

Universidade Estadual Paulista – UNESP

"Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Química de Araraquara

Oedem Paulo de Almeida Junior

“Estudo da Influência da Infecção pelo Mycobacterium tuberculosis sobre a Replicação do HIV e a Imunidade Celular em associação com os Polimorfismos dos Genes tlr2 e tlr4”

ARARAQUARA

2008

Universidade Estadual Paulista – UNESP

"Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Química de Araraquara

Oedem Paulo de Almeida Junior

“Estudo da Influência da Infecção pelo Mycobacterium tuberculosis sobre a Replicação do HIV e a Imunidade Celular em associação com os Polimorfismos dos Genes tlr2 e tlr4”

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química – UNESP, Campus de Araraquara, como pré-requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

ARARAQUARA

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

A447e	Almeida Junior, Oedem Paulo de Estudo da influência da infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> sobre a replicação do HIV e a imunidade celular em associação com os polimorfismos dos genes <i>tlr2</i> e <i>tlr4</i> / Oedem Paulo de Almeida Junior. – Araraquara : [s.n], 2008 75 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Paulo Inácio da Costa 1. HIV. 2. Tuberculose. 3. Receptores toll-like. 4. Co-infecção. I. Título.
-------	---

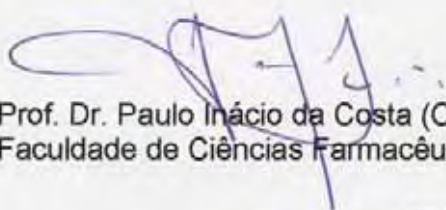
Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

OEDEM PAULO DE ALMEIDA JUNIOR

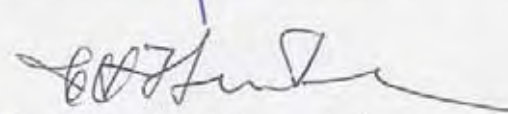
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 28 de janeiro de 2008.

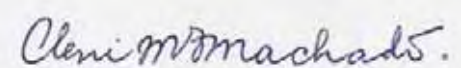
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa (Orientador)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Profª Drª Clarice Queico Fujimura Leite
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Profª Drª Cleni Mara Marzocchi Machado
Faculdade de Ciências Farmacêuticas– USP, Ribeirão Preto

Oedem Paulo de Almeida Junior

1. Dados Pessoais

1.1 Nascimento: 04/01/1983

1.2 Naturalidade: Brasileiro

1.3 Estado Civil: Solteiro

1.4 Filiação: Oedem Paulo de Almeida e Sonia Maria Bissaco Agrelli

1.5 Profissão: Farmacêutico – Bioquímico

1.6 RG: 43.813.943-4

1.7 CPF: 226.463.248-80

1.8 Endereço: Rua Paraíba, nº 234, Bom Jesus. CEP: 15600-000

1.9 E-mail: oedemfarm@yahoo.com.br

2. Formação Acadêmica

2.1 **Mestrado em Biotecnologia**, curso de Pós Graduação em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia, concluído em 28 de janeiro de 2008 no Instituto de Química – Unesp, campus de Araraquara.

2.2 **Graduação em Farmácia e Bioquímica** (bacharelado), concluído em 21 de dezembro de 2004 na Fundação Educacional de Fernandópolis.

DEDICATÓRIA

À minha querida mãe **Sonia Maria B. Agrelli** por toda a compreensão, incentivo e amor incondicional.

À minha avó **Maria José B. Agrelli** pelo apoio e pelo carinho dedicado a mim.

Ao meu avô **Mario Agrelli** (*in memorian*) por ter sido pai, amigo, conselheiro e por ser meu exemplo de humanidade, humildade, respeito ao próximo e à vida.

Ao meu querido irmão **Rafael Eduardo de Almeida** pela amizade e pelo apoio em minhas escolhas.

Aos demais familiares **Luis Henrique B. Agrelli, Suzeli Cunha Agrelli, Osvaldo José de Almeida e Irse Molina de Almeida** que acompanharam esta etapa da minha vida.

Aos verdadeiros **amigos**, que próximos ou distantes, sempre torceram por mim e fizeram com que os momentos de sofrimento e dificuldades se tornassem mais amenos.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Paulo Inácio da Costa por ter sido orientador e amigo, sempre apoiando e depositando enorme confiança em mim, tornado possível à realização deste trabalho.

As minhas queridas amigas, Ana Paula Munhoz, Juliana Cristina Silva e Ana Claudia Gonçalves, pela colaboração, carinho, incentivo e pela convivência prazerosa.

Aos amigos Adelino Brantis de Carvalho e Carlos Eduardo Brantis de Carvalho pela convivência e companhia agradável.

Aos queridos amigos da República A Rocha, Piá, João, Sassa, Macau, Mariposa, Bola, Lex, Igão, ET, Tueio, Macaco, Birruga, Fester e Plex pelos inesquecíveis momentos de convivência e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Clínica: Ana Carolina, Marisa e Michele pela ajuda prestada e pelos bons momentos de convivência.

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

À amiga Patrícia Rodela pelo carinho e incentivo que foi fundamental para o início desta etapa.

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

À prof. Dra. Maria Célia Bertolini do Instituto de Química – UNESP, por ter cedido a estrutura laboratorial necessária para realização de algumas etapas do trabalho.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Aos pacientes que contribuíram diretamente com esse trabalho.

Muito Obrigado!

**Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia
Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP
Araraquara.**

LISTA DE ABREVIATURAS

TLR	Receptor <i>toll-like</i> / Toll-like receptor / Receptor semelhante ao <i>Toll</i>
PAMP	Padrão molecular associado ao patógeno
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
TIR domínio	Domínio de receptor toll / interleucina
DC	Célula dendrítica
NF-κB	Fator nuclear kappa beta
LRR	Domínio rico em repetições de leucina
IL-1 R	Receptor de Interleucina 1
LAM	Lipoarabinomanan
AraLAM	Lipoarabinomanan com cadeias laterais de arabinofuranosil
ManLAM	Lipoarabinomanan com uma capa de manose
PIM	Fosfaditil Inositol Manosilado
STF	Fator solúvel de tuberculose
LTR	Longas repetições terminais (região promotora do HIV)
SNP	Polimorfismo de um único Nucleotídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
TCLE	Termo de Esclarecimento Livre e Esclarecido
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína Clorofilada de Peridina
TNF	Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE GRÁFICOS

1. Distribuição dos pacientes do Grupo A referente ao resultados da contagem de Linfócitos CD3 ⁺ e sub-populações CD4 ⁺ e CD8 ⁺ .	35
2. Perfil dos pacientes do Grupo A quanto à contagem de Linfócitos T CD4 ⁺ /CD8 ⁺ .	36
3. Distribuição dos pacientes do Grupo B referente aos resultados da contagem de Linfócitos CD3 ⁺ e sub-populações CD4 ⁺ e CD8 ⁺ .	38
4. Perfil dos pacientes do Grupo B quanto à contagem de Linfócitos T CD4/CD8.	38
5. Distribuição dos pacientes dos grupos A, B' e B'' referente aos resultados da contagem dos Linfócitos T CD4 ⁺ e as médias para cada grupo.	39
6. Comparação das médias e desvio padrão dos resultados de CD4 e CD8 entre os grupos A e B.	39
7. Perfil dos pacientes do grupo A quanto a carga viral plasmática.	41
8. Perfil dos pacientes do grupo B quanto a carga viral plasmática.	41
9. Comparação das médias e desvio padrão dos pacientes com viremia detectável entre os grupos A e B.	43
10. Comparação das médias e desvio padrão dos pacientes com viremia detectável entre os grupos A e B' e B''.	43

LISTA DE QUADROS

1. <i>Primers</i> para amplificação da seqüência do gene <i>tlr2</i> .	26
2. <i>Primers</i> para amplificação da seqüência do gene <i>tlr4</i> .	26
3. Reação de PCR para regiões dos genes <i>tlr2</i> e <i>tlr4</i> .	26
4. Reação de sequenciamento volume final 10µL.	30
5. Constituintes do gel de sequenciamento	31
6. Tampão e agentes polimerizantes do gel de sequenciamento.	32

LISTA DE FIGURAS

1. O domínio TIR é caracterizado pela presença de três regiões altamente similares (boxes 1, 2 e 3).	3
2. Diferentes PAMPs, respectivos reconhecimentos por TLRs e as proteínas adaptadoras necessárias em cada caso	4
3. Efeitos da lipoproteína de 19kDa do <i>M. tuberculosis</i> mediados pela ativação de TLR 2 em macrófagos.	8
4. Possíveis caminhos para a indução do HIV LTR desencadeado por patógenos através de sinalização por TLRs. AP-1, C/EBP, CREB e Sp1 são fatores de transcrição	12
5. SNPs conhecidos dentro das seqüências de TLR2 e TLR4	14
6. Esquema do teste Vasant HIV-1 RNA 3.0	22
7. Esquema representativo da clivagem do amplicom de <i>tlr2</i> pela enzima Acil (SsiI).	27
8. Gel de Agarose 1,5% mostrando a eficácia da PCR para a seqüência alvo do gene <i>tlr2</i>	33
9. Gel de Agarose 1,5% mostrando a eficácia da PCR para a seqüência alvo do gene <i>tlr4</i>	33
10. Eletroforese em gel de agarose à 0,8% das extrações do DNA genômico pelo método de “salting out”	44
11. Eletroforese dos produtos de PCR para amplificação da seqüência alvo do gene <i>tlr2</i> em gel de agarose a 2%	45
12. Eletroforese dos produtos de PCR para amplificação da seqüência alvo do gene <i>tlr4</i> em gel de agarose a 2%	45
13. Eletroforese em gel de agarose a 3% dos produtos da digestão pela enzima SsiI	47
14. Eletroforese em gel de agarose 1%, aplicando 1µL dos produtos de PCR para a seqüência alvo do gene <i>tlr2</i> após purificação com o kit Gene Clean® Qbiogene	47
15. Eletroforese em gel de agarose 1%, aplicando 1µL dos produtos de PCR para a seqüência alvo do gene <i>tlr4</i> após purificação com o kit Gene Clean® Qbiogene.	48

16. Alinhamento das seqüências alvo do gene <i>tlr2</i> dos pacientes B1 e B2, comparadas com a seqüência selvagem.	49
17. Alinhamento das seqüências obtidas dos grupos A e B comparadas com a seqüência consenso, mostrando a região do polimorfismo A12874G	52
18. Alinhamento das seqüências obtidas dos grupos A e B comparadas com a seqüência consenso, mostrando a região do polimorfismo C13174T	53
19. Esquema representativo das possíveis clivagens da seqüência de <i>tlr2</i> em estudo e os fragmentos originados visualizados na eletroforese	56

LISTA DE TABELAS

1. Receptores <i>toll-like</i> e seus ligantes.	5
2. Resultados da tipagem dos linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ em pacientes portadores de HIV (grupo A).	35
3. Resultados da tipagem dos linfócitos T CD4 e CD8 em pacientes portadores de HIV e co-infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (grupo B).	37
4. Resultados da determinação da viremia plasmática em portadores da infecção pelo HIV (pacientes do grupo A).	40
5. Resultados da determinação da viremia plasmática em portadores da infecção pelo HIV e co-infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	42

Resumo

A infecção produzida pelo HIV leva à debilidade do sistema imune e confere ao indivíduo infectado maior vulnerabilidade às infecções oportunistas. Neste aspecto a tuberculose e o HIV estão intimamente relacionados, uma vez que a infecção pelo vírus contribui significativamente para o aumento na incidência da tuberculose. Por outro lado, a co-infecção do HIV com outros patógenos é um importante fator exógeno que influencia a gravidade e a taxa de progressão da doença em indivíduos soro-positivos. O sistema imune pode reconhecer padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) através dos receptores *toll-like*, sendo que esta sinalização resulta na ativação de fatores de transcrição fundamentais para as respostas imune e inflamatória. A indução do HIV como consequência da ativação imunológica produzida por ligantes microbianos tem sido implicada como o mecanismo responsável pela elevada expressão viral observada em indivíduos co-infectados. Polimorfismos nos genes *tlr*, bem como nos vários componentes de seus caminhos de sinalização, têm grande importância na resposta imunológica do hospedeiro frente a vários patógenos. Neste estudo foi avaliado se a do hospedeiro infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* tem influência na replicação do HIV e na imunidade celular relacionada aos polimorfismos nos genes *tlr2* e 4. Foram analisados 37 pacientes de ambos os sexos com média de idade de 41 anos. Os pacientes foram divididos em 2 grupos: grupo A (17 indivíduos portadores de HIV) e grupo B (20 indivíduos portadores de HIV co-infectados com *M. tuberculosis*); o grupo B foi subdividido em pacientes com histórico de infecção pregressa pelo *M. tuberculosis* (12 indivíduos designados por B') e aqueles que apresentavam manifestações clínicas da tuberculose durante as coletas (8 indivíduos designados por B''). 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; os polimorfismos do gene *tlr2* foram avaliados por PCR-RFLP e os polimorfismos do gene *tlr4* por seqüenciamento da região genômica de interesse. A média dos valores de CD4⁺ e CD8⁺ nos pacientes do grupo A (17 indivíduos) foram 489±248 e 938±398 céls/μL, respectivamente; enquanto que no grupo B os valores de CD4⁺ e CD8⁺ foram 418±276 e 909±658 céls/μL, respectivamente. O subgrupo B'' (8 pacientes) apresentou resultados de CD4⁺ inferiores aos demais grupos (298±251 céls/μL). No grupo A, 47% dos pacientes (8/17) apresentaram viremia plasmática detectável, sendo a média entre eles de 16.248 cópias/mL; 55% dos pacientes do grupo B (11/20) apresentaram viremia detectável, sendo o valor médio de 75.680 cópias/mL; 87% dos indivíduos do subgrupo B'' (7/8) tiveram viremia detectável com valores bastante elevados (média de 110.252 cópias/mL). As seqüências dos genes *tlr2* e *tlr4*, analisadas PCR-

RFLP e por seqüenciamento de DNA não apresentaram polimorfismos. De acordo com os resultados obtidos e com a comparação entre os grupos, foi possível observar maior replicação do HIV e piores condições imunológicas entre os indivíduos com manifestações clínicas recentes da tuberculose; considerando que não foram identificadas alterações nos genes *tlr2* e *4*, descritas por alterar o reconhecimento de moléculas oriundas de patógenos, os resultados sugerem a influência da co-infecção sobre a replicação do HIV, possivelmente pela sinalização por TLRs. Portanto, embora com número reduzido de pacientes, conclui-se que a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* favorece a replicação do HIV e a ausência de polimorfismos nos genes *tlr2* e *4* colaboram para o efeito sinérgico da replicação do HIV frente à co-infecção.

Abstract

The infection caused by the HIV virus lead to debility of the immune system and confers to the infected individual a greater vulnerability to opportunist infections. In this aspect the tuberculosis and the HIV are closely related, once that the infection by the virus significantly contribute for the increase of tuberculosis incidence. The co-infection with others pathogens is an important exogenous factor that influence the severity and the rate of progression of the disease at serum-positive patients. The Immune System can recognize pathogens associated molecular patterns (PAMPs) through the toll-like receptors, this signalization results in the activation of fundamental transcriptional factors to the immune and anti-inflammatory responses. The induction of HIV like a consequence of immunological activation produced by microbial ligands has been implicated as the responsible mechanism of the elevated viral expression observed at co-infected individuals. Polymorphisms at the *tlr* genes, as well as at various components of its signaling pathways, has a great importance on the immunological response of the host front various pathogens. In this study was evaluated the influence of the *Mycobacterium tuberculosis* at the replication of HIV and at cellular immunity related to polymorphisms at the genes *tlr2* and *4*. Thirty seven patients, from both sex and with age ratio of 41 years old, were analyzed. The patients were divided into two groups: group A (17 individuals HIV positive) and group B (20 co-infected HIV – *M. tuberculosis* individuals); the group B was divided into patients with historic of infection by *M. tuberculosis* (12 individuals designated by B') and those that was manifesting the symptoms of tuberculosis during the reaps (8 individuals designated by B''). The immunological profile was evaluated by the quantitative determination of phenotypes CD3⁺/CD4⁺ and CD3⁺/CD8⁺ of lymphocytes from peripheral blood; the viral profile was determined by the plasmatic-RNA-HIV viral load measurement; the polymorphisms of the gene *tlr2* was evaluated by PCR-RFLP and the polymorphisms of the gene *tlr4* by sequencing of the genomic region of interest. The values average of CD4⁺ and CD8⁺ at the patients from group A (17 individuals) were 489±248 e 938±398 cells/μL, respectively; while in the group B the values of CD4⁺ and CD8⁺ were 418±276 e 909±658 cells/μL, respectively. The subgroup B' (8 patients) shown results for CD4⁺ lowers than the others (298±251cells/μL). In the group A, 47% of the patients (8/17) shown detectable plasmatic viral load, being the average value of 75.680 copies/mL; 87% of the individuals from subgroup B'' (7/8) had high detectable viral load (average of 110.252 copies/mL). The sequences from the genes *tlr2* and *tlr4* analyzed by PCR-RFLP and by sequencing of DNA did not show polymorphisms. According to the acquired results and with comparison among the groups was possible to observe a major replication from HIV and worse

immunological conditions among the individuals with recent clinical manifestations of tuberculosis; considering that weren't identify alterations at the genes *tlr2* and 4, described to alter the recognition of pathogen derivates molecules, the results suggest an influence from the co-infection upon the HIV replication, possibly by TLRs signaling. Therefore, although the reduced number of patients, it is possible to conclude that the infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes the HIV replication and the absence of polymorphisms at the genes *tlr2* and 4 contribute to the synergic effect of HIV replication front the co-infection.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Receptores <i>Toll-Like</i> e o Sistema Imune	1
1.2 <i>Mycobacterium</i> e Receptores Toll-like	6
1.3 HIV-1 e co-infecção com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
1.4 Polimorfismos genéticos dos Receptores <i>Toll-like</i> 2 e 4	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. METODOLOGIA	17
3.1 FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO	17
3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	18
3.3 IMUNOFENOTIPAGEM LINFOCITÁRIA	18
3.3.1 AMOSTRAS	19
3.4 DOSAGEM DA VIREMIA PLASMÁTICA	19
3.4.1 PREPARAÇÃO E LISE DOS PRECIPITADOS	20
3.4.2 REAÇÃO DE CAPTURA DO RNA – HIV E HIBRIDAÇÃO DAS SONDAS ALVOS	21
3.4.3 HIBRIDAÇÃO DAS SONDAS PRÉ-AMPLIFICADORA E SONDA AMPLIFICADORA.	21
3.4.4 HIBRIDAÇÃO DA SONDA MARCADA	22
3.4.5 DETECÇÃO DA LUMINESCÊNCIA PRODUZIDA	22
3.4.6 CURVA DE CALIBRAÇÃO E ANÁLISE DAS REAÇÕES	23
3.5 ISOLAMENTO DO DNA GENÔMICO	23
3.6 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA A VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DO DNA	25
3.7 REAÇÃO DE PCR	25

3.8 DIGESTÃO DOS PRODUTOS DE PCR DA SEQÜÊNCIA ALVO DO GENE <i>tlr2</i>	27
3.9 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR PARA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO	28
3.10 QUANTIFICAÇÃO DO DNA PURIFICADO	29
3.11 REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR	30
3.11.1 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE SEQÜENCIAMENTO	30
3.11.2 PREPARO DO GEL	31
4. RESULTADOS	33
4.1 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR	33
4.2 FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO	34
4.3 DETERMINAÇÃO DOS FENÓTIPOS CD3/CD4 e CD3/CD8	34
4.4 DETERMINAÇÃO DA VIREMIA PLASMÁTICA	39
4.5 ISOLAMENTO DO DNA GENÔMICO	44
4.6 REAÇÃO DE PCR	44
4.7 DIGESTÃO/RESTRIÇÃO	45
4.8 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	47
4.9 SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO ALVO DO GENE <i>tlr2</i>	48
4.10 SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO ALVO DO GENE <i>tlr4</i>	50
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICES	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Receptores *Toll-Like* e o Sistema Imune

O sistema imunológico inclui imunidade inata e adquirida, as quais atuam cooperativamente para proteger o hospedeiro de infecções. A imunidade adquirida é caracterizada pela especificidade e memória mostrada por linfócitos T e B. Cada linfócito expressa um receptor de superfície com uma especificidade única que é gerada durante sua maturação. Porém, a iniciação da imunidade adquirida normalmente leva vários dias para acontecer, assim a imunidade inata é a principal linha de defesa na fase inicial da infecção. Os principais componentes da imunidade inata são fagócitos tais como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (DCs) (AKIRA & HEMMI, 2003).

