

**Denise Goffi Triglia**

**Caracterização Molecular do Arco da Alça V3  
da gp120 do HIV-1**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu para a obtenção do título de mestre em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica – Mestrado Profissional.

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini**

**BOTUCATU  
2007**

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

Triglia, Denise Goffi

Caracterização molecular do arco da alça V3 da gp 120 do HIV-1 / Denise Goffi Triglia. – Botucatu : [s.n.], 2007

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2007.

Orientador: Maria Inês de Moura Campos Pardini

Assunto CAPES: 20804008

1. Biologia molecular 2. Biotecnologia médica

CDD 574.87

Palavras-chave: Arco da alça V3; HIV-1; Progressão da doença

*Aos pacientes...*

*Sem o consentimento e participação dessas pessoas especiais, nada disso  
seria possível.*

## *Agradecimentos*

---

*À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Maria Inês, pela oportunidade de poder integrar a equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro e pela maneira única com que me ensinou a crescer como pessoa e profissionalmente.*

*À Dr<sup>a</sup>. Rejane, que me ensinou, com profissionalismo e dedicação, meus primeiros passos na Biologia Molecular e que me acompanhou por todo o caminho.*

*Ao pessoal da BioMol: Juliana, Chiara, Camila, Juliano, Adriana, Marcinha, Marilisa e Lúcia pela paciência e conhecimento compartilhado. Vocês são os responsáveis por tornar meu ambiente de trabalho um lugar especial. Mais que colegas, vocês são amigos pra vida toda.*

*À Marina, Priscila, Juliana e Elaine, que mesmo não pertencendo a BioMol são parte da equipe e exemplos de amizade e cooperação.*

*Aos professores do Programa de Pós-Graduação de Mestrado Profissional: o conhecimento adquirido com mestres como vocês têm valor inigualável em nossa formação.*

*Aos funcionários do Hemocentro, que direta ou indiretamente me ajudaram e contribuíram nessa jornada.*

*À Coordenação do Viral Genetic Diversity Network (VGDN), pela oportunidade de participação nesse projeto.*

*À Equipe de Bioinformática do VGDN, pelo desenvolvimento do script e análise das seqüências obtidas.*

*Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pela realização das análises estatísticas.*

*Aos funcionários da Biblioteca e do Setor de Pós-Graduação do Campus da Unesp de Botucatu pela grande disposição em ajudar em todos os momentos necessários.*

*Aos meus pais, Martha e Sérgio pelo amor, carinho e apoio em todas as etapas de minha vida. Vocês são imprescindíveis.*

*À minha irmã Deborah, pelas incansáveis horas de ajuda e pelo carinho. Ao meu irmão Eduardo, porque ele existe. Tem coisas que só os irmãos fazem.*

## *Agradecimentos*

---

*Às “meninas de casa” Ana Cláudia e Talisia, pela paciência, apoio e acima de tudo, pela amizade. Nesses anos de convivência vocês se tornaram verdadeiras irmãs.*

*À Jaqueline pela “arte” na capa do trabalho. Adorei.*

*E, por fim, aos meus amigos, em especial a Tais, que não contribuíram tecnicamente, mas que me ajudam da maneira que só os amigos fazem e possuem papel indispensável em minha vida.*

*Meu muito obrigada! Vocês foram essenciais para que esta jornada fosse concluída.*

*O valor das coisas não está no tempo que elas duram,  
mas na intensidade com que acontecem. Por isso,  
existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e  
pessoas incomparáveis.  
(Fernando Pessoa)*

**Prefácio**

*Meu ingresso no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro deu-se por meio do Programa de Aprimoramento Profissional da Fundap, no qual tive a oportunidade de conhecer toda a rotina ali existente.*

*Iniciei meus conhecimentos em Biologia Molecular com a participação no Grupo Cooperativo Hemocentro de Botucatu - Hospital Amaral Carvalho de Jaú que dá assistência na área de Onco-Hematologia, em que pude acompanhar os exames de Pesquisa Residual Mínima e Pesquisa de Quimerismo pós-Transplante de Medula Óssea.*

*Houve então a oportunidade de ingressar no grupo de pesquisa do VGDN (Viral Genetic Diversity Network), auxiliando nas tarefas de estudo dos vírus HIV e HCV, onde permaneço até hoje.*

*Durante esse período tive contato com pesquisa de grande impacto, onde aprendi e aprendo muita coisa nova e diferente a cada dia; fato esse de extrema importância em minha formação como pesquisadora e profissional.*

*Mesmo com meu ingresso no Programa de Pós-Graduação, continuei participando ativamente da rotina de pesquisa do VGDN, que culminou com o trabalho aqui apresentado.*

*O objetivo principal de um programa de mestrado profissional é a aplicabilidade do conhecimento gerado com a pesquisa e por isso, essa dissertação foi apresentada em um formato diferente do usual.*

*A primeira parte consiste de uma breve revisão de literatura sobre o vírus HIV e importância da região da alça V3 do mesmo. Segue-se então um artigo redigido ainda não enviado para publicação, com parte dos dados obtidos com o estudo da região da alça V3 do vírus e que se encontra à disposição para sugestões e eventuais alterações. A terceira e última parte surgiu da necessidade de se padronizar a realização da técnica de sequenciamento da região da alça V3 no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro, que culminou com a confecção de um Procedimento Operacional Padrão (POP), que está aqui apresentado.*

## ***Prefácio***

---

*Termino esse prefácio agradecendo a oportunidade de diversificar minha formação, conhecendo algumas da grande quantidade de áreas na qual a biologia molecular pode ser aplicada. Espero ainda que esse trabalho possa ter contribuído tanto para a comunidade científica quanto para a rotina do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro.*



## **Resumo**

O HIV-1 é um retrovírus que possui grande variabilidade genética, principalmente no gene que codifica o envelope viral (env). A diversidade de seqüências encontrada na terceira alça variável (alça V3) da gp120 é relacionada a várias características biológicas virais, tais como: habilidade do vírus a induzir sincício, antigenicidade e tropismo viral. O arco da alça V3 é formado por uma seqüência de aminoácidos relativamente conservada (GPGR) nos vírus do subtipo B. No Brasil, encontramos a variante B', que possui a seqüência GWGR formando a região do arco e tem sido associada a uma progressão mais lenta da infecção. O fenótipo viral Não Indutor de Sincício (NSI) predomina nas fases assintomáticas, enquanto que o fenótipo Indutor de Sincício (SI) emerge em indivíduos infectados precedendo um declínio acentuado de células T CD4, sendo associado à progressão para aids. A mudança do fenótipo NSI para SI é resultante da substituição de determinados aminoácidos na alça V3. Mutações que alterem a seqüência de aminoácidos da alça V3, incluindo a região do arco podem ser utilizadas como marcadores genéticos para inferir sobre a evolução da infecção. DNA viral foi isolado a partir de leucócitos e utilizado como fonte para amplificação por PCR e seqüenciamento automático da região da alça V3. Um *script* desenvolvido pelo setor de Bioinformática foi utilizado para identificar os fenótipos SI/NSI e a seqüência de aminoácidos do arco da alça V3 (GPGR/GWGR) em 1279 pacientes estudados no Estado de São Paulo como parte do projeto VGDN. Esse estudo mostrou que 34,8% dos pacientes possuíam os aminoácidos GPGR formando a região do arco enquanto que 22,8% possuíam GWGR. Além disso, análises estatísticas utilizando o Teste de Goodman apontaram uma prevalência significativa de GWGR em pacientes assintomáticos com fenótipo NSI. Esses achados sugerem que a seqüência GWGR pode estar associada ao fenótipo NSI e conseqüentemente a uma progressão mais lenta para aids.

**Palavras-chave:** HIV-1, arco da alça V3, seqüenciamento, progressão da doença.

**Abstract**

Genomic diversity in HIV-1 is a well-characterized feature and although this heterogeneity is distributed throughout the genome, most of the polymorphisms are located in the envelope gene (*env*). Sequence variability at the *env* gene third variable region (V3 loop) of HIV-1 is highly correlated with several viral biological features, such as the ability to induce syncytia, antigenicity and viral tropism. The tip of V3 loop consists of a relative conserved amino acid sequence (GPGR) in subtype B and the presence of GWGR motif in this region has been found in Brazilian strains (B' variant). Non-syncytium-inducing (NSI) phenotype variants predominate in the asymptomatic phase and Sincytium-inducing (SI) phenotype variants emerge in infected patients preceding a CD4 cell decline and correlate with progression to clinical manifestations. The switch from an NSI to an SI phenotype was correlated with one or more basic amino acids substitutions in the V3 loop. Genetic mutations modifying the V3 sequence has been associated with alterations in cytopathic abilities and antigenicity. The patterns of the HIV-1 sequences variability can be used as genetic marker to infer about the infection evolution. Viral DNA isolated from leucocytes was used as a source for PCR amplification and automatic sequencing of the V3 loop gene. Home-made PERL scripts were used to identify NSI/SI phenotypes and GPGR/GWGR motif in 1279 patients studied in São Paulo State, Brazil, as part of VGDN Project ([www.lemb.icb.usp.br](http://www.lemb.icb.usp.br)). This study showed that 34.8% of the patients have had GPGR variants and 22.8% GWGR. In addition, statistical analysis using Goodman's Test showed GWGR prevailed in asymptomatic patients with NSI strains. These finds suggest that GWGR could be associated with NSI phenotype and subsequent low progression to AIDS.

