211K, K223EKQ, D237E
A5''	M41L, E44A, D67N,	Y181C	V135I, T39A, K43E, K73KM, A98AS, I135T, T139R, S162D,

	V75IMV, V118I, M184V, L210W, T215Y, K219N		V179I, G196E, H208Y, R211K, K223EKQ, D237E
A5'''	M41L, E44A, D67N, V75IMV, V118I, M184V, L210W, T215Y, K219N	Y181C	V135I, T39A, K43E, K73KM, A98AS, I135T, T139R, S162D, V179I, G196E, H208Y, R211K, K223EKQ, D237E
A6'''	-	-	I135T, I142V, I178M, R211K
A9''	M41L, E44D, D67N, M184V, L210W, T215Y	L100I, K103N	K122E, I135T, R211K

TABELA 9 – Perfil de mutações do grupo A para protease

PACIENTES	P MAIOR	P MENOR	POLIMORFISMOS
A1'	-	-	T12K, I15V, E35ED, M36I, N37D, T74TS, L89M
A1'''	-	-	T12Q, I15V, E35 ED, M36I, N37D
A2'	-	-	L33V, N37CS, L63P, I64V, H69HQ, K70KT
A2''	-	-	L33V, N37CS, L63P, I64V, H69HQ, K70KT
A3'	-	-	I13V, N37S, L63A, V77I
A3''	-	-	I13V, K14KR, N37S, R41RK, L63T, V77I
A4'	-	-	N37S, L63T, V77I
A4''	-	-	E35D, L63T, V77I
A4'''	-	-	N37S, L63T, V77I
A5'	-	-	T12A, K14KR, M36MI, N37NS, R41K, R57K, Q61D, L63P
A5''	-	-	T12A, K14KR, M36MI, N37NS, R41K, R57K, Q61D, L63P
A5'''	-	-	T12A, K14KR, M36MI, N37NS, R41K, R57K, Q61D, L63P
A6'''	-	-	K14R, E35D, N37S, P39S, R41K, Q61N, I62V, L63T, I64V, E65D
A9''	-	-	T4S, I13V, I15V, N37S, R57K, H69K, T74S, L89M
A10'	-	L10V	L19I, H69Q

TABELA 10 – Perfil de mutações do grupo C para transcriptase reversa

PACIENTES	ITRN	ITRNN	POLIMORFISMOS
C1'	-	-	I135IT, T200E, R211K, F214L
C2'	-	-	V21I, V60I, I135T, K173KT, Q174R, D177E, I178L, V189IV, I202V, R211KR, V245M
C3'	-	-	K20R, V35T, E36A, T39AT, K49KR, D86DN, K122EK, S162Y, E169DN, K173T, Q174K, D177E, I202IT, R211K, F214L
C4'	-	-	K49KR, K102Q, K104KR, K122A, T165I, I178IL, I202V, F214L, V245M

TABELA 11 – Perfil de mutações do grupo C para protease

PACIENTES	P MAIOR	P MENOR	POLIMORFISMOS
C1'	-	-	I15V, L19I, E35D, M36I, R14K, R57K, Q61N, E65D, I72IT, L89M, I93L
C2'	-	L10LV	T12K, I15V, L19V, M36MI, N37E, I93IL
C3'*			
C4'	-	L10LV	K14R, I15V, G16E, N37T, P39S, L63LP

- Não foi possível realizar o seqüenciamento deste paciente.

Alinhamento das seqüências da região *pol* do HIV (região RT) com os grupos de pacientes

						
		5	15	25	35	45
seq rt/B		AACAATGGCC	ATTGACAGAA	GAAAAAATAA	AAGCATTAGT	AGAAATTTGT
1118 RTe		AACAATGGCC	ATTGACAGAA	GAAAAAATAA	AAGCATTAAC	AGAAATATGT
1119 RTe		AACAATGGCC	ATTGACAGAA	GAAAAAATAA	AAGCATTAAC	AGAAATATGT
1120 RTe		AACAATGGCC	ATTGACAGAG	GAAAAAATAA	AAGCATTTGAC	AGAAATTTGT
1121 RTe		AACAATGGCC	ATTGACAGAG	GAAAAAATAA	AAGCATTTGAC	AGAAATTTGT
1122 RTe		AACAATGGCC	ATTGACAGAA	GAAAAAATAA	AAGCATTAGT	AGAAATATGT
1123 RTe		-----	-----	-----	-----	-----
1125 RTe		AACAATGGCC	ATTGACAGAA	GAAAAAATAA	AAGCATTAGT	AGAAATATGT
1126 RTe		AACAATGGCC	ATTGACAGAA	GAAAAAATAA	AAGCATTAGT	AGAAATATGT
1127 RTe		AACAATGGCC	ATTGACAGAA	GAAAAAATAA	AAGCMYTAGT	AGAAATATGT
1128 RTe		AACAATGGCC	ATTGACAGAA	GAAAAAATAA	AAGCACTAAT	AGAAATCTGT
1129 RTe		AACAATGGCC	ATTGACAGAA	GAAAAAATAA	AAGCACTAAT	AGAAATCTGT
1130 RTe		AACAATGGCC	ATTGACAGAA	GAAAAAATAA	AAGCACTAAT	AGAAATCTGT
1131 RTe		AACAATGGCC	ATTGACAGAA	GAAAAAATAA	AAGCATTAGT	AGAAATCTGT
1133 RTe		AACAATGGCC	ATTGACAGAA	GAAAAAATAA	AAGCATTAGT	AGAAATTTGT
1136 RTe		AACAATGGCC	ATTGACAGAA	GAAAAAATAA	AAGCATTAGT	AGAAATCTGT
1137 RTe		AACAATGGCC	ATTGACAGAA	GAAAAAATAA	AAGCATTAGT	AGAAATTTGT
1141 RTe		AACAATGGCC	ATTGACAGAA	GAAAAAATAA	AAGCATTAGT	AGAAATTTGT

						
		55	65	75	85	95
seq rt/B		ACAGAGATGG	AAAAGGAAGG	GAAAATTTCA	AAAATTGGGC	CTGAAAATCC
1118 RTe		ACAGAAATGG	AAAAGGAAGG	AAAATTTTCA	AAAATTGGGC	CTGAAAATCC
1119 RTe		ACAGAAATGG	AAAAGGAAGG	AAAATTTTCA	AAAATTGGGC	CTGAAAATCC
1120 RTe		ACAGAAATGG	AAAAGGAAGG	RAAAATTTCA	AAAATTGGGC	CYGAAAATCC
1121 RTe		ACAGAAATGG	AAAAGGAAGG	AAAATTTTCA	AAAATTGGGC	CTGAAAATCC
1122 RTe		ACAGAAATGG	AAAAGGAAGG	AAAATTTTCA	ARAATTGGGC	CTGAAAATCC
1123 RTe		-----	-----	-----	-----	-----
1125 RTe		ACAGAAATGG	AAAAGGAAGG	AAAATTTTCA	AAAATTGGGC	CTGAAAATCC
1126 RTe		ACAGAAATGG	AAAAGGAAGG	AAAATTTTCA	AAAATTGGGC	CTGAAAATCC
1127 RTe		ACAGAAATGG	ARAAGGAAGG	AAAATTTTCA	AAATYGGGC	CTGAAAATCC
1128 RTe		GCAGAACTGG	AAGAGGCAGG	GAAAATTTCA	AAAATTGGGC	CTGAAAATCC
1129 RTe		GCAGAACTGG	AAGAGGCAGG	GAAAATTTCA	AAAATTGGGC	CTGAAAATCC
1130 RTe		GCAGAACTGG	AAGAGGCAGG	GAAAATTTCA	AAAATTGGGC	CTGAAAATCC
1131 RTe		ACAGAAATGG	AAAAGGAAGG	GAAAATTTCA	AAAATTGGGC	CTGAAAATCC
1133 RTe		ACAGAACTGG	AAAAGGACGG	GAAAATTTCA	AAAATTGGGC	CTGAAAATCC
1136 RTe		ACAGAAATGG	AAAAGGAAGG	GAAAATTTCA	AAAATTGGGC	CTGAAAATCC
1137 RTe		ACAGAAATGG	AAAAGGAAGG	AAAATTTTCA	AAAATTGGGC	CTGAAAATCC
1141 RTe		ACAGAAATGG	AAAAGGAAGG	AAAATTTTCA	ARAATTGGGC	CTGAAAATCC

						
		105	115	125	135	145
seq rt/B		ATACAATACT	CCAGTATTTG	CCATAAAGAA	AAAAGACAGT	ACTAAATGGA
1118 RTe		ATACAATACT	CCAATATTTG	CCATAAAGAA	AAAAGATGGT	AATAARTGGA
1119 RTe		ATACAATACT	CCAATATTTG	CCATAAAGAA	AAAAGATGGT	AATAARTGGA
1120 RTe		ATACAATACT	CCAATATTTG	CCATAARGAA	AAAAGACAGT	ACWAARTGGA
1121 RTe		ATACAATACT	CCARTATTTG	CCATAARGAA	AAAAGACAGT	ACTAAATGGA
1122 RTe		TTACAATACT	CCAGTATTTG	CCATAAAGAA	AAAAGACAGT	ACTAAATGGA
1123 RTe		-----	-----	-----	-----	-----
1125 RTe		TTACAATACT	CCAGTATTTG	CCATAAAGAA	AAARGACAGT	ACTAAATGGA
1126 RTe		TTACAATACT	CCAGTATTTG	CCATAAAGAA	AAAAGACAGT	ACTAAATGGA
1127 RTe		TTACAATACT	CCAGTATTTG	CCATAAAGAA	RAAAGACAGT	ACTAAATGGA
1128 RTe		ATATAATACT	CCAGTATTTG	CCATAAAGAA	AAAGAATAGT	ACTAAATGGA
1129 RTe		ATATAATACT	CCAGTATTTG	CCATAAAGAA	AAAGAATAGT	ACTAAATGGA