Acreditava-se que a função primária das células envolvidas na imunidade inata era a fagocitose não específica, digestão e apresentação de antígenos derivados de patógenos para as células T (AKIRA & HEMMI, 2003). Porém, a recente identificação dos receptores *toll-like* (TLRs) mudou este conceito. Foi revelado que a imunidade inata pode reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) através de TLRs expressos na superfície das células imunes, mostrando que a imunidade inata tem um alto grau de especificidade (AKIRA & TAKEDA, 2004).

A descoberta dos TLRs teve início com a identificação do *Toll*, uma proteína expressada em *Drosophila*, que apresenta um papel essencial no estabelecimento da polaridade dorsoventral embrionária nestes insetos, funcionando como um gene regulatório (HASHIMOTO, HUDSON & ANDERSON, 1988). Estudos subsequentes revelaram que o *Toll* também apresenta uma importante função na resposta imune inata contra infecções

fúngicas em *Drosophila* adultas (LEMAITRE *et al*, 1996). Os receptores *Toll-like* identificados em *Drosophila*, répteis, aves e mamíferos mostram-se bem conservados e estão relacionados com o reconhecimento de uma variedade de moléculas (PAMPs), mediando a resposta imune (ARMANT & FENTON, 2002).

Estudos sobre o reconhecimento dos PAMPs têm realçado o papel crítico de um grupo de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), os receptores toll-like, no reconhecimento de patógenos e na defesa do hospedeiro. Os TLRs distinguem-se de outros PRRs (como por exemplo CD14, CD11, CD18, lectina C, e vários outros) pela sua habilidade de reconhecer e discriminar diferentes classes de patógenos (ZHANG & GOSH, 2001).

O compromisso dos TLRs frente a patógenos é conduzir a ativação da resposta imune inata, e o principal alvo de sinalização do TLR é a ativação do fator de transcrição NF- κ B, que é uma chave reguladora das respostas imune e inflamatória. O NF- κ B pode ser ativado por diferentes estímulos tais como produtos de microrganismos, citocinas proinflamatórias e estresses físicos e químicos. Este fator de transcrição é expresso constitutivamente e desempenha uma função central na regulação e expressão de muitos genes envolvidos nos processos imunes, inflamatórios e apoptóticos. O NF- κ B, por sua vez regula a expressão induzível de muitas citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, proteínas de fase aguda e peptídios antimicrobianos (ZHANG & GOSH, 2001).

Os TLRs são glicoproteínas de membrana do tipo I. Baseado em sua similaridade na região citoplasmática, de aproximadamente 200 resíduos de aminoácidos, conhecida como *Toll*/IL-1R (TIR), os TLRs constituem uma superfamília de proteínas de membrana que engloba os receptores de

interleucina-1 (IL-1 Rs). A região extracelular dos TLRs e dos IL-1Rs são notavelmente distintas, esta região nos TLRs contém domínios ricos em leucina (LRR), enquanto os IL-1Rs apresentam três domínios de ligação semelhantes às imunoglobulinas. Dentro dos domínios TIR, as regiões de homologia incluem três “boxes” conservados, os quais são cruciais para a sinalização por moléculas adaptadoras, conforme representado na Figura 1 (AKIRA & TAKEDA, 2004; SANGHAVI *et al.*, 2004).

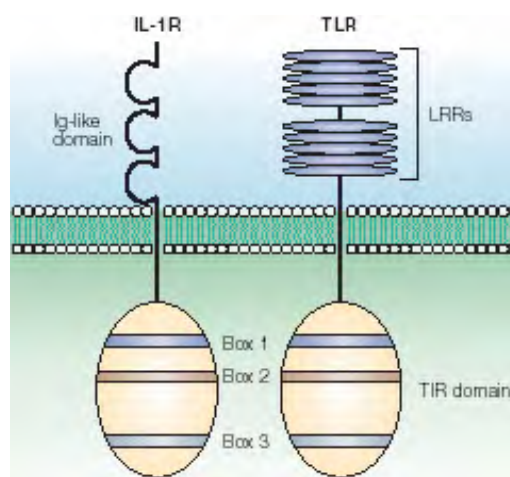


Figura 1. O domínio TIR é caracterizado pela presença de três regiões altamente similares (boxes 1, 2 e 3). A região extracelular é notavelmente diferente, os TLRs apresentam LRR, enquanto os IL-1Rs apresentam domínios semelhantes a imunoglobulinas (Ig-like domains).

Os domínios LRR formam uma estrutura com aspecto de ferradura, onde sua superfície côncava é envolvida diretamente no reconhecimento de vários patógenos. Os vários ligantes reconhecidos por TLRs estão resumidos na Tabela 1 (AKIRA & TAKEDA, 2004; TAKAMURA & MIYAKE, 2006).

Existem pelo menos 11 TLRs que reconhecem diferentes padrões moleculares associados a patógenos, sinalizando através de proteínas

adaptadoras as vias que induzem a expressão de diferentes genes da resposta imune (KARAYIANNIS, 2005; AKIRA & TAKEDA, 2004).

As vias de sinalização dos TLRs levam a diferentes padrões de expressão gênica. Isto pode ser explicado pela existência de muitas moléculas adaptadoras, as quais são usadas por diferentes TLRs. Estes adaptadores, que apresentam domínios TIR, são os seguintes (em ordem de identificação): MyD88; TIRAP (domínio TIR contendo proteína adaptadora, também conhecido com MyD88-adaptor-like protein, MAL); TRIF (domínio TIR contendo proteína adaptadora que induz IFN- β , também conhecido como TICAM1); e TRAM (TRIF relacionado à molécula adaptadora, também conhecido como TICAM2) (AKIRA & TAKEDA, 2004; TAKAMURA & MIYAKE, 2006) (Figura 2).

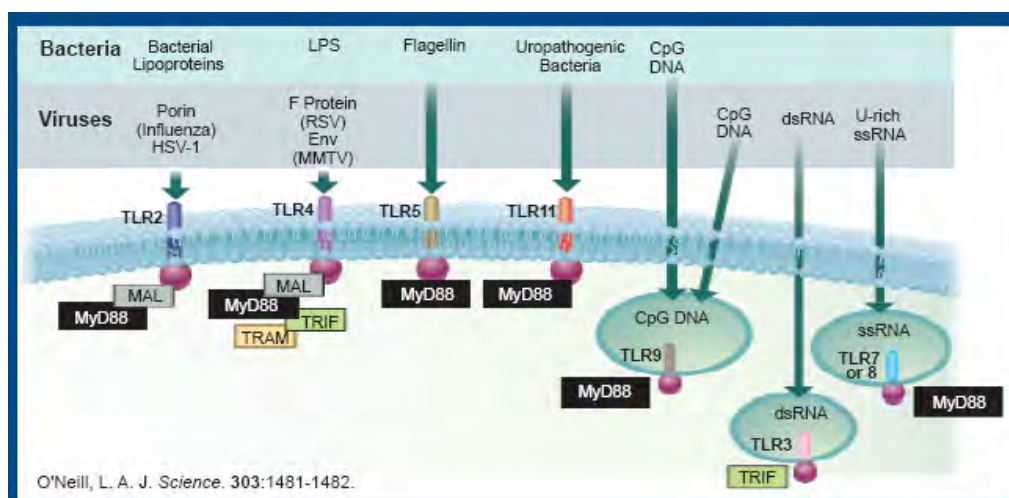


Figura 2. Diferentes PAMPs, respectivos reconhecimentos por TLRs e as proteínas adaptadoras necessárias em cada caso (Adaptado de HESTER & HALSEY, 2005).

Tabela 1. Receptores *toll-like* e seus ligantes.

RECEPTOR	LIGANTES	ORIGEM DOS LIGANTES
TLR1	Lipopeptídios triacilados Fatores Solúveis	Bactérias e Micobactérias <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoproteínas e Lipopeptídios Peptidioglicano Ácido Lipoteicóico Lipoarabinomanam Modulinas Glicoinositolfosfolipídios Porinas Lipopolissacarídeos atípicos Zymosan Hsp 70 (proteína de estress)	Diversos Patógenos Bactérias Gram-positivas Bactérias Gram-positivas Micobactérias <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> e <i>Porphyromonas gingivalis</i> Fungos Hospedeiro
TLR3	RNA de fita dupla	Vírus
TLR4	Lipopolissacarídeo Taxol Proteína de fusão Hsp 60 Hsp 70 Oligossacarídeos de Ácido Hialurônico Fibrinogênio	Bactérias Gram-negativas Plantas Vírus do Sincício Respiratório <i>Chlamydia pneumoniae</i> Hospedeiro Hospedeiro Hospedeiro
TLR5	Flagelina	Bactérias
TLR6	Lipopeptídios diacilados Ácido Lipoteicóico Zymosan	<i>Mycoplasma</i> Bactérias Gram-positivas Fungos
TLR7	Imidazoquinolina, Loxorribina e Bromopirimina RNA de fita simples	Compostos sintéticos Vírus
TLR8	Imidazoquinolina RNA de fita simples	Compostos sintéticos Vírus
TLR9	DNA contendo CpG	Bactérias e vírus
TLR10	Não determinado	Não determinado
TLR11	Não determinado	Bactérias Uropatogênicas

Adaptado de AKIRA & TAKEDA, 2004; TAKAMURA & MIYAKE, 2006.

Heil *et al.* (2004) mostraram em seus estudos que moléculas de RNA de fita simples apresentam um potencial imunoestimulatório através do reconhecimento por TLR 7 e TLR 8. Os oligonucleotídeos contendo seqüências ricas em guanossina e uridina (GU), oriundos do RNA do HIV-1(vírus da

imunodeficiência humana do tipo 1), foram capazes de ativar células mononucleares de sangue periférico, havendo produção de citocinas (IFN- α , TNF- α , IL-12 e IL-6).

Estudos de mapeamento genético revelaram que os genes *tlr* estão localizados de maneira dispersa no genoma de mamíferos. No genoma humano, especificamente, os genes *tlr* localizam-se nos cromossomos 4 (TLR1, TLR2, TLR3, TLR6 e TLR10), 9 (TLR4), 1 (TLR5), X (TLR7 e TLR8) e 3 (TLR9) (ARMANT & FENTON, 2002).

1.2 *Mycobacterium* e Receptores Toll-like

As micobactérias dispõem de evoluídos mecanismos de evasão do sistema de defesa do hospedeiro. O *Mycobacterium tuberculosis*, principal agente causador da tuberculose em humanos, é uma bactéria intracelular capaz de sobreviver nas células mononucleares do indivíduo infectado (STENGER & MODLIN, 2002). A infecção pelo *M. tuberculosis* pode ocorrer pela inalação de partículas contendo esses bacilos, que ao atingirem os alvéolos pulmonares são 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).

O sistema imune do hospedeiro é capaz de reconhecer moléculas expressas pelo patógeno (PAMPs), tais como lipoproteínas e lipoglicanos, através dos TLRs. O reconhecimento dos PAMPs por estes receptores modula funções da imunidade inata e adquirida mediando a secreção de moléculas antibacterianas e pela regulação de moléculas imunomodulatórias apoiando o

desenvolvimento de uma resposta Th1 (STENGER & MODLIN, 2002; KRUTZIK & MODLIN, 2004). Desta maneira, a ativação dos TLRs contribui com a defesa contra infecções microbianas.

Considerando que o tecido pulmonar é o principal ambiente de contato com patógenos, tais como o *M. tuberculosis*, é crítico para o pulmão ter sua superfície cercada por PRRs. De fato, análises de tecidos humanos revelaram que o pulmão é o principal local para a expressão de RNA mensageiro de TLRs. Mais especificamente, há expressão de TLR2 em macrófagos alveolares e em células epiteliais alveolares do tipo II (ZAREMBER & GODOWSKI, 2002; DROEMANN *et al.*, 2003).

O principal componente imuno-estimulatório do *M. tuberculosis* é a Lipoproteína de 19-kDa que é um antígeno secretado pelo bacilo. Brightbill *et al* (1999) demonstraram em seus estudos que a lipoproteína de 19kDa induziu células ativando NF- κ B e secretando Interleucina 12 (IL-12) dependente do reconhecimento por TLR2 (Fig.3). Este estudo também mostrou que esta lipoproteína induz a produção de óxido nítrico (NO) em ratos, um potente agente anti-micobacteriano. Semelhantemente, foi mostrado que a ativação de células por TLR2 com a lipoproteína de 19kDa resulta na morte de *M. tuberculosis* intracelular e disparou a maturação de células dendríticas (BRIGHTBILL *et al.*, 1999; KRUTZIK & MODLIN, 2004).

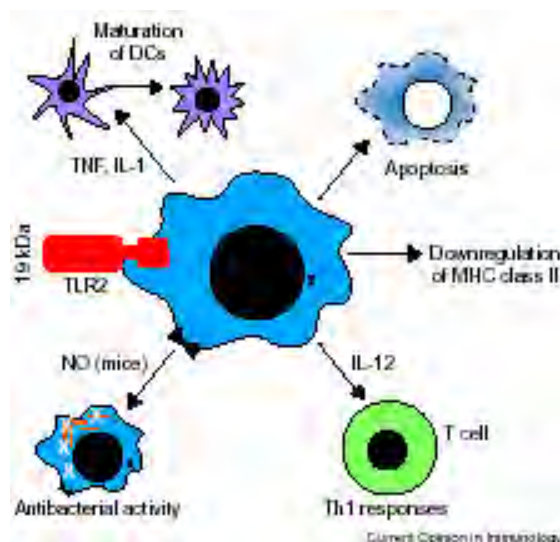


Figura 3. Efeitos da lipoproteína de 19kDa do *M. tuberculosis* mediados pela ativação de TLR 2 em macrófagos (Adaptado de STENGER & MODLIN, 2002).

Outro componente da membrana rica em glicolipídios das micobactérias que constitui um importante PAMP é o lipoarabinomanan (LAM). Nas micobactérias foram identificados duas formas quimicamente distintas de LAM: uma altamente ramificada com cadeias laterais de arabinofuranosil (AraLAM), e uma com uma capa de manose (ManLAM). AraLAM é encontrado em linhagens de micobactérias avirulentas de crescimento lento, mostrou ativar células através do reconhecimento por TLR-2. ManLAM, encontrada em linhagens virulentas de crescimento rápido, não ativa células através dos TLR-2 ou TLR-4 em sistema de transfecção; entretanto, ManLAM pode ativar NFkB, sugerindo uma possível sinalização por outros TLRs (KRUTZIK & MODLIN, 2004).

Um terceiro componente do *M. tuberculosis* capaz de ativar TLRs é o fator solúvel de tuberculose (STF), o qual contém Fosfatidilinositol Manosilado (PIM), podendo apresentar-se nas formas mono-, di- ou hexa-manosilado (KRUTZIK & MODLIN, 2004). PIM é um precursor na biossíntese de LAM e o componente crítico de STF para a ativação de NFkB, da proteína ativadora-1 e

MAPkinase em macrófagos. Estudos demonstraram o envolvimento dos TLR2 e TLR6 mediando a ativação celular com STF (BULUT *et al.*, 2001). O TLR2 é conhecido por formar heterodímeros com TLR6 e TLR1, que cooperam com o reconhecimento de lipoproteínas triaciladas do tipo STF. A formação de heterodímeros de TLRs permite o reconhecimento de ligantes específicos e a ativação de distintos programas de genes (KRUTZIK *et al.*, 2003; KRUTZIK & MODLIN, 2004).

1.3 HIV-1 e co-infecção com *Mycobacterium tuberculosis*

O número de pessoas vivendo com AIDS no mundo chegou a 33,2 milhões em 2007 (JOINT UNITED NATIONS PROGRAME ON HIV/AIDS & WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). A co-infecção com outros patógenos é um importante fator exógeno que influencia a severidade e a taxa de progressão da doença em indivíduos soro-positivos. Vários agentes infecciosos de origem heterogênea são comuns na infecção com HIV, tais como o Herpes vírus humano; protozoários como *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum*; e bactérias como *Mycobacterium* *ssp* e *Neisseria gonorrhoea* (BÁFICA *et al.*, 2004).

O Vírus da Imunodeficiência Humana tem aproximadamente 100 nm de diâmetro, é envelopado, apresentando em sua superfície uma membrana lipídica oriunda da membrana da célula hospedeira, duas glicoproteínas (gp 41 e gp 120), uma matriz protéica, formada pela proteína p17 e o capsídeo viral de forma cônica composto pela proteína p24. Seu genoma é constituído de RNA e através da enzima DNA-polimerase RNA-dependente (transcriptase reversa – RT) é capaz de copiar seu genoma em uma dupla fita de DNA e integrar-se ao

genoma da célula hospedeira (retrovírus). Dentro do capsídeo viral encontram-se o tRNA e as enzimas necessárias para os primeiros eventos da replicação viral (WIGG, 2002).

O início da infecção ocorre mediante a ligação da partícula viral, através das glicoproteínas de superfície gp41 e gp120 a receptores específicos na célula alvo. O principal co-receptor para o HIV-1 é o CD4, expresso 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, sendo necessários receptores de quimiocinas para o seu reconhecimento. 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 *et al.*, 2002).

A proteína gp120, após ligação à 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 & KIM, 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 nucleoprotéico 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 & SKALKKA, 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 (Long Terminal Repeats) 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 glicoprotéico, 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 & WONG-STAAAL, 1991; PUGLISI *et. al.*, 1992; KAPLAN *et. al.*, 1994; HOPE, 1997).

A infecção produzida pelo HIV leva à debilidade do sistema imune e confere ao indivíduo infectado maior vulnerabilidade às infecções oportunistas. Neste aspecto a tuberculose e o HIV estão intimamente relacionados desde a emergência da AIDS, uma vez que a infecção pelo vírus contribui significativamente para o aumento na incidência da tuberculose (RAVIGLIONE

et al.,1992). Mundialmente, a tuberculose é a infecção oportunista mais comum entre pacientes soro-positivos para o HIV e a causa de morte mais freqüente entre os pacientes com AIDS (RAVIGLIONE *et al.*, 1995).

A indução do HIV como consequência da ativação imunológica induzida por ligantes microbianos foi implicada como o mecanismo responsável pela elevada expressão viral observada em indivíduos co-infectados. A imuno-ativação refere-se à estimulação das longas repetições terminais do HIV (LTR), que constitui a região promotora do genoma viral, por meio de sinais ativados pela resposta imune a antígenos de agentes infecciosos não-HIV (Figura 4). Estes sinais podem operar através de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-1 induzidas na resposta imune celular, e/ou através de fatores de transcrição ativados nas células infectadas com HIV e co-infectadas com um segundo patógeno (BÁFICA *et al.*, 2004).