**Keywords:** HIV-1, tip of V3 loop, sequencing, disease progression

## **Sumário**

Prefácio

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	pág. 12
2 . Artigo.....	pág. 24
2.1 – Introdução.....	pág. 25
2.2 – Casuística e Metodologia.....	pág. 26
2.3 – Resultados e Discussão.....	pág. 28
2.4 – Referências Bibliográficas.....	pág. 30
2.5 – Anexos.....	pág. 35
3. Procedimento Operacional Padrão (POP).....	pág. 36

## **Introdução**

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é um retrovírus pertencente à família *Lentiviridae*, descrito como o agente etiológico causador da aids (Gallo et al., 1984; Abbas & Lichtman, 2005).

A infecção pelo vírus causa uma depleção gradual e disfunção do sistema imunológico, propiciando o aparecimento e proliferação de infecções oportunistas e/ou tumores malignos, podendo conduzir o indivíduo à morte (Abbas & Lichtman, 2005).

São conhecidos atualmente dois tipos de HIV: o HIV-1 e o HIV-2, que diferem entre si em sua estrutura genômica e antigencidade, sendo o HIV-1 o tipo mais freqüente causador da Aids (Abbas & Lichtman, 2005).

Baseado na análise completa de seu genoma, o HIV-1 é subdividido em três grupos: grupo M (*major*) composto por oito subtipos (A,B,C,D,F,G,H e K) e recombinantes entre esses subtipos, grupo O (*out group*) e por último, o grupo N (*new*) (Louwagie et al., 1993; Simon et al., 1998).

Com cerca de 100nm de diâmetro, o HIV-1 apresenta sua estrutura formada por um nucleocapsídeo central (NC) protéico, cujas principais proteínas são a proteína da matriz (MA) p17 e a proteína do capsídeo (CA) p24, contendo duas cópias idênticas de RNA que constituem seu genoma e as enzimas virais transcriptase reversa, integrase e protease. Além destas, estão presentes outras proteínas que se apresentam como produtos de baixo peso molecular (p1, p2, p6 e p7) e proteínas regulatórias (vif, vpr, tat, rev, vpu, nef). (Freed & Martin, 2001). Envolvendo esse sistema existe um envelope lipoprotéico, formado por uma porção lipídica originária da membrana celular da célula hospedeira, onde estão inseridas glicoproteínas de origem viral: a gp120 e a gp41. (Turner & Summers, 1998) (Figura 1).

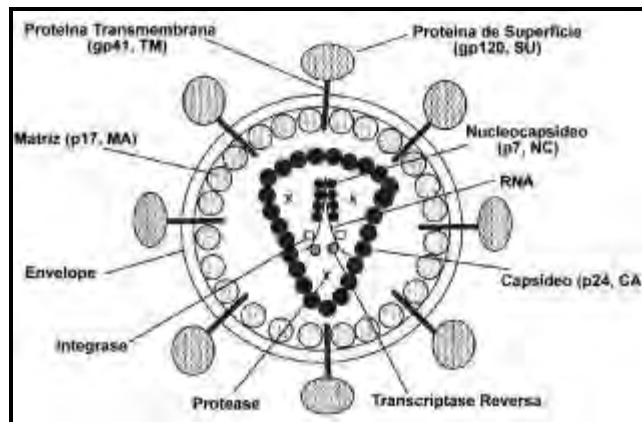


Fig. 1. Estrutura do HIV-1 (adaptado de Freed, 2002)

O genoma do HIV-1 é formado por duas moléculas idênticas de RNA de aproximadamente 9,2 kb de comprimento flanqueadas por duas seqüências análogas denominadas LTR (*long terminal repeat*), que controlam a expressão dos genes virais no provírus. Neste genoma estão presentes três genes estruturais (*gag*, *env*, *pol*) e seis genes regulatórios (*vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, *nef*) (Abbas & Lichtman, 2005) (Figura 2).

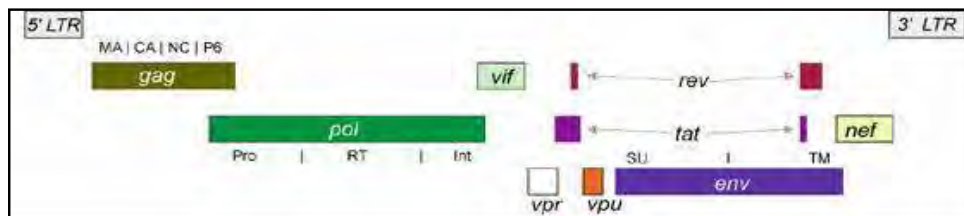


Fig. 2. Representação esquemática do genoma do HIV-1 (<http://hivweb.lanl.gov/content/hiv-db/MAP/hivmap.html>).

O gene *gag* codifica as proteínas estruturais do vírus: as proteínas da matriz, do capsídeo e nucleocapsídeo, além das proteínas de baixo peso molecular p1, p2, p6. O gene *pol* constitui a região mais conservada do genoma do HIV, codificando uma poliproteína gag-pol que após clivagem proteolítica origina as enzimas virais protease, transcriptase reversa e integrase. O gene *env*, por sua vez, codifica inicialmente uma proteína de 160KDa, a gp160, que é posteriormente clivada originando as glicoproteínas maduras do envelope viral: gp120 e gp41 (Freed & Martin, 2001).

Por não possuir um sistema de reparo na incorporação de nucleotídeos, a transcriptase reversa, enzima viral com atividade polimerase RNA dependente, gera inúmeras mutações no genoma do HIV-1, originando a grande diversidade genética encontrada entre os vírus circulantes (Overbaugh & Bangham, 2001). Dos três genes estruturais, o gene *env* é o que possui maior variabilidade genética e essa característica é a responsável pelo escape do vírus ao sistema imune do hospedeiro (Freed & Martin, 2001).

O HIV-1 apresenta tropismo e infecta células que expressem a molécula de CD4 em suas superfícies, como os linfócitos T, macrófagos, células dendríticas e células da microglia (Abbas & Lichtman, 2005).

Para que o vírus infecte a célula alvo, é necessário que haja a fusão entre a bicamada lipídica viral e a membrana celular, processo esse mediado pelos componentes virais mais expostos em sua superfície externa: as glicoproteínas do envelope (Wyatt & Sodroski, 1998).

A ligação inicia-se com a interação entre a gp120 e a molécula de CD4 da membrana celular. Essa interação induz alterações conformacionais na gp120, expondo nessa glicoproteína um sítio de ligação que irá interagir com um co-receptor, uma molécula da família dos receptores de quimiocina: CCR5 ou CXCR4. Essa segunda ligação aproxima o envelope viral da superfície celular, permitindo a interação entre o chamado peptídeo de fusão da gp41 com o domínio de fusão na superfície celular. O vírus, então, se funde à célula alvo e insere seu material genético no citoplasma celular, dando continuidade ao seu ciclo replicativo (Turner & Summers, 1998; Wyatt & Sodrovski, 1998).

As glicoproteínas do envelope se apresentam como complexos triméricos (Figura 3) constituídos por três pares de duas subunidades: uma subunidade transmembrana responsável por ancorar o complexo na bicamada lipídica denominada gp41 e uma subunidade externa, ligada não covalentemente à gp41 denominada gp120 (Freed, 2002).

A localização dessas glicoproteínas na superfície externa do vírus permite que elas realizem suas funções, mas as tornam o principal componente viral exposto ao sistema imunológico do hospedeiro e alvo de anticorpos neutralizantes (Wyatt et al, 1998).

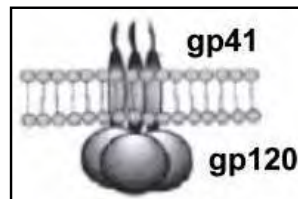


Fig.3: Configuração espacial do complexo trimérico das glicoproteínas inseridas no envelope viral (adaptado de Freed, 2002)

A gp120 é uma glicoproteína de superfície, altamente glicosilada, formada por cinco regiões variáveis (V1-V5) intercaladas a cinco regiões constantes (C1-C5). As quatro primeiras regiões variáveis (V1-V4) formam alças que se projetam para fora do *core* protéico devido à formação de pontes dissulfeto em suas bases (Wyatt et al., 1998).

A estrutura da gp120 (Figura 4) é composta por dois domínios: um interno e um externo, além de uma região de ligação, em forma de “ $\beta$ -sheet”, denominada *Bridging Sheet*. O nome dos domínios reflete a orientação da gp120 no complexo protéico, sendo que o domínio interno faz interface com a gp41, enquanto que o domínio externo fica exposto na superfície do arranjo (Wyatt et al, 1998).

