



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 Hebeler 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 Hebelar 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 Yousafzaí)

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 inexiste 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_{κ} e V_H	76
Material Suplementar D: Amplificação dos fragmentos das constantes C_{κ} e C_H	79
Material Suplementar E: PCR <i>overlap</i> para cadeias H e κ	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.

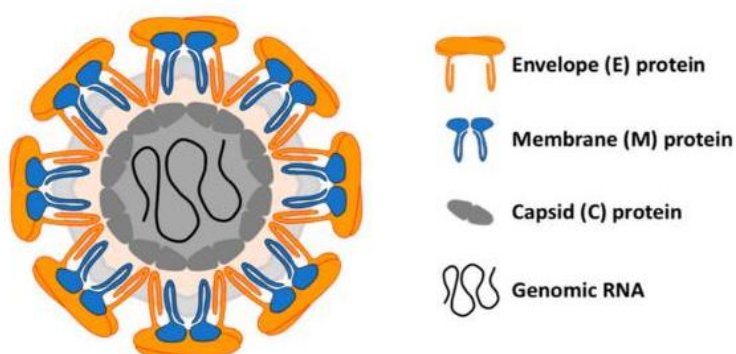


Figura 1. Esquema representativo do ZIKV evidenciando RNA genômico (preto), proteína do capsídeo (cinza) cujo conjunto constituem o nucleocapsídeo viral; proteína de membrana (azul) e do envelope (amarelo) que se inserem em uma bicamada lipídica icosaédrica (Adaptado de Ávila-Pérez, 2018)(3).

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).

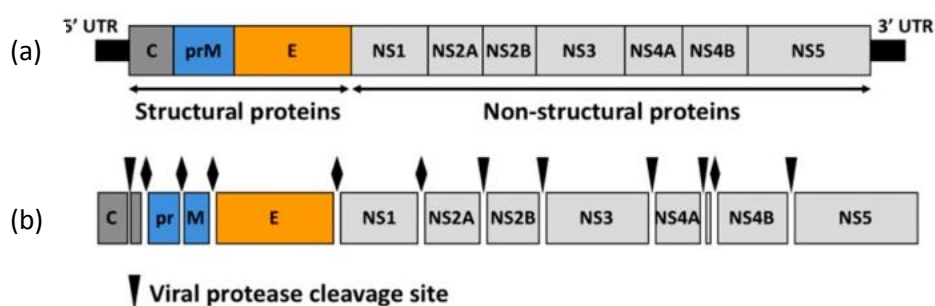


Figura 2. (a) Esquema representativo do genoma do ZIKV, evidenciando as regiões codificadoras das proteínas do capsídeo (cinza escuro), membrana (azul) do envelope (laranja) e, em cinza claro as regiões codificadoras das proteínas não estruturais. Genoma flanqueado pelas regiões não traduzidas, 5'UTR 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).

Casos descritos e distribuição

Até o final do século XX casos raros de infecção pelo ZIKV se mantiveram restritos a África e Ásia, sem relato de mortes, sendo considerada uma infecção

benigna, mas em 2007 houve um surto relatado fora da África e da Ásia, na Micronésia e outro grande surto que ocorreu em outubro de 2013 na Polinésia Francesa. A infecção acabou se disseminando para outras Ilhas do Pacífico e, em seguida, para o Brasil(6).

A grande preocupação e, emergência em saúde pública relacionada às infecções por ZIKV se deve a associação entre a presença do vírus e a microcefalia em neonatos, documentada ao final de 2015, e/ou a síndrome de *Guillain-Barré* (reação autoimune à componentes do sistema nervoso)(7).

Mundialmente, as principais variantes virais descritas são a africana e asiática, sendo que as linhagens americanas descritas no último surto possuem homologia à linhagem asiática. Mutações gênicas entre as duas linhagens homólogas podem ter gerado alterações fenotípicas com impacto na neurovirulência do ZIKV(8).

Vias de Infecção e Tropismo

A via de transmissão do ZIKV mais comum é a picada de artrópodes, sendo, o *Aedes aegypti* o principal vetor na zona urbana embora outras vias já tenham sido descritas como a transmissão sexual, por transfusão sanguínea e a transmissão vertical(9–12). O RNA viral já foi detectado em outros fluídos corporais, como o leite, urina, sêmen e saliva.

Embora algumas moléculas de superfície já tenham sido associadas como prováveis receptores virais, muitos tipos celulares podem constituir reservatório biológico para o vírus devido ao seu tropismo por diferentes tecidos. Alguns receptores já descritos incluem AXL e Tyro3 que pertencem à mesma família TAM (Tyro3 Axl Mer) do grupo de receptores tirosina quinase responsáveis por adesão celular e pela regulação da resposta imune inata, o receptor TIM1 pertence à família TIM (*T cell immunoglobulin domain and the mucin domain protein*) e é responsável pela modulação da resposta imune inata e adaptativa, TLR3 e TLR8 da família TLR

(*toll-like receptors*) e ambos possuem função de reconhecimento de vírus de RNA, RIG-I e MDA5 pertencem à mesma família LRLs (*retinoic acid-inducible gene-I-like receptors*) associados à regulação na imunidade inata e reconhecimentos de vírus de RNA, DC-SIGN desempenha papel importante de adesão celular na superfície de células dendríticas e macrófagos(5,13–17).

No tecido nervoso, as principais células alvo são as progenitoras neurais (NPC's) em embriões, porém em adultos o vírus também consegue infectar células neurais como as astroglias, micróglia e neurônios(18). No que se refere aos outros tecidos já foi demonstrada a presença do vírus nas células da pele como aos fibroblastos dérmicos e queratinócitos epidérmicos, em células do sistema imune como células dendríticas e monócitos (CD14⁺ e CD16⁺), dos testículos (células de Sertoli e espermatozoides), dos rins (célula mesangial renal, podócito glomerular e Célula Endotelial Glomerular Renal), da retina (pericitoretiniano, células endoteliais microvasculares da retina) e da placenta (células de Hofbauer, trofoblastos e células endoteliais)(19–25).

Deteção do ZIKV

Em zonas endêmicas com outros flavivírus o número real de pessoas infectadas com o ZIKV provavelmente é subestimado devido a reação cruzada em testes sorológicos, principalmente se o indivíduo foi exposto previamente a outro flavivírus em especial o vírus da Dengue ou recebeu a vacina contra febre amarela(26–28). Hoje o padrão ouro de sorodiagnóstico para diferenciação de flavivírus é o teste de neutralização por redução de placa (PRNT), porém não é um teste simples e demanda tempo para obtenção do resultado devendo estar associado ao diagnóstico molecular(29).