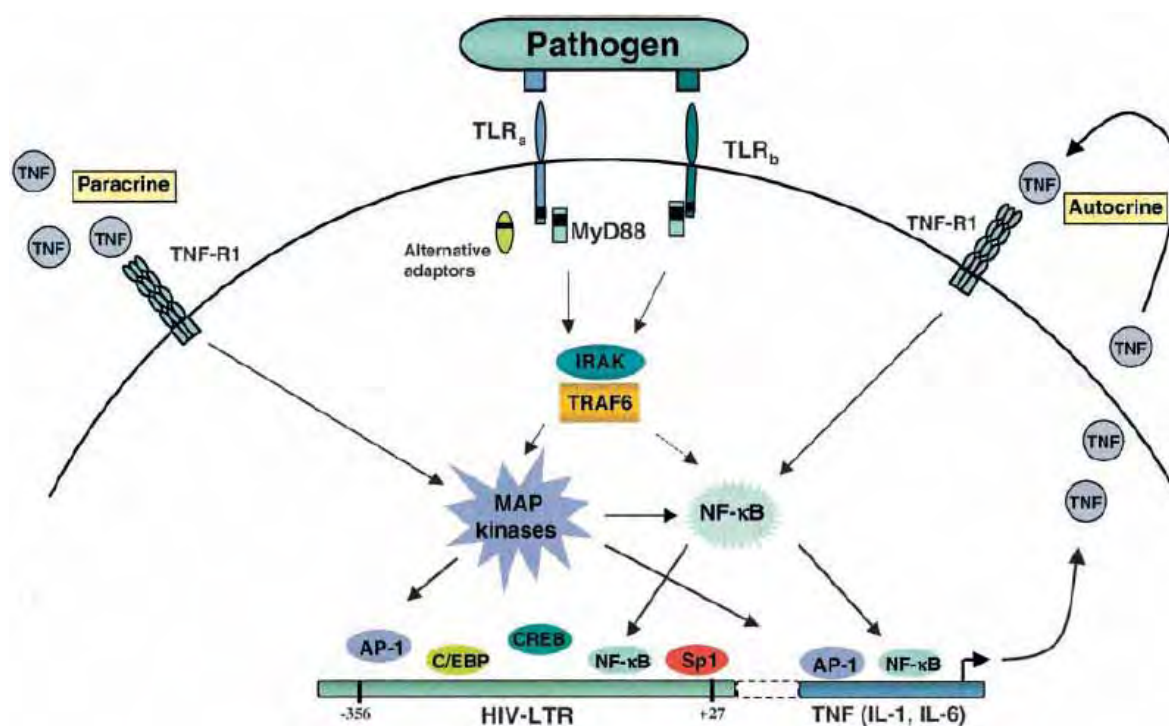


Figura 4. Possíveis caminhos para a indução do HIV LTR desencadeados por patógenos através de sinalização por TLRs. **AP-1**, **C/EBP**, **CREB** e **Sp1** são fatores de transcrição (adaptado de BÁFICA *et al.*, 2004).

Muitos estudos mostraram o envolvimento da sinalização por TLRs na indução da expressão do HIV devido a ligantes microbianos. EQUILS *et al.* (2001) demonstraram que lipopolissacarídeo (LPS) estimula a transativação de HIV LTR através da sinalização por TLR4.

Microrganismos vivos e extratos microbianos promovem a expressão do HIV “in vitro”, como mostrado que *M. tuberculosis* vivo estimula a atividade promotora do HIV LTR em células transfectadas, bem como a replicação do vírus em células monocíticas cronicamente infectadas. Os extratos purificados deste patógeno (Lipoarabinomanam e PIM micobacterianos) estimulam as mesmas respostas virais por meio da sinalização por TLR2 (JONES *et al.*, 2001).

1.4 Mutações e polimorfismos genéticos associados aos receptores *Toll-like* 2 e 4

Os polimorfismos genéticos, em sua maior parte, decorrentes da alteração de um único nucleotídeo (SNP), são variantes comuns em uma população; encontrados em uma frequência superior a 1%. Os SNPs podem alterar a sequência de aminoácidos da proteína, alterando sua função ou ser completamente silencioso. Há vários SNPs descritos em genes envolvidos no sistema imunológico, como nos PRRs (receptores de reconhecimento padrão) e citocinas (SCHRÖDER & SCHUMANN, 2005).

Devido à importância dos genes envolvidos na imunidade inata, tais como os genes *tlr*, onde seus produtos constituem moléculas chave para a imunidade, variações nestes genes podem ter um impacto fundamental na defesa do hospedeiro (HAMANN *et al.*, 2004).

Polimorfismos nos genes *tlr*, bem como nos vários componentes de seus caminhos de sinalização, têm grande importância na resposta imunológica do hospedeiro frente a vários patógenos. O gene *tlr2* apresenta polimorfismo G2408A que, quando presente, causa a mutação Arg753Gln na sequência de aminoácidos do receptor que é associada ao aumento do risco de infecção por *Streptococcus pneumoniae*. Um segundo polimorfismo apresentado por este gene é a substituição C2180T, causando a mutação Arg677Trp que é relacionada com a inabilidade na sinalização mediada por Micobactérias (Fig.5A). Este polimorfismo também tem sido evidenciado em população asiática portadora de hanseníase (HESTER & HALSEY, 2005; HAMANN *et al.*, 2004; LORENZ *et al.*, 2000).

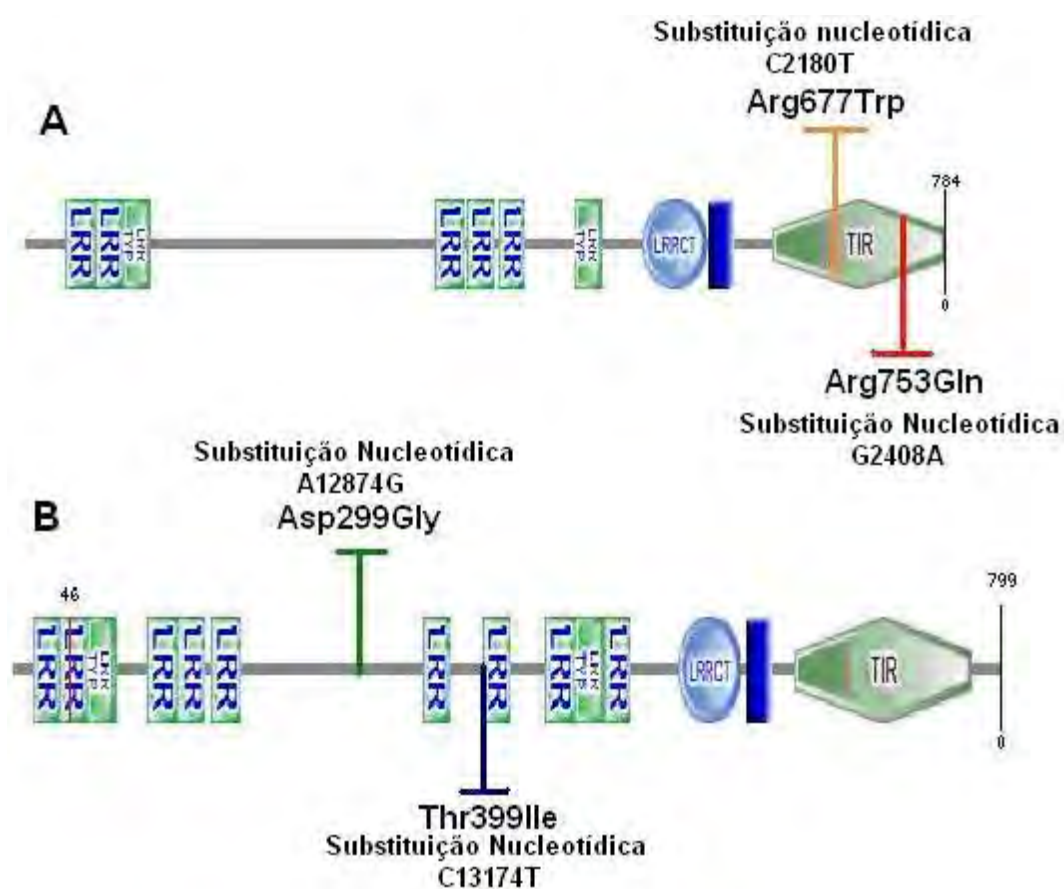


Figura 5. Alterações conhecidas dentro das sequências de TLR2 (A) e TLR4 (B), ocasionadas por alterações nucleotídicas em seus respectivos genes (ALMEIDA JR., 2007. Ainda não publicado).

Foram relatados dois importantes polimorfismos no gene *tlr4* humano, A12874G e C13174T, que provocam as respectivas mutações Asp299Gly e Thr399Ile no receptor, com frequências superiores a 2% (Fig.5B). Estas variantes estão presentes em alta proporção entre indivíduos com baixa resposta a lipopolisacarídeo (LPS) inalado comparado com uma população controle. Os polimorfismos do TLR4 também estão associados com um aumentado risco de bronquite causada pelo vírus do sincício respiratório (RSV), cuja proteína de fusão estimula TLR4 (SCHRÖDER & SCHUMANN, 2005).

As alterações descritas acima nas seqüências protéicas dos TLRs, correspondem aos domínios TIR (TLR2) e LRR (TLR4), cujas regiões codificadoras localizam-se nos exons 2 e 3 dos respectivos genes. O domínio TIR é localizado na porção citoplasmática do receptor enquanto que o domínio LRR compõe a região extracelular dos TLRs (SCHRÖDER & SCHUMANN, 2005, AKIRA & TAKEDA, 2004).

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como finalidade avaliar a influência da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* sobre a Imunidade Celular e sobre a replicação viral associado com os polimorfismos nas seqüências nucleotídicas dos genes *tlr2* e *tlr4* em portadores da infecção pelo HIV-1 e co-infectados pelo *M. tuberculosis* em pacientes da região de Araraquara.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a carga viral plasmática e contagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ dos pacientes que compõem o estudo.
- Avaliar a presença de polimorfismos conhecidos nos genes *tlr2* e *tlr4* nos pacientes do estudo.
- Avaliar a presença de outros polimorfismos nas seqüências analisadas.
- Analisar e comparar os perfis imunológico e viral entre os grupos de estudo, frente suas peculiaridades clínicas.
- Relacionar os perfis imunológico e viral com os polimorfismos identificados.

3. METODOLOGIA

3.1 FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

O grupo de estudo, a princípio, a ser estudado baseava-se nos pacientes do Hospital Nestor Goulart Reis – Américo Brasiliense, cujo comitê de ética hospitalar proveu parecer favorável a execução do trabalho. Devido à dificuldade encontrada na composição dos grupos, mais precisamente, no encontro de pacientes co-infectados, foi realizada uma parceria com o Serviço Especial de Saúde de Araraquara – SESA, no sentido de abranger o leque de pacientes e ser possível formar os grupos para análise.

A população de estudo consiste de pacientes soro-positivos para HIV e pacientes co-infectados pelo *M. tuberculosis*, sendo 17 mulheres e 23 homens com uma idade média de 41 ± 10 anos.

Foram formados 2 grupos de estudo sendo compostos por: pacientes HIV, com e sem tratamento; pacientes co-infectados *M.tuberculosis/HIV* que já tiveram tuberculose no passado e que hoje tratam somente HIV ou àqueles que se encontram tratando com tuberculostático.

Para manter o sigilo dos respectivos nomes foi elaborado um método para caracterizar os grupos sem identificá-los da seguinte maneira:

GRUPO A: pacientes portadores do HIV (17 pacientes);

GRUPO B: pacientes portadores do HIV co-infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis* (20 pacientes).

Os pacientes foram identificados dentro desses grupos por: A1, A2, B1, B2, e assim, sucessivamente.

3.2 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, seguindo as normas de biossegurança, imediatamente após a coleta.

Ficou determinado a coleta em três tubos Vacutainer (5 mL), sendo um dirigido à tipagem de linfócitos, outro dirigido à dosagem da carga viral e, um, destinado à extração do DNA genômico.

As amostras dirigidas a tipagem de linfócitos foram processadas imediatamente. Para tanto, usou-se sangue total. As amostras destinadas à dosagem da carga viral vieram conservadas no gelo, e foram processadas dentro de 3 horas, sob condições estéreis em fluxo laminar.

A separação do plasma foi realizada por meio de centrifugação a 400 g durante 15 minutos. As amostras armazenadas para genotipagem também foram manipuladas nas mesmas circunstâncias. Em ambas, utilizou-se 1 mL de plasma, que foram armazenados em *eppendorf* esterilizados e já identificados com nome e iniciais de cada pacientes, e mantidos em *freezer* a -80 ° C.

3.3 IMUNOFENOTIPAGEM LINFOCITÁRIA

A tipagem de linfócitos T segue os procedimentos padronizados para a detecção dos linfócitos T CD3⁺/CD4⁺ e CD3⁺/CD8⁺, através do método de Citometria de Fluxo no sistema BD[®] FACSCalibur (Becton-Dickinson

Immunocytometry Systems, Califórnia-USA). Utilizou-se o Software multiSET V2.2.

Para a realização da técnica utilizou-se anticorpos monoclonais específicos ligados aos seguintes fluorocromos: CD4 – FITC (fluoresceína), CD8 – PE (ficoeritrina) e CD3 – PerCP (Peridinina Clorofila Proteína), e quando colocados na presença do sangue total, pode-se identificar as células contendo esses marcadores de superfície.

3.3.1 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, homogeneizou-se e incubou por 15 minutos no escuro.

Decorrido esse tempo, pipetou-se 450 μL do Facslysing Solution 1/10 (solução tamponada contendo < 15% de formaldeído e < 50% de dietilenoglicol) para a lise dos glóbulos vermelhos, homogeneizou-se e incubou por mais 15 minutos no escuro.

3.3.2 VALORES DE REFERÊNCIA

A partir desse tempo, as amostras foram passadas no citômetro, apresentando-se como valores de referência, as seguintes contagens absolutas: CD3⁺: 690 – 2540 células/ μL ; CD3⁺/CD4⁺: 410 – 1590 células/ μL e CD3⁺/CD8⁺: 190 – 1140 células/ μL .

3.4 DOSAGEM DA VIREMIA PLASMÁTICA

A reação de extração do RNA viral e sua quantificação foram realizadas segundo as especificações do sistema VERSANT[®] Ensaio HIV-1 3.0 (bDNA) – Bayer, procedimento utilizado para quantificação direta do vírus através da amplificação de um sinal emitido pelo ácido nucléico, 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 necessária a utilização de uma cabine de Segurança Biológica Classe II.

3.4.1 PREPARAÇÃO E LISE DOS PRECIPITADOS

Foram adicionadas 50 µL de solução precipitante (partículas de poliestireno inerte em solução tamponada com azida sódica < 0,1% e outros preservantes) em cada tubo previamente identificado e 1 mL das amostras (plasma) depois de descongeladas, e mantidos no gelo até centrifugação. Centrifugou-se a 100.000 *g* por 1 hora entre 2 e 8°C. Após o término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado, utilizando uma pipeta estéril sem filtro, deixando aproximadamente 20 µL no tubo. Esse precipitado foi então congelado à – 80°C por no mínimo 30 minutos.

Os volumes dos reagentes de trabalho utilizados para a técnica foram preparados em tubo de polipropileno e de acordo com o número de amostras que foram analisadas.

Para a lise dos precipitados, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente, adicionados 120 µL do reagente de trabalho de lise

(solução de proteinase K com azida sódica < 0,1% e outros preservantes) em cada tubo, agitados no vortex por 5 a 10 segundos, e colocadas em bloco térmico a uma temperatura de 63° C por 2 horas.

3.4.2 REAÇÃO DE CAPTURA DO RNA – HIV E HIBRIDAÇÃO DAS SONDAS ALVOS

Foram utilizadas placas de microtitulação com 96 micropoços de poliestireno revestidos com sondas de captura (oligonucleotídeos sintéticos específicas para o RNA – HIV), formadas por 17 sondas individuais.

Transcorrido 2 horas do procedimento de lise, os tubos foram retirados do bloco térmico e resfriados à temperatura ambiente por 10 minutos.

Transferiu-se 100 µL de cada tubo para o respectivo micropoço na placa, seguindo o diagrama de identificação. Juntamente com as amostras foram colocados os padrões (soluções com concentrações conhecidas de RNA – HIV) de A a F, controles negativos, controle positivo baixo e controle positivo alto. A incubação foi de 16 a 18 horas (overnight), seguido de lavagem com tampão Wash A.

Com o RNA, depois de capturado nos micropoços, utilizou-se sondas alvo, sendo oligonucleotídeos sintéticos compostos por 81 alvos de extensão individuais que irão se ligar à regiões diferentes do gene *pol* do RNA viral.

Foram utilizadas soluções de lavagem A e B para o procedimento e baseavam-se em soluções tamponadas com azida sódica 0,1%.

3.4.3 HIBRIDAÇÃO DAS SONDAS PRÉ-AMPLIFICADORA E SONDA AMPLIFICADORA.

Terminada a incubação (63°C), o ciclo de resfriamento (45°C)/lavagem durou aproximadamente 15 minutos e foram adicionados 100 µL do reagente

de trabalho do pré-amplificador (solução protéica tamponada com azida sódica < 0,1%) em cada micropoço, e a incubação durou 30 minutos.

Passado esse tempo e novamente mais um o ciclo de resfriamento e lavagem, adicionou-se 100 µL do reagente de trabalho de amplificação (idem ao pré-amplificador) em cada micropoço, incubando-se por mais 30 minutos. Na presença de RNA viral na amostra as sondas pré-amplificadoras se anelam as regiões específicas, e por consequência as sondas amplificadoras conectam-se a essas, formando um complexo ramificado.

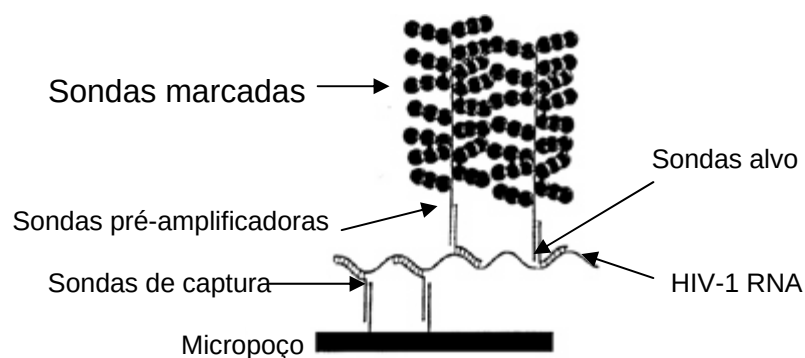


Figura 6. Esquema do teste Vesant HIV-1 RNA 3.0 (Bayer).

3.4.4 HIBRIDAÇÃO DA SONDA MARCADA

Terminado o período de incubação, adicionou-se 100 µL do reagente de trabalho de marcação (oligonucleotídeos sintéticos marcados com fosfatase alcalina em solução tamponada com azida sódica < 0,1%) em cada micropoço, seguido de um período de incubação de 45 minutos, e novamente outro ciclo de resfriamento/lavagem. As sondas marcadas hibridaram-se ao complexo imobilizado.

3.4.5 DETECÇÃO DA LUMINESCÊNCIA PRODUZIDA

Terminada a incubação e após o ciclo de lavagem, foram adicionados 80 μ L da solução de substrato (Lumi-PhosPlus) em cada micropoço e iniciado um período de incubação de 30 minutos. A emissão de luz detectada foi diretamente proporcional à quantidade de HIV-1 RNA presente na amostra (cópias/ml).

O Software Bayer de Gerenciamento de dados (DMS) foi preparado para receber os dados do luminômetro.

3.4.6 CURVA DE CALIBRAÇÃO E ANÁLISE DAS REAÇÕES

Correu-se, paralelamente, 6 padrões (contendo plasma de origem humano utilizando a estirpe 8E5/LAV do HIV-1 com concentrações conhecidas) para cada teste a fim de se produzir uma curva padrão que foi utilizada para calcular a carga viral de cada amostra.

Foram definidos como valores de referência 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.

3.5 ISOLAMENTO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi extraído de leucócitos do sangue periférico utilizando a técnica de *salting out*, cujo princípio baseia-se na precipitação das proteínas com NaCl 5M (MILLER *et al.*, 1988), modificada em nosso laboratório. A qualidade deste procedimento foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Para o procedimento de extração do DNA genômico foi utilizado 500µL da camada leucocitária, obtida por centrifugação a 2500 rpm (500 g) por 10 minutos das amostras de sangue total colhidas com EDTA.

Em microtubos de 1,5mL, previamente autoclavados, foram colocados 500µL da camada leucocitária e adicionados 1mL do tampão de lise de eritrócitos 5x concentrado (apêndice item 1.6). Homogeneizou-se por inversão por cerca de 30 segundos e, em seguida, centrifugou-se a 13000 rpm (equivalente à aproximadamente 13000 g) por 1 minuto. O sobrenadante foi desprezado e o tubo lavado com 1mL de água *Milli-Q* estéril, em seguida, o material foi centrifugado novamente nas mesmas condições e o sobrenadante desprezado novamente.