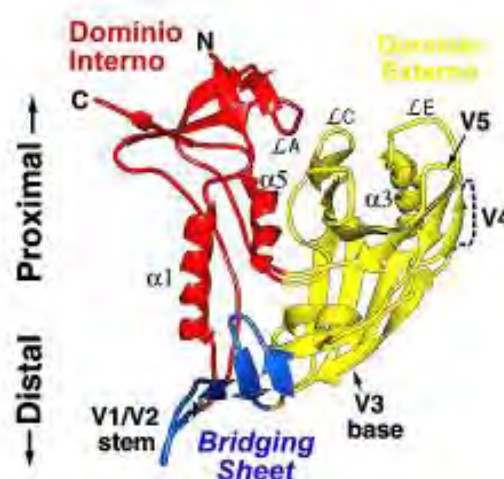


Fig. 4. Esquema representativo da estrutura da gp120 (Adaptado de Wyatt et al, 1998).

A molécula de CD4 se liga a uma cavidade da gp120 formada na junção entre os domínios interno, externo e a *bridging sheet*, enquanto que o co-receptor provavelmente liga-se em uma região na base da proteína, entre a terceira região variável (alça V3) e a *bridging sheet* (Wyatt & Sodroski, 1998).

Estudos descrevem a divisão da superfície da gp120 em três regiões quanto à produção de anticorpos: a primeira, denominada “Face não-neutralizante” (destacada em roxo na figura 5), desencadeia a produção de anticorpos não-neutralizantes e inclui o domínio interno e a região de interação com a gp41. A “Face Neutralizante” (destacada em branco na figura 5) é composta por partes dos dois domínios e a *bridging sheet*, incluindo a região das alças V2 e V3 e desencadeia a produção de anticorpos neutralizantes. Existe ainda uma face denominada “Face Silenciosa” (destacada em azul na figura 5), composta pela parte da gp120 mais exposta do domínio externo, que parece ser minimamente imunogênica devido à alta taxa de glicosilação encontrada nessa região (Wyatt et al., 1998).

Devido sua localização, a gp120 é um importante alvo para o sistema imune do hospedeiro, sendo descrito na literatura anticorpos neutralizantes que reconhecem tanto as regiões constantes quanto as regiões variáveis dessa glicoproteína, principalmente contra epítomos próximos às regiões de ligação com receptores e co-receptores, entre elas, a alça V3. (Ho et al., 1991; Wu et al., 1996; Wyatt et al., 1998).

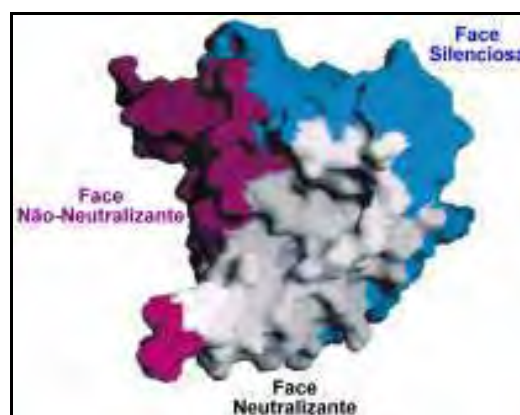


Fig. 5. Esquema da superfície molecular da gp120 evidenciando a divisão de suas faces quanto à produção de anticorpos (Adaptado de Wyatt et al, 1998).

A alça V3 é a terceira região variável da gp120, composta por aproximadamente 35 aminoácidos (Cann et al., 1992) sendo representada pela seqüência consenso CTRPNNTRKSIHIGPGRAFYTTEIIGDIRQAHC (Stanfield et al., 1999).



As duas cisteínas presentes em suas extremidades são altamente conservadas e ligam-se através de pontes dissulfeto, dando a conformação de alça para essa região (Hartley et al., 2005).

A alça V3 pode ser subdividida em três regiões estruturais: uma base conservada, integrada ao *core*, uma haste flexível, que se estende para fora do *core* e um arco em forma de “ $\beta$ -hairpin” (Huang et al., 2005).

Devido a sua posição na gp120, a alça V3 interage diretamente na ligação com o co-receptor e sua seqüência de aminoácidos determina qual co-receptor será utilizado pelo vírus (CCR5 ou CXCR4) para entrar na célula alvo (Hartley et al., 2005).

A porção N-terminal do co-receptor se liga à gp120 na base da alça V3, próxima à *bridging sheet* (Huang et al., 2005) explicando a grande importância dessa região na interação gp120-co-receptor. Estudos mostram ainda, que essa região de ligação é altamente conservada e que fica separada das regiões da alça altamente variáveis (Cormier & Dragic, 2002).

Alterações na seqüência de aminoácidos da alça V3, portanto, influenciam várias características virais, i) definindo o tropismo viral através da determinação do co-receptor utilizado pelo vírus (Jensen et al., 2003), ii) influenciando na sensibilidade e na habilidade do vírus em escapar tanto de drogas inibidoras de fusão, quanto de anticorpos neutralizantes, iii) em sua antigenicidade (Hartley et al., 2005) e ainda iv) está altamente relacionada à citopatogenicidade do vírus (de Jong et al., 1992; Hoffman et al., 2002).

Nesse contexto, as variabilidades na seqüência de aminoácidos na alça V3 da gp120 pode ser utilizado como marcador genético para inferir na evolução da infecção pelo HIV-1.

Alguns vírus são capazes de induzir a formação de células gigantes, multinucleadas e que são capazes de produzir grandes quantidades de vírus antes de morrerem (Zhu et al., 1993). Essa característica é denominada formação de sincício e está intimamente relacionada à seqüência de aminoácidos formadora da alça V3, principalmente aos aminoácidos presentes nas posições 11 e 25 dessa seqüência. (de Jong et al., 1992; Chesebro et al., 1996). A posição 25 parece ser particularmente importante, pois a ausência de um aminoácido ácido (com carga negativa) nesta

posição parece afetar a substituição em outras posições e já é indicativa de capacidade de indução de sincício (Milich et al., 1993).

As variantes virais com fenótipo Não Indutor de Sincício (NSI) possuem aminoácidos neutros ou ácidos nessas posições e mostram-se predominantes nas fases iniciais e assintomáticas da doença, levantando a hipótese de que essa seja a forma viral mais transmitida de uma pessoa para outra (Roos et al., 1992). Essa característica também está relacionada ao tropismo viral, pois esses vírus utilizam preferencialmente o co-receptor CCR5 para entrar na célula alvo, infectando preferencialmente macrófagos (M-trópicas) (Kozak et al., 1997).

Os vírus que apresentam fenótipo Indutor de Sincício (SI) por sua vez, apresentam aminoácidos alcalinos nessas posições e utilizam preferencialmente o co-receptor CXCR4, infectando preferencialmente linfócitos T (T-trópicas). Esses vírus surgem em pacientes infectados precedendo um acentuado declínio de células T CD4, levando a uma progressão mais rápida da doença (Jordan et al., 1991; Callaway et al., 1999).

Tem sido relatada a mudança do fenótipo Não Indutor de Sincício (NSI) para um fenótipo Indutor de Sincício (SI), sendo esse fato prerrogativa de um pior prognóstico para o paciente (de Jong et al., 1992; Chesebro et al., 1996).

O arco é a região mais exposta da alça V3 e possui papel importante na ligação com o co-receptor, supostamente interagindo com a segunda alça dessa molécula (Huang et al., 2005). Quando alguma mutação ocorre nessa região, seu efeito é observado sobre a ligação da gp120 com o co-receptor, pouco interferindo no processo de fusão entre as membranas viral e celular (Suphaphiphat et al., 2006).

Análises da região do arco indicam um alto grau de conservação, tanto em sua seqüência quanto em estrutura (Cormier & Dragic, 2002). Porém, alterações na seqüência de aminoácidos do arco podem ocorrer e gerar modificações na estrutura secundária da gp120 e, provavelmente, alterar sua antigenicidade (Couto-Fernandes et al., 1994).

Entre os vírus do subtipo B encontramos a seqüência de aminoácidos GPGR (Glicina-Prolina-Glicina-Arginina) constituindo o arco. No Brasil encontramos uma variante do subtipo B amplamente distribuída, denominada B', que possui um

triptofano (W) em substituição à prolina, dando origem ao fenótipo GWGR. (Covas et al. 1998; Morgado et al.,1998)

Como essa variante é amplamente distribuída entre as categorias, sugere-se que ela surgiu ou foi introduzida no Brasil desde o início da epidemia (Morgado et al., 1994).

Estudos conduzidos com amostras do Brasil vêm demonstrando que pacientes infectados com a variante B' do HIV-1 possuem um melhor prognóstico, evoluindo mais lentamente para a aids (Santoro-Lopes et al., 2000; Casseb et al., 2002).

A real função da região do arco da alça V3 ainda não foi inteiramente esclarecida e sabendo-se da presença no Brasil dessa variante B' (GWGR) fica evidente a necessidade de se estudar essa região na tentativa de estabelecer parâmetros que auxiliem no tratamento do paciente infectado pelo HIV-1.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. 5th ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

Callaway DS, Ribeiro RM, Nowak MA. Virus phenotype switching and disease progression in HIV-1 infection. *Proc R Soc Lond*. 1999;266:2523-30.

Cann AJ, Churcher MJ, Boyd M, O'brien W, Zhao JQ, Zack J, et al. The region of the envelope gene of human immunodeficiency virus type 1 responsible for determination of cell tropism. *J Virol*. 1992;66:305-9.