A falta de especificidade das reações sorológicas para o ZIKV baseadas em interação antígeno-anticorpo vem sendo relacionada à patogênese viral embora não exista um consenso nos dados publicados até o momento. Alguns estudos mostram

que a presença de anticorpos neutralizantes específicos à outros flavivírus pode estar relacionada a efeito protetor ao indivíduo infectado pelo ZIKV(30,31) e, por outro lado, existem estudos que demonstraram que a presença de anticorpos contra outros flavivírus pode contribuir para a exacerbação da doença causada pelo ZIKV, da mesma forma como ocorre com a reinfecção por dengue de outros sorotipos(32,33).

O diagnóstico molecular apesar de ser mais específico também possui um limitante que é o curto período de viremia do ZIKV no paciente infectado, com média de sete dias para detecção por PCR em Tempo-Real utilizando plasma. Estudos mostraram que a urina pode ser um fluido biológico útil no diagnóstico do ZIKV, considerando que estudos vem demonstrando que o RNA viral apresenta níveis mais elevados quando comparados aos detectáveis no plasma. A literatura científica reporta que a detecção do ZIKV utilizando urina como material fonte pode ser realizada por PCR em Tempo Real por um período médio de 15 dias(34).

Anticorpos

Os anticorpos são proteínas altamente específicas, com síntese estimulada pela presença de um antígeno e, fundamentais na resposta imune adaptativa humoral de vertebrados. Estas proteínas, da família das imunoglobulinas, apresentam uma estrutura monomérica básica constituída por quatro cadeias polipeptídicas, duas pesadas e duas leves. As cadeias pesadas são unidas entre si por pontes dissulfeto e, cada cadeia pesada está ligada à uma cadeia leve por pontes dissulfeto e interações não covalentes. Tanto as cadeias pesadas quanto as leves possuem regiões constantes e regiões variáveis quanto à sequência de aminoácidos. A região constante da cadeia pesada define a classe do anticorpo, podendo ser μ (IgM), γ (IgG), δ (IgD), α (IgA), ϵ (IgE). Já as cadeias leves podem ser do tipo κ e λ , sendo κ a mais comum na espécie humana. Com esta organização a unidade monomérica do anticorpo é simétrica, adquirindo a forma de Y(35).

A região variável (aminoterminal) do anticorpo é denominada *Fragment Antigen Binding* (Fab) e, em suas extremidades formam-se alças hipervariáveis denominadas regiões determinantes de complementariedade (CDR), que irão formar o sítio combinatório dos anticorpos. Essas regiões são divididas em CDR1, CDR2 e CDR3, sendo a CDR3 a mais variável, essas regiões participam intensamente com a ligação com os antígenos. A região constante da estrutura do anticorpo (carboxiterminal) é denominada fração cristalizável (Fc)(36). A figura 3 ilustra a estrutura monomérica básica do anticorpo.

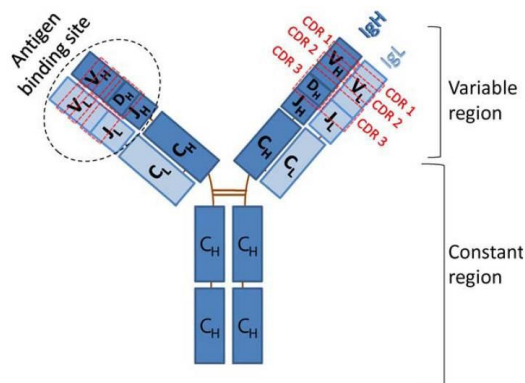


Figura 3. Esquema da estrutura monomérica do anticorpo, constituído de duas cadeias pesadas (IgH) em azul escuro e duas cadeias leves (IgL) em azul claro. Ambas cadeias possuem regiões variáveis (VH e VL), regiões de junção (JH e JL) e regiões constantes (CH e CL). Em vermelho estão as regiões hipervariáveis (CDR). (Adaptado de Hwang, 2015)(37)

O código genético para o anticorpo se encontra em três *loci* independentes, a cadeia pesada é codificada no cromossomo 14, a cadeia leve κ no 2 e, λ no 22. No entanto, a síntese do anticorpo não é um processo simples. Ainda em nível de DNA, durante a maturação do linfócito B, ocorre recombinação de segmentos gênicos específicos denominados V e J para a cadeia leve e; V, D e J para a cadeia pesada gerando éxons rearranjados, o que garante a alta diversidade de anticorpos encontrada nos organismos vivos. Assim, depois da estimulação antigênica, durante a transcrição e processamento do RNA o éxon previamente rearranjado VDJ na cadeia pesada se justapõe com um dos éxons $C\mu$, $C\gamma$, $C\alpha$, $C\epsilon$ ou $C\delta$. Para a cadeia

leve, o éxon rearranjado VJ se une a, preferencialmente, C κ na espécie humana(38,39). Sequências altamente conservadas denominadas sequências de sinais de recombinação (RSSs) estão próximas dos segmentos V(D)J e reconhecidas pelas proteínas RAG1 e RAG2 (*Recombination Activating Gene*) que irão auxiliar na recombinação dos segmentos, as duas proteínas quando complexadas são conhecidas como recombinase(40,41). A figura 4 representa o processo de recombinação das cadeias pesada e leve dos anticorpos.

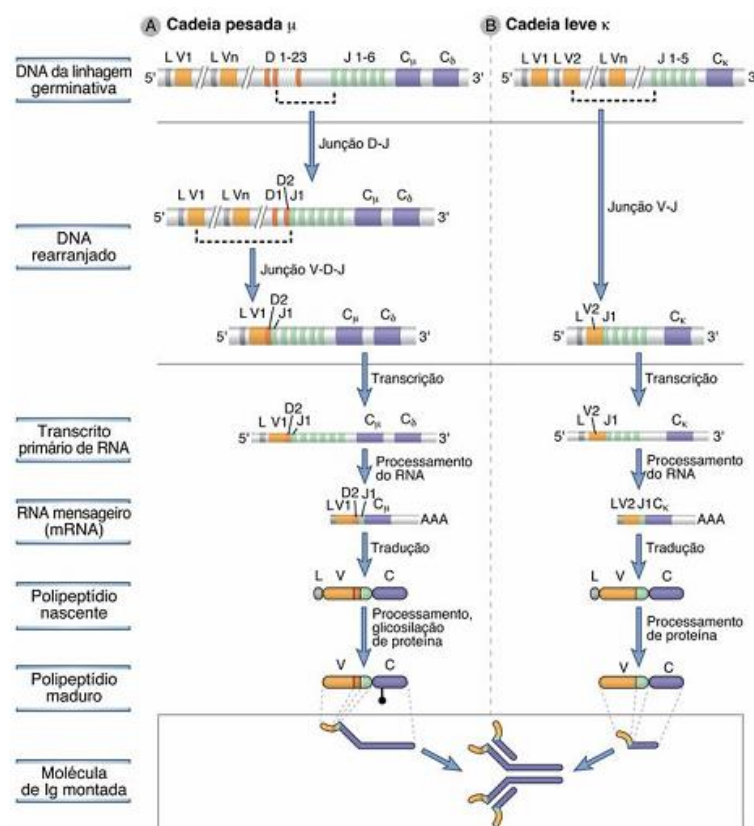


Figura 4. Sequência das etapas do rearranjo gênico da cadeia pesada (A) e cadeia leve (B) até a expressão do anticorpo. (Adaptado de Abbas e Lichtman, 2014)(42).

