

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/02/2021.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**FRANCIELLE MARTINS SANTOS**

**Construção de uma Biblioteca de Anticorpos Anti-ZIKA**  
**Vírus**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Patologia.

Orientador: Profa Dra Rejane Maria Tommasini Grotto

Coorientador: Dra Flávia Hebeler Barbosa Trovão

**Botucatu**  
**2019**

FRANCIELLE MARTINS SANTOS

Construção de uma Biblioteca de Anticorpos Anti-ZIKA  
Vírus

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Patologia.

Orientador: Profa Dra Rejane Maria Tommasini Grotto

Coorientador: Dra Flávia Hebelers Barbosa Trovão

Botucatu  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Santos, Francielle Martins.

Construção de uma biblioteca de anticorpos anti-ZIKA  
Vírus / Francielle Martins Santos. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de  
Botucatu

Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto  
Coorientador: Flávia Hebelers Barbosa Trovão  
Capes: 40105008

1. Microbiota. 2. Doenças - Prevenção. 3. Pesquisa. 4.  
Armazenamento de dados.

Palavras-chave: Anticorpos; Biblioteca; Fab; ZIKA Vírus .

*Dedicatória*

*Dedico este trabalho...*

*...Aos meus amados pais, Luzia e João pela oportunidade de uma boa formação, por todo amor e zelo durante esse percurso.*

*Agradecimientos*

Aos meus pais, sem vocês, nada disso seria possível.

À professora e orientadora Dra. Rejane, pela oportunidade, apoio e pela confiança até mesmo nos momentos que duvidei da minha capacidade. Muito obrigada pela oportunidade e ensinamentos.

À minha coorientadora Dra. Flávia, pelo auxílio técnico e disponibilidade para resolução de problemas, para que conseguíssemos chegar ao objetivo proposto.

À Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini, por disponibilizar o laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro, para realização deste trabalho.

Aos queridos funcionários e amigos do laboratório (Rotina e Pesquisa) pelo nosso cafezinho de todos os dias, por todo apoio e suporte.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Com vocês, divido minha alegria.



*Epígrafe*

*“Uma criança, um professor, um livro e  
um lápis, podem mudar o mundo.”*

*(Malala Yousafzai)*

# *Prefácio*

*Neste volume é apresentada a Dissertação de Mestrado de Francielle Martins Santos.*

*Este trabalho foi subdividido em capítulos da forma que se segue: (I) Levantamento Teórico: breve descrição dos conceitos e bibliografia para contextualizar o cenário de desenvolvimento do trabalho; (II) Objetivos do trabalho; (III) Versão preliminar do artigo: An optimized guide to construction of the Fragment Antigen Binding (FaB) using PCR overlap from clinical samples with ZIKV, nas normas da revista Nature Protocols; (IV) Material Suplementar: Considerando que a revista Nature Protocols é exclusiva para modelos de artigos em formato de protocolos experimentais optou-se por acrescentar um capítulo para complementação; (V) Conclusão: breve conclusão do trabalho realizado evidenciando sua contribuição para a academia; (VI) Artigo: HPA -1a/1b could be considered molecular predictor of poor prognostic in chronic Hepatitis C, artigo submetido à Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.*

*Resumo*

Bibliotecas conformacionais de anticorpos vem constituindo importantes ferramentas na investigação científica de imunoglobulinas expressas em diferentes situações biológicas incluindo patologias. O conhecimento e elucidação estrutural de anticorpos diferenciais produzidos em patologias distintas pode representar ferramenta molecular fundamental para a intervenção na fisiopatologia da doença; incluindo diagnóstico diferencial, identificação de biomarcadores, terapêutica baseada em imunoglobulinas para bloqueio de patógenos bem como, contribuir para a constituição de painéis de anticorpos capazes de identificar epítomos agregando, também, informações para avanços no desenvolvimento de vacinas. A maior dificuldade atualmente reportada na literatura científica é a obtenção *in vitro* dos fragmentos Fab (*Fragment Antigen Binding*) devido à ausência de informações metodológicas das fases experimentais necessárias à construção do Fab, substrato essencial a construção de bibliotecas de anticorpos. Uma abordagem ainda inédita neste contexto é o desenvolvimento de uma metodologia experimental eficiente para a obtenção de bibliotecas de Fab na infecção pelo vírus ZIKA (ZIKV). A infecção pelo vírus ZIKA (ZIKV) vem sendo associada à casos de microcefalia em neonatos de gestantes infectadas e síndrome de *Guillain-Barré*, a neutralização viral baseada em anticorpos dirigidos contra epítomos específicos é pouco conhecida, a maioria dos estudos se referem a outros *Flavivirus*. A resposta imunológica humoral é essencial a proteção contra os *Flavivirus*, por isso é importante conhecer os mecanismos desenvolvidos pelo sistema imunológico do hospedeiro na presença do vírus. Assim, a finalidade deste estudo foi a criação de uma metodologia experimental, com delineamento ainda inédito na literatura, para obtenção do Fab a partir de pacientes com infecção ativa pelo ZIKV e, a obtenção de uma biblioteca de Fab dos anticorpos expressos nestes pacientes. A metodologia utilizada no presente estudo foi adaptada de Andris-Widhopf, et al. (2000) e Barbas et al. (2001). Os resultados obtidos mostraram o desenvolvimento de uma nova metodologia para construção do Fab anti-ZIKV, sugerindo que o detalhamento metodológico é essencial para o sucesso na obtenção da biblioteca, o que inexistia nos artigos anteriores que abordam a construção de bibliotecas conformacionais de anticorpos. Em conclusão a construção do Fab e, de bibliotecas de anticorpos apresentam variabilidades individuais na dependência do patógeno e, das diferentes etapas experimentais do processo. Palavras Chave: Anticorpos, Biblioteca, Fab, ZIKA Vírus