Casseb J, Komninakis S, Abdalla L, Brigido LF, Rodrigues R, Araujo F, et al. HIV disease progression: is the Brazilian variant subtype B' (GWGR motif) less pathogenic than US/European subtype B (GPGR)? *Int J Infect Dis*. 2002; 6(3):164-9.

Chesebro B, Wehrly K, Nishio J, Perryman S. Mapping of independent V3 envelope determinants of human immunodeficiency virus type 1 macrophage tropism and syncytium formation in lymphocytes. *J Virol*. 1996; 70:9055-9.

Cormier EG, Dragic T. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in Human Immunodeficiency Virus Type I envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J Virol*. 2002; 76(17):8953-7.

Couto-Fernandes JC, Janssens W, Heyndrickx L, Motte J, Fransen K, Peeters M, et al. Genetic and Antigenic variability of HIV type 1 in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994; 10(9):1157-63.

Covas DT, Biscaro TA, Kashima S, Duarte G, Machado AA. High frequency of the GWG (Pro Trp) envelope variant of HIV-1 in southeast Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1998; 19:74-9.

De Jong J, de Ronde A, Keulen W. Minimal requirements for the Human Immunodeficiency Virus Type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol.* 1992; 66(11):6777-80.

Freed EO, Martin MA. HIVs and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott; 2001, p.1601-55.

Freed EO. HIV-1 Replication. *Som Cell Mol Gen.* 2002; 26(1/6):13-33.

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science.* 1984; 224:500–3.

Hartley O, Klasse PJ, Sattentau QJ, Moore JP. V3: HIV's switch hitter. *Aids Res Hum Retroviruses.* 2005; 21(2):171-89.

Ho DD, McKeating JA, Li XL, Moudgil T, Daar ES, Sun NC, et al. Conformational epitope on gp120 important in CD4 binding and human immunodeficiency virus type 1 neutralization identified by a human monoclonal antibody. *J Virol.* 1991; 65(1):489-93.

Hoffman NG, Seillier-Moiseiwitsch F, Ahn J, Walker JM, Swanstrom R. Variability in the Human Immunodeficiency Virus Type-1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop. *J Virol.* 2002; 76(8):3852-64.

Huang C, Tang M, Zhang M, Majeed S, Montabana E, Stanfield RL, et al. Structure of a V3-containing HIV-1gp120 core. *Science.* 2005; 310:1025-8.

Jensen MA, Li FS, van't Wout AB, Nickie DC, Shriner D, He HX, et al. Improve Coreceptor Usage Prediction and Genotypic Monitoring of R5-to-X4 Transition by Motify Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type I env V3 loop Sequences. *J Virol.* 2003; 77(24):13376-88.

Jordan CA, Watkins BA, Kufra C, Dubois-Dalcq M. Infection of brain microglial cells by human immunodeficiency virus type 1 is CD4 dependent. *J. Virol.* 1991; 65:736-42.

Kozak SL, Platt EJ, Madani N, Ferro FE, Peden K, Kabat SL. CD4, CXCR-4 and CCR5 dependencies for infections by primary patient and laboratory-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1997; 71:873-82.

Louwagie JFE, Mccutchan M, Peeters TP, Brennan E, Scanders-Buell GA, Eddy G, et al. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *AIDS.* 1993; 7:769–80.

Milich L, Margolin BH, Swanstrom R. V3 loop of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Env Protein: Interpreting Sequence Variability. *Virol.* 1993; 67:5623-34.

Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimaraes MD. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *Aids Res Human Retrovirus.* 1994;10 (5):569-76.

Morgado MG, Guimarães ML, Neves-Jr I, Veloso dos Santos VG, Linhares de Carvalho MI, Castello-Branco LR, et al. Molecular epidemiology of HIV in Brazil: polymorphism of the antigenically distinct HIV-1 B subtype-strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93(3):383-6.

Overbaugh J, Bangham CRM. Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. *Science.* 2001; 292:1106-9.

Roos MTL, Lange JMA, de Goede R, Coutinho RA, Schellekens PTA, Miedema F. Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type-1 infection. *J.Infect. Dis.* 1992;165:427-32.

Santoro-Lopes G, Harrison LH, Tavares MD, Xexéo A, Santos ACE, Schechter M. HIV disease progression and V3 serotypes in Brazil: Is B different from B-Br? *Aids Res Hum Retroviruses*. 2000; 16(10):953-8.

Simon F, Mauclore P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med*. 1998; 4:1032-7.

Stanfield R, Cabezas E, Satterthwait A, Stura E, Profy A, Wilson I. Dual conformations for the HIV-1 gp120 V3 loop in complexes with different neutralizing fabs. *Structure Fold Des*. 1999;15:131-42.

Suphaphiphat P, Essex M, Lee T. Mutations in the V3 stem versus the V3 crown and C4 region have different effects on the binding and fusion steps of human immunodeficiency virus type 1 gp120 interaction with the CCR5 coreceptor. *Virology*. 2006 (in press).

Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol*. 1998; 285:1-32.

Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR5. *Nature*. 1996; 384:179-83.

Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*. 1998; 280:1884-8.

Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature*. 1998; 393:705-11.

Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cão Y, Koup RA, et al. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science*. 1993; 261:1179-81.

**Molecular Characterization of V3 loop tip and viral cytophatic ability in HIV-1 infection - Part of VGDN Project**

**Abstract**

Genomic diversity in HIV-1 is a well-characterized feature. Although this heterogeneity is distributed throughout the genome, most of the polymorphisms are located in the envelope gene (*env*). Sequence variability at the *env* gene third variable region (V3 loop) of HIV-1 is highly correlated with several viral biological features, such as the ability to induce syncytia, antigenicity, and viral tropism. The tip of V3 loop consists of a relative conserved amino acid sequence (GPGR) in subtype B and the presence of GWGR motif in this region has been found in Brazilian strains (B' variant). Non-syncytium-inducing (NSI) phenotype variants predominate in the asymptomatic phase. Syncytium-inducing (SI) phenotype variants emerge in infected patients preceding a CD4 cell decline, and correlate with progression to clinical manifestations. The switch from an NSI to an SI phenotype was correlated with one or more basic amino acids substitutions in the V3 loop. Genetic mutations modifying the V3 sequence has been associated with alterations in cytopathic abilities and antigenicity. The patterns of the HIV-1 sequences variability can be used as genetic marker to infer about the infection evolution. Viral DNA isolated from leucocytes was used as a source for PCR amplification and automatic sequencing of the V3 loop gene. Home-made PERL scripts were used to identify NSI/SI phenotypes and GPGR/GWGR motif in 1279 patients studied in São Paulo State, Brazil, as part of VGDN Project ([www.lemb.icb.usp.br](http://www.lemb.icb.usp.br)). The study showed that 34.8% of the patients have had GPGR variants and 22.8% had GWGR. In addition, statistical analysis using Goodman's Test showed that GWGR prevailed in asymptomatic patients with NSI strains. These finds suggested that GWGR could be associated with NSI phenotype virus and subsequent low progression to AIDS.



### **Introduction**

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) shows a high genetic variability, particularly on the env gene genomic region. This gene encodes viral envelope glycoprotein gp120 and gp41 that are involved in virus entry into the target cells (Freed & Martin, 2004).

The surface glycoprotein gp120 consists of five variable regions (V1-V5) intercalated with five conserved regions (C1-C5). The third variable region has 35 amino acid (Cann et al, 1992) and shows as consensus the sequence CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTTGEIIGDIRQAHC (Stanfield et al, 1999). The presence of two cysteine residues flanking the sequence leads to disulphide-bond which results in a loop conformation. The tip of V3 loop (crown) consists of a conserved amino acid sequence (GPGR) in subtype B, prevalent in Brazil (Foley & Korber, 1995). The substitution of the proline for a tryptophan creating the GWGR motif has been found in Brazilian strains (B' variant) (Covas et al., 1998; Bongertz et al., 2000). This motif can alter the protein's secondary structure leading to changes of viral antigenicity (Galvão-Castro et al., 1996).

Besides, V3 sequence can determine which co-receptor (CXCR4 or CCR5) will be used for the virus entry establishing the viral tropism (Jensen et al, 2003). It is also highly associated with the virus ability to induce syncytium. Syncytium is characterized by the formation of large multinucleated cells which can produce a high number of viral particles before its death (Zhu et al, 1993). Non-syncytium-inducing (NSI) phenotype variants predominate in the asymptomatic phase, using the CCR5 as co-receptor and Syncytium-inducing (SI) phenotype variants that use usually CXCR4 emerge in infected patients preceding a CD4 cell decline and correlate with progression to clinical manifestation (Jordan et al., 1991; Callaway et al., 1999). The switch from an NSI to an SI phenotype has been related with the addition of basic amino acids at positions 11 and 25 in the V3 loop sequence (De Jong et al, 1992; Milich et al., 1993; Chesebro et al., 1996).

Genetic mutations modifying the V3 sequence has been associated with alterations in viral tropism, cytopathic abilities and antigenicity (Hartley et al, 2005). In

this context, the patterns of the HIV-1 sequences variability can be used as a genetic marker to infer about the infection evolution.

The aim of this study is to sequencing in the region that encodes the V3 loop of the HIV-1 strains, and to infer about the crown motif, viral cytopathic abilities, and disease progression.