A variabilidade do anticorpo ainda pode aumentar quando o linfócito B é ativado pelo contato com o antígeno podendo ocorrer uma mutação denominada

hipermutação somática, o que colabora com o aumento da afinidade do anticorpo com o antígeno. Anticorpos com baixa afinidade também podem ser gerados, porém células secretoras de anticorpos com baixa afinidade irão ser induzidas a apoptose(37,43).

A produção de anticorpos se dá pela diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos, que irão produzir os anticorpos nos órgãos linfoides secundários e na medula óssea. Dentre as funções dos anticorpos, estão a neutralização que consiste na ligação dos anticorpos em receptores na superfície do agente infeccioso impedindo sua ligação aos receptores celulares. A opsonização que compreende o revestimento da superfície de microrganismo por anticorpos IgG, sua porção Fc em contato com fagócitos facilita a fagocitose dos microrganismos(44). A Citotoxicidade Mediada por Células Dependente de Anticorpo (ADCC) que envolve o reconhecimento por células efectoras de células sinalizadas por anticorpos, principalmente o Linfócito *Natural Killer* (NK) que irão destruí-la. A via clássica do sistema complemento tem a participação de anticorpos IgG e IgM que se ligam a proteínas do complemento que induzem a lise, fagocitose e inflamação(45). A neutralização intracelular dependente de anticorpos (ADIN) consiste em anticorpos ligados a vírus sem envelope serem carregados para dentro das células por endocitose, dentro da célula a porção Fc dos anticorpos se ligam ao receptor TRIM21 localizado no citosol, esse receptor pertence à família TRIM (*tripartite motif containing*) que desempenha papel importante na resposta antiviral, a regulação positiva de TRIM21 evita a replicação viral e recruta linfócitos(46,47).

Embora nem todos os anticorpos produzidos durante a infecção pelo ZIKV sejam neutralizantes estudos já demonstraram que anticorpos neutralizantes dirigidos contra a proteína do envelope do ZIKV bem como anticorpos induzidos pela presença de flavivírus podem ser importantes na resposta imunológica do hospedeiro à infecção, ficando evidente que a resposta imunológica humoral pode contribuir na proteção ao vírus(48,49).

Biblioteca Conformacional de anticorpos

Conhecer a diversidade de anticorpos colabora com o entendimento do sistema imunológico, que traz como benefício a produção de novas terapias, diagnóstico e vacinas, devido sua alta especificidade e baixa toxicidade. Por essa razão, têm alto potencial de aplicação na indústria farmacêutica(50). Hoje vários anticorpos monoclonais estão disponíveis para tratamento principalmente de doenças autoimune e câncer, alguns biomarcadores também são utilizados para o diagnóstico e para identificar o grau da doença(51–53).

A engenharia de anticorpos monoclonais vem evoluindo ao longo dos anos com o avanço da biotecnologia. A primeira tecnologia para obtenção de anticorpos foi a do hibridoma na qual células do baço de um camundongo imunizado eram fusionadas com células do mieloma, porém anticorpos totalmente murinos são imunogênicos o que dificulta a utilização terapêutica. Outras tecnologias surgiram, dentre elas os anticorpos quiméricos nos quais apenas as regiões variáveis são murinas, esta técnica foi aprimorada e os anticorpos passaram a ser conhecidos como humanizados por possuírem apenas alças hipervariáveis murinas combinadas em um anticorpo humano. A Figura 5 ilustra um modelo de anticorpo quimérico e um humanizado. Para obtenção de anticorpos totalmente humanos foi desenvolvida a técnica de camundongos transgênicos que produzem IgG humana(54,55).

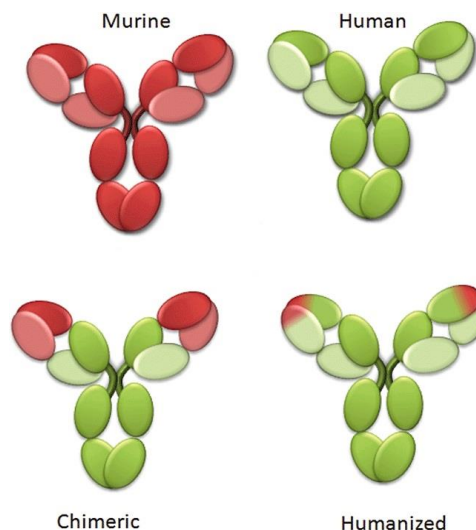


Figura 5. Representação da estrutura dos anticorpos quiméricos e humanizados. Em vermelho regiões murinas e em verde regiões humanas (Adaptado de Chames, 2009)(54).

A construção e seleção de bibliotecas conformacionais de anticorpos *in vitro* passou a ser amplamente utilizada, expressos principalmente na superfície de fagos filamentosos e leveduras(56,57). Esta metodologia constitui alternativa à obtenção de anticorpos monoclonais, apresentando a vantagem de não necessitarem de humanização para uso terapêutico como ocorre com os anticorpos monoclonais murinos(58,59). As bibliotecas conformacionais de anticorpos podem ser construídas a partir do mRNA de indivíduos infectados por determinado patógeno, pacientes portadores de tumores ou outra condição patológica, animais imunizados com o antígeno de interesse, naive (repertório não selecionado pelo antígeno) e, até mesmo sequencias de anticorpos sintéticas(60,61).

Depois da construção de bibliotecas de anticorpos é necessário a seleção dos anticorpos com antígenos específicos. Muitos estudos clássicos vêm realizando esta fase utilizando reações imunológicas baseadas em interação antígeno-anticorpos(62,63). Outra estratégia para a seleção a biblioteca é o sequenciamento de nova geração (NGS), que elimina o viés de outros métodos tradicionais de seleção que podem perder anticorpos de alta afinidade por serem pouco representativos na amostra e, possibilita a obtenção de repertórios de anticorpos de alta produtividade(64).