1130	RTe	ATATAATACT	CCAGTATTTG	CCATAAAGAA	AAAGAATAGT	ACTAAATGGA
1131	RTe	ATATAATACT	CCAGTATTTG	CCATAAAGAA	AAAGGATAGT	ACTAAGTGG
1133	RTe	ATACAATACT	CCAGTATTTG	CCATAAAGAA	AAAGAACAGT	ACTAAATGGA
1136	RTe	ATACAATACT	CCAGTATTTG	CCATAAAGAA	AAAAGACAGT	ACTAAATGGA
1137	RTe	ATACAATACT	CCAATATTTG	CCATAAAGAA	AAAGGACAGT	ACTAAATGGA
1141	RTe	ATACAATACT	CCAGTATTTG	CYATAAAGAA	AAAGGATAGT	ACTAAATGGA

						
		155	165	175	185	195
seq	rt/B	GAAAAATTAGT	AGATTTTCAGA	GAAGTTAATA	AGAGAACTCA	AGACTTCTGG
1118	RTe	GAAAAATTAGT	AGATTTTCAGA	GAAGTTAATA	AGAGAACTCA	AGATTTCTGG
1119	RTe	GAAAAATTAGT	AGAYTTTCAGA	GAAGTTAATA	AGAGAACTCA	AGATTTCTGG
1120	RTe	GAAAAATTAGT	AGATTTTCAGA	GARCTYAATA	ARAGAACTCA	AGAYTTTTGG
1121	RTe	GAAAAATTAGT	AGATTTTCAGR	GAAGTTAATA	AGAGAACTCA	AGACTTTTGG
1122	RTe	GAAAAATTAGT	AGATTTTCAGA	GAAGTTAATA	AGAGAACTCA	AGACTTCTGG
1123	RTe	-----	-----	-----	-----	-----
1125	RTe	GAAAAATTAGT	AGATTTTCAGA	GARCTYAATA	AGAGAACTCA	AGACTTCTGG
1126	RTe	GAAAAATTAGT	AGATTTTCAGA	GAAGTTAATA	AGAGAACTCA	AGACTTCTGG
1127	RTe	GAAARTTAGT	AGATTTTCAGA	GARCTTAATA	AGAGAACTCA	AGACTTCTGG
1128	RTe	GAAWGCTART	RGATTTTCAGA	GAAGTTAATA	AGAGAACWCA	AGACTTCTGG
1129	RTe	GAATGCTAAT	GGATTTTCAGA	GAAGTTAATA	AGAGAACWCA	AGACTTCTGG
1130	RTe	GAATGCTAAT	GGATTTTCAGA	GAAGTTAATA	AGAGAACWCA	AGACTTCTGG
1131	RTe	GAAAGTTAGT	AGATTTTCAGA	GAAGTTAATA	AGAGAACTCA	AGACTTCTGG
1133	RTe	GAAAAATTAGT	AGATTTCCGA	GAGCTTAATA	AGAGAACTCA	AGACTTCTGG
1136	RTe	GAAAAATTAGT	AGATTTTCAGA	GAAGTTAATA	AGAGAACTCA	AGACTTCTGG
1137	RTe	GAAAAATTGGT	GGATTTTCAGA	GAAGTTAATA	AGAGAACTCA	AGACTTCTGG
1141	RTe	GAAAAATTAGT	AGATTTTYAGA	GAAGTTAATA	ARAGAACTCA	AGACTTCTGG

						
		205	215	225	235	245
seq	rt/B	GAAGTTCAAT	TAGGAATACC	ACATCCCGCA	GGGTAAAAAA	AGAAAAAATC
1118	RTe	GAAGTTCAAT	TAGGAATACC	ACATCCTGCA	GGGTAAAGA	AGAAAAAGTC
1119	RTe	GAAGTTCAAT	TAGGAATACC	ACATCCTGCA	GGGTAAAGA	AGAAAAAGTC
1120	RTe	GAAGTTCAAT	TAGGAATACC	ACAYCCCGCA	GGGTAAAAAA	AGAAAAAATC
1121	RTe	GAAGTTCAAT	TAGGAATACC	ACATCCCGCA	GGGTAAAAAA	AGAAAAAATC
1122	RTe	GAAGTCCAAT	TAGGAATACC	ACATCCTGCA	GGATTAATA	AGAAAAAATC
1123	RTe	-----	-----	-----	-----AGA	AGCAGGAGCC
1125	RTe	GAAGTCCAAT	TAGGAATACC	ACATCCCGCA	GGRTTAATA	AGAAAAAATC
1126	RTe	GAAGTCCAAT	TAGGAATACC	ACATCCYGCA	GGAYTAATA	AGAAAAAATC
1127	RTe	GAAGTCCAAT	TAGGAATACC	ACATCCYGCA	GGRTTAATA	AGAAAAAATC
1128	RTe	GARGTTCAAT	TAGGAMTACC	ACATCCCKCA	GGGTAAAAAA	AGAAAAAATC
1129	RTe	GARGTTCAAT	TAGGRATACC	ACATCCCTCA	GGGTAAAAAA	AGAAAAAATC
1130	RTe	GARGTTCAAT	TAGGAATACC	ACATCCCKCA	GGGTAAAAAA	AGAAAAAATC
1131	RTe	GAAGTTCAAT	TAGGAATACC	ACATCCCGCA	GGGTAAAAAA	AGAAAAAATC
1133	RTe	GAAGTTCAAT	TAGGGATACC	ACATCCCGCA	GGGATAAGA	AGAACAAATC
1136	RTe	GAAGTTCAAT	TAGGAATACC	ACATCCTGCA	GGGTAAARA	AGAAAAAATC
1137	RTe	GAAGTTCAAT	TAGGGATACC	ACATCCCGCA	GGGTAAAAAA	AGAAAAAATC
1141	RTe	GAAGTTCAAT	TAGGAATACC	ACATCCYGCA	GGGTAAAAAC	AGAAAAARATC

						
		255	265	275	285	295
seq	rt/B	AGTAACAGTA	CTGGATGTGG	GTGATGCATA	TTTTTCAGTT	CCCTTAGATG
1118	RTe	AGTAACAGTA	CTGGATGTGG	GTGATGCATA	TTTTTCAGTT	CCYTTAGATG
1119	RTe	AGTAACAGTA	CTGGATGTGG	GTGATGCATA	TTTTTCAGTT	CCYTTAGATG
1120	RTe	AGTAACAGTA	CTGGATGTGG	GTGATGCATA	CTTTTCAGTY	CCYTTAGATA
1121	RTe	AGTAACAGTA	CTGGATGTGG	GTGATGCATA	YTTTTTCAGTT	CCCTTAGATR
1122	RTe	AGTAACAGTA	CTGGATGTGG	GTGATGCATA	CTTTTCAGTT	CCCTTAGATG
1123	RTe	GATAG----A	CAAGGACAAG	GAAGTGTAT-	CCCTTAGCTT	CCCTCAGATC
1125	RTe	AGTAACAGTA	CTGGATGTGG	GTGATGCATA	TTTTTCAGTT	CCCTTAGATA
1126	RTe	AGTAACAGTA	CTGGATGTGG	GTGATGCATA	TTTTTCAGTT	CCYTTAGATA
1127	RTe	AGTAACAGTA	YTGGATGTGG	GTGATGCATA	TTTTTCAGTT	CCYTTAGATA
1128	RTe	AATAACAGTA	CTAGATGTGG	GTGATGCATA	TTTTTCAATT	CCCTTAGATA
1129	RTe	AATAACAGTR	CTAGATGTGG	GTGATGCATA	TTTTTCAATT	CCCTTAGATA
1130	RTe	AATAACAGTR	CTAGATGTGG	GTGATGCATA	TTTTTCAATT	CCCTTAGATA

1131	RTe	AGTAACAGTA	CTGGATGTGG	GTGATGCATA	TTTTTCAGTT	CCCTTAGATA
1133	RTe	AGTAACAGTA	CTGGATGTGG	GCGATGCATA	TTTTTCAGTT	CCCTTAGATG
1136	RTe	AGTAACAGTA	CTGGATGTGG	GTGATGCATA	TTTTTCAGTK	CCTTTAGATA
1137	RTe	AGTAACAGTR	TTAGATGTGG	GTGATGCATA	YTTCTCAGTT	CCYTTAGAYA
1141	RTe	AGTAACAGTA	CTGGATGTGG	GTGATGCATA	TTTTTCAGTT	CCCTTAGATG
						
		305	315	325	335	345
seq	rt/B	AAGACTTCAG	GAAGTATACT	GCATT-TACC	ATACCTAGTA	TAAACAATGA
1118	RTe	AAGACTTCAG	GAAGTAYACT	GCATT-TACC	ATACCTAGTA	CAAACAATGA
1119	RTe	AARACTTCAG	GAAGTAYACT	GCATT-TACC	ATACCTAGTA	CAAACAATGA
1120	RTe	AGGACTTCAG	GAAGTATACT	GCATT-YACC	ATACCTAGTA	CAAAYAATGA
1121	RTe	AGGACTTCAG	GAAGTATACT	GCATT-YACC	ATACCTAGTA	CAAACAATGA
1122	RTe	AAGACTTCAG	GAAGTATACT	GCATT-TACC	ATACCTAGTA	CAAACAATGA
1123	RTe	ACT-CTTTGG	CAGCGACCCC	TCGTCACART	AARGATAGGG	GGGCAACTAA
1125	RTe	AAGACTTCAG	GAAGTATACT	GCATT-TACC	ATACCTAGTA	TAAACAATGA
1126	RTe	AAGACTTCAG	GAAGTATACT	GCATT-TACC	ATACCTAGTA	TAAACAATGA
1127	RTe	AAGAYTTCAG	GAARTATACT	GCATT-TACC	ATACCTAGTA	TAAACAATGA
1128	RTe	AAGACTTCAG	GAAGTATACT	GCATT-TACC	ATACCTAGTA	CAAATAATGA
1129	RTe	AAGACTTCAG	GAAGTATACT	GCATT-TACC	ATACCTAGTA	CAAATAATGA
1130	RTe	AAGACTTCAG	GAAGTATACT	GCATT-TACC	ATACCTAGTA	CAAATAATGA
1131	RTe	AAGACTTCAG	GAAGTATACT	GCATT-CACT	ATACCTAGTA	CAAATAATGA
1133	RTe	AAGACTTCAG	GAAATATACT	GCATT-TACC	ATACCTAGTA	CGAACAATGA
1136	RTe	AAGATTTCAG	GAAGTATACT	GCATT-TACM	ATACCTAGTA	YAAACAATGA
1137	RTe	AAGACTTCAG	GAAGTACACT	GCATT-TACC	ATACCTAGTA	CWAATAATGA
1141	RTe	CAGACTTCAG	RAAGTATACT	GCATT-TACC	ATACCTAGTA	TAAACAATGA
						