### **Casuistic and Methods**

#### **Patients Selection**

In this study were included 1279 patients with positive serology to HIV-1 from São Paulo (n=210), Ribeirão Preto (n=149), Araçatuba (n=150), São Vicente (n=150), Presidente Prudente (n=151), Sorocaba (n=154), São José do Rio Preto (n=165), Botucatu (n=150), cities of São Paulo State, Brazil.

The samples were divided in two groups, according to the following clinical conditions: Group 1: Patients with AIDS according to Rio de Janeiro/Caracas definition (Brasil, 2004).

Group 2: Patients with asymptomatic HIV-1 infection (without disease or condition associated to AIDS). The groups were subdivided according to the viral subtype and NSI/SI phenotype.

#### **Methodology**

Viral DNA was isolated from blood using the DNA Blood Mini Kit (Quiagen) and it was used as a source for V3 loop sequencing. The technique consisted in PCR reactions, whose products were analyzed by a system of automatic sequencing.

The first PCR was performed in a mix containing 1X Buffer (Invitrogen), 2.5 mM of MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0.4mM dNTP (Applied Biosystems), 0.2pmol of ED5 primer (5'-ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG-3'), 0.2pmol of ED12 primer (5'-AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG-3') (MULLINS, 1995), 2.5U of Taq Recombinant DNA Polymerase (Invitrogen – 5U/μL) and 5 μL of DNA in a reaction total volume of 50μL. Amplification conditions were 95°C for 10 minutes, followed 35 cycles [94°C-45 seconds, 55°C-30 seconds, 72°C-30 seconds] and 7 minutes at 72°C.

The Nested – PCR was performed in a mix containing 1X Buffer (Invitrogen), 2.5 mM of MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0.4mM dNTP (Applied Biosystems), 0.2pmol of ED31 primer (5'-GTTGACTCAGATTGGTTGCAC-3'), 0.2pmol of ED33 primer (5'-GTATGTCATTGACAGTCCAGC-3') (MULLINS, 1995), 2.5U of Taq Recombinant DNA Polymerase (Invitrogen – 5U/μL) and 5μL of PCR product in a reaction total volume of 50μL. Amplification conditions were 95°C for 10 minutes, followed 35 cycles [94°C-45 seconds, 56°C-30 seconds, 72°C-30 seconds] and 7 minutes at 72°C.

The amplification was confirmed by visualization of the fragment of expected size (565bp) in 2% agarose gel.

Nested - PCR products used for sequencing were purified using Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), according to the manufacturer's specifications.

Sequencing of the Nested PCR products was performed with The BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit version 3.1 (Applied Biosystems), using ED31 and ED33 primers in separated reactions and analyzed on ABI Prims™ 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions.

The sequences created were submitted in the VGDN site for quality analysis and contig creating (<http://www.lemb.icb.usp.br/lemb/vgdn/www/>) (VGDN, 2006, in press). The contigs were analyzed using the program BioEdit (<http://iubio.bio.indiana.edu/soft/iubionew/molbio/dna/rna/BioEdit/bioedit.html>) to obtain protein sequence in the correct frame.

Home-made PERL scripts were used to identify distinct phenotypes according to the amino acid present in 11 and 25 positions of the protein sequence and the V3 loop tip motif, as part of VGDN Project ([www.lemb.icb.usp.br](http://www.lemb.icb.usp.br)). The viral subtype was previously determined in VGDN project (VGDN, 2006, in press).

The statistical analysis was performed using the Goodman's Test for contrasts among multinomial populations, where two frequencies (absolute or relative) followed by equal letters do not differ at the level of 5% of significance.

### **Results and Discussion**

From 1279 samples included in this study, 729 had the sequencing concluded by this method. The limitations of this technique, in most cases, was concentrated on the sequencing phase. High genomic diversity in RNA virus is a well-characterized feature (Hahn et al., 1985) and it is a result from virus replication associated with high rate incorrect incorporation of nucleotides during reverse transcription (Wei et al., 1995; Preston & Poiesz & Loeb, 1988). Although this heterogeneity is distributed throughout the genome, most of them are located in the envelope gene (*env*) (Kuiken et al., 1999). This high rate of polymorphisms could explain the difficulty of sequencing phase, since different variants can be amplified in the PCR reaction but generated sequences from this amplified product would be of poor quality. Other critical phase was amplification. Amplification difficulties in these cases are due to a high rate of mutation in this gene region, which can occur at the primers annealing site.

81.6% (595 of 729) were included in subtype B and 18.4% (134 of 729) were non-B subtypes, including subtype F, C and recombinant forms. These finds are according to other authors (Morgado et al, 1994, Foley & Korber, 1995). From 729 patients, 297 (40.7%) presented AIDS and 432 (59.3%) were asymptomatic according to Rio de Janeiro/Caracas Definition (Brasil, 2004). When observing the presence of basic amino acids at the 11<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> position of the V3 loop sequence, 284 samples (39%) had SI phenotype and 445 (61%) NSI phenotype.

The tip of V3 loop showed the sequence GPGR in 34.8% (254) and GWGR in 22.8% (166) of samples. Remaining isolates presented other sequences at this region. The GWGR form has been found in Brazil in a frequency range of 35-57% in subtype B (Potts et al, 1993; Morgado et al, 1994; Covas et al, 1998; Bongertz et al, 2000) although lower incidence has already been demonstrated (Couto-Fernandez et al, 1994). However, these findings could be underestimated because among those that show different sequences at the tip of V3 loop, 139 presented "P" and 28 "W" in position 16. In addition, some sequences could represent impracticable virus and the same analysis performed with RNA sources would explain better these findings.

Table 1 summarizes the results of this study after statistical analysis using Goodman's Test with  $p < 0.05$ . Significant differences were found in GPGR and GWGR

frequency inside the clusters. GWGR sequence was more frequent in asymptomatic patients with subtype B/NSI virus while GPGR predominated in non-B subtypes (see column of capital letters fixing the clinical condition, phenotype and tip of V3 loop sequence).

About the relation between the sequence of the tip of V3 loop and viral cytopathic abilities was observed that GWGR prevailed in asymptomatic patients with NSI strains (Table 1, see column of minuscule letters fixing the clinical condition, viral subtype and tip of V3 loop sequence). Although no statistical differences were found, the same tendency was observed in the patients with AIDS. Using the same logic, GPGR was found more frequently in all clusters (when seen column of capital Greek letters fixing the clinical condition, viral subtype and phenotype), except for the NSI phenotype cluster, which can be explained by a probable increase in the GWGR's frequency in this cluster.

The GWGR found in 15 samples of non-B subtypes were recombinants forms of subtype B (data not shown). Therefore, the recombinant forms which had the *env* gene originated from subtype B viruses were reorganized and placed together to the B subtype virus cluster.

Statistical analyses were then performed but samples that did not show either GPGR or GWGR sequences and those samples with the *env* gene belonging to another viral subtype were considered.

Table 2 shows data found among those samples with *env* gene belonging to B subtype. The GWGR sequence proved to be prevalent in NSI strains whereas GPGR was prevalent in SI strains.

These finds suggest that GWGR may be associated with NSI phenotype virus. Non-synctytium-inducing variants have been related with minor cytopathicity and predominate in disease's asymptomatic phases (Roos et al, 1992), which there is lower viral levels and higher CD4 T cells count (Zhu et al, 1993; Koot et al, 1993; Kozak et al, 1997). In this way, NSI phenotype has been associated with better prognosis and slower progression to AIDS (Jordan et al, 1991).

The results are supported by previous studies that have found similar results. Santoro-Lopes et al. in 2000 demonstrated that the progression to AIDS was faster in patients infected with GPGR strain. Similar result was found by Casseb et al. in 2002,

patients with GWGR variant had lower risk to develop AIDS. In 2006, de Brito et al. showed that patients with GWGR virus presented higher CD4 T count and lower plasma viral load and retarded the AIDS emergence.

In summary, this study showed that the B' variants (with GWGR sequence in the tip of V3 loop) were associated with less cytopathicity than B strain (GPGR sequence in this region) and consequently the patients with GWGR variants could present AIDS lately.

### **References**

Bongertz V, Bou-Habib DC, Brigido LFM, Caseiro M, Chequer PJ, Couto-Fernandez JC, et al. HIV-1 diversity in Brazil: Genetic, Biologic and Immunologic characterization of HIV-1 strains in three potencial HIV vaccine evaluation sites. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000; 23:184-93.

BRASIL. Ministério da Saúde. Critérios de Definição de Casos de Aids em Adultos e Crianças. Série Manuais n. 60. Brasília: Ministério da Saúde. 2004.

Callaway DS, Ribeiro RM, Nowak MA. Virus phenotype switching and disease progression in HIV-1 infection. *Proc R Soc Lond.* 1999;266:2523-30.

Cann AJ, Churcher MJ, Boyd M, O'brien W, Zhao JQ, Zack J, et al. The region of the envelope gene of human immunodeficiency virus type 1 responsible for determination of cell tropism. *J Virol.* 1992;66:305-9.