Algumas bibliotecas construídas contra vírus já descritas incluem anticorpos anti HIV-1, Influenza H1N1, Coronavírus(65–67).

Assim, diferentes abordagens para obtenção de anticorpos são descritas na literatura científica, embora diferentes tecnologias possam ser associadas buscando melhores benefícios, como otimização do experimento, aumento na capacidade de triagem e melhor compreensão do repertório analisado.

Independente da abordagem metodológica escolhida etapa fundamental do processo é a obtenção das frações variáveis seja na forma de cadeia simples (*single chain*) ou de Fab(68–70).

Considerando a grande divergência de metodologias descritas na literatura para obtenção do Fab a ser utilizado na expressão de bibliotecas o que gera grande demanda de investimentos e tempo para a adequação metodológica em cada situação biológica a proposta deste estudo foi desenvolver um protocolo otimizado para obtenção do Fab em pacientes portadores de ZIKV com o maior detalhamento possível, incluindo obstáculos, dificuldades, limitações técnicas e estratégias de sucesso para superá-los.

Referências Bibliográficas

1. Dick GW., Kitchen S., Haddock A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952; 46(5):509–20.
2. Ye Q, Liu Z-Y, Han J-F, Jiang T, Li X-F, Qin C-F. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. *Infect Genet Evol.* 2016; 43:43–9.
3. Ávila-Pérez G, Nogales A, Martín V, Almazán F, Martínez-Sobrido L. Reverse Genetic Approaches for the Generation of Recombinant Zika Virus. *Viruses.* 2018; 10(11).
4. Brand C, Bisailon M, Geiss BJ. Organization of the Flavivirus RNA replicase complex. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2017; 8(6).
5. Lee I, Bos S, Li G, Wang S, Gadea G, Desprès P, et al. Probing Molecular Insights into Zika Virus–Host Interactions. *Viruses.* 2018; 10(5).
6. Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Santhana RS, Dye C. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull World Health Organ.* 2016; 94(9):675–686C.
7. World Health Organization. Zika virus outbreaks in the Americas. *Relev Epidemiol Hebd.* 2015; 90(45):609–10.
8. Beaver JT, Lelutiu N, Habib R, Skountzou I. Evolution of Two Major Zika Virus Lineages: Implications for Pathology, Immune Response, and Vaccine Development. *Front Immunol.* 2018; 9:1640.
9. Driggers RW, Ho C-Y, Korhonen EM, Kuivanen S, Jääskeläinen AJ, Smura T, et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *N Engl J Med.* 2016; 374(22):2142–51.

10. Sakkas H, Bozidis P, Giannakopoulos X, Sofikitis N, Papadopoulou C. An Update on Sexual Transmission of Zika Virus. *Pathogens*. 2018; 7(3):66.
11. Magnus MM, Espósito DLA, Costa VA da, Melo PS de, Costa-Lima C, Fonseca BAL da, et al. Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2018; 40(3):250–4.
12. Pereira L. Congenital Viral Infection: Traversing the Uterine-Placental Interface. *Annu Rev Virol*. 2018; 5(1):273–99.
13. Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2010; 235(1):172–89.
14. Tsou W-I, Nguyen K-QN, Calarese DA, Garforth SJ, Antes AL, Smirnov S V, et al. Receptor tyrosine kinases, TYRO3, AXL, and MER, demonstrate distinct patterns and complex regulation of ligand-induced activation. *J Biol Chem*. 2014; 289(37):25750–63.
15. Reikine S, Nguyen JB, Modis Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. *Front Immunol*. 2014; 5:342.
16. Wang J, Qiao L, Hou Z, Luo G. TIM-1 Promotes Hepatitis C Virus Cell Attachment and Infection. *J Virol*. 2017; 91(2).
17. Liu P, Ridilla M, Patel P, Betts L, Gallichotte E, Shahidi L, et al. Beyond attachment: Roles of DC-SIGN in dengue virus infection. *Traffic*. 2017; 18(4):218–31.
18. Tabata T, Petitt M, Puerta-Guardo H, Michlmayr D, Wang C, Fang-Hoover J, et al. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe*. 2016; 20(2):155–66.
19. Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep*. 2017; 18(2):324–33.

20. Stefanik M, Formanova P, Bily T, Vancova M, Eyer L, Palus M, et al. Characterisation of Zika virus infection in primary human astrocytes. *BMC Neurosci.* 2018; 19(1):5.
21. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. Diamond MS, editor. *J Virol.* 2015; 89(17):8880–96.
22. Michlmayr D, Andrade P, Gonzalez K, Balmaseda A, Harris E. CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nat Microbiol.* 2017; 2(11):1462–70.
23. Sun X, Hua S, Chen H-R, Ouyang Z, Einkauf K, Tse S, et al. Transcriptional Changes during Naturally Acquired Zika Virus Infection Render Dendritic Cells Highly Conducive to Viral Replication. *Cell Rep.* 2017; 21(12):3471–82.
24. Sheng Z-Y, Gao N, Wang Z-Y, Cui X-Y, Zhou D-S, Fan D-Y, et al. Sertoli Cells Are Susceptible to ZIKV Infection in Mouse Testis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7:272.
25. Roach T, Alcendor DJ. Zika virus infection of cellular components of the blood-retinal barriers: implications for viral associated congenital ocular disease. *J Neuroinflammation.* 2017; 14(1):43.
26. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1232–9.
27. Calvet GA, Santos FB dos, Sequeira PC. Zika virus infection: epidemiology, clinical manifestations and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2016; 29(5):459–66.
28. Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J, Edupuganti S, et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113(28):7852–7.

29. Maeda A, Maeda J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Vet J* [Internet]. 2013; 195(1):33–40.
30. Swanstrom JA, Plante JA, Plante KS, Young EF, McGowan E, Gallichotte EN, et al. Dengue Virus Envelope Dimer Epitope Monoclonal Antibodies Isolated from Dengue Patients Are Protective against Zika Virus. *MBio*. 2016; 7(4).
31. Grifoni A, Pham J, Sidney J, O'Rourke PH, Paul S, Peters B, et al. Prior Dengue virus exposure shapes T cell immunity to Zika virus in humans. Dermody TS, editor. *J Virol* . 2017; 91(24).
32. Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol*. 2016; 17(9):1102–8.
33. Paul LM, Carlin ER, Jenkins MM, Tan AL, Barcellona CM, Nicholson CO, et al. Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. *Clin Transl Immunol*. 2016; 5(12):e117.
34. Gourinat A-C, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika Virus in Urine. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(1):84–6.
35. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 1996; 381(6585):751–8.
36. Stewart AK, Schwartz RS. Immunoglobulin V regions and the B cell. *Blood*. 1994; 83(7):1717–30.
37. Hwang JK, Alt FW, Yeap L-S. Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. In: *Mobile DNA III*. American Society of Microbiology; 2015. p. 325–48.
38. Hsu E, Pulham N, Rumfelt LL, Flajnik MF. The plasticity of immunoglobulin gene systems in evolution. *Immunol Rev*. 2006; 210(1):8–26.