O material contido no microtubo foi então ressuspenso em: 80 µL de tampão Proteinase K (apêndice item 1.7), 30 µL de proteinase K (1mg/mL), 40 µL de SDS a 10% e 216 µL de água *Milli-Q* estéril, misturados em um tubo a parte. Posteriormente, o material foi incubado em banho a 56°C por 30 minutos, resfriados até temperatura ambiente e, então, adicionou-se 132 µL de NaCl 5M e homogeneizou-se em vórtex por 15 segundos. O microtubo foi centrifugado a 13000 rpm por 6 minutos e o sobrenadante transferido para outro microtubo.

Ao sobrenadante foi adicionado 1mL de etanol absoluto (Merck) e o conteúdo homogeneizado por inversão. Deixou-se precipitar por 2 minutos a temperatura ambiente e, na sequência, o material foi centrifugado a 13000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante foi desprezado. Finalmente o micro tubo foi lavado com 1mL de etanol 70% preparado com água *Milli-Q* estéril, centrifugou-se e desprezou-se novamente o sobrenadante. O material foi seco invertendo o

tubo sobre papel absorvente e, em seguida, dissolveu-se o material em 100µL de água *Milli-Q* estéril e homogeneizou-se em vórtex por 30 segundos.

O DNA genômico dissolvido em 100µL de água foi aliquotado e congelado a -20°C a fim de evitar a degradação do mesmo.

3.6 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA A VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DO DNA

As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, para verificação da pureza da amostra e da integridade do DNA.

Cada gel foi preparado com 100 mL de agarose 0,8% em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) pH 8,3, nas dimensões de 11 x 14 cm. Os poços para a aplicação das amostras foram confeccionados colocando-se um pente de 1 mm de espessura, o qual foi retirado após a solidificação da agarose. Cinco microlitros de cada amostra de DNA (diluídas 10x) foram misturados com 5 µL de uma solução contendo azul de bromofenol 0,1%, SDS 1%, glicerol 50% e EDTA.Na₂ 0,1 M (tampão da amostra). Estas misturas foram homogeneizadas em vórtex e, então, aplicadas nos poços do gel.

Após a migração, o gel foi corado em um recipiente contendo 200mL de uma solução de 0,5µg/mL de brometo de etídeo em água *Milli-Q*, durante 15 minutos, para a visualização do DNA em transluminador de luz ultra-violeta (UV).

3.7 REAÇÃO DE PCR

Os iniciadores para as fitas senso e anti-senso utilizados na reação de PCR foram desenhados a partir das seqüências polimórficas dos genes *tlr2* e *tlr4*, amplificando regiões de 340 e 590 pares de bases, respectivamente.

Após desenhados e sintetizados os iniciadores, estes foram testados na reação de PCR, sendo que os parâmetros térmicos da reação foram padronizados em relação: a temperatura de anelamento dos iniciadores, a extensão dos iniciadores pela enzima Taq DNA polimerase a 72°C e desnaturação a 94°C.

Quadro 1. *Primers* para amplificação da sequência do gene *tlr2*.

Oligonucleotídeos Iniciadores <i>TLR-2</i>	
Senso	5' gcc tac tgg gtg gag aac ct 3'
Anti-senso	5' ggc cac tcc agg tag gtc tt 3'

Quadro 2. *Primers* para amplificação da sequência do gene *tlr4*.

Oligonucleotídeos Iniciadores <i>TLR-4</i>	
Senso	5' att taa aga aat tag gct tca taa gct 3'
Anti-senso	5' cca aga agt ttg aac tca tgg taa 3'

A reação de PCR foi realizada com 25µL de volume final em microtubos de 0,2 mL estéreis, utilizando o seguinte protocolo:

Quadro 3. Reação de PCR para regiões dos genes *tlr2* e *tlr4*.

	Volume	Concentração final
Tampão PCR sem Mg²⁺ 10 x Concentrado	2,5 µL	1 x
MgCl 50mM	1,0 µL	2 mM
dNTP 10mM	0,5 µL	0,2 mM
Oligo senso 25 pM/µL	1,0 µL	25 pM
Oligo anti-senso 25 pM/µL	1,0 µL	25 pM
DNA genômico	1,0 µL	± 10 ng
Taq DNA polimerase 1 U/µL	1,0 µL	1 U
Água Milli-Q estéril	17,0 µL	-

Os microtubos contendo os reagentes descritos no quadro acima, foram colocados no termociclador programado para 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 55°C por 35 segundos e 72°C por 45 segundos. Após os ciclos a reação prossegue a 72°C por 5 minutos e cessada a 4°C.

Após a reação de PCR, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 2% para verificar a amplificação da região esperada, utilizando 5µL dos produtos de PCR com 2 µL do tampão contendo azul de bromofenol. Para isso foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb.

3.8 DIGESTÃO DOS PRODUTOS DE PCR DA SEQÜÊNCIA ALVO DO GENE *tlr2*

Para a digestão dos produtos da reação de PCR para a seqüência alvo do gene *tlr2*, foi utilizada a enzima Ssil, que é um isoesquisômero da enzima AclI. Esta endonuclease corta o amplicon em estudo em dois sítios de restrição distintos, como mostrado abaixo.

Sítio de restrição Ssil (AclI):

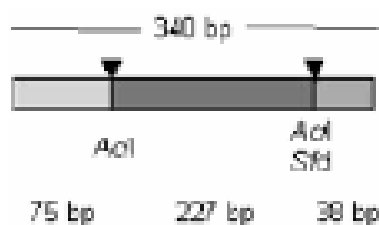


Figura 7. Esquema representativo da clivagem do amplicon de *tlr2* pela enzima AclI (Ssil).

Para realizar a reação de digestão a enzima SsiI foi adicionado em um microtubo de 0,2mL 10μL do produto da reação de PCR para o *tlr2*; 16μL de água milli-Q autoclavada; 2μL do Tampão 0 10x (Fermentas), constituído de 500mM de Tris-HCL (pH 7,5 a 37°C), 100mM de MgCl₂, 1M de NaCl e BSA a 1mg/mL ; e 0,5μL da enzima SsiI.

A mistura foi gentilmente homogeneizada e centrifugada em poucos segundos (Spin), posteriormente incubada a 37°C durante 2 horas em termociclador. Após este período a reação foi submetida à temperatura de 65°C por 20 minutos para inativação da enzima e finalmente a 4°C.

Para visualizar os fragmentos produzidos pela restrição, 10μL do produto desta reação foi submetido a corrida em gel de agarose a 3% por aproximadamente 60 minutos.

3.9 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR PARA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Para seqüenciar os produtos de PCR para ambos os genes em estudo foi necessário purificar os *amplicons* obtidos devido à presença de amplificações inespecíficas observadas no gel.

Primeiramente foi aplicado todo o conteúdo das PCRs realizadas para corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, preparado com brometo de etídeo, para a separação da banda desejada.

Sobre o transluminador de luz ultra-violeta (UV) removeu-se as bandas de interesse cortando o gel com auxílio de uma lâmina. As bandas recortadas do gel de agarose foram colocadas em microtubos de 1,5mL devidamente identificados e a estes foram adicionados 1mL de uma solução de NaI (Iodeto

de sódio) 6M e então foram incubados a 65°C por alguns minutos para a completa dissolução do polímero de agarose.

Acrescentou-se 5µL de uma resina em suspensão aquosa (GLASSMILK® Qbiogene), homogeneizou-se bem e incubou-se à temperatura ambiente por 10 minutos invertendo o tudo a cada dois minutos.

Os tubos foram centrifugados a 14.000 *g* por 1 minuto, descartou-se o sobrenadante e secou-se o líquido na parede do tubo.

O sedimento (resina + DNA) foi dissolvido em 800µL de etanol 70%, os tubos foram centrifugados a 14.000 *g* por 1 minuto, descartou-se o sobrenadante e secou-se os tubos com papel absorvente.

Finalmente, o sedimento foi dissolvido em 15µL de água *Milli-Q* estéril e os tubos incubados a 65°C durante 1 minuto. Centrifugou-se a 14.000x *g* por 1 minuto e o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo.

Para verificação da eficácia da purificação, foram aplicados 1µL de cada amostra para eletroforese em gel de agarose a 1%.

3.10 QUANTIFICAÇÃO DO DNA PURIFICADO

As amostras foram quantificadas através da leitura em um comprimento de onda de 260nm em espectrofotômetro de UV, utilizando cubetas de quartzo, após a diluição de 1:1000 e calibrado com água *Milli-Q*.

Para cada unidade de densidade óptica (D.O.) em 260nm tem-se o equivalente a 50ng de DNA dupla fita por µL. Portanto, para cada leitura de D.O. realizou-se um cálculo de acordo com a fórmula abaixo.

$[\text{ }] \text{ de DNA ng/}\mu\text{L} = \text{D.O. em 260nm} \times 50 \times \text{diluição (1000)}$

3.11 REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o kit BigDye® Terminator (Applied Biosystems), o qual se baseia no método de seqüenciamento do DNA por terminação de cadeia (ou método dideoxi) desenvolvido por Frederick Sanger em 1977.

Primeiramente foi necessário preparar uma solução com DNA na concentração de 150ng/μL, que foi possível a partir da quantificação do DNA purificado. Os iniciadores (*primers*) também foram diluídos de modo a atingirem uma concentração de 1,6pM/μL. Então as reações foram efetuadas de acordo com o seguinte protocolo.

Quadro 4. Reação de sequenciamento volume final 10μL.

Reagentes	[] final
2μL de Big Dye (Applied Biosystems)	-
2μL de Tampão de sequenciamento	-
2μL de primer Forward ou Reverse a 1,6pM/μL	3,2pM
4μL de DNA a 150ng/μL	600ng

Os tubos contendo as reações foram colocados em termociclador com o seguinte programa térmico: 96°C por 2 minutos; 40 ciclos de 96°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos.

3.11.1 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE SEQÜENCIAMENTO

Para a purificação das reações de seqüenciamento foram adicionados aos microtubos 80μL de isopropanol 70% e todo o conteúdo do tubo (volume da reação + isopropanol) foi transferido para tubos de 1,5mL. Estes foram

centrifugados a 10000 *g* por 20 minutos em temperatura ambiente, descartou-se o sobrenadante por inversão e secou-se no papel absorvente.

Aos tubos secos foi adicionado 700µL de etanol 70% gelado e homogeneizado em vórtex por 5 segundos. Centrifugou-se a 14000x *g* por 10 minutos em temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e repetiu-se a lavagem.

Os tubos foram secos em papel absorvente e deixados para secar em temperatura ambiente ao abrigo da luz por aproximadamente 3 horas. Os tubos secos foram então guardados a -20°C até o momento da aplicação no gel de seqüenciamento.

3.11.2 PREPARO DO GEL

O gel de seqüenciamento foi preparado com uma solução de acrilamida 30% e bis acrilamida 0,8%, uréia e polimerizado com persulfato de amônia e tetrametiletilenodiamina (TEMED) na placa suporte do aparelho ABI PRISM® 377 DNA Sequencer.

Quadro 5. Constituintes do gel de seqüenciamento.

	40mL de Gel
Solução de Acrilamida 30% e Bis Acrilamida 0,8%	4mL
Uréia	14,5g
Amberlite (posteriormente removido por filtração)	0,4g
Água Milli-Q	20mL

Os compostos descritos acima foram misturados em um béquer e submetidos à agitação em agitador magnético por 10 minutos. O conteúdo do

béquer foi então filtrado a vácuo e deaerado por 10 minutos no recipiente utilizado para filtração a vácuo.

Por fim, adicionou-se o TBE 10x, o TEMED e a solução de APS 10% que inicia a polimerização. O gel foi aplicado na placa suporte do aparelho imediatamente. Após a polimerização, a placa foi colocada no seqüenciador até a aplicação dos produtos das reações de seqüenciamento no gel.

Quadro 6. Tampão e agentes polimerizantes do gel de seqüenciamento.

TBE 10x	4mL
TEMED (Tetrametiletilenodiamina)	28 μ L
APS 10% (Persulfato de amônia)	200 μ L

Os produtos das reações de seqüenciamento foram ressuspendidos em 2 μ L de uma mistura de formamida e o tampão de corrida que compõe o kit de seqüenciamento. Os tubos com as reações ressuspendidas foram submetidos ao banho seco a 96°C para desnaturação por 1 minuto e depois colocados no gelo. Finalmente aplicou-se 1 μ L de cada reação ressuspendida no gel.

4. RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR

As reações de PCR foram padronizadas seguindo os parâmetros térmicos em relação: a temperatura de anelamento dos iniciadores, a extensão dos iniciadores pela enzima Taq DNA polimerase a 72°C e desnaturação a 94°C (como citado em metodologia 3.7).

Para ambos os iniciadores testados foi possível adotar o mesmo protocolo de execução, com resultados satisfatórios.

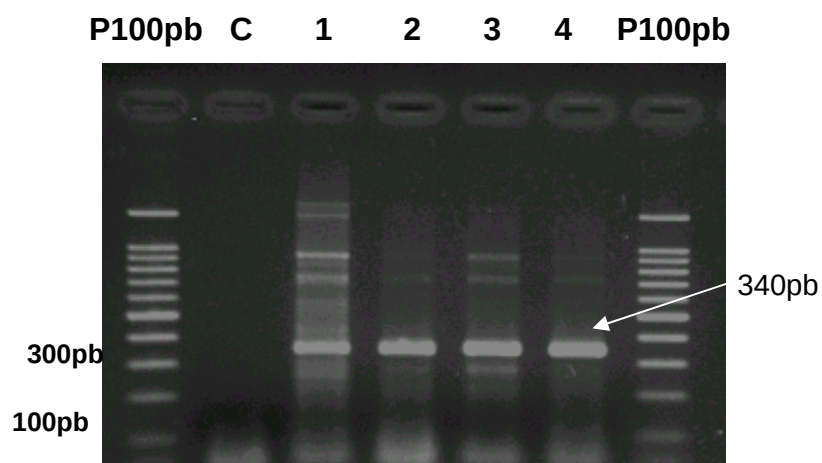


Figura 8. Gel de Agarose 1,5% mostrando a eficácia da PCR para a sequência alvo do gene *tlr2*. **P100pb**: marcador de peso molecular de 100 pares de bases. **C**: reação controle, realizada na ausência de DNA genômico. **1 a 4**: amostras utilizadas.

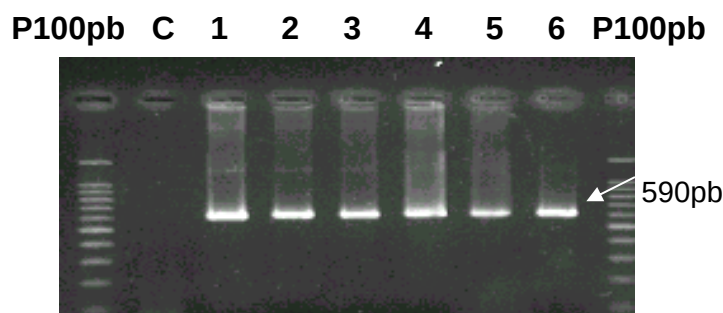


Figura 9. Gel de Agarose 1,5% mostrando a eficácia da PCR para a sequência alvo do gene *tlr4*. **P100pb**: marcador de peso molecular de 100 pares de bases. **C**: reação controle, realizada na ausência de DNA genômico. **1 a 6**: amostras utilizadas.

4.2 FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

As coletas foram iniciadas em janeiro de 2006, tendo que até o presente momento um total de 37 pacientes, sendo 14 mulheres e 23 homens com uma média de idade de 41 ± 10 anos, divididos em dois grupos (A e B).

O grupo A é formado por 17 indivíduos portadores do HIV-1 e o grupo B constituído por 20 pacientes portadores do HIV-1 co-infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis*.

No grupo B foram analisados separadamente oito pacientes (B11, B12, B13, B16, B17, B18, B19 e B20), os quais estavam com manifestações agudas da tuberculose durante o período das coletas. Para facilitar a análise e demonstração dos resultados, o grupo B foi subdividido em grupo B' (indivíduos com histórico de infecção pregressa pelo *M. tuberculosis*) e B'' (indivíduos com manifestações recentes da infecção pelo *M. tuberculosis*).

4.3 DETERMINAÇÃO DOS FENÓTIPOS CD3/CD4 e CD3/CD8

Os resultados da tipagem linfocitária obtidos por procedimentos padronizados para a detecção de linfócitos T CD3⁺/CD4⁺ e CD3⁺/CD8⁺ através de citometria de fluxo.

Os pacientes que compõem o grupo A constituíram-se de 9 mulheres e 8 homens com média de idade de 40 anos. Os valores da contagem de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ neste grupo apresentam-se relativamente satisfatórios, com exceção do A9, com resultado de CD4⁺ inferior a 200 células/mm³ e CD8⁺ inferior a 300 (Tabela 2; Gráficos 1 e 2).

A média aritmética dos valores de CD4⁺ e CD8⁺ nos pacientes portadores de HIV (grupo A) foram 489 ± 248 e 938 ± 398 , respectivamente.

Tabela 2. Resultados da tipagem dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em pacientes portadores de HIV (grupo A).

PACIENTES DO GRUPO A	CD4⁺ (cels/mm³)	CD8⁺ (cels/mm³)	CD3⁺ (cels/mm³)
A1	297	909	1191
A2	328	700	1056
A3	298	575	968
A4	283	905	1219
A5	403	876	1348
A6	318	905	1290
A7	688	857	1597
A8	499	1261	1869
A9	149	238	406
A10	931	1701	2731
A11	520	1143	1723
A12	986	1241	2302
A13	697	1648	2421
A14	279	368	664
A15	692	839	1599
A16	675	1194	1923
A17	274	599	1046

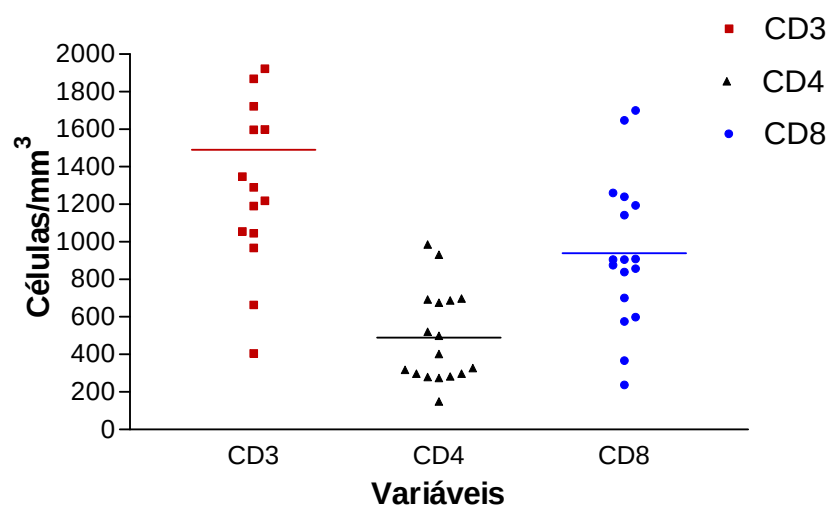


Gráfico 1. Distribuição dos pacientes do Grupo A referente ao resultados da contagem de Linfócitos CD3⁺ e sub-populações CD4⁺ e CD8⁺, as barras representam as médias.

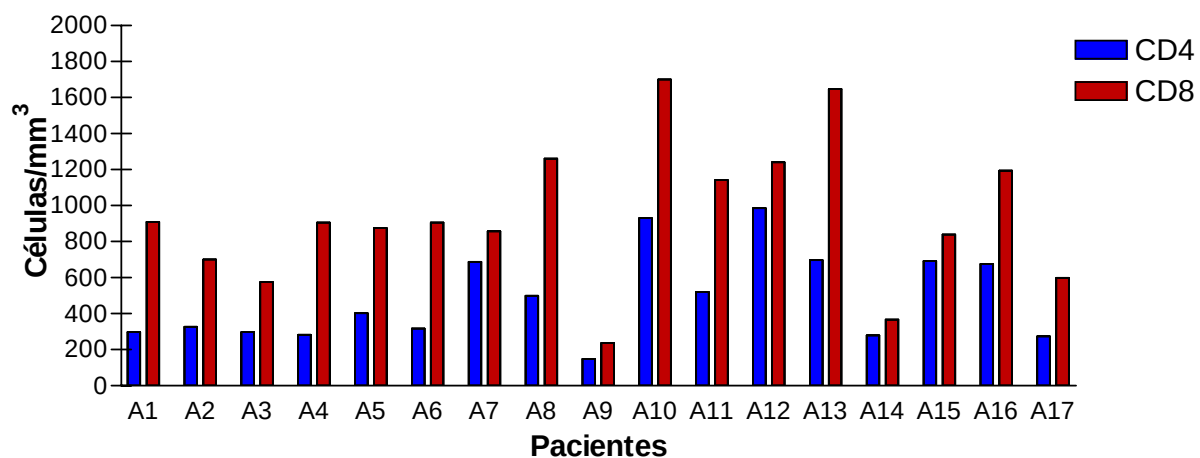


Gráfico 2. Perfil dos pacientes do Grupo A quanto à contagem de Linfócitos T CD4⁺/CD8⁺.