Casseb J, Komninakis S, Abdalla L, Brigido LF, Rodrigues R, Araujo F, et al. HIV disease progression: is the Brazilian variant subtype B' (GWGR motif) less pathogenic than US/European subtype B (GPGR)? *Int J Infect Dis.* 2002; 6(3):164-9.

Chesebro B, Wehrly K, Nishio J, Perryman S. Mapping of independent V3 envelope determinants of human immunodeficiency virus type 1 macrophage tropism and syncytium formation in lymphocytes. *J Virol.* 1996; 70:9055-9.

Couto-Fernandes JC, Janssens W, Heyndrickx L, Motte J, Fransen K, Peeters M, et al. Genetic and Antigenic variability of HIV type 1 in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994; 10(9):1157-63.

Covas DT, Biscoaro TA, Kashima S, Duarte G, Machado AA. High frequency of the GWG (Pro Trp) envelope variant of HIV-1 in southeast Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1998; 19:74-9.

de Brito A, Komninakis SC, Novoa P, de Oliveira RM, Fonseca LA, Duarte AJ, et al. Women infected with HIV type 1 Brazilian variant, subtype B (B'-GWGR motif) have slower progression to AIDS, compared with patients infected with subtype B (B-GPGR motif). *Clin. Infect. Dis*. 2006; 43(11):1476-81.

de Jong J, de Ronde A, Keulen W. Minimal requirements for the Human Immunodeficiency Virus Type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol*. 1992; 66(11):6777-80.

Foley B, Korber B. Global variation in the HIV-1 V3 region. In: *Human Retroviruses and AIDS*. Myers G, Korber B, Hahn BH, Jeang K-T, Mellors JW, McCutchan FE, Henderson LE, Pavlakis GN. Los Alamos: National Laboratory, New Mexico;1995. p.77-108.

Freed EO, Martin MA. HIVs and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott; 2001, p.1601-55.

Galvão-Castro B, Couto-Fernandez JC, Mello MA, Linhares-De-Carvalho MI, Castello-Branco LR, Bongertz V, et al. A Nationwide Effort to Systematically Monitor HIV-1 Diversity in Brazil: Preliminary Results. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996; 91:339-42.

Goodman, CA. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Ann Math Stat*. 1964; 35(2):716-25.

Goodman, CA. Simultaneous confidence multinomial proportions. *Technometrics*. 1965; 7(2):247-54.

Hahn, BH, Gonda MA, Shaw GM, Popovic M, Hoxie JA, Gallo RC, et al. Genomic diversity of the acquired immune deficiency syndrome virus HTLV-III: Different viruses exhibit greatest divergence in their envelope genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 82: 4813-17.

Hartley O, Klasse PJ, Sattentau QJ, Moore JP. V3: HIV's switch hitter. *Aids Res Hum Retroviruses*. 2005; 21(2):171-89.

Jensen MA, Li FS, van't Wout AB, Nickie DC, Shriner D, He HX, et al. Improve Coreceptor Usage Prediction and Genotypic Monitoring of R5-to-X4 Transition by Motify Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type I env V3 loop Sequences. *J Virol*. 2003; 77(24):13376-88.

Jordan CA, Watkins BA, Kufra C, Dubois-Dalcq M. Infection of brain microglial cells by human immunodeficiency virus type 1 is CD4 dependent. *J. Virol*. 1991; 65:736-42.

Koot M, Keet IPM, Vos AHV, De Goede REY, Roos MTHL, Coutinho RA, et al. Prognostic value of human immunodeficiency virus type 1 biological phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med*. 1993; 118: 681-8.

Kozak SL, Platt EJ, Madani N, Ferro FE, Peden K, Kabat SL. CD4, CXCR-4 and CCR5 dependencies for infections by primary patient and laboratory-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 1997; 71:873-82.

Kuiken CL, Foley B, Hahn B, Korber B, McCutchan F, Marx P, Mellors J, Mullins JI, Sodroski J, Wolinsky S. 1999. Human retroviruses and AIDS 1999: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N.Mex.



Milich L, Margolin BH, Swanstrom R. V3 loop of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Env Protein: Interpreting Sequence Variability. *Viol.* 1993; 67:5623-34.

Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimaraes MD. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *Aids Res Human Retrovirus.* 1994;10 (5):569-76.

Mullins JI. HIV-1 HMA Subtyping Kit. [cited 2004 Mar]. Available from: <http://ubik.microbiol.washington.edu/HMA/html/primers.html>.

Potts KE, Kalish ML, Lott T, Orloff G, Luo C, Bernard M, et al. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. *AIDS.* 1993, 7:1191-97.

Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science.* 1988; 242:1168–71.

Roos MTL, Lange JMA, de Goede R, Coutinho RA, Schellekens PTA, Miedema F. Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type-1 infection. *J.Infect. Dis.* 1992;165:427-32.

Santoro-Lopes G, Harrison LH, Tavares MD, Xexéo A, Santos ACE, Schechter M. HIV disease progression and V3 serotypes in Brazil: Is B different from B-Br? *Aids Res Hum Retroviruses.* 2000; 16(10):953-8.

Stanfield R, Cabezas E, Satterthwait A, Stura E, Profy A, Wilson I. Dual conformations for the HIV-1 gp120 V3 loop in complexes with different neutralizing fabs. *Structure Fold Des.*1999;15:131-42.

Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature.* 1995;.373:117–22.

Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cao Y, Koup RA, et al. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science*. 1993; 261:1179-81.

Attachments

Table 1. Distribution of data found relating clinical condition, viral subtype and phenotype and tip of V3 loop sequence

Clinical Condition	SUBTYPE	PHENOTYPE	TIP OF V3 LOOP SEQUENCE			Total
			GPGR	GWGR	Outros	
AIDS	B	NSI	36 (0,288) aAαΔ	34 (0,272) aAαΔ	55 (0,440) aAαΔ	125
		SI	49 (0,412) aAαΩ	19 (0,160) aAαΔ	51 (0,429) aAαΩ	119
	NON-B	NSI	15 (0,455) aAαΩ	4 (0,121) aAαΔ	14 (0,424) aAαΩ	33
		SI	10 (0,500) aAαΩ	2 (0,100) aAαΔ	8 (0,400) aAαΩ	20
ASYMPTOMATIC	B	NSI	60 (0,267) aAαΔ	84 (0,373) bBαΔ	81 (0,360) aAαΔ	225
		SI	41 (0,325) aAαΩ	14 (0,111) aAαΔ	71 (0,563) bAαΣ	126
	NON-B	NSI	35 (0,565) aBαΣ	8 (0,129) aAαΔ	19 (0,306) aAαΩ	62
		SI	8 (0,421) aAαΩ	1 (0,053) aAαΔ	10 (0,526) aAαΩ	19

Minuscul letters: phenotypes comparison fixing the clinical condition, viral subtype and tip of V3 loop sequence

Capital letters: subtypes comparison fixing the clinical condition, phenotype and tip of V3 loop sequence

Minuscul greek letters: Clinical Conditions comparison fixing the viral subtype and phenotype and tip of V3 loop sequence

Capital greek letters: Tip of V3 loop sequences comparison fixing the clinical conditions, viral subtype and phenotype (ΔΩΣ)

Table 2. Distribution of data found in samples with subtype B env gene relating viral phenotype and tip of V3 loop sequence.

VIRAL PHENOTYPE	TIP OF V3 LOOP SEQUENCE		
	GPGR	GWGR	Total
NSI	102(0,440) aA	130(0,560) bB	232
SI	95(0,725) bB	36(0,275) aA	131

Minuscul letters: phenotypes comparison fixing the tip of V3 loop sequence

Capital letters: tip of V3 loop sequences comparison fixing the phenotype

*PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DO LABORATÓRIO DE  
BIOLOGIA MOLECULAR (POP)*

*PARTE INTEGRANTE DO PROJETO VGDN*

***HEMOCENTRO DE BOTUCATU***

*Hospital das Clínicas – FMB – UNESP*

**AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO DO ENVELOPE  
DO HIV-1**

FICHA TÉCNICA N.º 1

**Material a ser coletado para extração de DNA**

- ✚ Sangue periférico de pacientes soropositivos para HIV: **ficha técnica n.º. 2.**

### **Coleta de Sangue Periférico**

- ✚ A coleta da amostra deve ser realizada por profissional da saúde devidamente habilitado;
- ✚ Colher de 3 a 5 mL de sangue periférico (SP) de cada paciente em tubo de hemograma contendo 3 gotas de anticoagulante EDTA 6%;
- ✚ Após a coleta do sangue, identificar o tubo com nome e número do paciente e homogeneizar por inversão (aproximadamente 5 vezes);
- ✚ Acondicionar as amostras em caixa térmica resistente;
- ✚ Transportá-las até o local de manipulação em no máximo quatro horas;
- ✚ Caso a manipulação das amostras não seja imediata, armazená-las a 4°C até que seja manipulada, o que deve ocorrer em no máximo dois dias.

FICHA TÉCNICA N.º 3

**Recebimento das amostras ao Laboratório de Biologia**

- ✚ No recebimento das amostras no laboratório, verificar as condições de transporte: **(ficha técnica n.º 2)**;
- ✚ Conferir a identificação dos tubos com os dados das solicitações médicas;
- ✚ Armazenar os tubos em geladeira a 4°C até iniciar o processo de extração de DNA **(ficha técnica n.º 4)**;
- ✚ Registrar as amostras em um livro de registros.