39. Steiniger SCJ, Dunkle WE, Bammert GF, Wilson TL, Krishnan A, Dunham SA, et al. Fundamental characteristics of the expressed immunoglobulin VH and VL repertoire in different canine breeds in comparison with those of humans and mice. *Mol Immunol*. 2014; 59(1):71–8.
40. Agrawal A, Eastman QM, Schatz DG. Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature*. 1998; 394(6695):744–51.
41. Carmona LM, Schatz DG. New insights into the evolutionary origins of the recombination-activating gene proteins and V(D)J recombination. *FEBS J*. 2017; 284(11):1590–605.
42. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 8th ed. 2014.
43. Jenne CN, Kennedy LJ, McCullagh P, Reynolds JD. A new model of sheep Ig diversification: shifting the emphasis toward combinatorial mechanisms and away from hypermutation. *J Immunol*. 2003; 170(7):3739–50.
44. VanBlargan LA, Goo L, Pierson TC. Deconstructing the Antiviral Neutralizing-Antibody Response: Implications for Vaccine Development and Immunity. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016; 80(4):989–1010.
45. Rodgers KR, Chou RC. Therapeutic monoclonal antibodies and derivatives: Historical perspectives and future directions. *Biotechnol Adv*. 2016; 34(6):1149–58.
46. Foss S, Watkinson R, Sandlie I, James LC, Andersen JT. TRIM21: a cytosolic Fc receptor with broad antibody isotype specificity. *Immunol Rev*. 2015; 268(1):328–39.
47. Rhodes DA, Isenberg DA. TRIM21 and the Function of Antibodies inside Cells. *Trends Immunol*. 2017; 38(12):916–26.
48. Dai L, Wang Q, Qi J, Shi Y, Yan J, Gao GF. Molecular basis of antibody-

- mediated neutralization and protection against flavivirus. *IUBMB Life*. 2016; 68(10):783–91.
49. Heinz FX, Stiasny K. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017; 81(1).
 50. Berger M, Shankar V, Vafai A. Therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Am J Med Sci*. 2002; 324(1):14–30.
 51. Murad JP, Lin OA, Espinosa EVP, Khasawneh FT. Current and experimental antibody-based therapeutics: insights, breakthroughs, setbacks and future directions. *Curr Mol Med*. 2013; 13(1):165–78.
 52. Kennedy PJ, Oliveira C, Granja PL, Sarmento B. Monoclonal antibodies: technologies for early discovery and engineering. *Crit Rev Biotechnol*. 2018; 38(3):394–408.
 53. Krawczyk K, Kelm S, Kovaltsuk A, Galson JD, Kelly D, Trück J, et al. Structurally Mapping Antibody Repertoires. *Front Immunol*. 2018; 9:1698.
 54. Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, Baty D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol*. 2009; 157(2):220–33.
 55. Saeed AFUH, Wang R, Ling S, Wang S. Antibody Engineering for Pursuing a Healthier Future. *Front Microbiol*. 2017; 8:495.
 56. Sheehan J, Marasco WA. Phage and Yeast Display. *Microbiol Spectr*. 2015; 3(1):AID-0028-2014.
 57. Schröter C, Beck J, Krah S, Zielonka S, Doerner A, Rhiel L, et al. Selection of Antibodies with Tailored Properties by Application of High-Throughput Multiparameter Fluorescence-Activated Cell Sorting of Yeast-Displayed Immune Libraries. *Mol Biotechnol*. 2018; 60(10):727–35.

58. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. 1990; 348(6301):552–4.
59. Maranhão AQ, Brígido M de M. Humanização de anticorpos de interesse clínico. *Biotechnol Ciência e Desenvolv*. 2001; 38–43.
60. Tiller T, Schuster I, Deppe D, Siegers K, Strohn R, Herrmann T, et al. A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties. *MAbs*. 2013; 5(3):445–70.
61. Kim S, Park I, Park SG, Cho S, Kim JH, Ipper NS, et al. Generation, Diversity Determination, and Application to Antibody Selection of a Human Naïve Fab Library. *Mol Cells* . 2017; 40(9):655–66.
62. Barbas CF. *Phage display : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
63. Dantas-Barbosa C, Brígido MM, Maranhão AQ. Construction of a human Fab phage display library from antibody repertoires of osteosarcoma patients. *Genet Mol Res*. 2005; 4(2):126–40.
64. Rouet R, Jackson KJL, Langley DB, Christ D. Next-Generation Sequencing of Antibody Display Repertoires. *Front Immunol*. 2018; 9:118. A
65. Tung C-P, Chen I-C, Yu C-M, Peng H-P, Jian J-W, Ma S-H, et al. Discovering neutralizing antibodies targeting the stem epitope of H1N1 influenza hemagglutinin with synthetic phage-displayed antibody libraries. *Sci Rep*. 2015; 5(1):15053.
66. Lopes RS, Queiroz MAF, Gomes STM, Vallinoto ACR, Goulart LR, Ishak R. Phage display: an important tool in the discovery of peptides with anti-HIV activity. *Biotechnol Adv*. 2018; 36(7):1847–54.
67. Zhao G, He L, Sun S, Qiu H, Tai W, Chen J, et al. A Novel Nanobody Targeting Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Receptor-

Binding Domain Has Potent Cross-Neutralizing Activity and Protective Efficacy against MERS-CoV. Gallagher T, editor. J Virol. 2018; 92(18).

68. Andris-Widhopf J, Steinberger P, Fuller R, Rader C, Barbas CF. Generation of Human Fab Antibody Libraries: PCR Amplification and Assembly of Light- and Heavy-Chain Coding Sequences. Cold Spring Harb Protoc. 2011; 2011(9):pdb.prot065565-pdb.prot065565.
69. Andris-Widhopf J, Steinberger P, Fuller R, Rader C, Barbas CF. Generation of Human scFv Antibody Libraries: PCR Amplification and Assembly of Light- and Heavy-Chain Coding Sequences. Cold Spring Harb Protoc. 2011; 2011(9):pdb.prot065573-pdb.prot065573.
70. Nelson MD, Fitch DHA. Overlap Extension PCR: An Efficient Method for Transgene Construction. Methods Mol Biol. 2012; 772:459–70.