4.3.1 CO-INFEÇÃO

Os pacientes portadores de HIV e co-infectados com *Mycobacterium tuberculosis* apresentaram resultados bem heterogêneos, sendo possível dividir esses pacientes entre aqueles com história de infecção pregressa ou manifestação crônica e aqueles com tuberculose em curso (manifestações clínicas recentes) no período das coletas (destacados em azul na Tabela 3).

Tabela 3. Resultados da tipagem dos linfócitos T CD4 e CD8 em pacientes portadores de HIV e co-infectados com *Mycobacterium tuberculosis* (grupo B).

PACIENTES DO GRUPO B	CD4⁺ (cels/mm³)	CD8⁺ (cels/mm³)	CD3⁺ (cels/mm³)
B1	425	543	978
B2	395	1337	1760
B3	1136	1110	2287
B4	165	168	330
B5	548	328	885
B6	494	924	1480
B7	421	822	1210
B8	701	601	1314
B9	669	1156	1871
B10	647	1399	2221
B11	230	1066	1277
B12	157	1159	1356
B13	39	544	565
B14	219	437	640
B15	169	639	831
B16	500	3320	3846
B17	801	633	1467
B18	376	627	1001
B19	131	774	842
B20	150	610	779

Pacientes destacados em azul: Apresentavam tuberculose em curso durante o período das coletas (Grupo B'').

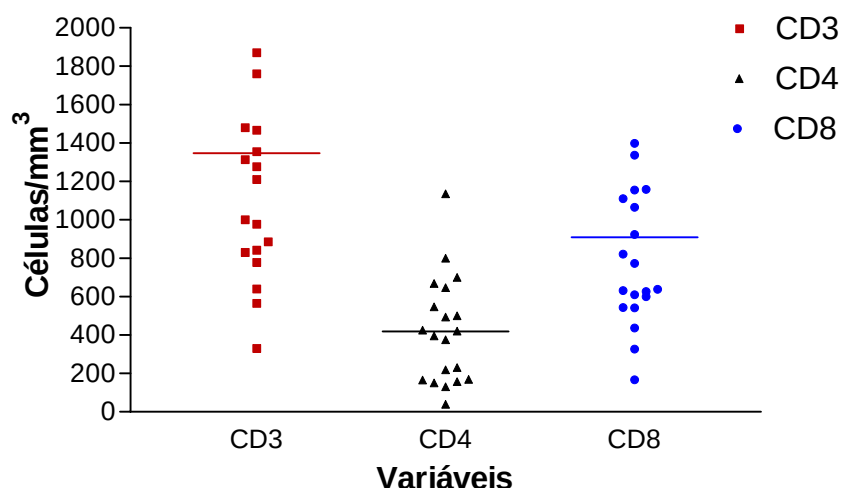


Gráfico 3. Distribuição dos pacientes do Grupo B referente aos resultados da contagem de Linfócitos CD3⁺ e sub-populações CD4⁺ e CD8⁺, as barras referem-se as médias.

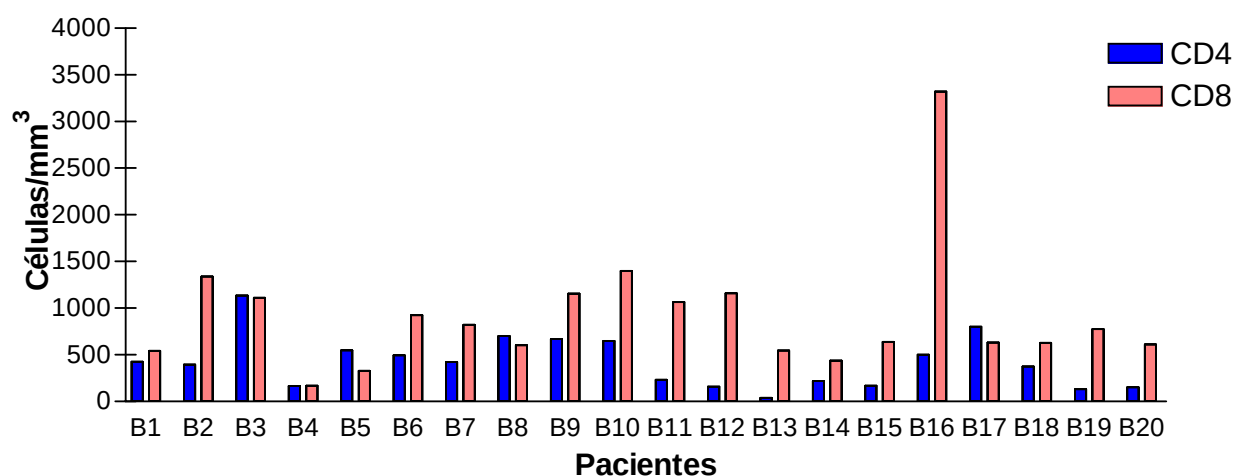


Gráfico 4. Perfil dos pacientes do Grupo B quanto à contagem de Linfócitos T CD4/CD8.

Analisando separadamente o grupo B'' (B11, B12, B13, B16, B17, B18, B19 e B20), é possível observar que estes apresentaram valores de CD4⁺ inferiores se comparados com o restante do grupo. A média dos valores de CD4⁺ e CD8⁺ entre estes pacientes é de 298 ± 251 e 1091 ± 928 , respectivamente (Gráficos 5 e 6).

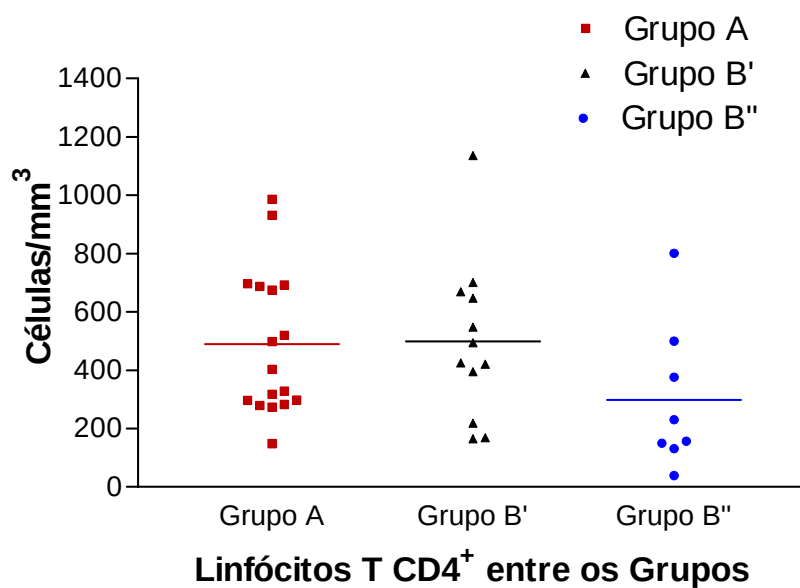


Gráfico 5. Distribuição dos pacientes dos grupos A, B' e B'' referente aos resultados da contagem dos Linfócitos T CD4⁺ e as médias para cada grupo.

As médias dos valores observados para os linfócitos CD4 e CD8 nos pacientes portadores de HIV e co-infectados com *Mycobacterium tuberculosis* (grupo B) foram 418 ± 276 e 909 ± 658 , respectivamente.

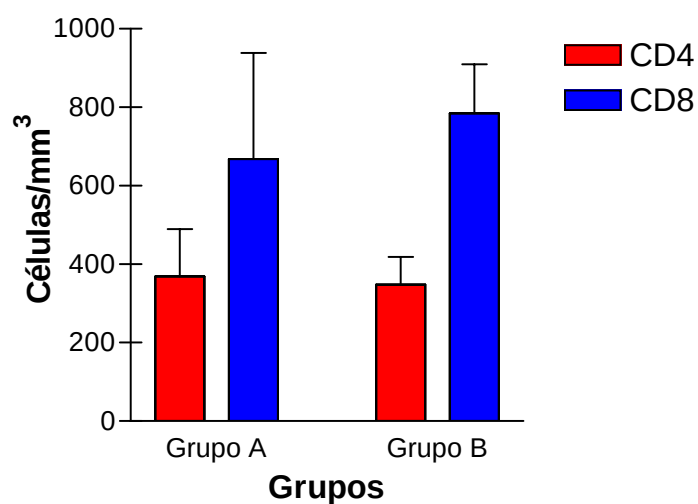


Gráfico 6. Comparação das médias e desvio padrão dos resultados de CD4 e CD8 entre os grupos A e B.

Pela comparação das médias entre os grupos pode-se notar uma diferença entre os níveis de CD8, sendo estes maiores no grupo B.

4.4 DETERMINAÇÃO DA VIREMIA PLASMÁTICA

Os resultados da determinação da carga viral plasmática nos pacientes que compõem os grupos de estudo (A e B) seguem nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Resultados da determinação da viremia plasmática em portadores da infecção pelo HIV (pacientes do grupo A). **Limite mínimo:** 50 cópias.

<i>Pacientes do Grupo A</i>	<i>Carga Viral HIV (Cópias/mL)</i>
A1	113
A2	74719
A3	9259
A4	23701
A5	< limite mínimo
A6	908
A7	3632
A8	16881
A9	< limite mínimo
A10	< limite mínimo
A11	< limite mínimo
A12	< limite mínimo
A13	< limite mínimo
A14	< limite mínimo
A15	< limite mínimo
A16	771
A17	< limite mínimo

No grupo A, 47% dos pacientes, ou seja, 8 indivíduos apresentaram viremia plasmática detectável. O perfil destes pacientes quanto a carga viral está apresentado no Gráfico 7.

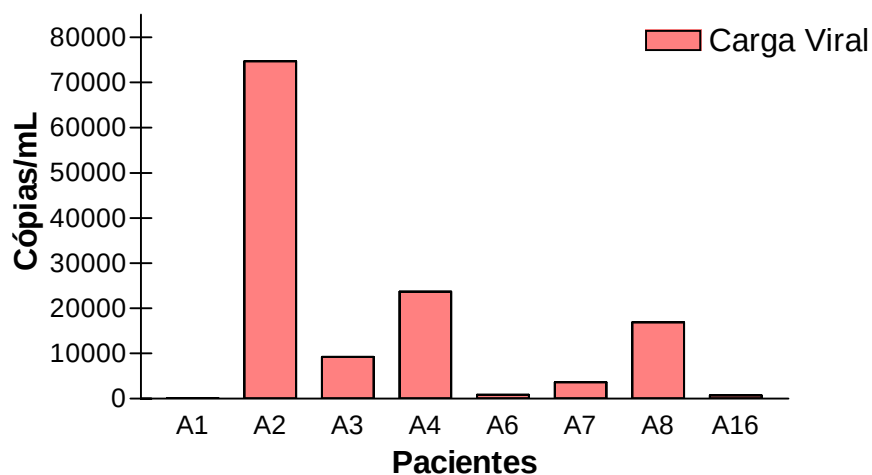


Gráfico 7. Perfil dos pacientes do grupo A quanto a carga viral plasmática.

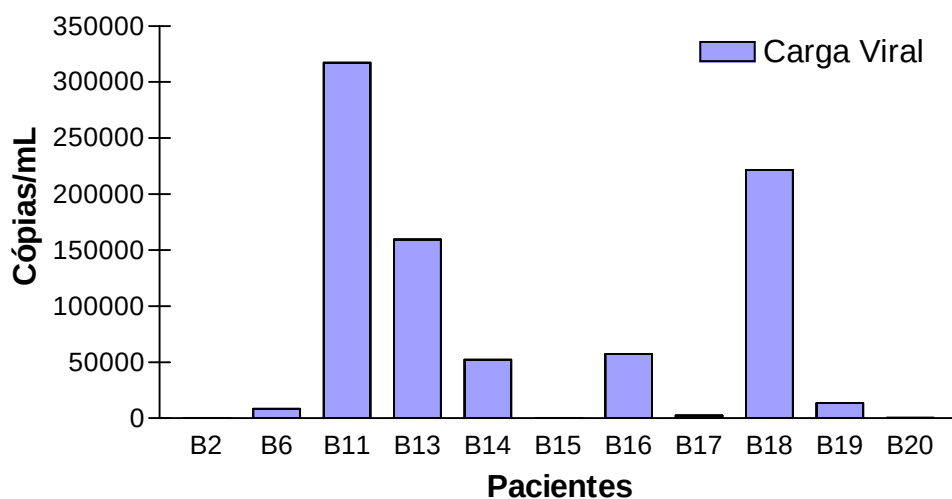


Gráfico 8. Perfil dos pacientes do grupo B quanto a carga viral plasmática.

Tabela 5. Resultados da determinação da viremia plasmática em portadores da infecção pelo HIV e co-infectados com *Mycobacterium tuberculosis* (pacientes do grupo B). **Limite mínimo:** 50 cópias.

<i>Pacientes do Grupo B</i>	<i>Carga Viral HIV</i>
B1	< limite mínimo
B2	62
B3	< limite mínimo
B4	< limite mínimo
B5	< limite mínimo
B6	8330
B7	< limite mínimo
B8	< limite mínimo
B9	< limite mínimo
B10	< limite mínimo
B11	317183
B12	< limite mínimo
B13	159466
B14	52264
B15	62
B16	57401
B17	2489
B18	221387
B19	13434
B20	404

Pacientes destacados em azul: Apresentavam tuberculose em curso durante o período da coletas.

Analisando os resultados de viremia plasmática do grupo B (Gráfico 8), observou-se que 11 pacientes (55%) apresentaram resultados de viremia plasmática detectável. No entanto, observando separadamente o grupo B'' (8 pacientes), notou-se que 87% (7/8) destes apresentaram carga viral plasmática detectável, sendo estes também os pacientes com carga viral mais elevada entre ambos os grupos (Gráficos 9 e 10).

Observando o Gráfico 9 e 10, é possível notar uma grande diferença entre a viremia plasmática entre os grupos de estudo. A maioria dos pacientes que estavam com tuberculose durante o período de coletas apresentam carga viral muito elevada.

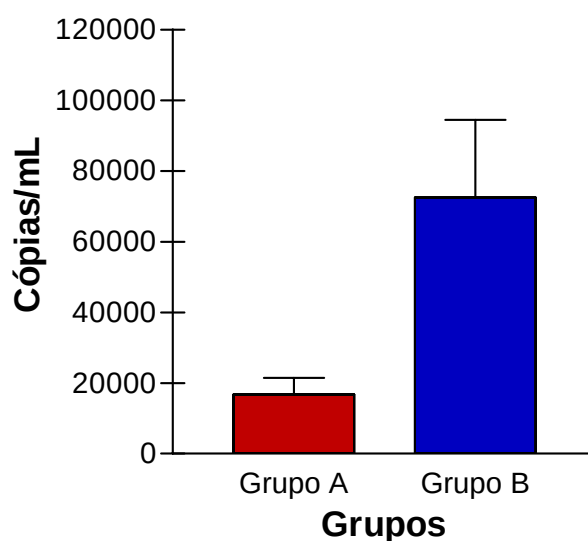


Gráfico 9. Comparação das médias e desvio padrão dos pacientes com viremia detectável entre os grupos A e B.

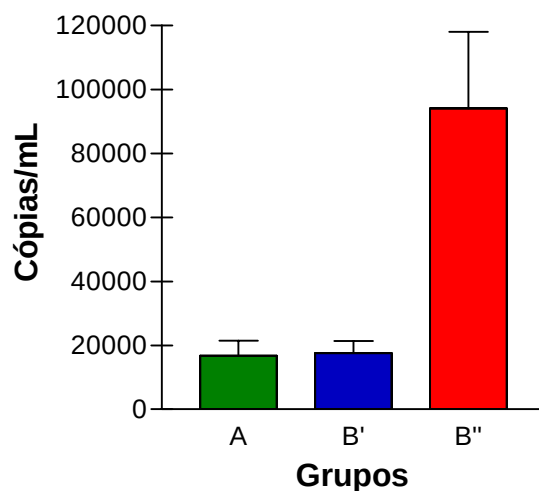


Gráfico 10. Comparação das médias e desvio padrão dos pacientes com viremia detectável entre os grupos A e B' e B''.

4.5 ISOLAMENTO DO DNA GENÔMICO

O procedimento de extração do DNA genômico forneceu excelentes resultados, adequados à realização da reação de PCR. Após eletroforese em gel de agarose 0,8%, observou-se a presença de bandas únicas com pouco arraste, indicando que o material se encontra íntegro o suficiente para a metodologia proposta.

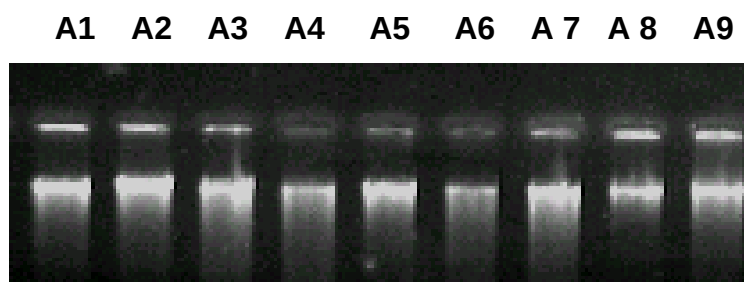


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose à 0,8% das extrações do DNA genômico pelo método de “salting out” (MILLER *et al.*, 1988) diluídas na proporção de 1:10 em água milli-Q. **A1** até **A9** são as designações dos pacientes de onde foi coletado o sangue para extração. O gel foi corado com solução de 0,5µg/mL de brometo de etídeo.

4.6 REAÇÃO DE PCR

As reações de PCR foram executadas seguindo o protocolo experimental descrito anteriormente, padronizado de acordo com os parâmetros térmicos dos oligonucleotídeos senso e anti-senso utilizados e da Taq DNA polimerase.

Foram amplificadas as seqüências alvo esperadas para o gene *tlr2*, em torno de 340 pb, apresentando-se em bandas fortes e bem definidas na eletroforese em gel de agarose a 2% (Figura 11). A amplificação foi bem sucedida para as amostras dos 37 pacientes obtidos.

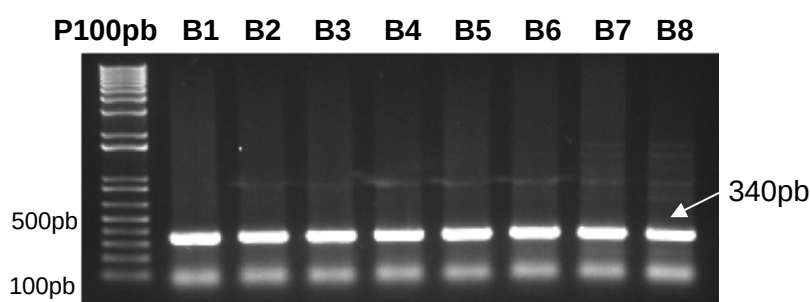


Figura 11. Eletroforese dos produtos de PCR para amplificação da seqüência alvo do gene *tlr2* em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo a 0,5µg/mL. Observa-se bandas fortes e bem definidas contendo amplicons de aproximadamente 340pb. **P100pb**: marcador de peso molecular de 100 pares de base. **B1** até **B8** são as designações dos pacientes de onde foi extraído o DNA para realização das PCRs.

A seqüência alvo do gene *tlr4* foi amplificada com sucesso para as 37 amostras disponíveis, os produtos da PCR foram observados pela corrida em gel de agarose a 2%, sendo os produtos amplificados de aproximadamente 590pb observados em bandas fortes e bem definidas (Figura 12).