		355	365	375	385	395
seq	rt/B	GACACCAGGG	ATTAGATATC	AGTACA-ATG	TGCTTCCACA	GGGATGGAAA
1118	RTe	GACACCAGGG	ATTAGATATC	AGTACA-ATG	TACTTCCACA	GGGATGGAAA
1119	RTe	GACACCAGGG	ATTAGATATC	AGTACA-ATG	TACTTCCACA	GGGATGGAAA
1120	RTe	GACACCAGGA	ATTAGATATC	ARTACA-ATG	TGCTTCCACA	AGGATGGAAA
1121	RTe	GACACCAGGA	ATTAGATAYC	AGTACA-ATG	TGCTTCCACA	AGGATGGAAA
1122	RTe	GACACCAGGG	ATTAGATATC	AGTACA-ATG	TGCTTCCACA	GGGATGGAAA
1123	RTe	AGGAAGCTCT	ATTAGATACA	GGAGCAGATG	ATACAGTATT	AGAAGAAATG
1125	RTe	GACACCAGGG	ATTAGATATC	AGTACA-AYG	TGCTTCCACA	GGGATGGAAA
1126	RTe	GACACCRGGR	ATTAGATATC	AGTACA-ATG	TGCTTCCACA	GGGATGGAAA
1127	RTe	GACACCAGGG	ATTAGATATC	AGTACA-ATG	TGCTTCCACA	GGGATGGAAA
1128	RTe	AAGACCAGGG	ATTAGATATC	AGTACA-ATG	TACTTCCCCA	GGGATGGAAA
1129	RTe	AAGACCAGGG	ATTAGATATC	AGTACA-ATG	TACTTCCYCA	GGGATGGAAA
1130	RTe	AAGACCAGGG	ATTAGATATC	AGTACA-ATG	TACTTCCCCA	GGGATGGAAA
1131	RTe	AACACCAGGG	GTTAGGTATC	AGTACA-ATG	TGCTTCCCCA	GGGATGGAAA
1133	RTe	GACACCAGGG	ATTAGATATC	AGTACA-ATG	TGCTTCCCCA	GGGATGGAAAG
1136	RTe	AACGCCAGGA	ATTAGATATC	AGTACA-ATG	TGCTTCCACA	GGGATGGAAA
1137	RTe	GACACCAGGG	ATTAGRTAYC	ARTACA-ATG	TGCTTCCACA	GGGATGGAAA
1141	RTe	GACACCAGGG	ATTAGATATC	AGTACA-ATG	TGCTTCCACA	GGGATGGAAA
						
		405	415	425	435	445
seq	rt/B	GGATCACCAG	CAATATTCCA	AAGTAGCATG	ACAAAAATC-	TTAGAGCCTT
1118	RTe	GGATCACCAG	CAATATTCCA	AAGTAGCATG	ACRAAAATY-	TTAGATCCTT
1119	RTe	GGATCACCAG	CAATATTCCA	AAGTAGCATG	ACRAAAATY-	TTAGATCCTT
1120	RTe	GGATCACCAG	CAATATTCCA	ATGTAGCATG	ACAAAAATC-	TTAGAGCCTT
1121	RTe	GGATCACCAG	CAATATTCCA	ATGTAGCATG	ACAAAAATC-	TTAGAGCCTT
1122	RTe	GGATCACCAG	CAATATTCCA	AAGTAGCATG	ACAAAAATY-	TTAGAGCCTT
1123	RTe	AGTTTACCAG	GAARGTGGAA	ACCAAAAAATG	ATAGGGGGGAA	TTGGAGGTTT
1125	RTe	GGATCACCAG	CAATATTCCA	AAGTAGCATG	ACAAAAATC-	TTAGAGCCTT
1126	RTe	GGATCACCAG	CAATATTCCA	AAGTAGCATG	ACAAAAATC-	TTAGAGCCTT
1127	RTe	GGATCACCAG	CAATATTCCA	AAGTAGCATG	ACAAAAATC-	TTAGAGCCTT
1128	RTe	GGATCACCAG	CAATATTCCA	AGATAGCATG	ACAAAAATC-	TTAGAGCCTT
1129	RTe	GGATCACCAG	CAATATTCCA	AGATAGCATG	ACAAAAATC-	TTAGAGCCTT
1130	RTe	GGATCACCAG	CAATATTCCA	AGATAGCATG	ACAAAAATC-	TTAGAGCCTT
1131	RTe	GGATCACCAG	CAATATTCCA	AAGTAGCATG	ACAAAAATC-	TTAGAGCCTT

1133	R	T	e	GGATCACCAG	CAATATTTCA	AAGTAGCATG	ACAAAAATC-	TTAGAGCCTT
1136	R	T	e	GGATCACCAG	CAATATTCCA	GAGTAGCATG	ACAAAAATC-	TTAGAGCCTT
1137	R	T	e	GGATCACCAG	CAATATTCCA	RAGTAGCATG	ACAAAAATC-	TTAGAGCCTT
1141	R	T	e	GGATCACCAG	CAATATTCCA	AAGTAGCATG	ATAAAAAATC-	TTAGAGCCTT

....				
455	465	475	485	495

seq	rt/B	TTAGAAAACA	AAATCCAGAC	ATAGTTATCT	ATCAATACAT	GGATGATTTG
1118	R	T	e	TTAGAAAAGCA	GAACCCAGAC	ATAGTTATCT
1119	R	T	e	TTAGAAAAGCA	GAACCCAGAC	ATAGTTATCT
1120	R	T	e	TTAGAAAAGCA	AAATCCAGAC	ATAGTTATCT
1121	R	T	e	TTAGAAAAGCA	AAATCCAGAC	WTAGTTATCT
1122	R	T	e	TTAGAAAAGCA	AAATCCAGAA	ATAATTATAT
1123	R	T	e	TATCAAAGTA	AGAC---ART	ATGATCAGAT
1125	R	T	e	TTAGAAAAGCA	AAATCCAGAA	ATAATTATAT
1126	R	T	e	TTAGAAAAGCA	AAATCCAGAA	ATAATTATAT
1127	R	T	e	TTAGAAAAGCA	AAATCCAGAR	ATAATYATAT
1128	R	T	e	TTAGAAAACA	AAATCCAGAC	ATAATTATCT
1129	R	T	e	TTAGAAAACA	AAATCCAGAC	ATAATTATCT
1130	R	T	e	TTAGAAAACA	AAATCCAGAC	ATAATTATCT
1131	R	T	e	TTAGAAAACA	AAATCCAGAC	ATGGTTATCT
1133	R	T	e	TTAGAAAACA	AAATCCAGAC	ATAGTGATCT
1136	R	T	e	TTAGAAAACA	AAAYCCAGAC	ATAGTTATCT
1137	R	T	e	TTAGAAMACG	AAATCCAGAA	CTAGTGATCT
1141	R	T	e	TTAGAAAACA	AAATCCAGAC	MTAGTTATAT

....				
505	515	525	535	545

seq	rt/B	TATGTAGGAT	CTGACTTAGA	AATAGGGCAG	CATAGAACAA	AAATAGAGGA
1118	R	T	e	TATGTAGGAT	CTGACTTAGA	AATAGGGCAG
1119	R	T	e	TATGTAGGAT	CTGACTTAGA	AATAGGGCAG
1120	R	T	e	TATGTAGGCT	CTGACTTAGA	AATAGGACAR
1121	R	T	e	TATGTAGGCT	CTGACTTAGA	AATAGGACAA
1122	R	T	e	TATGTAGGAT	CTGACTTAGA	AATAGGGGAA
1123	R	T	e	CATAAAGCTA	TAGGTACAGT	RTTAATAGGA
1125	R	T	e	TATGTAGGAT	CTGACTTAGA	AATAGGGCAA
1126	R	T	e	TATGTAGGAT	CTGACTTAGA	AATAGGGCAA
1127	R	T	e	TATGTAGGAT	CTGACTTAGA	AATAGGGCAA
1128	R	T	e	TATGTAGGAT	CTGACTTAGA	AATAGAGCAG
1129	R	T	e	TATGTAGGAT	CTGACTTAGA	AATAGAGCAG
1130	R	T	e	TATGTAGGAT	CTGACTTAGA	AATAGAGCAG
1131	R	T	e	TATGTAGGAT	CTGACTTAGA	AATAGGGCAG
1133	R	T	e	TATGTAGGGT	CTGACTTAGA	AATAGGGCAA
1136	R	T	e	TATGTAGGTT	CTGACTTAGA	AATAGGGCAG
1137	R	T	e	TATRTAGGAT	CTGACTTAGA	AATAGGACAG
1141	R	T	e	TATGTAGGAT	CTGACTTAGA	AATAGGRCAG

....				
555	565	575	585	595

seq	rt/B	GCTGAGACAA	CATCTGTTGA	GGTGGGGACT	TACCACACCA	GACAAAAAAC
1118	R	T	e	ACTGAGACAA	CATCTGTTGA	GGTGGGGATT
1119	R	T	e	ACTGAGACAA	CATCTGTTGA	GGTGGGGATT
1120	R	T	e	RCTGAGAGCA	CATTTGCTAA	AGTGGGGATT
1121	R	T	e	ACTGAGAGCA	CATTTGCTAA	AGTGGGGATT
1122	R	T	e	ACTGAGACAA	CAYTTGTTGA	AGTGGGGATT
1123	R	T	e	ATTGGAAGAA	-ATCTGTTGA	CTCA--GATT
1125	R	T	e	RCTGAGACAA	CATTTGTTGA	AGTGGGGATT
1126	R	T	e	ACTGAGACAA	CATTTGTTGA	AGTGGGGATT
1127	R	T	e	ACTGAGRCAA	CATTTGTTGA	AGTGGGGATT
1128	R	T	e	ATTGAGACAA	TATCTGTGGA	AGTGGGGATT
1129	R	T	e	ATTGAGACAA	TATCTGTGGA	AGTGGGGATT