2. Objetivos

1- Elaborar uma abordagem metodológica inovadora para obtenção do Fab a partir de amostras clínicas de pacientes infectadas pelo ZIKA vírus com infecção ativa.

2- Construir uma biblioteca de Fab que representem os anticorpos expressos nos pacientes incluídos no estudo.

3. *Artigo: segundo normas*
Nature Protocols

An optimized guide to construction of the Fragment Antigen Binding (FaB) using overlap PCR from clinical samples with ZIKV

Francielle Martins Santos^{1,2}, Flavia Hebler Barbosa Trovão^{1,2}, Leonardo Nazário de Moraes^{1,3}, Carlos Magno Fortaleza², Maria Inês de Moura Campos Pardini^{1,2}, Rejane Maria Tommasini Grotto^{1,3}

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Hemocentro de Botucatu, Hospital das Clínicas, Laboratório de Biologia Molecular, Botucatu, SP, Brasil; ²Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu, Campus de Botucatu, SP, Brasil; ³Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Campus de Botucatu, SP, Brasil. Correspondência deve ser enviada para R.M.T.G. (e-mail: rejane.grotto@unesp.br).

Resumo

A construção do segmento gênico Fab (*Fragment Antigen Bindin*) por PCR *overlap* é uma técnica de baixo custo, alto rendimento e não há a necessidade da humanização dessas moléculas, quando comparada com técnicas convencionais para obtenção de anticorpos monoclonais. A técnica consiste em utilizar longos *primers* para fusionar as sequências gênicas das cadeias variáveis com as constantes dos anticorpos para diferentes aplicações. Apesar de ser uma técnica que é cada vez mais utilizada com finalidades diagnósticas, profiláticas e/ou terapêuticas, a literatura carece de informações detalhadas sobre a metodologia uma vez que o sucesso do método se encontra no detalhamento metodológico. No presente artigo se apresenta uma metodologia com detalhamento ainda não apresentado na literatura para a construção do segmento Fab a partir de pacientes com infecção ativa pelo ZIKV. Este protocolo pode ser desenvolvido, depois de padronizado em um período de seis meses desde que se disponha das amostras biológicas utilizadas como ponto de partida. Embora este método foi aqui proposto para ser utilizado para construção de fragmentos Fab pode ser adaptado para segmentos. scFv.

Introdução

Desenvolvimento e Aplicações do Método

A PCR *overlap* consiste em uma tecnologia que vem sendo utilizada em biotecnologia para construção de vetores e plasmídeos recombinantes^{1,2}. A tecnologia envolve a união de sequências de DNA sem a necessidade de utilização de enzimas de restrição ou estratégias de ligação convencionais utilizadas nos procedimentos de geração de moléculas de DNA recombinantes. De maneira geral, PCR utilizando *primers* longos (entre 20 e 30 nucleotídeos) são realizadas para a amplificação dos segmentos gênicos de interesse de forma muito similar a uma PCR convencional sendo que o diferencial consiste no fato dos *primers* utilizados apresentarem uma cauda complementar que será utilizada, em uma segunda etapa, para união dos fragmentos amplificados que se deseja fusionar³. A figura 1 ilustra um modelo de amplificação por PCR *overlap*.

Esta tecnologia vem sendo utilizada para construção do segmento gênico Fab (*Fragment Antigen Binding*) de anticorpos humanos. Os anticorpos humanos apresentam estrutura monomérica simétrica na forma de Y sendo constituídos de duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, sendo que tanto as cadeias leves quanto pesadas apresentam regiões constantes e variáveis em sua sequência de aminoácidos. A porção variável do anticorpo é denominada *Fragment Antigen Binding* (Fab) e, em sua extremidade originam-se três alças polipeptídicas hipervariáveis denominadas regiões determinantes de complementariedade (CDR), que constituem o sítio combinatório dos anticorpos⁴.

A porção variável da cadeia pesada (VH) é constituída por três conjuntos de segmentos gênicos (V, D, J) enquanto as das cadeias leves (V κ ou V λ) por apenas dois (V, J). A formação da cadeia pesada dos anticorpos ocorre, inicialmente, pela justaposição de um segmento D com um J e, em seguida com um V, originando um rearranjo VDJ que, é posteriormente unido a cadeia constante. Processo similar ocorre para formação da cadeia leve sendo que, nesse caso, a justaposição é apenas VJ e, posteriormente com a cadeia constante⁵. A região VH possui cerca de 50 segmentos gênicos funcionais conhecidos e a V κ , tipo de cadeia leve mais

frequente na espécie humana, cerca de 44. Esses segmentos são divididos em famílias sendo que já foram descritas sete famílias (VH1 a VH7) para VH e, sete para V κ (V κ 1 a V κ 7). São considerados segmentos da mesma família quando os mesmos apresentam 80% de homologia quanto à sequência de nucleotídeos⁶⁻⁸.

Esta hipervariabilidade dos anticorpos é a principal justificativa para a utilização da técnica de PCR *overlap* para geração do Fab humano uma vez que *primers* específicos para todas as famílias de VH e V κ podem ser desenhados para amplificação da maioria das famílias expressas no momento biológico de interesse sendo que todos estes *primers* devem ser desenhados com caudas que permitam a posterior fusão dos produtos VH e V κ amplificados com os segmentos gênicos codificadores das cadeias constantes⁹. A figura 1 ilustra esta estratégia de amplificação.

Uma das principais aplicações para o fragmento Fab produzido por PCR *overlap* é funcionar como material fonte para a construção de bibliotecas conformacionais de anticorpos que constituem coleções de biomoléculas variantes, nas quais cada constituinte apresenta uma forma distinta que determinará a capacidade de sua interação com uma molécula alvo¹⁰. Já foram descritas bibliotecas de anticorpos dirigidos contra tumores, tétano, doenças neurodegenerativas, e alguns vírus, mas até o momento não há metodologia descrita para obtenção do Fab utilizado para construção de bibliotecas de anticorpos anti Zika vírus¹¹⁻¹⁵.

Embora o desenvolvimento deste método tenha sido para gerar Fab anti-ZIKV as estratégias aqui descritas também podem ser aplicadas para obtenção de fragmentos variáveis de cadeia única (scFvs).

Comparação com outros métodos

Ao longo dos anos tecnologias foram surgindo para obtenção de anticorpos cada vez menos imunogênicos, dentre eles estão os anticorpos murinos, anticorpos quiméricos 70% humanos, anticorpos humanizados 90% humanos e os anticorpos

humanos produzidos por camundongos transgênicos. No entanto, todas as técnicas aqui citadas são de difícil execução e alto custo, com a vantagem de produção de moléculas completas de anticorpos^{16,17}.