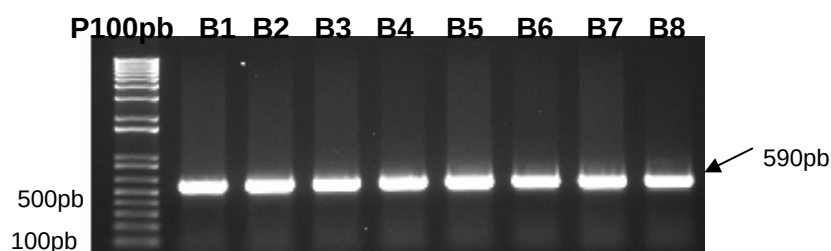


Figura 12. Eletroforese dos produtos de PCR para amplificação da seqüência alvo do gene *tlr4* em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo a 0,5µg/mL. Observa-se bandas fortes e bem definidas contendo amplicons de aproximadamente 590pb. **P100pb**: marcador de peso molecular de 100 pares de base. **B1** até **B8** são as designações dos pacientes de onde foi extraído o DNA para realização das PCRs.

4.7 DIGESTÃO/RESTRIÇÃO

A reação de digestão pela enzima *SsiI* foi padronizada de acordo com o protocolo descrito anteriormente. A região do gene *tlr2* submetida à restrição é clivada em dois sítios distintos, o que permite a identificação de dois polimorfismos conhecidos, C2180T e G2408A. Quando o amplicom é clivado em ambos os sítios de restrição, origina três fragmentos (227pb, 75pb e 38pb) e não apresenta nenhum dos polimorfismos descritos (tipo selvagem). A ausência de restrição em um dos sítios, originando fragmentos de 265pb e 75pb evidencia a presença do polimorfismo G2408A. No caso de não haver restrição em um dos sítios, originando fragmentos de 302pb e 38pb, observa-se a presença do polimorfismo C2180T (Figura 19).

A reação foi executada com produtos da PCR para a região alvo do gene *tlr2*, oriundos das 37 amostras obtidas. Em todas as amostras a restrição produziu fragmentos bem visíveis de aproximadamente 227 pares de bases e fragmentos menores de 75pb e 38pb que apresentaram-se difusos devido a seu pequeno tamanho e as condições da corrida, tais como a concentração e porosidade do polímero de agarose (Figura 13).

Os polimorfismos descritos para a região amplificada não foram observados na totalidade das amostras testadas (grupos A e B).

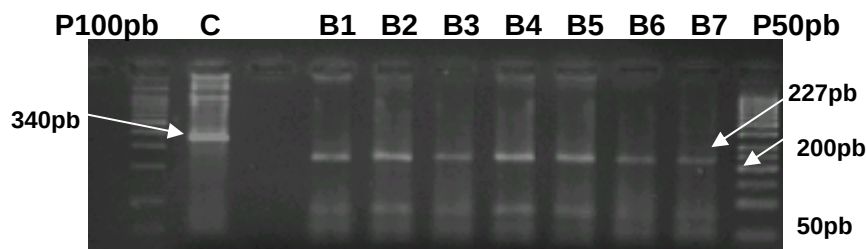


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 3% dos produtos da digestão pela enzima *SsiI*. A digestão produziu fragmentos de 227pb, 75pb e 38pb e não foi observado a presença de polimorfismos nas seqüências digeridas. **P100pb**: marcador de peso molecular de 100pb. **C**: reação controle, realizada na ausência da enzima *SsiI*. **B1** até **B7**: pacientes. **P50pb**: marcador de peso molecular de 50pb.

4.8 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

A purificação dos produtos de PCR para ambos os iniciadores utilizados proveu excelentes resultados, os quais foram observados através da corrida eletroforética em gel de agarose 1%, aplicando-se 1µL do purificado (Figuras 14 e 15). No gel observou-se somente a presença das seqüências amplificadas sem qualquer produto inespecífico que comprometeria a reação de seqüenciamento.

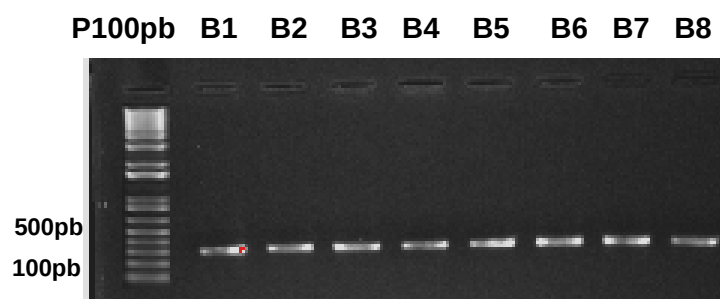


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1%, aplicando 1µL dos produtos de PCR para a seqüência alvo do gene *tlr2* (340 pb) após purificação com o kit Gene Clean® Qbiogene. **P100pb**: marcador de peso molecular de 100pb. **B1** até **B8**: designação para os pacientes.

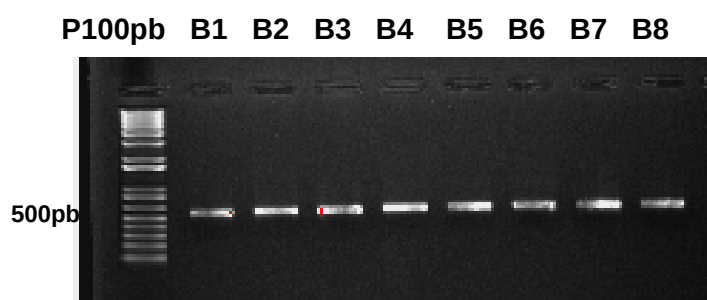


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 1%, aplicando 1 μ L dos produtos de PCR para a seqüência alvo do gene *tlr4* (590 pb) após purificação com o kit Gene Clean® Qbiogene.

4.9 SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ALVO DO GENE *tlr2*.

Para confirmar a ausência dos polimorfismos procurados, causados pela substituições nucleotídicas C2180T e G2408A, evidenciados pela digestão das seqüências amplificadas do gene *tlr2* (RFLP) pela enzima SsiI, foi realizado o sequenciamento do DNA amplificado de dois pacientes (B1 e B2). Os resultados obtidos pelo sequenciamento foram alinhados entre si e comparadas com a seqüência disponível no banco de dados do Gen Bank.

Nenhum dos polimorfismos citados foi observado. Também não se observou qualquer outra alteração nas seqüências dos dois indivíduos (B1 e B2) analisados comparando com a seqüência consenso.

As seqüências alinhadas seguem na Figura 16. Os pontos polimórficos (SNPs) procurados estão destacados em laranja e vermelho e encontram-se nas posições 76 e 305 da seqüência, respectivamente.

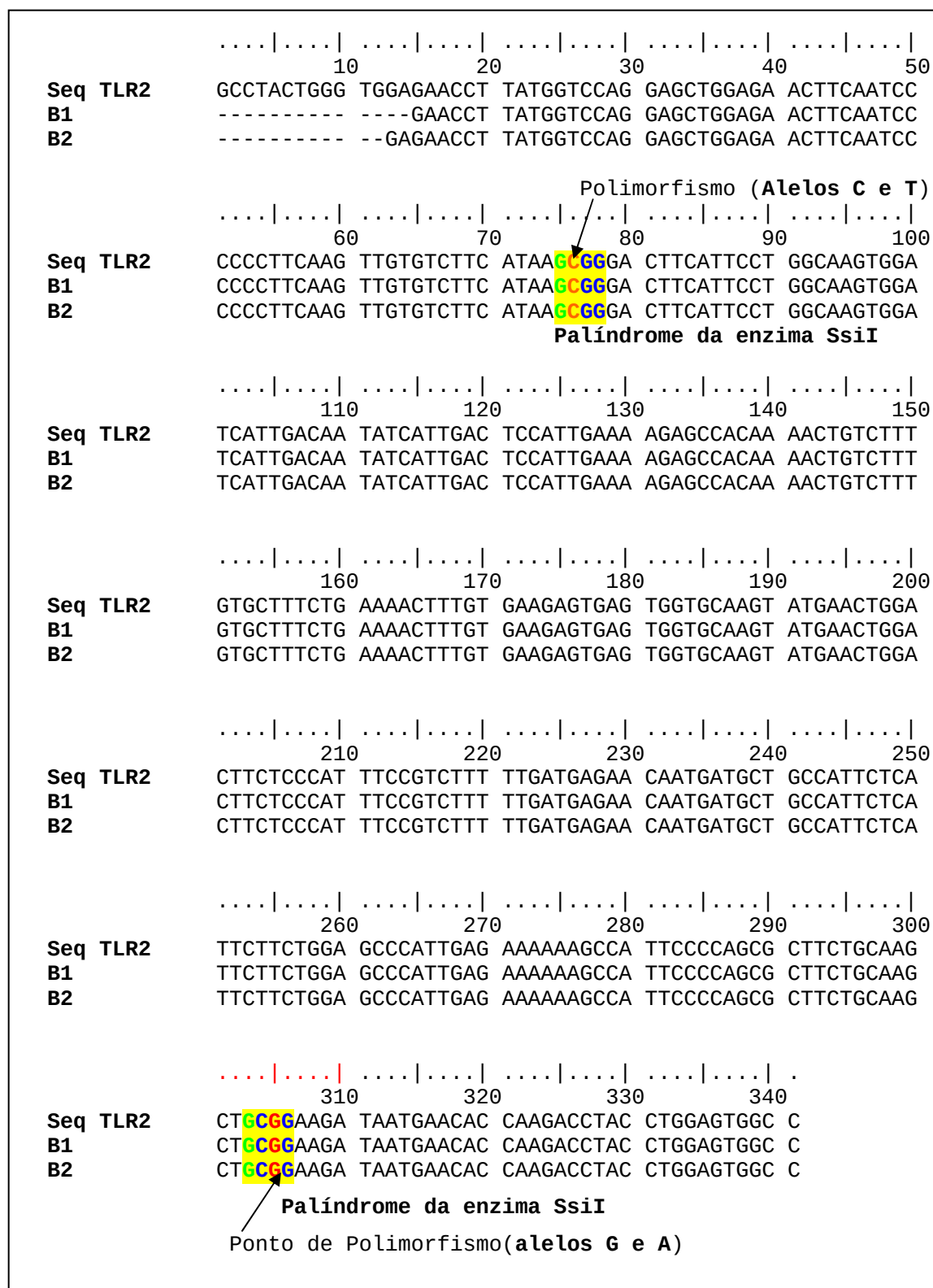


Figura 16. Alinhamento das seqüências alvo do gene *tlr2* dos pacientes B1 e B2, comparadas com a seqüência selvagem. A palíndrome da enzima de restrição SsiI está grifada em amarelo. Os pontos de clivagem da enzima SsiI estão destacados em verde. O ponto de polimorfismo C2180T e G2408A estão destacados em laranja e vermelho respectivamente.

4.10 AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA REGIÃO CORRESPONDENTE AO DOMÍNIO LRR DO GENE *tlr4* POR SEQUENCIAMENTO DE DNA

A região alvo do gene *tlr4* amplificada (593pb) não possuía sítios de restrição que possibilitasse a identificação dos polimorfismos A12874G e C13174T por RFLP. Por esta razão foi realizado o sequenciamento dessa região para todas as amostras do estudo, tornando possível assim analisar qualquer eventual alteração na seqüência e não somente aquelas já relatadas previamente.

A reação de sequenciamento foi padronizada quanto às concentrações de DNA *template*, concentração dos *primers* e quantidade de *Big Dye* utilizado. Foi realizado inicialmente o sequenciamento das fitas senso e anti-senso da seqüência amplificada, pois no sequenciamento em gel há muitas falhas de leitura no início da seqüência (aproximadamente 100pb) o que impossibilita a identificação completa da seqüência. No entanto, a região polimórfica de interesse neste gene localiza-se a partir de 200 pares de bases do início da seqüência amplificada, sendo possível sequenciar somente a fita codificadora (senso), o que proveu bons resultados para a análise.

Foram seqüenciadas as amostras dos 37 pacientes e os resultados foram satisfatórios. As regiões polimórficas aparecem sem *background* no eletrocromatograma, provendo confiabilidade às seqüências obtidas.

As seqüências obtidas dos 37 pacientes, divididos nos grupos A e B, foram alinhadas entre si e com a seqüência consenso no intuito de identificar os polimorfismos A12874G e C13174T. Tais substituições implicam em alterações na estrutura protéica do receptor, que corresponde ao domínio rico

em repetições de leucina (LRR) com frequências estabelecidas em muitas populações. Além disso, foi realizada uma análise dos alinhamentos buscando qualquer outra alteração nucleotídica na sequência do gene *tlr4*.

Não foram identificados os polimorfismos relatados em nenhuma das sequências obtidas dos 37 pacientes que compõem o estudo (Figuras 17 e 18). Também não se observou qualquer alteração nucleotídica nas demais regiões das sequências do gene *tlr4* analisadas no estudo (Ver alinhamento no Apêndice). Desta forma, não foi possível estabelecer uma frequência de polimorfismos na região do gene *tlr4* analisada neste trabalho.

		
		160 170 180 190 200
Seq TLR4		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
A1		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
A2		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
A3		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
A4		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
A5		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
A6		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
A7		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
A8		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
A9		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
A10		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
A11		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
A12		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
A13		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
A14		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
A15		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
A16		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
A17		ACTTAGACTA CTACCTCGAT GATATTATTG ACTTATTTAA TTGTTTGACA
Ponto do polimorfismo Asp299Gly causado por substituição nucleotídica de A por G.		
		
		160 170 180 190 200
Seq TLR4		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B1		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B2		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B3		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B4		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B5		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTTTGA CTTATTTAAT TGTTTNGNAA
B6		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B7		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B8		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B9		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B10		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B11		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B12		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B13		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B14		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B15		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B16		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B17		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B18		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B19		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA
B20		CTTAGACTAC TACCTCGATG ATATTATTGA CTTATTTAAT TGTTTGACAA

Figura 17. Alinhamento das seqüências obtidas dos grupos A e B comparadas com a seqüência consenso, mostrando a região do polimorfismo A12874G. O ponto do Polimorfismo está realçado em amarelo.

		
		460470480490500
Seq TLR4		CTCAAAGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA AGTATTTAGA TCTGAGCTTC
A1		CTCAAAGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA AGTATTTAGA TCTGAGCTTC
A2		CTCAAAGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA AGTATTTAGA TCTGAGCTTC
A3		CTCAAAGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA AGTATTTAGA TCTGAGCTTC
A4		CTCAAAGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA AGTATTTAGA TCTGAGCTTC
A5		CTCAAAGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA AGTATTTAGA TCTGAGCTTC
A6		CTCAAAGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA AGTATTTAGA TCTGAGCTTC
A7		CTCAAAGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA AGTATTTAGA TCTGAGCTTC
A8		CTCANTGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA AGTATTTAGA TCTGAGCTTC
A9		CTCAAAGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA AGTATTTAGA TCTGAGCTTC
A10		CTCAAAGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA AGTATTTAGA TCTGAGCTTC
A11		CTCAAAGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA ACTATTTAGA TCTGAGCTTC
A12		CTCAAAGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA AGTATTTAGA TCTGAGCTTC
A13		CTCAAAGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA AGTATTTAGA TCTGAGCTTC
A14		CTCAAAGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA AGTATTTAGA TCTGAGCTTC
A15		CTCAAAGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA AGTATTTAGA TCTGAGCTTC
A16		CTCAAAGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA AGTATTTAGA TCTGAGCTTC
A17		CTCAAAGTGA TTTTGGGACA ACCAGCCTAA AGTATTTAGA TCTGAGCTTC
Ponto do polimorfismo Thr399Ile causado por substituição nucleotídica de C por T.		
		
		460470480490500
Seq TLR4		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTCA
B1		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTCA
B2		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTCA
B3		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTTA
B4		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTTA
B5		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGANCTTTA
B6		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTTA
B7		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTTA
B8		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTTA
B9		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTTA
B10		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTTA
B11		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTTA
B12		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTTA
B13		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTTA
B14		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTCA
B15		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTTA
B16		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTTA
B17		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTTA
B18		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTTA
B19		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTTA
B20		TCAAAGTGAT TTTGGGACAA CCAGCCTAAA GTATTTAGAT CTGAGCTTTA

Figura 18. Alinhamento das seqüências obtidas dos grupos A e B comparadas com a seqüência consenso, mostrando a região do polimorfismo C13174T. O ponto do Polimorfismo está realçado em azul.

5. DISCUSSÃO

A susceptibilidade para infecções, tal como a tuberculose pode ser significativamente dependente de fatores genéticos, tais como os polimorfismos nos genes de imunidade inata. A importância dos polimorfismos nos receptores *Toll-like* têm sido relatada por vários pesquisadores em diversas situações clínicas.

O polimorfismo G2408A (substituição Arg753Gln no receptor) do gene *tlr2* foi encontrado com frequência de 2,7% em brancos por LORENZ *et al* (2000), enquanto que na Alemanha a mesma variante foi relatada com uma frequência de 14,6% (SCHRÖDER *et al*, 2003). No mesmo estudo não foram encontrados indivíduos com o polimorfismo C2180T (Arg677Trp no receptor), porém este alelo do gene *tlr2* foi relatado em 22% de um total de 45 pacientes coreanos infectados pelo *Mycobacterium leprae*, mas não foi encontrado no grupo controle formado de pacientes saudáveis (KANG & CHAE, 2001).

A frequência do polimorfismo A12874G (Asp299Gly no receptor) do gene *tlr4* tem sido relatada em vários estudos com frequências que variam entre 3 e 18% (AGNESE *et al*, 2002; READ *et al*, 2002; FETEROWSKI, 2003; LORENZ *et al*, 2001). Já o alelo C13174T (Thr399Ile no receptor) deste gene foi relatado com frequência de 6%, em genotipagem realizada num grupo formado por mais de 2000 indivíduos (LORENZ *et al*, 2001). No entanto, os estudos de OKAYAMA *et al* (2002) realizados no Japão e de YOON *et al* (2006) na Coreia não encontraram nenhum indivíduo com esta variante entre mais de 300 indivíduos analisados, sugerindo que este polimorfismo pode ser muito raro em populações asiáticas.

No presente trabalho não se verificou a presença de nenhum polimorfismo, incluindo aqueles acima descritos, após análises com 17 pacientes portadores de HIV e 20 co-infectados com *M. tuberculosis*.

Os resultados deste trabalho, bem como os resultados descritos acima, podem sugerir que a ocorrência destes polimorfismos genéticos varia de acordo com as peculiaridades das populações alvo das pesquisas, tais como características étnicas, visto que, nos estudos relatados, os indivíduos analisados apresentam raças bem definidas (caucasianos e orientais). De acordo com estes resultados, pode-se considerar que estes genes apresentam-se bem conservados dentro de determinada população. Este estudo foi realizado com uma população bastante heterogênea com relação às raças, considerando que nossa população é muito miscigenada. Além disso, estes resultados podem ser justificados pelo pequeno número de pacientes obtidos para a pesquisa (n= 37), uma vez que os grupos de estudo formados nos trabalhos descritos na literatura constituem-se de centenas de indivíduos.

Relacionando as características clínicas dos pacientes com a ausência de alterações nos genes pesquisados, podemos sugerir que a susceptibilidade para a infecção pelo *M. tuberculosis*, não esteja relacionada diretamente com as alterações nos receptores *toll-like* 2 e 4. Temos ainda que considerar que neste estudo não foram examinadas as seqüências dos genes *tlr2* e *tlr4* por completo, mas sim uma região específica onde os polimorfismos ocorrem mais freqüentemente.

Para compensar as limitações da técnica de PCR-RFLP usada para a genotipagem do TLR2 quanto aos polimorfismos C2180T e G2408A, foram seqüenciadas algumas amostras, elucidando a presença dos sítios de restrição

da endonuclease SsiI e dos pontos polimórficos identificáveis pela técnica (Fig. 19).