1130	RTe	ATTGAGACAA	TATCTGTGGA	AGTGGGGATT	TTACACACCA	GACAACAAAC
1131	RTe	ATTGAGACAA	CATCTGTTGA	AGTGGGGGTT	TACCACACCA	GACAAAAAAC
1133	RTe	ACTAAGACAA	CATCTGTGGA	AGTGGGGATT	TTACACACCA	GACAAAAAAC
1136	RTe	GCTGAGACAA	CATCTGTTGA	AGTGGGGATT	AACCACACCA	GACAAAAAAC
1137	RTe	ACTRAGACAA	CATCTGTTGA	RGTGGGGATT	TACCACACCA	GACAAAAAAC
1141	RTe	ACTGAGACAA	CATCTGTTGA	GGTGGGGACT	TACCACACCA	GACAAAAAAC
..... 605 615 625 635 645						
seq	rt/B	ATCAGAAAGA	ACCTCCATTC	CTTTGGATGG	GTTATGAACT	CCATCCTGA
1118	RTe	ATCAGAAAGA	ACCTCCATTT	CTTTGGATGG	GTTATGAACT	CCATCCTGA
1119	RTe	ATCAGAAAGA	ACCTCCATTT	CTTTGGATGG	GTTATGAACT	CCATCCTGA
1120	RTe	ATCARAAAGA	ACCYCCATTT	CTTTGGATGG	GTTATGAGCT	CCATCCTGA
1121	RTe	ATCAGAAAGA	ACCCCCATTT	CTTTGGATGG	GTTATGAGCT	CCATC----
1122	RTe	ATCAGAARGA	ACCCCCATTY	CTTTGGATGG	GTTATGAGCT	CCATCCTGA
1123	RTe	-TTAAATTTT	CCCATTAGTC	CTATTGAAAC	TGTACCAGT-	-----
1125	RTe	AYCAGAAAGA	ACCCCCATTC	CTCTGGATGG	GTTATGAGCT	CCATCCTGA
1126	RTe	ATCAGAAAGA	ACCCCCATTC	CTYTGGATGG	GTTATGAGCT	CCATCCTGA
1127	RTe	ATCAGAAAGA	ACCCCCATTC	CTYTGGATGG	GTTATGAGCT	CCATCCTGA
1128	RTe	ATCAGVAAGA	ACCACCATTC	CTTTGGATGG	GTTATGAACT	TCATCCTGA
1129	RTe	ATCAGMAAGA	ACCACCATTC	CTTTGGATGG	GTTATGAACT	TCATCCTGA
1130	RTe	ATCAGMAAGA	ACCACCATTC	CTTTGGATGG	GTTATGAACT	TCATCCTGA
1131	RTe	ACCAGAAAGA	ACCTCCATTC	CTTTGGATGG	GTTATGAACT	TCATCCTGA
1133	RTe	ATCAGAAAGA	ACCCCCATTC	CTTTGGATGG	GGTATGAGCT	CCACCCTGA
1136	RTe	ATCAGAAAGA	ACCGCCATTC	CTTTGGATGG	GTTATGAACT	CCATCCTGA
1137	RTe	ATCAGAAAGA	ACCTCCATTC	CTTTGGATGG	GTTATGAGCT	TCATCCTGA
1141	RTe	ATCAGAAAGA	ACCTCCATTC	CTTTGGATGG	GTTATGAACT	CCATCCTGA

FIGURA 7 – Alinhamento das seqüências nucleotídicas (Subtipo B) para a região da Transcriptase Reversa nos grupos analisados.

					
	5	15	25	35	45
seq prot/B	TTAACTTCCC	TCAGGTCAC	CTTTGGCAAC	GACCCCTCGT	CACAATAAAG
1118_06Pte	TTAGCTTCCC	TCAAATCACT	CTTTGGCAAC	GACCACTAGT	TCAAATAAAR
1119_06Pte	TTAGCTTCCC	TCAAATCACT	CTTTGGCAAC	GACCACTAGT	TCAAATAAAR
1120_06Pte	TTAGCTTCCC	TCAGATCACT	CTTTGGCAAC	GACCCCTCGT	YACAATAAAG
1121_06Pte	TTAGCTTCCC	TCAGATCACT	CTTTGGCAAC	GACCCCTCGT	YACAATAAAG
1122_06Pte	TTAGCTTCCC	TCAGATCACT	CTTTGGCAGC	GACCCCTCGT	CACAGTAAAG
1123_06Pte	TTAGCTTCCC	TCAGATCACT	CTTTGGCAGC	GACCCCTCGT	CACARTAARG
1125_06Pte	TTAGCTTCCC	TCAGATCACT	CTTTGGCAAC	GACCCCTCGT	CACAATAAAG
1126_06Pte	TTAGCTTCCC	TCAGATCACT	CTTTGGCARC	GACCCCTYGT	CACAATAAAG
1127_06Pte	TTAGCTTCCC	TCAGATCACT	CTTTGGCARC	GACCCCTYGT	CACAATAAAG
1128_06Pte	TTAACTTCCC	TCAAATCACT	CTTTGGCAAC	GACCCCTAGT	YGCAATAARG
1129_06Pte	TTAACTTCCC	TCAAATCACT	CTTTGGCAAC	GACCCCTAGT	CGCAATAAGG
1130_06Pte	TTAACTTCCC	TCAAATCACT	CTTTGGCAAC	GACCCCTAGT	YGCAATAARG
1131_06Pte	TTAACTTCCC	TCAAATCACT	CTTTGGCAAC	GACCCCTAGT	CACAATAAGG
1133_06Pte	TCAGCTGCCC	TCAAATCTCT	CTTTGGCAAC	GACCCCTTGT	CACAGTAAAG
1134_06Pte	TTAACTGCCC	TCAGATCACT	CTTTGGCAAC	GACCCGTCGT	CACAATAAAG
1137_06Pte	TTAGCTTCCC	TCAAATCACT	CTTTGGCARC	GACCACTAGT	CAAAATAAAG
1141_06Pte	TTAACTTCCC	TCAGATCACT	CTTTGGCARC	GACCCSTCGT	CACAATAAAG
					
	55	65	75	85	95
seq prot/B	ATAGGGGGGC	AACTAAAGGA	AGCTCTATTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC
1118_06Pte	GTAGGGGGGC	AACTAAAGGA	AGCTCTATTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC
1119_06Pte	GTAGGGGGGC	ARCTAAAGGA	AGCTCTATTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC
1120_06Pte	ATAGGGGGGC	AACTAAAAGA	AGCTCTMTTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC
1121_06Pte	ATAGGGGGGC	AACTAAAAGA	AGCTCTATTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC
1122_06Pte	ATAGGGGGGC	AACTAAAGGA	AGCTCTATTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC
1123_06Pte	ATAGGGGGGC	AACTAAAGGA	AGCTCTATTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC
1125_06Pte	ATAGGGGGGC	AACTAAAGGA	AGCTCTATTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC
1126_06Pte	ATAGGGGGGC	AACTAAARGA	AGCTCTATTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC
1127_06Pte	ATAGGGGGGC	AACTAAAGGA	AGCTCTATTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC
1128_06Pte	ATAGGGGGAC	AGYTAAGGA	AGCTYTATTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC
1129_06Pte	ATAGGGGGAC	AGCTAAAGGA	AGCTYTATTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC
1130_06Pte	ATAGGGGGAC	AGYTAAGGA	AGCTYTATTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC
1131_06Pte	ATAGGGGGAC	AGCTAAAGGA	AGCTCTATTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC
1133_06Pte	GTAGGGGGGC	AACTAAAGGA	AGCTTTATTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC
1134_06Pte	ATAGGGGGGC	AAATAAAGA	AGCTCTATTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC
1137_06Pte	GTAGGGGGAC	AAGTAAAGGA	AGCTCTATTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC
1141_06Pte	GTAGAGGGGC	AACTAAAGGA	AGCTCTATTA	GAYACAGGAG	CAGATGATAC
					
	105	115	125	135	145
seq prot/B	AGTATTAGAA	GAAATGAGTT	TGCCAGGAAG	ATGGAAACCA	AAAATGATAG
1118_06Pte	AGTATTAGAA	GASATAGATT	TACCAGGAAG	ATGGAAACCA	AAAATGATAG
1119_06Pte	AGTATTAGAA	GASATAGATT	TACCAGGAAG	ATGGAAACCA	AAAATGATAG
1120_06Pte	AGTAGTAGAA	GAAATGWGTT	TGCCAGGGAG	ATGGAAACCA	AAAATGATAG
1121_06Pte	AGTAGTAGAA	GAAATGWGTT	TGCCAGGGAG	ATGGAAACCA	AAAATGATAG
1122_06Pte	RGTATTAGAA	GAAATGAGTT	TACCAGGAAG	GTGGAAACCA	AAAATGATAG
1123_06Pte	AGTATTAGAA	GAAATGAGTT	TACCAGGAAR	GTGGAAACCA	AAAATGATAG
1125_06Pte	AGTATTAGAA	GAAATGAGTT	TACCAGGAAG	GTGGAAACCA	AAAATGATAG
1126_06Pte	AGTATTAGAA	GACATGAATT	TGCCAGGAAG	GTGGAAACCA	AAAATGATAG
1127_06Pte	AGTATTAGAA	GAAATGASTT	TACCAGGAAG	GTGGAAACCA	AAAATGATAG
1128_06Pte	AGTATTAGAA	GAAATRARTT	TGCCAGGAAA	ATGGAAACCA	AAAATGATAG
1129_06Pte	AGTRTTAGAA	GAAATAAGTT	TGCCAGGAAA	ATGGAAACCA	AAAATGATAG
1130_06Pte	AGTATTAGAA	GAAATAARTT	TGCCAGGAAA	ATGGAAACCA	AAAATGATAG
1131_06Pte	AGTATTAGAA	GACATGAGTT	TATCAGGAAA	ATGGAAACCA	AAAATGATAG
1133_06Pte	AGTATTAGAA	GAAATGAGTT	TGCCAGGAAG	ATGGAAACCA	AAAATGATAG
1134_06Pte	AGTATTAGAA	GAAATGAATT	TGCCAGGAAG	ATGGAAACCA	AAAATGATAG
1137_06Pte	AGTRTTAGAA	GAAATRGAGT	TGCCAGGGAG	ATGGAAACCA	AAAATGATAG
1141_06Pte	AGTATTAGAA	GAAATGACCT	TGTCAGGAAG	ATGGAAACCA	AAAATGATAG