**Extração de DNA de sangue periférico através do QIAamp  
DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)**

- ✓ TODO O PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DEVE SER REALIZADO NA SALA DE PRÉ-AMPLIFICAÇÃO
  - ✓ TODOS OS TUBOS DEVEM SER ABERTOS UTILIZANDO GAZE OU PAPEL ABSORVENTE
  - ✓ CUIDADO AO ABRIR E FECHAR CADA TUBO PARA QUE AS AMOSTRAS NÃO EXTRAVASEM.
1. Homogeneizar os tubos contendo as amostras por inversão (aproximadamente 10 vezes);
  2. Separar uma alíquota de 1mL do sangue total em tubos tipo eppendorf de 2mL devidamente identificados com o número do paciente e data;
  3. Armazenar a alíquota de 1mL no freezer a -70°C (Estoque de amostras);
  4. Em um outro tubo tipo eppendorf de 2mL devidamente identificado, separar outra alíquota de 200 µL do sangue total;
  5. Descartar o todo de hemograma com o restante da amostra em lixo infectante;
  6. Prosseguir com a extração de DNA seguindo especificações do fabricante (vide bula do kit), utilizando como material fonte os 200 µL de sangue total aliquotado (item 4);
  7. Após a extração, visualizar o DNA extraído em gel de agarose 2% (**ficha técnica n°.5**);
  8. Após a extração, deixar as amostras na geladeira (4°C) por aproximadamente 1 hora antes de armazená-las no freezer a -70°C até que seja realizada a primeira reação de PCR (**ficha técnica n°.6**);



## Visualização do produto extraído em gel de agarose

*Com o objetivo de verificar o sucesso do processo de extração e ainda quantificar o DNA extraído, é necessário que este seja visualizado em gel de agarose.*

- ✚ Preparar um gel de agarose 2,0% utilizando TEB 0,5X (**fichas técnicas n<sup>os</sup> 13 e 14**);
- ✚ Enquanto o gel polimeriza, ir até a sala de pré-amplificação onde estão as amostras de DNA a serem visualizadas;
- ✚ Quando as amostras estiverem descongeladas, agitá-las manualmente (duas a três vezes);
- ✚ Em uma placa do tipo ELISA limpa, aliquotar 4µL do DNA (usar um pocinho para cada amostra);
- ✚ Voltar para a sala de eletroforese com o material aliquotado;
- ✚ Em cada pocinho que contém amostra, adicionar 1,5 µL de tampão de amostra (azul) (**ficha técnica n° 14**);
- ✚ Homogeneizar com a pipeta (duas a três vezes);
- ✚ Aplicar 4,0- 4,5 µL de cada amostra em um pocinho do gel, pulando o primeiro pocinho;
- ✚ Aplicar 4 µL do marcador de peso molecular de 1kb (diluído de acordo com especificações do fabricante) no primeiro pocinho do gel;
- ✚ Anotar a seqüência das amostras aplicadas no gel;
- ✚ Correr a eletroforese por aproximadamente 30 minutos a 120V;
- ✚ Após o término da corrida, proceder com a visualização do gel em Transiluminador UV;
- ✚ Interpretar o resultado da seguinte maneira:
  - ✓ Ausência de banda: não há DNA na amostra; repetir a extração (**ficha técnica n° 4**);
  - ✓ Banda única e forte: DNA de boa qualidade e quantidade. Proceder com a amplificação utilizando 5 µl de DNA na reação;
  - ✓ Banda única e fraca: DNA de boa qualidade, porém em pouca quantidade. Proceder com a amplificação utilizando 10 µl de DNA na reação.

### Amplificação da Região da Alça V3

A alça V3 é codificada pelo gene *env* do HIV e para amplificação dessa região é utilizada a técnica de Nested PCR, que consiste de duas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) seguidas.

Os mix das reações (tanto da primeira PCR quanto do nested) devem ser preparados dentro do fluxo laminar da sala de pré-amplificação e devem ser mantidos no gelo até que as amostras sejam adicionadas e colocadas no termociclador.

O DNA deve ser manipulado preferencialmente utilizando-se ponteiras com filtro e dentro da sala de pré-amplificação, porém fora do fluxo laminar.

#### Primeira PCR

- Preparar o mix dos reagentes em quantidade suficiente para o número de amostras a serem amplificadas, seguindo a receita descrita no quadro abaixo:

REAGENTES	MIX PARA UMA AMOSTRA
Buffer 10X	4,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,5 µL
dNTP (10mM)	2,0 µL
Primer ED5 (10pmol/µL)	1,0 µL
Primer ED12 (10pmol/µL)	1,0 µL
Taq RECOMB (Invitrogen)	0,5 µL
Água	33,5 µL

- Aliquotar 45 µL do mix em tubo tipo eppendorf de 200 µL previamente identificado com o número da amostra;
- Adicionar ao mix 5 µL de DNA (volume final da reação=50 µL);

Caso haja necessidade de utilizar 10 µL de DNA, diminuir a quantidade de água no mix para 28,5 µL, e misturar 40 µL do mix com os 10 µL do DNA

- Homogeneizar pipetando várias vezes suavemente;

**POP - Biologia Molecular – Hemocentro de Botucatu**

---

- ✚ Colocar os tubos tipo eppendorf no termociclador e proceder com a seguinte ciclagem:

Step 1 (1 ciclo)	Step 2 (35 ciclos)	Step 3 (1 ciclo)	Step 4 (1 ciclo)
95°C 10min.	94°C 45 seg. 55°C 30 seg. 72°C 30 seg.	72°C 7 min.	4°C ∞

- ✚ Após o término da ciclagem, retirar os tubos do termociclador e armazená-los no freezer -20°C até que seja realizada a segunda PCR.

**Segunda PCR (Nested)**

O mix dos reagentes dessa etapa também deve ser feito na sala de pré-amplificação. A manipulação do produto da primeira PCR, entretanto, deve ser feita num ambiente de pós-amplificação, de preferência em uma câmara de fluxo laminar exclusiva para esse fim (capela de nested).

- ✚ Preparar o mix dos reagentes seguindo o descrito no quadro:

REAGENTES	MIX PARA UMA AMOSTRA
Buffer 10X	4,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,5 µL
dNTP (10mM)	2,0 µL
Primer ED31 (10pmol/µL)	1,0 µL
Primer ED33 (10pmol/µL)	1,0 µL
Taq RECOMB (Invitrogen)	0,5 µL
Água	33,5 µL

- ✚ Aliquotar 45 µL do mix em tubos do tipo eppendorf de 200 µL previamente identificados;
- ✚ Adicionar ao mix 5 µL do produto da primeira PCR (volume final=50 µL);
- ✚ Homogeneizar pipetando várias vezes suavemente;
- ✚ Colocar os tubos tipo eppendorf no termociclador e proceder com a seguinte ciclagem:

Step 1 (1 ciclo)	Step 2 (35 ciclos)	Step 3 (1 ciclo)	Step 4 (1 ciclo)
95°C 10min.	94°C 45 seg. 56°C 30 seg. 72°C 30 seg.	72°C 7 min.	4°C ∞

- ✚ Após o término da ciclagem, retirar os tubos do termociclador e armazená-los no freezer -20°C até que seja novamente manipulado.

FICHA TÉCNICA N°. 7

### Visualização do produto extraído em gel de agarose

- ✚ Preparar um gel de 2,0% utilizando TEB 0,5X (**fichas técnicas n<sup>os</sup> 12 e 13**);
- ✚ Aguardar até que as amostras descongelem;
- ✚ Homogeneizar manualmente (duas a três vezes);
- ✚ Em uma placa do tipo ELISA limpa, aliquotar 4µL do produto da segunda PCR (usar um pocinho para cada amostra).
- ✚ Em cada pocinho que contém amostra, adicionar 1,5 µL de tampão de amostra (azul) (**ficha técnica n° 13**).
- ✚ Homogeneizar com a pipeta (duas a três vezes).
- ✚ Aplicar 4,0- 4,5 µL de cada amostra em um pocinho do gel, pulando o primeiro pocinho.
- ✚ Aplicar 4 µL do marcador de peso molecular de 100pb, diluído de acordo com especificações do fabricante, no primeiro pocinho do gel.
- ✚ Anotar a seqüência de aplicação das amostras no gel.
- ✚ Ligar o equipamento de eletroforese.
- ✚ Correr a eletroforese por aproximadamente 30 minutos a 120V.
- ✚ Após o término da corrida, proceder com a visualização do gel em Transiluminador UV.
- ✚ Interpretar da seguinte maneira:
  - ✓ Ausência de banda: não houve amplificação;
  - ✓ Banda de 565pb: a região da alça V3 foi selecionada e amplificada.
    - ✚ Se a banda apresentar intensidade forte, utilizar 1µL na reação de seqüência (ficha técnica n°9), se a banda for fraca, utilizar 2µL.
- ✚ Armazenar as amostras no freezer -20°C até a realização do procedimento de purificação (**ficha técnica n° . 8**).