A técnica de obtenção do Fab *in vitro* por PCR *overlap* apresenta a vantagem de produção de amplo repertório de anticorpos, em menor tempo, com um menor investimento, embora apresente a desvantagem de não produzir o anticorpo completo e, sim uma fração dele (Fab). Outra particularidade é a chance de amplificar segmentos gênicos menos expressos que *in vivo* podem apresentar menor representatividade na resposta imunológica do hospedeiro, embora tais segmentos possam ser utilizados para desenvolvimento de moléculas exógenas que podem ser utilizadas com finalidades diagnósticas, profiláticas e/ou terapêuticas^{16,18}.

Delineamento experimental : considerações importantes

Obtenção do RNA a partir de amostras clínicas

Na tecnologia de PCR *overlap* o grupo ou grupos do estudo representativos da situação biológica investigada (no caso deste estudo, amostras de pacientes com RNA do ZIKV detectável por PCR em Tempo Real – **Material Suplementar A**) devem ser abordados na forma de *pool*. Desta forma, o momento de constituição do *pool* deve ser um fator a ser considerado. Maior eficácia do protocolo aqui descrito foi observada quando o *pool* foi constituído depois da extração de RNA quando comparado ao *pool* de sangue total e/ou *buffy coat*.

Neste contexto, o RNA deve ser extraído individualmente de cada amostra incluída no protocolo (foram utilizadas cinco amostras no presente protocolo) e, posteriormente o *pool* de RNA deve ser constituído. Pode-se optar, se necessário, pela extração de RNA em replicata da mesma amostra para elevar a concentração de RNA obtido considerando que, se este procedimento for adotado, a representatividade dos anticorpos expressos nesta amostra serão majoritários sobre as demais de forma sendo assim é importante que a extração de RNA em replicata

seja realizada para todas as amostras incluídas no protocolo se esta opção metodológica for realizada.

A coleta, transporte e armazenamento das amostras são essenciais para obtenção de material genético integro principalmente devido à instabilidade do RNA, susceptível a ação de nucleases celulares. Idealmente, a extração de RNA a partir de amostra de sangue total recentemente coletada resulta na obtenção de RNA de melhor qualidade no que se refere à integridade^{19,20}. Além da integridade, outro fator fundamental para a tecnologia de PCR *overlap* é a concentração do RNA do pool para dar prosseguimento a tecnologia. A tecnologia proposta por Barbas e colaboradores (2001)⁹ preconiza a utilização de 20µg de RNA como ponto de partida para a continuidade do método (amplificação das cadeias variáveis do anticorpo), sendo esta a única literatura disponível que destaca a importância desta elevada concentração. Esse parâmetro busca garantir que exista representatividade para a biblioteca a ser construída⁹. A maioria dos estudos não menciona a concentração de RNA total de partida para a construção do segmento Fab^{21,22} sendo esta uma inovação do presente estudo que pode fornecer subsídios metodológicos como ponto de partida para outros pesquisadores na área. No presente protocolo foi utilizada uma concentração de RNA 16µg, mostrando que na dependência da necessidade podem ser testadas concentrações próximas a idealmente proposta desde que se comprove a variabilidade e representatividade do Fab nas etapas subsequentes.

Assim, para se atingir a concentração ideal além de extração de RNA em replicatas das amostras pode-se optar pela extração de RNA do *buffy coat*, o que foi realizado nesse estudo por contar com participantes que não estão em acompanhamento no serviço e, obtenção de nova amostra foi inviável (**Material Suplementar B**).

Muitos estudos vêm utilizando estratégias de enriquecimento de RNA para minimizar os contaminantes e obter maior concentração de material de qualidade como a precipitação com glicogênio como carreador do ácido nucleico^{23,24}, no entanto para a tecnologia de PCR *overlap* esta estratégia foi pouco eficiente.

A obtenção de RNA livre de contaminação com DNA é essencial para o sucesso da construção da biblioteca, pois a diversidade dos anticorpos é resultante de vários processos, os quais ocorrem naturalmente durante os diversos estágios de diferenciação do linfócito B, incluindo rearranjos gênicos. Desta forma, o DNA que codifica os anticorpos no linfócito se encontra rearranjado e pode competir pela ligação ao *primer* utilizado na metodologia²⁵ e, se as etapas subsequentes fossem realizadas em amostras com DNA e RNA não seria possível distinguir se a amplificação das cadeias variáveis dos anticorpos ocorreu a partir do RNA (representando a expressão gênica real) ou a partir do DNA rearranjado em nível de linfócito B. A solução encontrada foi o tratamento do *pool* de RNA com a enzima DNase, enzima específica para degradação de DNA²⁶ (**Material Suplementar B**).

Primeira Etapa da PCR: Amplificação dos fragmentos genômicos codificadores das cadeias variáveis e constantes

O *pool* de RNA deve ser retrotranscrito, etapa menos crítica de todo protocolo. Na tecnologia de PCR *overlap* para geração do Fab nesta primeira etapa são gerados os fragmentos codificadores das cadeias variáveis pesada (VH) e leve do tipo κ (V κ) utilizando 12 reações de PCR separadas para VH e quatro para V κ para detecção das famílias majoritárias de cada um dos fragmentos que constituem o anticorpo. Cada reação de PCR utiliza uma combinação de *primers*, os quais para o Fab humano já foram descritos por Barbas e colaboradores (2001)⁹ (**Material Suplementar C**).

Consideração fundamental nessa fase envolvem a purificação dos produtos de PCR gerados uma vez que muitos fragmentos inespecíficos são gerados. A purificação dos fragmentos desejáveis (com 350-400pb) foi mais eficiente utilizando isolamento dos produtos de PCR a partir de gel de agarose a 2% depois da corrida eletroforética. A variação de 50pb que pode ocorrer entre as diferentes famílias dos fragmentos gênicos VH e V κ se justificam pela possibilidade de ocorrer inserção aleatória, deleção de nucleotídeos no segmento gênico e hipermutação somática

que, são mecanismos fisiológicos responsáveis pela ocorrência de maior variabilidade dos anticorpos^{9,27} (**Material Suplementar C**).

Importante considerar que a família VH2 mostra-se menos representada (**Material Suplementar C**), o que caracteriza uma subexpressão desta família, informação que é corroborada com a literatura, a superexpressão do VH2 é encontrada em algumas patologias como a dermatite atópica e espondilite anquilosante^{28,29}. O mesmo ocorre para as famílias V κ , sendo a V κ 1 a com maior número de segmentos gênicos funcionais³⁰.