	 155	 165	 175	 185	 195
seq prot/B	GGGGAATTGG	AGGTTTTATC	AAAGTAAGAC	AGTATGATCA	GATACTCATA
1118_06Pte	GGGGAATTGG	AGGTTTTATC	AAAGTAAGAC	ARTATGATCA	AATACTCATA
1119_06Pte	GGGGAATTGG	AGGTTTTATC	AAAGTAAGAC	ARTATGATCA	AATACTCATA
1120_06Pte	GAGGAATTGG	AGGTTTTATC	AAAGTAAGAC	AATATGATCA	AATACCTGTA
1121_06Pte	GAGGAATTGG	AGGTTTTATC	AAAGTAAGAC	AATATGATCA	AATACCTGTA
1122_06Pte	GGGGAATTGG	AGGTTTTATC	AAAGTAAGAC	AATATGATCA	GATAGCCATA
1123_06Pte	GGGGAATTGG	AGGTTTTATC	AAAGTAAGAC	ARTATGATCA	GATAACCATA
1125_06Pte	GGGGAATTGG	AGGTTTTATC	AAAGTAAGAC	AGTATGATCA	GATAACCATA
1126_06Pte	GGGGAATTGG	AGGTTTTATC	AAAGTAAGAC	ARTATGATCA	GATAACCATA
1127_06Pte	GGGGAATTGG	AGGTTTTATC	AAAGTAAGAC	AGTATGATCA	GATAACCATA
1128_06Pte	GGGGAATTGG	AGGTTTTATC	AAAGTAAAAC	AGTATGATGA	CATACCAATA
1129_06Pte	GGGGAATTGG	AGGTTTTATC	AAAGTAAAAC	AGTATGATGA	CATACCAATA
1130_06Pte	GGGGAATTGG	AGGTTTTATC	AAAGTAAAAC	AGTATGATGA	CATACCAATA
1131_06Pte	GGGGAATTGG	AGGCTTTATC	AAAGTAAGAC	AATATGATAA	CGTAACCGTA
1133_06Pte	GGGGAATTGG	AGGTTTTATC	AAAGTAAAAC	AGTATGATCA	AATACTCATA
1134_06Pte	GGGGAATTGG	AGGTTTTATC	AAAGTAAGAC	AGTATGATCA	GATACTCATA
1137_06Pte	GGGGAATTGG	AGGTTTTATC	AAAGTAAGAC	AGTATGATCA	GATACTYATA
1141_06Pte	GGGGAATTGG	AGGTTTTATC	AAAGTAAGAC	AGTATGATCA	GATACYCATA
	 205	 215	 225	 235	 245
seq prot/B	GAAATCTGTG	GACATAAAGC	TATAGGTACA	GTATTAGTAG	GACCTACACC
1118_06Pte	GAAATCTGTG	GGCATAAAGC	TATAGGTWCA	GTATTAGTAG	GACCTACMCC
1119_06Pte	GAAATCTGTG	GGCATAAAGC	TATAGGTACA	GTATTAGTAG	GACCTACACC
1120_06Pte	GAAATATGTG	GACAWAMAGC	TATAGGTACA	GTATTAGTAG	GACCTACACC
1121_06Pte	GAAATATGTG	GACADAMAGC	TATAGGTACA	GTATTAGTAG	GACCTACACC
1122_06Pte	GAAATCTGTG	GACATAAAGC	TATAGGTACA	GTATTAATAG	GACCTACACC
1123_06Pte	GAAATCTGTG	GACATAAAGC	TATAGGTACA	GTRTTAATAG	GACCTACACC
1125_06Pte	GAAATCTGTG	GACATAAAGC	TATAGGTACA	GTATTAATAG	GACCTACACC
1126_06Pte	GAAATCTGTG	GACATAAAGC	TATAGGTACA	GTATTAATAG	GACCTACACC
1127_06Pte	GAAATCTGTG	GACATAAAGC	TATAGGTACA	GTATTAATAG	GACCTACACC
1128_06Pte	GAAATTTGTG	GACACAAGGC	TATAGGTACA	GTATTAGTAG	GACCYACACC
1129_06Pte	GAAATTTGTG	GACACAAGGC	TATAGGTACA	GTATTAGTAG	GACCCACACC
1130_06Pte	GAAATTTGTG	GACACAAGGC	TATAGGTACA	GTATTAGTAG	GACCCACACC
1131_06Pte	GACATTTGTG	GACACAAGGC	TATAGGTACA	GTATTAGTAG	GACCTACACC
1133_06Pte	GAAATCTGTG	GAAAGAAAAGC	TATAGGTTCA	GTATTAGTAG	GACCTACACC
1134_06Pte	GAGATCTGTG	GACAAAAGGC	TATAGGTACA	GTATTAGTAG	GACCTACACC
1137_06Pte	GAAATYTGTC	GACATAAAGC	TATAGGTACA	GTGTTAGTAG	GRCCTACACC
1141_06Pte	GAAATCTGCG	GACATAAAGC	TATAGGTACA	GTATTAGTAG	GGCCTACACC
	 255	 265	 275	 285	 295
seq prot/B	TGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATCTGTTGAC	TCAGATTGGT	TGCACTTTAA
1118_06Pte	TGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATMTGTTGAC	TCAGATTGGY	TGCACTTTAA
1119_06Pte	TGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATCTGTTGAC	TCAGATTGGY	TGCACTTTAA
1120_06Pte	AGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATCTGTTTRAC	TCAGATTGGT	TGCACTTTAA
1121_06Pte	AGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATCTGTTGAC	TCAGATTGGT	TGCACTTTAA
1122_06Pte	TGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATCTGTTGAC	TCAGATTGGC	TGCACTTTAA
1123_06Pte	TGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATCTGTTGAC	TCAGATTGGC	TGCACTTTAA
1125_06Pte	TGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATCTGTTGAC	TCAGATTGGC	TGCACTTTAA
1126_06Pte	TGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATCTGTTGAC	TCAGATTGGC	TGYACTTTAA
1127_06Pte	TGTCAACATA	ATTGGAAGRA	ATCTGTTGAC	TCAGATTGGC	TGCACTTTAA
1128_06Pte	TGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATCTGTTGAC	TCAGATTGGC	TGCACTCTAA
1129_06Pte	TGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATCTGTTGAC	TCAGATTGGC	TGCACTCTAA
1130_06Pte	TGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATCTGTTGAC	TCAGATTGGC	TGCACTCTAA
1131_06Pte	TGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATCTGTTGAC	TCAGATTGGC	TGCACTTTAA
1133_06Pte	TGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATATGTTGAC	TCAGATTGGC	TGCACTTTAA
1134_06Pte	TGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATCTGTTGAC	TCAGATTGGT	TGCACTTTAA
1137_06Pte	TGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATCTGTTGAC	TCARMTTGGC	TGYACTTTAA
1141_06Pte	TGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATCTGTTGAC	TCAGATTGGC	TGCACTTTAA

				
	305	315	325	
seq prot/B	ATTTT--~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~
1118_06Pte	ATTTTCCCAT	TAGTCCTATT	GAAACTGTAC	CAGT
1119_06Pte	ATTTTCCCAT	TAGTCCTATT	GAAACTGTAC	CAGT
1120_06Pte	ATTTTCCCAT	TAGTCCTATT	GAAACTGTAC	CAGT
1121_06Pte	ATTTTCCCAT	TAGTCCTATT	GAAACTGTAC	CAGT
1122_06Pte	ATT-~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~
1123_06Pte	ATTTTCCCAT	TAGTCCTATT	GAAACTGTAC	CAGT
1125_06Pte	ATTTTCCCAT	TAGTCCTATT	GAAACTGTAC	CAGT
1126_06Pte	ATTTTCCCAT	TAGYCCTATT	GAAACTGTAC	CAGT
1127_06Pte	ATTTTCCCAT	TAGTCCTATT	GAAACTGTAC	CAGT
1128_06Pte	ATTTTCCCAT	CAGTCCTATT	GAAACTGTAC	CAGT
1129_06Pte	ATTTTCCCAT	CAGTCCTATT	GAAACTGTAC	CAGT
1130_06Pte	ATTTTCCCAT	CAGTCCTATT	GAAACTGTAC	CAGT
1131_06Pte	ATTTTCCCAT	TAGTCCTATT	GAAACTGTAC	CAGT
1133_06Pte	ATTTTCCCAT	TAGTCCTATT	GAAACTGTAC	CAGT
1134_06Pte	ATTTTCCCAT	TAGTCCTATT	AAGACTGTAC	CAGT
1137_06Pte	ATTTTCCYAT	TAGTCCTATT	GARACTGTAC	CAGT
1141_06Pte	ATTTTCCCAT	TAGTCCTATT	GAAACTGTAC	CAGT

FIGURA 8 – Alinhamento das sequências nucleotídicas (Subtipo B) para a região da Protease nos grupos analisados.