FICHA TÉCNICA N° 8

**Protocolo para purificação de produto de PCR utilizando o  
*ChargeSwitch PCR Clean-UP Kit (Invitrogen)***

1. Identificar dois tubos tipo eppendorf de 1,5mL para cada uma das amostras;
2. No primeiro tubo de 1,5 mL colocar 50 µL do produto amplificado e 50 µL da solução NS5 (*Purification Buffer*);
3. Adicionar 10 µL do *Bead Magnético* (homogeneizar por vortex antes de usar);
4. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto;
5. Colocar os tubos na *rack* magnética por 1 minuto;
6. Sem retirar os tubos da *rack*, desprezar o sobrenadante cuidadosamente com a pipeta sem perturbar o *pellet*;
7. Tirar os tubos da *rack*;
8. Adicionar 150 µL da solução W12 (*Wash Buffer*) em cada um dos tubos e homogeneizar com a pipeta;
9. Colocar os tubos na *rack* por 1 minuto;
10. Sem retirar os tubos da *rack*, desprezar o sobrenadante cuidadosamente com a pipeta sem perturbar o *pellet*;
11. Repetir a lavagem (passos 7-10);
12. Remover os tubos da *rack*;
13. Adicionar 50 µL da solução de eluição (*Elution Buffer*) e homogeneizar com a pipeta;
14. Incubar os tubos a temperatura ambiente por 1 minuto;
15. Colocar os tubos na *rack* por 1 minuto;
16. Sem retirar os tubos da *rack*, transferir o sobrenadante para o outro tubo de 1,5mL estéril já identificado anteriormente;
17. Armazenar as amostras purificadas no freezer a -20°C até que seja realizada a Reação de Marcação Fluorescente (**ficha técnica n° 9**).

## Reação de Marcação Fluorescente

A reação de marcação fluorescente é realizada em placa de 96 poços e, para cada amostra realizamos duas reações, uma com o primer forward ED31 e outra com o primer reverse ED33.

A preparação da placa deve ser realizada na capela de nested.

- Preparar um mix de reagentes com o primer ED31 e outro com o primer ED33 em tubos tipo eppendorf, de acordo com a quantidade de amostras e seguindo o quadro abaixo:

REAGENTES	MIX PARA UM EXAME
Big Dye (Versão 3.1)	2,0 µL
Buffer 5X	3,0 µL
Primer (3,2pmol/ µL)	1,0 µL
Água estéril	13,0 µL

- Preparar uma reação separada para o padrão pGem (aproximadamente 4 receitas por placa) seguindo a receita:

REAGENTES	MIX PARA UM EXAME
Big Dye (versão 3.1)	2,0 µL
Buffer 5X	3,0 µL
Primer M13 (3,2pmol/ µL)	2,0 µL
Água estéril	12,0 µL
DNA (pGem)	1,0 µL

- Distribuir 20 µL da reação do pGem em cada pocinho;
- Aliquotar 19 µL do mix de reagentes para as amostras em cada poço da placa;
- Adicionar 1 µL do produto purificado da amostra a ser seqüenciada (caso seja necessário a utilização de 2 µL de amostra, diminuir a quantidade de água do mix para 11 µL);
- Homogeneizar pipetando suavemente (duas a três vezes);
- Anotar a seqüência em que as amostras foram aplicadas na placa;
- Colocar a placa no termociclador;
- Ajustar a manta de plástico em cima da placa para evitar a evaporação das amostras;
- Prosseguir com a seguinte ciclagem:

*POP - Biologia Molecular – Hemocentro de Botucatu*

---

Step 1 (1 ciclo)	Step 2 (35 ciclos)	Step 3 (1 ciclo)
95°C 5 min.	96°C 10 seg. (1°C/s até 53°C) 50°C 5 seg. 60°C 4 min.	4°C ∞

- ✚ Após o término da ciclagem, retirar a manta e selar a placa com adesivo próprio;
- ✚ Embrulhar a placa em papel alumínio;
- ✚ Estocar em freezer -20°C até a realização da precipitação em placa.



### **Precipitação em Placa**

- ✚ Colocar a placa com as amostras em uma estante de gelo;
- ✚ Preparar a solução de isopropanol para uma placa, adicionando 1.100 µL de água MilliQ estéril a 3.300 µL de isopropanol 99%;
- ✚ Colocar 80 µL da solução de isopropanol em cada poço, com a pipeta multicanal ou monocanal;
- ✚ Agitar a placa no vortex durante 1 minuto;
- ✚ Deixar a placa em repouso e embrulhada em papel alumínio à temperatura ambiente por 15 minutos;
- ✚ Centrifugar a placa a 4000 rpm por 25 minutos;
- ✚ Desprezar de uma vez na pia todo o isopropanol da placa;
- ✚ Colocar a placa invertida em cima de papel absorvente e sem fiapo;
- ✚ Preparar à parte uma solução de álcool 70% adicionando 4.290 µL de água MilliQ estéril a 10.010 µL de etanol 100%;
- ✚ Colocar 200 µL da solução de álcool 70% em cada poço da placa;
- ✚ Agitar a placa no vortex por 2 minutos;
- ✚ Centrifugar a placa por 5 minutos a 4000 rpm;
- ✚ Desprezar de uma vez na pia, por inversão, todo o álcool 70% da placa;
- ✚ Colocar a placa invertida em cima de papel absorvente e sem fiapo;
- ✚ Forrar o suporte da centrífuga com papel absorvente e colocar a placa invertida em cima do suporte;
- ✚ Dar um “spin down” na placa, centrifugando-a por 1 minuto a 1000 rpm.
- ✚ Secar a placa sem a manta plástica no termociclador com a tampa aberta por 2 minutos a 90°C;
- ✚ Retirar a placa do termociclador e tampa-la com o adesivo plástico;
- ✚ Guardar a placa no freezer -20°C embrulhada em papel alumínio até o início do processo de desnaturação das amostras.

### **Aplicação do *loading buffer* e desnaturação das amostras**

- ✚ Acrescentar 2,0  $\mu$ L da solução “loading buffer” (azul) em cada poço da placa com uma pipeta;
- ✚ Centrifugar a placa por 10 segundos a 1000 rpm, para que o azul desça para o fundo do poço;
- ✚ Agitar a placa no vortex durante 1 minuto;
- ✚ Desnaturar as amostras a 95°C por 3 minutos no termociclador;
- ✚ Deixar a placa em estante com gelo até a aplicação das amostras no gel de sequenciamento.

## **Seqüenciamento automático**

- ✚ Proceder segundo descrito nas fichas técnicas n°s. 11, 12, 13, 14 e 15 do POP de Sequenciamento do Laboratório de Biologia Molecular (2005).

### **Preparação do Gel de Agarose 2,0%**

- ✚ Observar a capacidade de volume da cuba.
- ✚ Para cuba pequena (aproximadamente 40mL de volume):
  - ✚ Pesar 0,8g de agarose em um erlenmeyer;
  - ✚ Acrescentar 40mL de TEB 0,5X (**ficha técnica n°.14**);
  - ✚ Tampar o erlenmeyer com um pedaço de filme PVC e fazer alguns furos no plástico;
  - ✚ Ferver por 1 minuto e meio no microondas (potência máxima);
  - ✚ Retirar do microondas com cuidado e aguardar até que o líquido fique morno.
  - ✚ Adicionar 1,0 µL de brometo de etídeo a 10mg/mL;
  - ✚ Homogeneizar balançando o erlenmeyer gentilmente até que o brometo se dissolva por completo;
  - ✚ Despejar o conteúdo na cuba;
  - ✚ Aguardar até que o gel polimerize totalmente (endureça);
  - ✚ Proceder com a aplicação das amostras.
- ✚ Para cuba grande (aproximadamente 80mL de volume):
  - ✚ Pesar 1,6g de agarose em um erlenmeyer.
  - ✚ Acrescentar 80mL de TEB 0,5X (**ficha técnica n°.14**).
  - ✚ Proceder com os mesmos passos descritos acima

### Preparo dos reagentes utilizados na técnica

✚ **TEB 10X** (Tampão para corrida da eletroforese)

Tris .....27g  
EDTA.....25 mL de solução a 0,2M  
Ácido Bórico.....13,75 g  
Água Milli Q .....qsp 250mL  
Acertar o pH em 8,0  
Autoclavar  
Estocar a 4°C

✚ **TEB 0,5X** (Tampão para corrida da eletroforese e preparo do gel)

Para preparar 500mL:  
25mL.....TEB 10X  
475mL.....Água Milli Q

✚ **Loading Buffer** (Tampão azul para aplicação no gel de sequenciamento)

- Preparar uma solução com 500µL de EDTA 0,5M pH 8,0 e 9500 µL de água Milli Q autoclavada;
- Pesar 0,5g de blue dextran e adicionar a essa solução;
- Homogeneizar bem (o volume será 10mL);
- Preparar uma diluição com 1 parte dessa segunda solução para 5 partes de formamida deionizada (1500µL de formamida para 300µL de solução);
- Aliquotar e armazenar a 4°C.

✚ **Tampão de amostra 5X** (Tampão azul para aplicação no gel de agarose)

Para preparar 10mL:  
Glicerol ..... 5mL  
TEB10X.....2,5mL  
Azul de Bromofenol (5%)...400µL  
Água MilliQ.....2,1mL  
Estocar a 4°C.