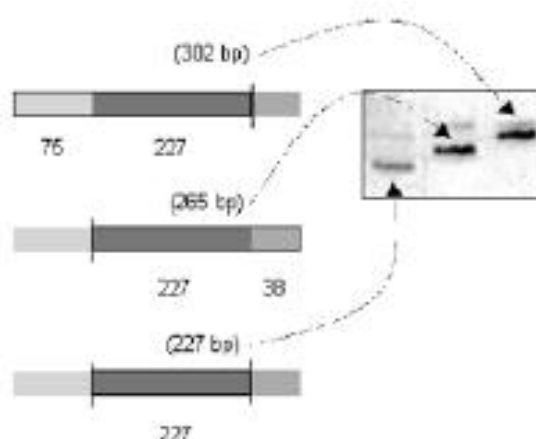


Figura 19. Esquema representativo das possíveis clivagens da sequência de *tlr2* em estudo e os fragmentos originados visualizados na eletroforese (adaptado de SCHRÖDER *et al*, 2003).

A fenotipagem linfocitária e a dosagem da viremia plasmática dos pacientes forneceram perfis imunológico e virológico dos grupos de estudo, sendo estes resultados muito importantes para estabelecermos possíveis relações entre a co-infecção HIV/*M. tuberculosis* e a resposta imunológica mediada pela sinalização através dos receptores *toll-like*.

Em estudo com mastócitos humanos infectados com HIV estimulados com ligantes de TLR 2, 4 e 9, foi observado aumento da replicação viral (SUNDSTROM *et al*, 2004), mostrando que a sinalização por estes receptores exercem efeito sinérgico sobre a replicação do HIV. HEGGELUND *et al* (2004) mostraram que a estimulação “in vitro” com gp120 aumentou significativamente a expressão de TLR2 em monócitos. No mesmo estudo foi relatado que a estimulação de TLR2 foi acompanhada por um significativo aumento da replicação do HIV em pacientes com baixa contagem de linfócitos T CD4⁺. Isto sugere que a presença de agonistas de TLRs oriundos de microrganismos co-

infectantes, exercem importante influência sobre o curso da infecção pelo HIV. Assim, um tratamento precoce e eficaz contra infecções bacterianas oportunistas tem grande importância para uma evolução benéfica da infecção pelo HIV.

Os caminhos pelos quais os ligantes microbianos de TLRs disparam a expressão do HIV não foram totalmente elucidados, embora existam óbvias suposições (Fig.4). Acredita-se que a indução de HIV LTR através da ativação de NF- κ B seja o principal mecanismo pelo qual agentes de microrganismos co-infectantes elevam a transcrição pro-viral. Os níveis séricos de TNF também têm sido relacionados com a elevada carga viral em pacientes co-infectados HIV/*M. tuberculosis* (BAFICA *et al*, 2004; TOOSSI *et al*, 2003).

As condições desfavoráveis, considerando a carga viral plasmática e os níveis de linfócitos T CD4⁺, dos indivíduos do grupo B'' (com tuberculose durante o período das coletas) em relação aos pacientes do grupo A e os pacientes do grupo B' é um indicativo da indução da replicação do HIV-1 como consequência da sinalização por TLRs desencadeada por ligantes oriundos de patógenos co-infectantes.

Apesar das limitações presentes neste trabalho, tais como o número reduzido de pacientes, a co-infecção HIV/*M. tuberculosis* mostrou ser um fator determinante da elevada taxa de replicação do HIV, bem como do perfil imunológico avaliado pela contagem dos linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ nos indivíduos com tuberculose recente. A ausência dos polimorfismos pesquisados no estudo reforça o possível envolvimento dos receptores *toll-like* na indução da replicação viral diante de antígenos de patógenos co-infectantes como o *M. tuberculosis*.

O fato de não haver polimorfismos genéticos na região analisada nos genes *tlr2* e *tlr4* relacionada com o bom estado imunológico e viral da maioria dos pacientes do grupo A e dos pacientes do grupo B', pode ser um indicativo da ativação de uma resposta imunológica efetiva a partir da sinalização por estes receptores.

Portanto, os resultados deste trabalho condizem com aqueles relatados pela literatura.

6. CONCLUSÃO

De acordo com a análise dos resultados do presente estudo é possível concluir que:

- A infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* favorece a replicação do HIV; evidenciado pelo aumento da viremia plasmática.
- A redução numérica dos linfócitos T CD4⁺ é mais acentuada na presença do *M. tuberculosis* nos indivíduos co-infectados com tuberculose em curso.
- A ausência de polimorfismos nos alelos C e G localizados na região codificadora do domínio TIR do gene *tlr2*, e, nos alelos A e C localizados na sequência codificadora do domínio LRR do gene *tlr4*, colabora para o efeito sinérgico da replicação do HIV.
- Na ausência dos polimorfismos em ambos TLRs, a infecção pelo HIV é favorecida; sugerindo um tratamento precoce e eficiente para a eliminação bacteriana nos casos de co-infecção com HIV.

REFERÊNCIAS

AGNESE, D. M.; CALVANO, J. E.; HAHM, S. J.; COYLE, S. M.; CORBETT, S. A.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Human Toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. **J. Infect. Dis.**, v.186, p.1522-1527, 2002.

AKIRA, S.; HEMMI, H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. **Immunol. Let.**, v. 85, p. 85-95, 2003.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signaling. **Nat. Rev. / Immunol.**, v. 4, p. 499 -511, 2004.

ARMANT, M. A.; FENTON, M. J. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. **Genomebiology**, v. 3, p. 1-5, 2002.

BÁFICA, A.; SCANGA, C. A.; SCHITO, M.; CHAUSSABEL, D.; SHER, A. Influence of coinfecting pathogens on HIV expression: evidence for a role of toll-like receptors. **J. Immunol.**, v.172, p. 7229-7234, 2004.

BOMM. R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of acid nucleic. **J. Clin. Microb.**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BRIGHTBILL, H. D.; LIBRATY, D. H.; KRUTZIK, S. R.; YANG, R. B.; BELISLE, J. T.; BLEHARSKI, J. R. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, p. 732-736, 1999.

BULUT, Y.; FAURE, E.; THOMAS, L.; EQUILS, O.; ARDITI, M. Cooperation of toll-like receptor 2 and 6 for celular activation by soluble tuberculosis factor an *Borrelia hurgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of toll-interacting protein and IL- 1 receptor signaling molecules in toll-like receptor 2 signaling. **J. Immunol.**, v. 167, p. 987-994, 2001.

DROEMANN, D.; GOLDMANN, T.; BRANSCHIED, D.; CLARK, R.; DALHOFF, K.; ZABEL, P.; VOLMER, E. Toll-like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human lung. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 119, p. 103-108, 2003.

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

EQUILS, O.; FAURE, E.; THOMAS, L.; BULUT, Y.; TRUSHIN, S.; ARDITI, M. Bacterial lipopolysaccharide activates HIV long terminal repeat through toll-like receptor 4. **J. Immunol.**, v. 166, p. 2342-2349, 2001.

FETEROWSKI, C.; EMANUILIDIS, K.; MIETHKE, T.; GERAUER, K.; RUMP, M.; ULM, K.; HOLZMANN, B.; WEIGHARDT, H. Effects of functional Toll-like receptor mutations on the immune to human and experimental sepsis. **Immunology**, v. 109, p. 426-431, 2003.

HAMANN, L.; HAMPRECHT, A.; GOMMA, A.; SHUMANN, R. R. Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor -2, -4, -9 genes. **J. Immunol. Methods**, v. 285, p. 281-291, 2004.

HASHIMOTO, C.; HUDSON, K. L.; ANDERSON, K. V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. **Cell**, v. 52, p. 269-279, 1988.

HEGGELUND, L.; MÜLLER, F.; LIEN, E.; YNDESTAD, A.; UELAND, T.; KRISTIANSEN, K. I.; ESPEVIK, T.; AUKRUST, P.; FROLAND, S. S. Increased expression of toll-like receptor 2 on monocytes in HIV infection: possible roles in inflammation and viral replication. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, p. 264-269, 2004.

HEIL, F.; HEMMI, H.; HOCHREIN, F. A.; KIRSCHNING, C.; AKIRA, S.; LIPFORD, G.; WAGNER, H.; BAUER, S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. **Science**, v. 303, p.1526-1529, 2004.

HESTER, J. D.; HALSEY, J. F. Monitoring of genetic polymorphisms in toll-like receptors 2, 4, 5 and 9 with real-time PCR assays. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ACADEMY OF ALLERGY, ASTHMA & IMMUNOLOGY, 61st, 2005, San Antonio. Poster. Disponível em: <<http://www.ibtrefflab.com/library/PDF/2005AAAAIposterTLRs.PDF>>. Acesso em: 20 out. 2006.

HOPE, T. J. Viral RNA export. **Chem. Biol.**, v. 4, p. 335-344, 1997.

JOINT UNITED NATIONS PROGRAME ON HIV/AIDS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **AIDS epidemic update**. December, 2007. Disponível em: <http://data.unaids.org/pub/EPIslides/2007/2007_epiupdate_en.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2007.

JONES, B. W.; MEANS, T. K.; HELDWEIN, K. A.; KEEN, M. A.; HILL, P. J.; BELISLE, T.; FENTON, M. J. Different toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. **J. Leuk. Biol.**, v. 69, p. 1036-1042, 2001.

KANG, T. J.; CHAE, G. T. Detection of Toll-Like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **FEMS Immunol. Microbiol.**, v. 31, p. 53-58, 2001.

KAPLAN, A. H.; MANCHESTER, M.; SWANSTROM, R. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and for release to occur with maximum efficiency. **J. Virol. Met.**, v. 68, p. 6782-6786, 1994.

KARAYIANNIS, P. The hepatitis C virus NS3/4A protease complex interferes with pathways of the innate immune response. **J. Hepatol.**, v. 43, p.743-745, 2005.

KATZ, R. A.; SKALKA, A. M. The retroviral enzymes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 63, p. 133-173, 1994.

KRUTZIK, S. R.; MODLIN, R. L. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. **Sem. Immunol.**, v. 16, p. 35-41, 2004.

KRUTZIK, S. R.; OCHOA, M. T.; SIELING, P. A.; UEMATSU, S.; NG, Y. W.; LEGASPI, A.; LIU, P. T.; COLE, S. T.; GODOWSKI, P. J.; MAEDA, Y.; SARNO, E. N.; NORGARD, M. V.; BRENNAN, P. J.; AKIRA, S.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nat. Med.**, v. 9, p. 525-532, 2003.

LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J. M.; HOFFMANN, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, v. 86, p. 973-983, 1996.

LORENZ, E.; FREES, K. L.; SCHWARTZ, D. A. Determination of the TLR4 genotype using allele-specific PCR. **Biotechniques**, v. 31, p. 22-24, 2001.

LORENZ, E.; MIRA, J. P.; CORNISH, K. L.; ARBOUR, N.C; SCHWARTZ, D. A. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with Staphylococcal infection. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6398-6401, 2000.

LU, M.; KIM, P. S. A trimeric structural subdomain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. **J. Biochem. Struct. Dyn.**, v.15, p. 465-471, 1997.

MILLER, A.S.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nuc. Ac. Res.**, v.16, p.1215, 1988.

OKAYAMA, N.; FUJIMURA, K.; SUEHIRO, Y.; HAMANAKA, Y.; FUJIWARA, M.; MATSUBARA, T.; MAEKAWA, T.; HAZAMA, S.; OKA, M.; NOHARA, H.; KAYANO, K.; OKITA, K.; HINODA, Y. Simple genotype analysis of the Asp299Gly polymorphism of the Toll-like receptor 4 gene that is associated with

lipopolysaccharide hyporesponsiveness. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 16, p. 56-58, 2002.

PEÇANHA, E. P.; ANTUNES, O. A. C.; TANURI, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. **Quim. Nova.**, v. 25, n. 6B, p.1108-1116, 2002.

PUGLISI, J. D.; TAN, R. Y.; CALNA, B. J.; FRANKEL, A. D. Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy. **Science**, v. 257, p.76-80, 1992.

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

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

READ, R. C.; PULLIN, J.; GREGORY, S.; BORROW, R.; KACZMARSKI, E. B.; di GIOVINE, F. S.; DOWER, S. K.; CANNINGS, C.; WILSON, A.C. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease. **J. Infect. Dis.** v. 184, p. 640-642, 2002.

SANGHAVI, S. K.; SHANKARAPPA, R.; REINHART, T. A. Genetic analysis of Toll/Interleukin-1 Receptor (TIR) domain sequences from rhesus macaque toll-like receptors (TLRs) 1-10 reveals high homology to human TLR/TIR sequences. **Immunogenetics.**, v. 56, p. 667-674, 2004.

SCHRÖDER, N. W.; SCHUMANN, R. R. Single nucleotide polymorphisms of toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. **Lan. Infect. Dis.**, v. 5, p. 156-164, 2005.

SCHRÖDER, N. W.; HERMANN, C.; HAMANN, L.; GOBEL, U. B.; HARTUNG, T.; SCHUMANN, R. R. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor 2 gene detected by a novel allele-specific PCR. **J. Mol. Med.**, v. 81, p. 368-372, 2003.

STENGER, S.; MODLIN, R. L. Control of *Mycobacterium tuberculosis* through mammalian Toll-like receptors. **Cur. Op. Immunol.**, v. 14, p. 452-457, 2002.

SUNDSTROM, J. B.; LITTLE, D. M.; VILLINGER, F.; ELLIS, J. E.; ANSARI, A. A. Signaling through toll-like receptors triggers HIV-1 replication in latently infected mast cells. **J. Immun.**, v. 172, p. 4391-4401, 2004.

TAKAMURA, A. S.; MIYAKE, K. Toll-like receptors (TLRs) and immune disorders. **J. Infect. Chem.**, v. 12, p. 233-240, 2006.

TOOSSI, Z. Virological and immunological impact of tuberculosis on human immunodeficiency virus type 1 disease. **J. Infect. Dis.**, v. 188, p. 1146-1152, 2003.

VAISHNAV, Y. N.; WONG-STAAAL, F. The biochemistry of AIDS. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 60, p. 577-630, 1991.

WIGG, M. D. Vírus da imunodeficiência humana. In: SANTOS, N.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 183-197.

YOON, H. J.; CHOI, J. Y.; KIM, C. O.; PARK, Y. S.; KIM, M. S.; KIM, Y. K.; SHIN, S. Y.; KIM, J. M.; SONG, Y. G. Lack of Toll-like receptor 4 and 2 polymorphisms in Korean patients with bacteremia. **J. Korean Med. Sci.**, v. 21, p. 979-982, 2006.

ZAREMBER, K. A.; GODOWSKI, P. J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. **J. Immunol.**, v. 168, p. 554-561, 2002.

ZHANG, G.; GHOSH, S. Toll-like receptor mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. **J. Clin. Invest.**, v.107, p. 13-19, 2001.

APÊNDICE

1. SOLUÇÕES UTILIZADAS NA EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

- 1.1) $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1M: foi preparado 50mL e autoclavado;
 1.2) Tris HCl 1M; pH 8,0: foi preparado 50mL e autoclavado;
 1.3) NaCl 5M: foi preparado 50mL e autoclavado;
 1.4) $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$ 0,5M; pH 8,0: foi preparado 50mL e autoclavado;
 1.5) SDS 10%: preparado 50mL em água Milli-Q previamente autoclavada;
 1.6) Tampão de lise de eritrócitos 5x concentrado

		Concentração
Sacarose	27,4g	1,6M
Triton-X	2,5mL	5%
* $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1M	1,25mL	25mM
*Tris HCl 1M pH 8,0	3,0mL	60mM
* H_2O qsp	50,0mL	

* Previamente autoclavados.

- 1.7) Tampão Proteinase K (5x concentrado)

*NaCl 5M	750 μ L
*EDTA. Na_2 0,5M, pH 8,0	2,4mL
* H_2O qsp	10,0mL

* Previamente autoclavados.

2. SOLUÇÕES UTILIZADAS NA ELETROFORESE

- 2.1) Tampão TBE (10x concentrado), para corrida em gel de agarose.:

		Concentração
Tris base	60,55g	1M
Ácido Bórico Anidro	27,8g	0,9M
$\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,85g	10mM
H_2O deionizada qsp	500mL	

pH final 8,3 a 25°C

Foi acertado o pH do tampão 10x concentrado e, para usar, o mesmo foi diluído em água Milli-Q estéril

OBS: só a água foi autoclavada.

2.2) Gel de Agarose

0,8g de agarose para cada 100mL de tampão TBE (1x).

Para cada corrida usar cerca de 70 a 80mL de agarose a 0,8%.

2.3) Solução de azul de bromofenol (para amostras de DNA e produtos de PCR)

Glicerol	0,5 mL	50%
EDTA.Na ₂ .2H ₂ O	0,037 g	0,1 M
SDS	0,01 g	1%
Azul de bromofenol	0,001 g	0,1%
Água destilada pura estéril qsp	1 mL	

3. ALINHAMENTOS DAS SEQUÊNCIAS DO GENE *tlr4* COMPARADAS COM A SEQUÊNCIA CONSENSO

1) Alinhamento do Grupo A

								
		10	20	30	40	50		
Seq	TLR4	TAATGAAAAC	TTGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTTG		
A1		TANTGAAAAC	TTGTATTAAA	G-TCTGGCTG	GTT-AGAAGT	CCATCGTTTG		
A2		TANTGAAAAC	TTG-ATTCAA	G-TCTGGCTG	GTT-AGAAGT	CCATCGTTTG		
A3		TAATGAAAAC	TTGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTTG		
A4		TAATGAAAAC	TTGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTANAAGT	CCATCGTTTG		
A5		TAATGAAAAC	TTGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTTG		
A6		TAATGAAAAC	TTGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTTG		
A7		TAATGAAAAC	TTGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTANAAGT	CCATCGTTTG		
A8		TAATGAAAAC	TTGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTTG		
A9		TAATGAAAAC	TTGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTANAAGT	CCATCGTTTG		
A10		TAATGAAAAC	TTGTATTCAA	GGTNTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTTG		
A11		TAATGAAAAC	TTGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTANAAGT	CCATCGTTTG		
A12		TAATGAAAAC	TTGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTTG		
A13		TAATGAAAAC	TTGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTTG		
A14		TAATGAAAAC	TTGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTTG		
A15		TAATGAAAAC	NTGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTANAAGT	CCATCGTTTG		
A16		TAATGAAAAC	CCGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTTG		
A17		TANTGAAAAC	TTGNATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTTG		

							
		60	70	80	90	100	
Seq TLR4		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
A1		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
A2		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
A3		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
A4		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
A5		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
A6		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
A7		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
A8		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
A9		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
A10		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
A11		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
A12		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
A13		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
A14		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
A15		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
A16		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
A17		GTTCTGGGAG	AATTTAGAAA	TGAAGGAAAC	TTGGAAAAGT	TTGACAAATC	
							
		110	120	130	140	150	
Seq TLR4		TGCTCTAGAG	GGCCTGTGCA	ATTTGACCAT	TGAAGAATTC	CGATTAGCAT	
A1		TGCTCTAGAG	GGCCTGTGCA	ATTTGACCAT	TGAAGAATTC	CGATTAGCAT	
A2		TGCTCTAGAG	GGCCTGTGCA	ATTTGACCAT	TGAAGAATTC	CGATTAGCAT	
A3		TGCTCTANAG	GGCCTGTGCA	ATTTGACCAT	TGAAGAATTC	CGNTTAGCAT	
A4		TGCTCTAGAG	GGCCTGTGCA	ATTTGACCAT	TGAAGAATTC	CGATTAGCAT	
A5		TGCTCTAGAG	GGCCTGTGCA	ATTTGACCAT	TGAAGAATTC	CGATTAGCAT	
A6		TGCTCTAGAG	GGCCTGTGCA	ATTTGACCAT	TGAAGAATTC	CGATTAGCAT	
A7		TGCTCTAGAG	GGCCTGTGCA	ATTTGACCAT	TGAAGAATTC	CGATTAGCAT	
A8		TGCTCTAGAG	GGCCTGTGCA	ATTTGACCAT	TGAAGAATTC	CGATTAGCAT	
A9		TGCTCTAGAG	GGCCTGTGCA	ATTTGACCAT	TGAAGAATTC	CGATTAGCAT	
A10		TGCTCTAGAG	GGCCTGTGCA	ATTTGACCAT	TGAAGAATTC	CGATTAGCAT	
A11		TGCTCTANAG	GGCCTGTGCA	ATTTGACCAT	TGAAGAATTN	CGATTACCAT	
A12		TGCTCTAGAG	GGCCTGTGCA	ATTTGACCAT	TGAAGAATTC	CGATTAGCAT	
A13		TGCTCTAGAG	GGCCTGTGCA	ATTTGACCAT	TGAAGAATTC	CGATTAGCAT	
A14		TGCTCTAGAG	GGCCTGTGCA	ATTTGACCAT	TGAAGAATTC	CGATTAGCAT	
A15		TGCTCTAGAG	GGCCTGTGCA	ATTTGACCAT	TGAAGAATTC	CGATTAGCAT	
A16		TGCTCTANAG	GGCCTGTGCA	ATTTGNCCAT	TGAAGAATTC	CGATTAGCAT	
A17		TGCTCTAGAG	GGCCTGTGCA	ATTTGACCAT	TGAAGAATTC	CGATTAGCAT	
							