Gráficos que expressam os perfis de cada paciente no decorrer das três coletas realizadas

GRUPO A

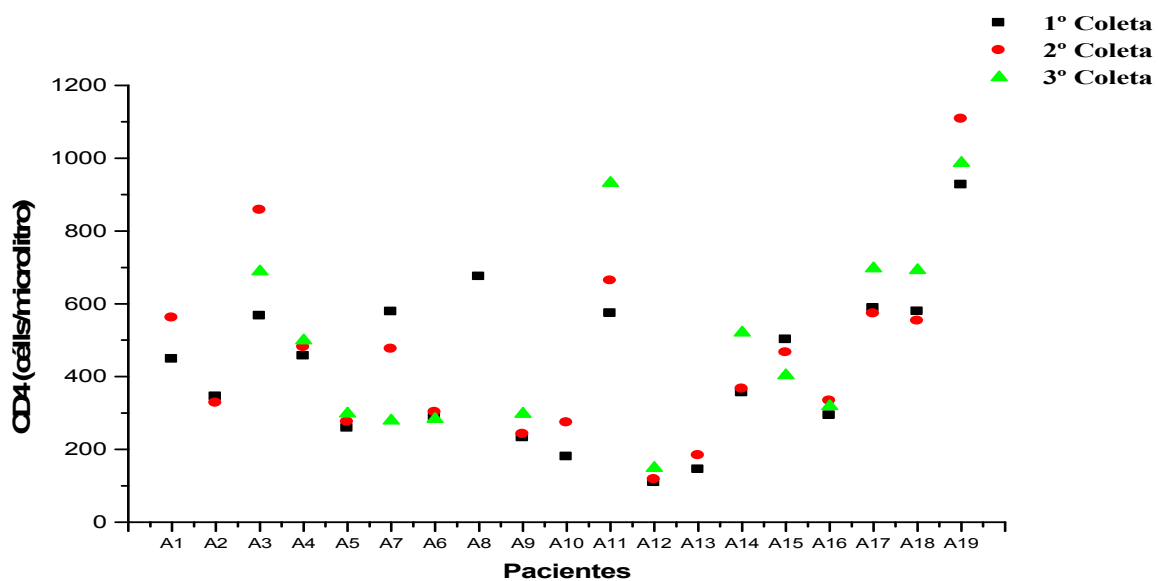


GRÁFICO 21 - Perfil dos pacientes do grupo A quanto a contagem de Linfócitos T CD4 no decorrer das três coletas.

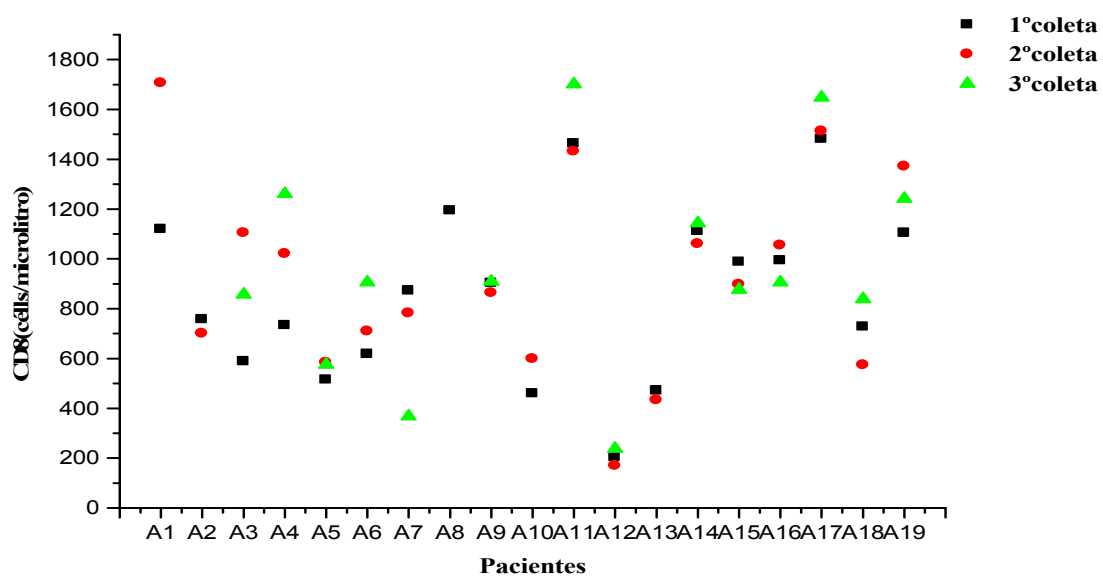


GRÁFICO 22 - Perfil dos pacientes do grupo A quanto a contagem de Linfócitos T CD8 no decorrer das três coletas.

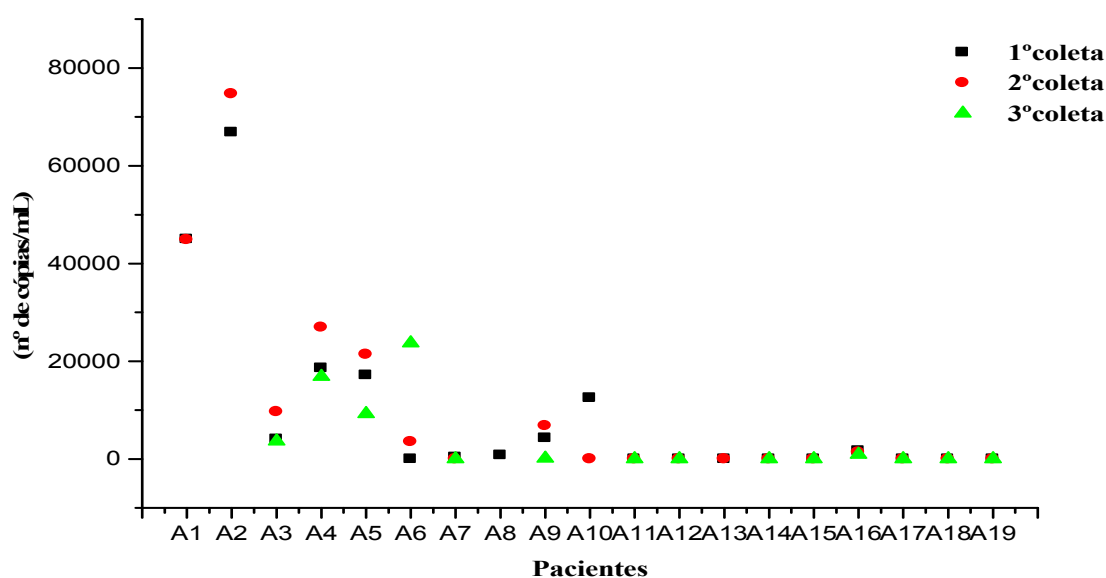


GRÁFICO 23 - Perfil dos pacientes do grupo A quanto a dosagem Carga Viral no decorrer das três coletas.

GRUPO B

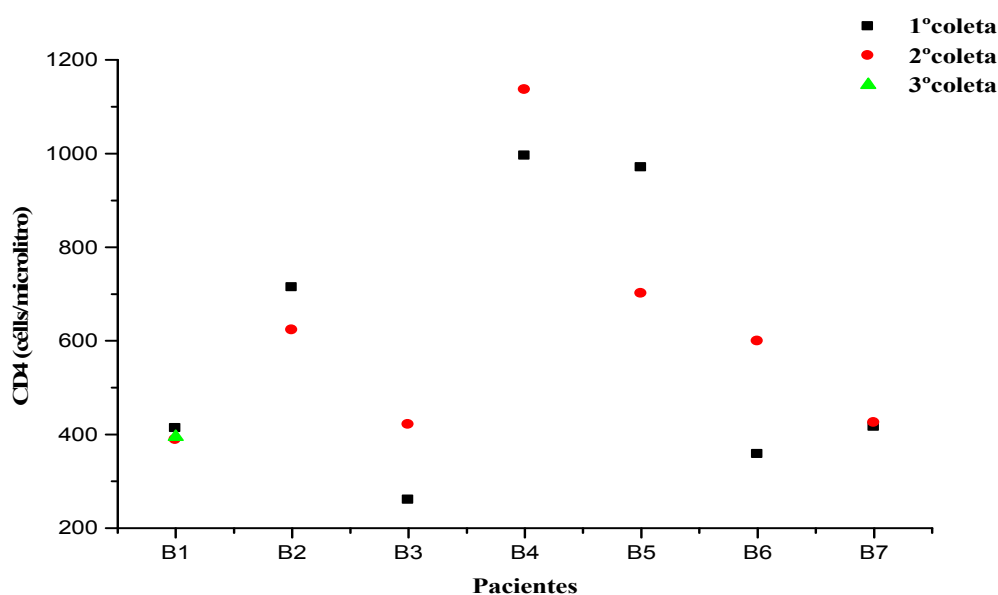


GRÁFICO 24 - Perfil dos pacientes do grupo B quanto a contagem de Linfócitos T CD4 no decorrer das três coletas.

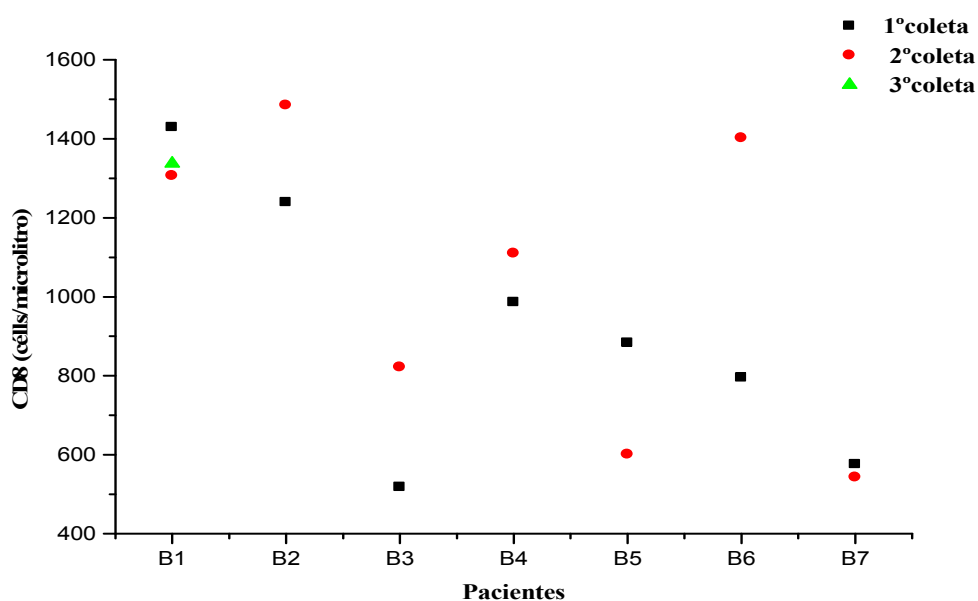


GRÁFICO 25 - Perfil dos pacientes do grupo B quanto a contagem de Linfócitos T CD8 no decorrer das três coletas.