*Abstract*

Conformational libraries of antibodies have become important tools for the scientific investigation of immunoglobulins expressed under different biological situations, including pathological conditions. The knowledge and structural elucidation of differential antibodies produced during distinct pathological conditions may be fundamental for intervention in the pathophysiology of diseases, including differential diagnosis, biomarker identification, immunoglobulin-based therapy for pathogen blocking, and constitution of antibody panels for identifying epitopes for vaccine advancement. Currently, the greatest difficulty reported in the scientific literature is the lack of methodological information for the experimental phases necessary for *in vitro* construction of Fab (Antigen Binding Fragment), an essential substrate for antibody library construction. In this context, an efficient experimental methodology for obtaining Fab libraries in ZIKA (ZIKV) virus infection is as yet unreported. ZIKV infection has been associated with cases of microcephaly in neonates of infected pregnant women and those with Guillain-Barré syndrome. However, viral neutralization based on antibodies directed against specific epitopes is not well understood, therefore, most studies have been carried out on other Flaviviruses. The humoral immune response is essential for protection against Flaviviruses; hence, it is important to understand the mechanisms of the host immune system against this virus. Thus, the purpose of this study was to develop a novel experimental methodology to obtain Fab from active ZIKV-infected patients and generate a Fab library of the antibodies expressed in these patients. The methodology used in the present study was adapted from those reported by Andris-Widhopf et al. (2000) and Barbas et al. (2001). The results showed the successful development of a new methodology for the construction of anti-ZIKV Fab, suggesting that the methodological details are essential for successfully creating the library. Such details are not presented in previous studies on the construction of conformational libraries of antibodies. In conclusion, the construction of the Fab and antibody libraries presents individual variabilities in the dependence of the pathogen, and of the different experimental stages of the process.

Keywords: Antibodies, Library, Fab, ZIKA Virus



## *Sumário*

Resumo .....	11
Abstract .....	13
1. Levantamento Teórico .....	17
ZIKA Vírus (ZIKV) .....	18
Casos descritos e distribuição .....	19
Vias de Infecção e Tropismo.....	20
Detecção do ZIKV .....	21
Anticorpos.....	22
Biblioteca Conformacional de anticorpos .....	26
Referências Bibliográficas .....	29
2. Objetivos.....	37
3. Artigo: segundo normas Nature Protocols.....	39
An optimized guide to construction of the Fragment Antigen Binding (FaB) using overlap PCR from clinical samples with ZIKV .....	40
Resumo .....	40
Introdução.....	41
4. Material Suplementar.....	68
Material Suplementar A: Amostras incluídas no estudo .....	69
Material Suplementar B: Avaliação da qualidade do RNA.....	74
Material Suplementar C: Amplificação dos fragmentos das variáveis $V_{\kappa}$ e $V_H$ .....	76
Material Suplementar D: Amplificação dos fragmentos das constantes $C_{\kappa}$ e $C_H$ .....	79
Material Suplementar E: PCR <i>overlap</i> para cadeias H e $\kappa$ .....	80
Material Suplementar F: PCR <i>overlap</i> para o Fab ( $H+\kappa$ ).....	82
Referências Bibliográficas .....	83
5. Conclusões.....	84
6. Artigo Submetido .....	86

# *1. Levantamento Teórico*

## ZIKA Vírus (ZIKV)

O Zika Vírus (ZIKV) foi isolado pela primeira vez em 1947 em Uganda na África, durante um estudo sobre a febre amarela em macacos Rhesus na floresta de Zika. No ano seguinte o vírus foi novamente isolado a partir do mosquito *A. africanus*, sugerindo tratar-se de um arbovírus. Outros estudos esporádicos mostraram evidências sorológicas da existência da infecção humana pelo ZIKV na África e Ásia(1).