		160	170	180	190	200	
Seq TLR4		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GATATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	
A1		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GATATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	
A2		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GATATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	
A3		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GATATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	
A4		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GATATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	
A5		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GATATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	
A6		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GATATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	
A7		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GATATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	
A8		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GGTATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	
A9		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GATATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	
A10		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GATATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	
A11		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GATATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	
A12		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GATATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	
A13		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GATATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	
A14		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GATATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	
A15		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GATATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	
A16		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GATATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	
A17		ACTTAGACTA	CTACCTCGAT	GATATTATTG	ACTTATTTAA	TTGTTTGACA	

							
		210	220	230	240	250	
Seq	TLR4	AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGTGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
A1		AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGTGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
A2		AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGTGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
A3		AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGTGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
A4		AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGTGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
A5		AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGTGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
A6		AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGTGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
A7		AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGTGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
A8		AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGTGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
A9		AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGTGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
A10		AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGTGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
A11		AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGTGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
A12		AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGTGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
A13		AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGTGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
A14		AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGTGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
A15		AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGTGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
A16		AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGNGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
A17		AATGTTTCTT	CATTTTCCCT	GGTGAGTGTG	ACTATTGAAA	GGGTAAAAGA	
							
		260	270	280	290	300	
Seq	TLR4	CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACATTT	AGAATTAGTT	AACTGTAAAT	
A1		CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACATTT	AGAATTAGTT	AACTGTAAAT	
A2		CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACATTT	AGAATTAGTT	AACTGTAAAT	
A3		CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACATTT	AGAATTACTT	AACTGTAAAT	
A4		CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACATTT	AGAATTAGTT	AACTGTAAAT	
A5		CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACATTT	AGAATTAGTT	AACTGTAAAT	
A6		CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACATTT	AGAATTAGTT	AACTGTAAAT	
A7		CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACATTT	ACAATTAGTT	AACTGTAAAT	
A8		CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACNTTT	AGAATTAGTT	AACTGTAAAT	
A9		CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACATTT	AGAATTAGTT	AACTGTAAAT	
A10		CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACATTT	AGAATTAGTT	AACTGTAAAT	
A11		CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACATTT	AGAATTAGTT	AACCGTAAAT	
A12		CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACATTT	AGAATTAGTT	AACTGTAAAT	
A13		CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACATTT	AGAAATTAGT	AACTGTAAAT	
A14		CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACATTT	AGAATTAGTT	AACTGTAAAT	
A15		CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACATTT	AGAATTAGTT	AACTGTAAAT	
A16		CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACATTT	AGAATTAGTT	AACTGTAAAT	
A17		CTTTTCTTAT	AATTTCCGGAT	GGCAACATTT	AGAATTAGTT	AACTGTAAAT	
							
		310	320	330	340	350	
Seq	TLR4	TTGGACAGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	CTCTCAAAAG	GCTTACTTTC	
A1		TTGGACAGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	CTCTCAAAAG	GCTTACTTTC	
A2		TTGGACAGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	CTCTCAAAAG	GCTTACTTTC	
A3		TTGGACAGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	CTCTCAAAAN	GCTTACTTTC	
A4		TTGGACAGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	CTCTCAAAAG	GCTTACTTTC	
A5		TTGGACAGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	CTCTCAAAAG	GCTTACTTTC	
A6		TTGGACAGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	CTCTCAAAAG	GCTTACTTTC	
A7		TTGGACAGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	CTCTCAAAAG	GCTTACTTTC	
A8		TTGGACAGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	CTCTCAAAAG	GCTTACTTTC	
A9		TTGGACAGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	CTCTCAAAAG	GCTTACTTTC	
A10		TTGGACAGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	CTCTCAAAAG	GCTTACTTTC	
A11		TTGCACCGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	CTCTCAAAAG	GCTTACTTTC	
A12		TTGGACAGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	NTCTCAAAAG	GCTTACTTTC	
A13		TTGGACAGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	CTCTCAAAAG	GCTTACTTTC	
A14		TTGGACAGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	CTCTCAAAAG	GCTTACTTTC	
A15		TTGGACAGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	CTCTCAAAAG	GCTTACTTTC	
A16		TTGGACAGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	CTCTCAAAAG	GCTTACTTTC	
A17		TTGGACAGTT	TCCCACATTG	AAACTCAAAT	CTCTCAAAAG	GCTTACTTTC	

							
		360	370	380	390	400	
Seq TLR4		ACTTCCAACA	AAGGTGGGAA	TGCTTTTTCA	GAAGTTGATC	TACCAAGCCT	
A1		ACTTCCAACA	AAGGTGGGAA	TGCTTTTTCA	GAAGTTGATC	TACCAAGCCT	
A2		ACTTCCAACA	AAGGTGGGAA	TGCTTTTTCA	GAAGTTGATC	TACCAAGCCT	
A3		ACTTCCAACA	AAGGTGGGAA	TGCTTTTTCA	GAAGTTGATC	TACCAAGCCT	
A4		ACTTCCAACA	AAGGTGGGAA	TGCTTTTTCA	GAAGTTGATC	TACCAAGCCT	
A5		ACTTCCAACA	AAGGTGGGAA	TGCTTTTTCA	GAAGTTGATC	TACCAAGCCT	
A6		ACTTCCAACA	AAGGTGGGAA	TGCTTTTTCA	GAAGTTGATC	TACCAAGCCT	
A7		ACTTCCAACA	AAGGTGGGAA	TGCTCTTTCA	GAAGTTGATC	TACCAAGCCT	
A8		ACTTCCAACA	AAGGTGGGAA	TGCTTTTTCA	GAAGTTGATC	TACCAACCCT	
A9		ACTTCCAACA	AAGGTGGGAA	TGCTTTTTCA	GAAGTTGATC	TACCAAGCCT	
A10		ACTTCCAACA	AAGGTGGGAA	TGCTTTTTCA	GAAGTTGATC	TACCAAGCCT	
A11		ACTTCCAACA	AAGGTGGAAA	TGCTTTTTCA	GAAGTTGNTC	TACCAAGCCT	
A12		ACTTCCAACA	AAGGTGGGAA	TGCTTTTTCA	GAAGTTGATC	TACCAAGCCT	
A13		ACTTCCAACA	AAGGTGGGAA	TGCTTTTTCA	GAAGTTGATC	TACCAAGCCT	
A14		ACTTCCAACA	AAGGTGGGAA	TGCTTTTTCA	GAAGTTGATC	TACCAAGCCT	
A15		ACTTCCAACA	AAGGTGGGAA	TGCTTTTTCA	GAAGTTGATC	TACCAAGCCT	
A16		ACTTCCAACA	AAGGTGGGAA	TGCTTTTTCA	GAAGTTGATC	TACCAAGCCT	
A17		ACTTCCAACA	AAGGTGGGAA	TGCTTTTTCA	GAAGTTGATC	TACCAAGCCT	
							
		410	420	430	440	450	
Seq TLR4		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAGTTTCAAA	GGTTGCTGTT	
A1		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAGTTTCAAA	GGTTGCTGTT	
A2		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAGTTTCAAA	GGTTGCTGTT	
A3		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAGTTTCAAA	GGTTGCTGTT	
A4		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAGTTTCAAA	GGTTGCTGTT	
A5		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAGTTTCAAA	GGTTGCTGTT	
A6		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAGTTTCAAA	GGTTGCTGTT	
A7		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAGTTTCAAA	GGTTGCTGTT	
A8		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAATTTCAAA	GGTTGCTGTT	
A9		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAGTTTCAAA	GGTTGCTGTT	
A10		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAGTTTCAAA	GGTTGCTGTT	
A11		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAGTTTCAAN	GGTTGCTGTT	
A12		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAGTTTCAAA	GGTTGCTGTT	
A13		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAGTTTCAAA	GGTTGCTGTT	
A14		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAGTTTCAAA	GGTTGCTGTT	
A15		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAGTTTCAAA	GGTTGCTGTT	
A16		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAGTTTCAAA	GGTTGCTGTT	
A17		TGAGTTTCTA	GATCTCAGTA	GAAATGGCTT	GAGTTTCAAA	GGTTGCTGTT	
							
		460	470	480	490	500	
Seq TLR4		CTCAAAGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	AGTATTTAGA	TCTGAGCTTC	
A1		CTCAAAGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	AGTATTTAGA	TCTGAGCTTC	
A2		CTCAAAGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	AGTATTTAGA	TCTGAGCTTC	
A3		CTCAAAGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	AGTATTTAGA	TCTGAGCTTC	
A4		CTCAAAGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	AGTATTTAGA	TCTGAGCTTC	
A5		CTCAAAGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	AGTATTTAGA	TCTGAGCTTC	
A6		CTCAAAGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	AGTATTTAGA	TCTGAGCTTC	
A7		CTCAAAGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	AGTATTTAGA	TCTGANCTTC	
A8		CTCANTGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	AGTATTTAGA	TCTGAGCTTC	
A9		CTCAAAGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	AGTATTTAGA	TCTGAGCTTC	
A10		CTCAAAGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	AGTATTTAGA	TCTGAGCTTC	
A11		CTCAAAGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	ACTATTTAGA	TCTGAGCTTC	
A12		CTCAAAGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	AGTATTTAGA	TCTGAGCTTC	
A13		CTCAAAGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	AGTATTTAGA	TCTGAGCTTC	
A14		CTCAAAGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	AGTATTTAGA	TCTGAGCTTC	
A15		CTCAAAGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	AGTATTTAGA	TCTGAGCTTC	
A16		CTCAAAGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	AGTATTTAGA	TCTGAGCTTC	
A17		CTCAAAGTGA	TTTTGGGACA	ACCAGCCTAA	AGTATTTAGA	TCTGAGCTTC	

					
		510	520	530	
Seq	TLR4	AATGGTGTTA	TTACCATGAG	TTCAAAC TTC	TTGG
A1		AATGGTGTTA	TTACCATGAG	TTCAAAC TTC	TTGN
A2		AATGGTGTTA	TTACCATGAG	TTCAAAC TTC	TTNG
A3		AATGGTGTTA	TTACCATGAG	TTCAAAC TTC	TTGN
A4		AATGGTGTTA	TTACCATGAG	TTCAAAC TTC	TTGG
A5		AATGGTGTTA	TTACCATGAG	TTCAAAC TNC	TTGG
A6		AATGGTGTTA	TTACCATGAG	TTCAAAC TTC	TTG -
A7		AATGGGGTTA	TNACCATGNG	TTCAAAC CTC	NTGG
A8		AATGGNGGTA	TCACCATGAG	TTCNAAN CCC	TTGG
A9		AATGGTGTTA	TTACCATGAG	TTCAAAC NNC	TTGG
A10		AATGGTGTTA	TTACCATGAG	TTCAAAC CCC	TTGG
A11		ATTGGTGT TN	TTCCCATNAG	TTCAAN CTC	TTNG
A12		AATGGNGTTA	TTACCATGAG	TTCANAC CCC	TTGG
A13		AATGGTGTTA	TTACCATGAG	TTCAAAC CCC	TTGG
A14		AATGGTGTTA	TTACCATGAG	TTCAAAC NNC	TTGG
A15		AATGGTGTTA	TTACCATGAG	TTCAAC NTC	TTGG
A16		ACTGGTGTTA	TNACCATGAG	TNCAAAC NTC	TNGG
A17		AATGGTGTTA	TTACCATGNG	TTCAAAC TTC	NTGN

2) Alinhamento do Grupo B

						
		10	20	30	40	50
Seq	TLR4	TAATGAAAAC	TTGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTGG
B1		NANTGAAAAC	TTGTATT CNA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTGG
B2		NAGTGAAANN	TTGNNTCCCA	GGTNTGGCTG	GTTNAGAAGT	CCATCGTTGG
B3		NNATGNAAAAC	TNGTATNCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTGG
B4		NNATGAAAAC	TNGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTGG
B5		NNATGANAAAC	TNGTATTCAA	GGTCNGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTGG
B6		AAATGAAAAC	TNGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTGG
B7		TAATGNAAAAC	TNGNNTNCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTGG
B8		TAATGNAAAAC	TNGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTGG
B9		TAATGAAAAC	TTGTATNCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTGG
B10		NAATGANAAAN	TNGTATT CNA	GGTCNGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTGG
B11		TAATGAAAAC	TNGTANTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCCTTGG
B12		TAATGNAAAAC	TNGTATNCNA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTGG
B13		TNATGNAAAAC	TNGTATNCAA	GGTCCGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTGG
B14		TNNTGAAAAC	TTGTANTNAN	GGTCNGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTGG
B15		TAATGANAAAC	TNGNATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTGG
B16		TAATGANAAAC	TNGNNTTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTGG
B17		TAATGNAAAAC	TNGTATTNAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTGG
B18		TAANGANAAC	TNGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTTAGAAGT	CCATCGTTGG
B19		TNATGANAAAC	TNGTATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTNAGAAGT	CCATCGTTGG
B20		TAATGAAAAC	TNGNATTCAA	GGTCTGGCTG	GTTNAGAAGT	CCATCGTTGG

							
		60	70	80	90	100	
Seq	TLR4	TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B1		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B2		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B3		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B4		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B5		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGANAAATNN	
B6		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B7		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B8		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B9		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B10		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B11		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B12		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B13		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B14		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B15		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B16		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B17		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B18		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B19		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	
B20		TTCTGGGAGA	ATTTAGAAAT	GAAGGAAACT	TGGAAAAGTT	TGACAAATCT	

							
		110	120	130	140	150	
Seq	TLR4	GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B1		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B2		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B3		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B4		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B5		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B6		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B7		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B8		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B9		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B10		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B11		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B12		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B13		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B14		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B15		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B16		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B17		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B18		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B19		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	
B20		GCTCTAGAGG	GCCTGTGCAA	TTTGACCATT	GAAGAATTCC	GATTAGCATA	

						
		160	170	180	190	200
Seq	TLR4	CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B1		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B2		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B3		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B4		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B5		CTTAGNCNNC	TNCTNCGATG	ATATTTTTGA	CTTATTTAAT	TGTTTNGNAA
B6		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B7		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B8		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B9		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B10		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B11		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B12		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B13		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B14		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B15		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B16		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B17		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B18		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B19		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA
B20		CTTAGACTAC	TACCTCGATG	ATATTATTGA	CTTATTTAAT	TGTTTGACAA

						
		210	220	230	240	250
Seq	TLR4	ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B1		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B2		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B3		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B4		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B5		NNGTTTNTNC	ATTTTNCCTG	GGNAGNGNNN	CTNTNGAANG	GGAAAAAAGAC
B6		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B7		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B8		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B9		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B10		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B11		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B12		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B13		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B14		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B15		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B16		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B17		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B18		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B19		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC
B20		ATGTTTCTTC	ATTTTCCCTG	GTGAGTGTGA	CTATTGAAAG	GGTAAAAGAC

							
		260	270	280	290	300	
Seq	TLR4	TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B1		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B2		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	AAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B3		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B4		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B5		TTTTCTTATA	ATTNCGNAGG	GCANCAATTTA	AAATTAGTTA	ACTGAAAATT	
B6		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B7		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B8		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B9		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B10		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B11		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B12		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B13		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B14		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B15		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B16		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B17		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B18		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B19		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	
B20		TTTTCTTATA	ATTTTCGGATG	GCAACATTTA	GAATTAGTTA	ACTGTAAATT	

							
		310	320	330	340	350	
Seq	TLR4	TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B1		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B2		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B3		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B4		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B5		TGGACNGTTT	CCCACATTGA	ANCCCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCC	
B6		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B7		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B8		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B9		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B10		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B11		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B12		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B13		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B14		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B15		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B16		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B17		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B18		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B19		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	
B20		TGGACAGTTT	CCCACATTGA	AACTCAAATC	TCTCAAAAGG	CTTACTTTCA	

						
		360	370	380	390	400
Seq	TLR4	CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B1		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B2		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B3		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B4		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B5		CTTCCAACAA	AGGGGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGACCT	ACCAAGCCTT
B6		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B7		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B8		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B9		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B10		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B11		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B12		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B13		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B14		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B15		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B16		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B17		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B18		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B19		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT
B20		CTTCCAACAA	AGGTGGGAAT	GCTTTTTTCAG	AAGTTGATCT	ACCAAGCCTT

						
		410	420	430	440	450
Seq	TLR4	GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B1		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B2		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B3		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B4		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B5		GAGTTTCTAG	ACCCAGTAG	AAATGGCTTG	GGTTTCAAAG	GTGCCTGTCC
B6		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B7		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B8		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B9		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B10		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B11		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B12		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B13		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B14		GAGTTTCTAG	ATCCNAGTAG	AAATGGCTTG	AGGTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B15		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAN	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B16		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B17		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B18		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B19		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT
B20		GAGTTTCTAG	ATCTCAGTAG	AAATGGCTTG	AGTTTCAAAG	GTTGCTGTTT

						
		460	470	480	490	500
Seq TLR4		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTCA
B1		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTCA
B2		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTCA
B3		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTTA
B4		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTTA
B5		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGANCTTTA
B6		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTTA
B7		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTTA
B8		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTTA
B9		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTTA
B10		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTTA
B11		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTTA
B12		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTTA
B13		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTTA
B14		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTCA
B15		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTTA
B16		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTTA
B17		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTTA
B18		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTTA
B19		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTTA
B20		TCAAAGTGAT	TTTGGGACAA	CCAGCCTAAA	GTATTTAGAT	CTGAGCTTTA

					...
		510	520	530	
Seq TLR4		ATGGTGTTAT	TACCATGAGT	TCAAAC TTCT	TGG
B1		ATGGTGTTAT	TACCATGAGT	TCAAAC TNCT	TGN
B2		ATGGTGTTAT	TACCATGAGT	TCAAAC TTCT	NGN
B3		ATGGTGTTAT	TACCATGAGT	TCAAAC TTCT	TGG
B4		ATGGTGTTAT	TACCATGAGT	TCAAAC NTCN	TNG
B5		ATGGTGTTT	TNCCNTGAGT	TCAAAC NNCT	TGG
B6		ATGGTGTTAT	TACCATGAGT	TCNNAC TTCT	TGG
B7		ATGGTGTTAT	TACCATGAGT	TCAAAC TNCT	TGG
B8		ATGGTGTTAT	TACCNTGAGT	TCAAAC TNNT	TGG
B9		ATGGTGTTAT	TACCATGAGT	TCAAAC TCCT	TGG
B10		ATGGTGTTAT	TACCATGAGT	TCAAAC TNNT	TGG
B11		ATGGTGTTAT	TACCATGAGT	TCAAAC TTCT	TGG
B12		ATGGTGTTAT	TACCATGAGT	TCAAAC TCNN	TGG
B13		ATGGTGTTAT	TACCATGNGT	TCAAAC TTCT	TGG
B14		ATGGTGTTAT	TACCATGAGT	TCAANC TTNT	TNN
B15		ATGGTGTTAT	TACCATGAGT	TCAAAC TTCT	TGG
B16		ATGGTGTTAT	TACCATGAGT	TCAAAC NCNT	TGG
B17		ATGGTGTTAT	TACCATGAGT	TCAAAC TNCT	TGG
B18		ATGGTGTTAT	TACCATGAGT	TCAAAC TTCT	TGG
B19		ATGGTGTTAT	AACCATGAGT	TCAAAC TTCT	TGG
B20		ATGGTGTTAT	TACCATGAGT	TCAAAC TTCT	TGG