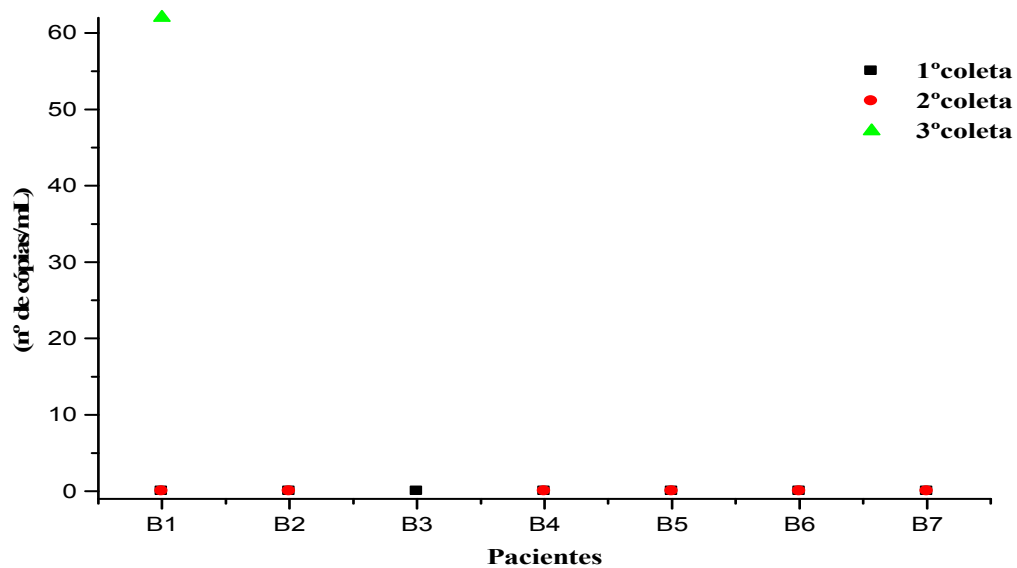


GRÁFICO 26 - Perfil dos pacientes do grupo B quanto a Carga Viral no decorrer das três coletas.

GRUPO C

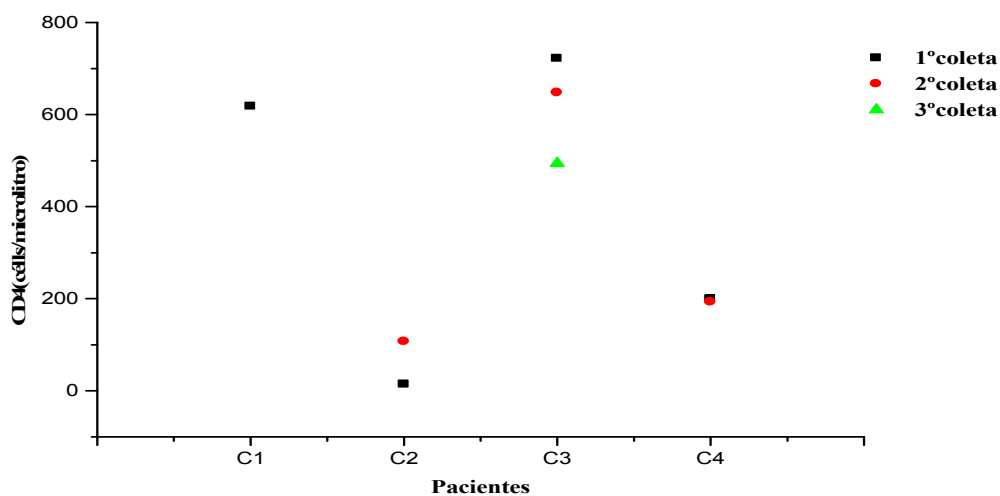


GRÁFICO 27 - Perfil dos pacientes do grupo C quanto a contagem de Linfócitos T CD4 no decorrer das três coletas.

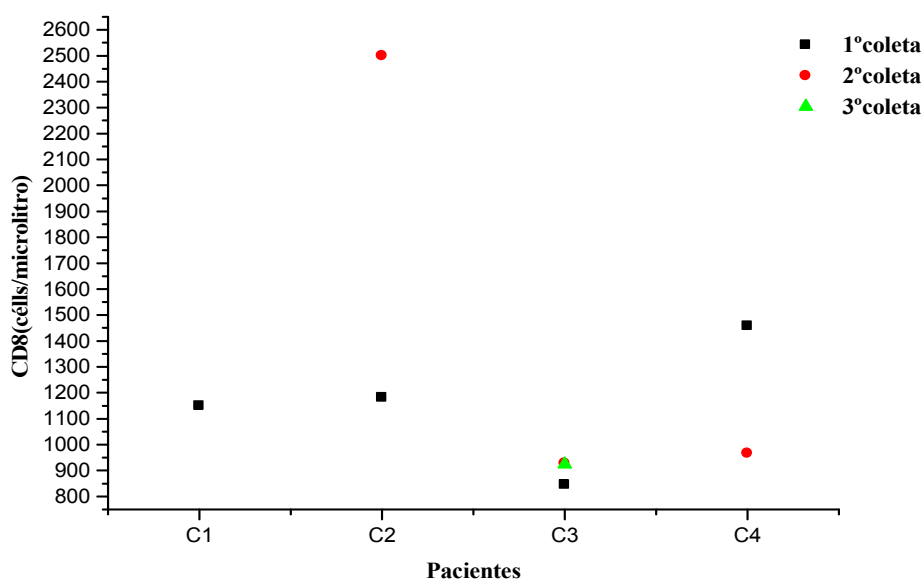


GRÁFICO 28 - Perfil dos pacientes do grupo C quanto a contagem de Linfócitos TCD8 no decorrer das três coletas.

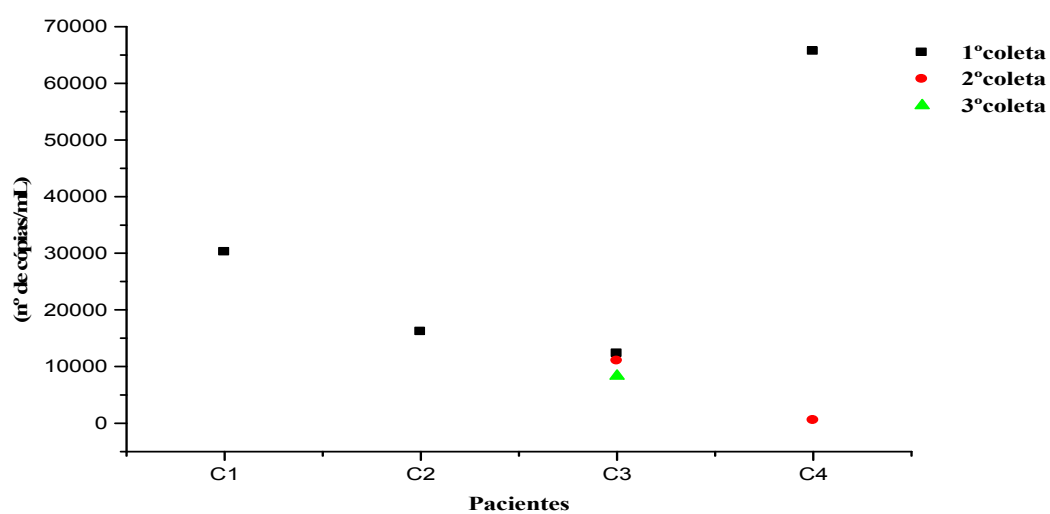


GRÁFICO 29 - Perfil dos pacientes do grupo C quanto a dosagem da Carga Viral no decorrer das três coletas.

GRUPO D

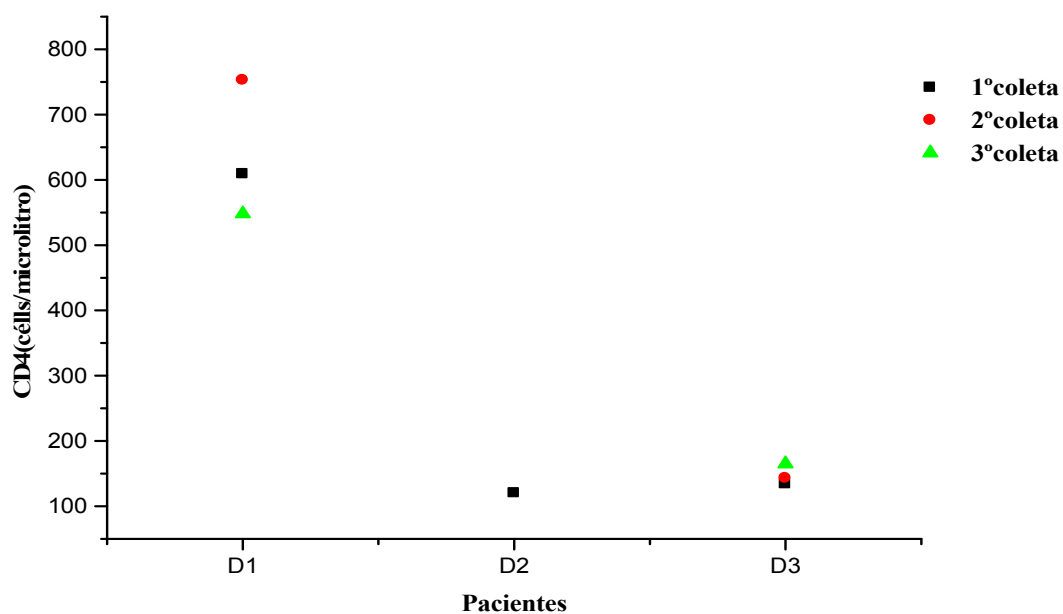


GRÁFICO 30 - Perfil de pacientes do grupo D quanto a contagem de Linfócitos T CD4 no decorrer das três coletas.