O ZIKV pertence à família *Flaviviridae* com organização genômica e estrutural semelhante a outros flavivírus. Apresenta genoma de RNA em fita simples de polaridade positiva, com 10,8 *kilobases* de comprimento, com uma única região aberta de leitura (*ORF – Open Reading Frame*) flanqueado por duas regiões não traduzidas (5' e 3' UTR – *untranslated region*). A ORF codifica uma poliproteína com 3419 aminoácidos que é clivada em três proteínas estruturais e sete não estruturais. As proteínas estruturais são proteína do capsídeo (C), pré-membrana/membrana (prM) e, proteína do envelope (E)(2). A figura 1 representa um esquema da estrutura do ZIKV.

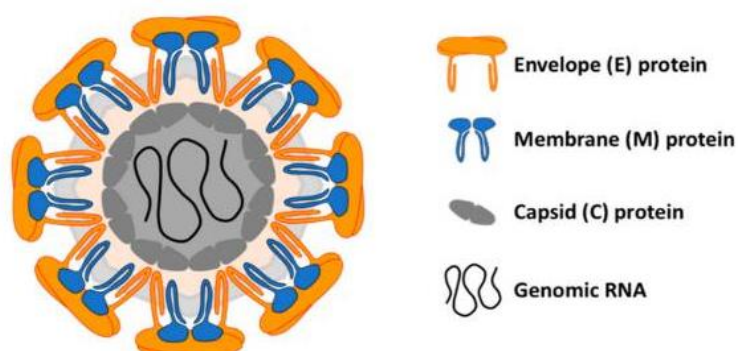


Figura 1. Esquema representativo do ZIKV evidenciando RNA genômico (preto), proteína do capsídeo (cinza) cujo conjunto constituem o nucleocapsídeo viral; proteína de membrana (azul) e do envelope (amarelo) que se inserem em uma bicamada lipídica icosaédrica (Adaptado de Ávila-Pérez, 2018)(3).

As sete proteínas não estruturais estão envolvidas na replicação viral, sendo que apenas as proteínas NS3 e NS5 possuem atividade enzimática conhecida, as proteínas NS1, NS2A, NS2B, NS4A, NS4B desempenham funções de cofatores enzimáticos, auxiliam no rearranjo citoplasmático para replicação viral, participam no bloqueio da sinalização de *interferon* e evasão da resposta imune. A figura 2 ilustra a organização genômica do RNA do ZIKV e a poliproteína resultante de sua expressão(4,5).

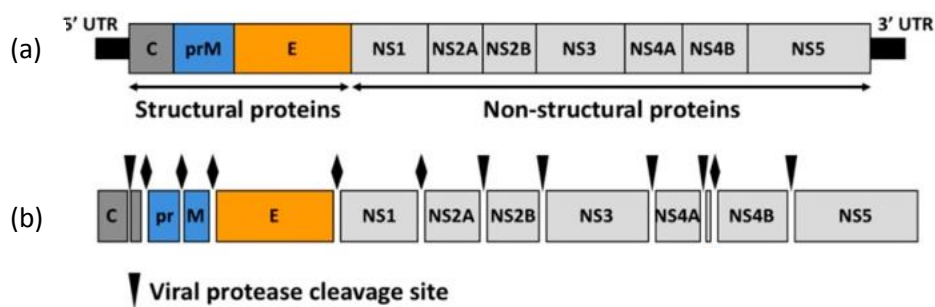


Figura 2. (a) Esquema representativo do genoma do ZIKV, evidenciando as regiões codificadoras das proteínas do capsídeo (cinza escuro), membrana (azul) do envelope (laranja) e, em cinza claro as regiões codificadoras das proteínas não estruturais. Genoma flanqueado pelas regiões não traduzidas, 5'UTR e 3'UTR em preto. (b) Representação esquemática da poliproteína codificada pelo genoma viral, evidenciando em cinza escuro, azul e laranja as proteínas estruturais e, em cinza claro as proteínas não estruturais. As setas pretas representam o local de clivagem pelas proteases da poliproteína codificada pelo genoma viral. (Adaptado de Ávila-Pérez, 2018)(3).

## Referências Bibliográficas

1. Lanciotti, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1232–9 (2008).
2. Gourinat, A.-C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C. & Dupont-Rouzeyrol, M. Detection of Zika Virus in Urine. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 84–86 (2015).
3. Ridgeway, J. A. & Timm, A. E. Comparison of RNA isolation methods from insect larvae. *J. Insect Sci.* **14**, (2014).
4. Barbas, C. F. *Phage display : a laboratory manual.* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

## *5. Conclusões*

De acordo com os objetivos propostos nesse estudo concluiu-se que:

1-Um método com detalhamento inovador foi desenvolvido para obtenção do Fab a partir de amostras clínicas de pacientes com infecção ativa pelo ZIKA vírus.

2-Uma biblioteca de Fab a partir de pacientes com ZIKV, construída por PCR *overlap*, foi obtida, estando armazenada no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.