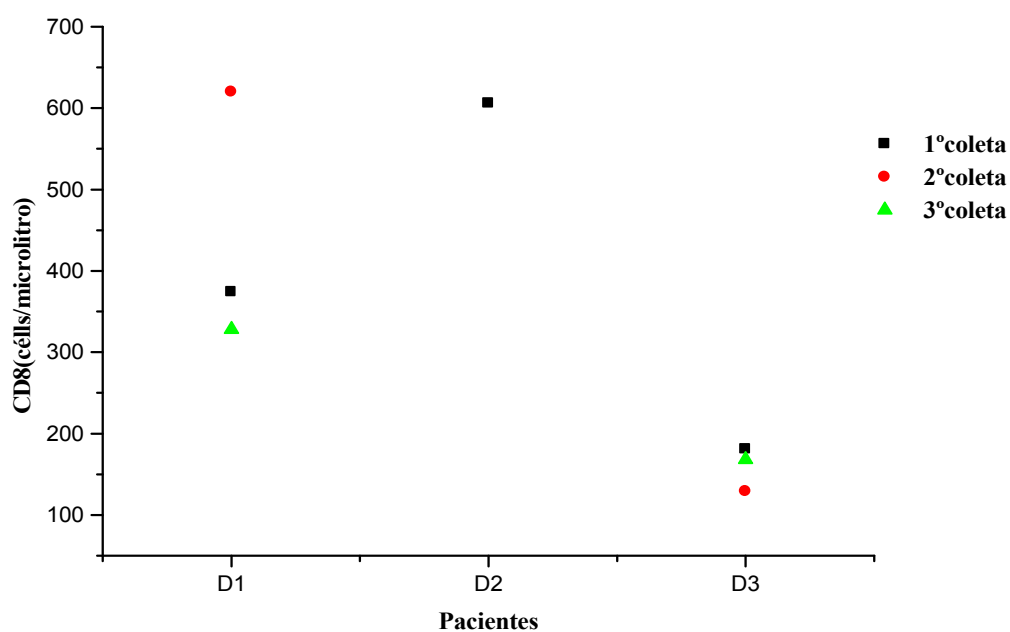


GRÁFICO 31 - Perfil de pacientes do grupo D quanto a contagem de Linfócitos T CD8 no decorrer das três coletas.

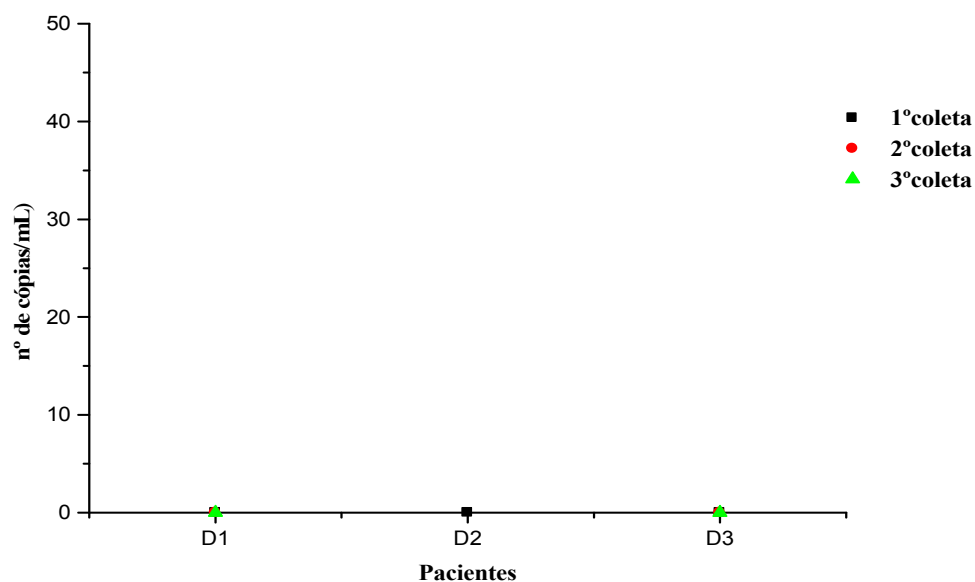


GRÁFICO 32 - Perfil dos pacientes do grupo D quanto a dosagem da Carga Viral no decorrer das três coletas.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, RG _____, Estado _____ Civil _____, Idade _____ anos, Residente na _____, n.º _____, Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____,

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade estudar eventuais mutações que podem ocorrer nos genes do vírus HIV, quando estes infectam células humanas. Estas mutações muitas vezes podem causar resistência às drogas utilizadas no tratamento da doença e, muitas vezes, esse problema se torna ainda mais grave porque a pessoa pode estar infectada não só pelo HIV, mas pode também apresentar a doença tuberculose (estes são os indivíduos chamados co-infectados HIV – Tuberculose). Assim, neste trabalho, nós iremos identificar estas possíveis mutações no gene da transcriptase reversa do HIV, auxiliando na compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência e falha terapêutica antiretroviral;
2. Ao participar desse trabalho estarei contribuindo para um estudo que poderá identificar pessoas que possuem o vírus HIV que sofreu mutação para um determinado gene e também estudar com que frequência estas mutações ocorrem em co-infectados HIV – Tuberculose;
3. Terei que doar para a realização dessa pesquisa, o(s) seguinte(s) material(ais) biológico(s): sangue e escarro;
4. A minha participação como voluntário deverá ter duração de 6 meses;
5. Que não corro nenhum risco ao participar dessa pesquisa e que ocorrerá apenas o desconforto da coleta do material;
6. Os materiais empregados na coleta serão descartáveis;
7. Deverei voltar ao laboratório todas as vezes que houver solicitação do médico ou dos pesquisadores desse projeto;
8. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;
9. Os procedimentos aos quais serei submetido não provocarão danos físicos ou financeiros e por isso não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável por esse trabalho ou das Instituições

(Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP, Araraquara- SP, Hospital Regional Nestor Goulart Reis, Américo Brasiliense – SP, Serviço Especial de Saúde de Araraquara – SESA e Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – capital);

10. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;
11. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização, isto é, sem interrupção do meu tratamento;
12. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos, poderei entrar em contato com a equipe científica pelos telefones: UNESP (16) 3301-6100 (ramal 6109) ou (16) 3368-6524; pessoal (16) 9714-5813 (Juliana Cristina da Silva);
13. Para notificação de qualquer situação de anormalidade que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Regional Nestor Goulart Reis, Américo Brasiliense – SP (16) 292-1914.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar da pesquisa “Estudo longitudinal da frequência de mutações no gene da transcriptase reversa em co-infectados HIV – Tuberculose”.

Araraquara, _____ de _____ de 200____.

Assinatura do Voluntário

Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa
Supervisor do Projeto

Juliana Cristina da Silva
Pesquisadora Responsável

Via do Pesquisador

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, RG _____, Estado Civil _____, Idade _____ anos, Residente na _____, n.º _____, Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____, _____,

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade estudar eventuais mutações que podem ocorrer nos genes do vírus HIV, quando estes infectam células humanas. Estas mutações muitas vezes podem causar resistência às drogas utilizadas no tratamento da doença e, muitas vezes, esse problema se torna ainda mais grave porque a pessoa pode estar infectada não só pelo HIV, mas pode também apresentar a doença tuberculose (estes são os indivíduos chamados co-infectados HIV – Tuberculose). Assim, neste trabalho, nós iremos identificar estas possíveis mutações no gene da transcriptase reversa do HIV, auxiliando na compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência e falha terapêutica antiretroviral;
2. Ao participar desse trabalho estarei contribuindo para um estudo que poderá identificar pessoas que possuem o vírus HIV que sofreu mutação para um determinado gene e também estudar com que frequência estas mutações ocorrem em co-infectados HIV – Tuberculose;
3. Terei que doar para a realização dessa pesquisa, o(s) seguinte(s) material(ais) biológico(s): sangue e escarro;
4. A minha participação como voluntário deverá ter duração de 6 meses;
5. Que não corro nenhum risco ao participar dessa pesquisa e que ocorrerá apenas o desconforto da coleta do material;
6. Os materiais empregados na coleta serão descartáveis;
7. Deverei voltar ao laboratório todas as vezes que houver solicitação do médico ou dos pesquisadores desse projeto;
8. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;
9. Os procedimentos aos quais serei submetido não provocarão danos físicos ou financeiros e por isso não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável por esse trabalho ou das Instituições

(Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP, Araraquara- SP, Hospital Regional Nestor Goulart Reis, Américo Brasiliense – SP, Serviço Especial de Saúde de Araraquara – SESA e Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – capital);

10. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;
11. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização, isto é, sem interrupção do meu tratamento;
12. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos, poderei entrar em contato com a equipe científica pelos telefones: UNESP (16) 3301-6100 (ramal 6109) ou (16) 3368-6524; pessoal (16) 9714-5813 (Juliana Cristina da Silva);
13. Para notificação de qualquer situação de anormalidade que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o comitê de Ética em pesquisa do hospital Regional Nestor Goulart Reis, Américo Brasiliense – SP (16) 292-1914.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar da pesquisa “Estudo longitudinal da frequência de mutações no gene da transcriptase reversa em co-infectados HIV – Tuberculose”.

Araraquara, _____ de _____ de 200____.

Assinatura do Voluntário

Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa
Supervisor do Projeto

Juliana Cristina da Silva
Pesquisadora Responsável

Via do Voluntário

TERMO DE DOAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Eu, _____,
RG_____, residente na_____, na
cidade de _____, concordo em doar o material biológico,
sangue e escarro, para a pesquisa “***Estudo Longitudinal da frequência de
mutações no gene da transcriptase reversa em co-infectados HIV-
Tuberculose***”.

Declaro também ter sido informado e esclarecido sobre a finalidade da
pesquisa e de que a minha identidade será mantida em sigilo.

Araraquara, ____ de _____ de 200__.

Assinatura do Voluntário