Quanto à amplificação dos segmentos gênicos das regiões constantes (CH e C κ - **Material Suplementar D**) o uso desta metodologia propõe amplificação dos mesmos utilizando Fab clonado no fagomídeo *pComb3X* como material fonte, o que favorece uma amplificação de maior especificidade e, se torna viável por se tratar de regiões constantes quanto à sequência de aminoácidos.

Para a realização da PCR *overlap* a literatura preconiza uma concentração de VH (*pool* dos produtos purificados de todas as PCRs para VH) e V κ (*pool* dos produtos purificados de todas as PCRs para V κ) de 2 a 4 μ g no mínimo (Barbas et al., 2001). Assim, devido a eficiência das reações de PCR e, da grande quantidade de fragmentos inespecíficos gerados para a amplificação das cadeias variáveis VH e V κ uma média de 50 a 100 reações de PCR devem ser realizadas. Considerando a maior eficiência e especificidade das PCRs para as regiões constantes em média 10 a 20 PCRs são suficientes para atingir a concentração ideal.

Segunda Etapa: PCR *overlap* para obtenção dos segmentos gênicos H (VH+CH) e κ (V κ +C κ)

Nesta etapa as caudas dos *primers* reverse introduzidos pelas reações de PCR na primeira etapa para VH e V κ , sendo complementares ao início dos segmentos gênicos das regiões constantes CH e C κ respectivamente funcionarão como *linkers (overlap)* para a união de VH e CH (gerando segmento H) e V κ e C κ (gerando segmento κ) (Figura 1). Esta união ocorre durante uma segunda reação de

PCR (PCR *overlap*) utilizando *primers* que flanqueiem as regiões variáveis (*forward*) e constantes (*reverse*).

Esta é uma etapa crítica do método aqui proposto. A literatura científica tem reportado trabalhos que utilizaram a PCR *overlap* mas o detalhamento metodológico é superficial na maioria dos casos¹¹⁻¹⁵. Alguns artigos metodológicos vêm sendo publicados nos últimos anos, mas as informações metodológicas ainda são contraditórias. Alguns autores defendem que a otimização da reação de PCR *overlap* pode ser realizada alterando concentrações de *primers* e concentração de DNA (se esta estratégia for utilizada neste protocolo concentrações equimolares dos produtos devem ser utilizados) como em uma PCR convencional³¹, no entanto estas abordagens convencionais não apresentaram sucesso neste protocolo. Além disso, uma discrepância observada na literatura é o número de ciclos necessários a PCR *overlap*, sendo que alguns autores utilizam 30 a 35 ciclos segundo modelo da PCR convencional^{32,33} e, outros um menor número de ciclos de 10 a 15^{9,34,35}, uma vez que uma primeira amplificação já foi realizada. No protocolo aqui apresentado observa-se que a utilização de 15 ciclos de amplificação mostrou resultado otimizado com maior especificidade dos fragmentos gerados do que a utilização de um maior número de ciclos.

Notou-se que mesmo depois da otimização do protocolo o produto amplificado do tamanho esperado (750-800pb) não era visualizado na revelação, mas um excesso de material amplificado no poço do gel (**Material Suplementar E**).

Considerando que para PCR *overlap* que objetiva construção de Fab humano é necessária a utilização de *inputs* iniciais (produtos da primeira etapa de PCR - VH ou VK) e, que para o prosseguimento do método é necessário a purificação dos fragmentos (750-800pb) o que é realizado pelo isolamento dos fragmentos do gel de agarose 2% uma consideração importante é a diluição do produto da PCR *overlap* 1/10 em água ultrapura para a corrida eletroforética (**Material Suplementar E**). Isto se justifica, pois, a eletroforese é um método de separação de moléculas que consiste em separar os fragmentos de acordo com o tamanho, carga, forma e propriedades topológicas^{36,37}.

Assim, quando o produto da PCR *overlap* é carregado no gel a estrutura superhelicoidal, compacta e altamente concentrada impossibilita a separação e corrida adequada dos fragmentos considerando, ainda que o gel de agarose à 2% oferece uma tensão maior do que os de menor concentração para o deslocamento dessas moléculas^{38,39}. Desta forma o sucesso somente é alcançado com a diluição, abordagem não reportada na literatura até o momento, sugerindo que possam estar existindo elevadas perdas de material durante os protocolos experimentais realizados. A redução do número de ciclos da PCR que já minimiza a concentração de moléculas associada à diluição do produto que reduz o enovelamento e acúmulo de moléculas foi o crítico para o sucesso do protocolo.

Da mesma forma que na primeira etapa deste método para a realização da segunda PCR *overlap* (próxima etapa) a literatura preconiza uma concentração de H e κ de 2 a 4 μ g, no mínimo. (Barbas et al., 2001)⁹. Embora menor número de ciclos de amplificação é necessário nessa etapa os produtos de PCR gerados apresentam-se de maior especificidade sendo necessárias entre 20 e 50 PCRs para atingir a concentração ideal. Para prosseguimento do protocolo *pools* dos produtos H e κ devem ser realizados.

Terceira Etapa: PCR *overlap* para obtenção do Fab (H+ κ)

Esta etapa consiste de nova reação de PCR *overlap* na qual os fragmentos H e κ serão unidos. A união destes fragmentos para formar o Fab ocorre porque uma sequência específica denominada *pelB leader sequence* foi introduzida nas caudas dos primers VH *forward* na primeira etapa a qual será reconhecida pela região *pelB leader* introduzido na cadeia C κ (Figura 1).

Por se tratar de nova reação de PCR *overlap* as mesmas considerações realizadas no item anterior devem ser observadas, sendo que devido ao tamanho superior deste fragmento (aproximadamente 1500pb) é uma etapa mais crítica.

A principal consideração desta etapa é acertar a concentração ideal para a reação. Foram realizados protocolos 10ng, 20ng, 30ng e 50ng de produto

amplificado e, o melhor resultado foi a concentração de 50ng em um volume final de 20µL. A banda apresentou um tamanho de aproximado de 1200pb, o valor de referência da literatura é de 1500pb (**Material suplementar F**).

Validação do Fab construído

Esta etapa consiste em uma estratégia para garantir de o fragmento construído constitui o segmento de interesse para avaliar suas aplicações e limitações de utilização.

Neste método se propõe a inserção do segmento construído em vetor construindo uma molécula recombinante, utilizada para transformar bactérias e sequenciamento destes clones.

Consideração importante desta etapa consiste em observar no segmento construído (visualizado no sequenciamento) a presença dos sítios de restrição (figura 1) se o mesmo for destinado à expressão ou, se este não estiver presente por eventuais perdas durante o procedimento experimental avaliar a possibilidade da utilização do fragmento construído (repetir o procedimento ou adaptar nova *overlap* para inserção da cauda com sítio de restrição adequado).

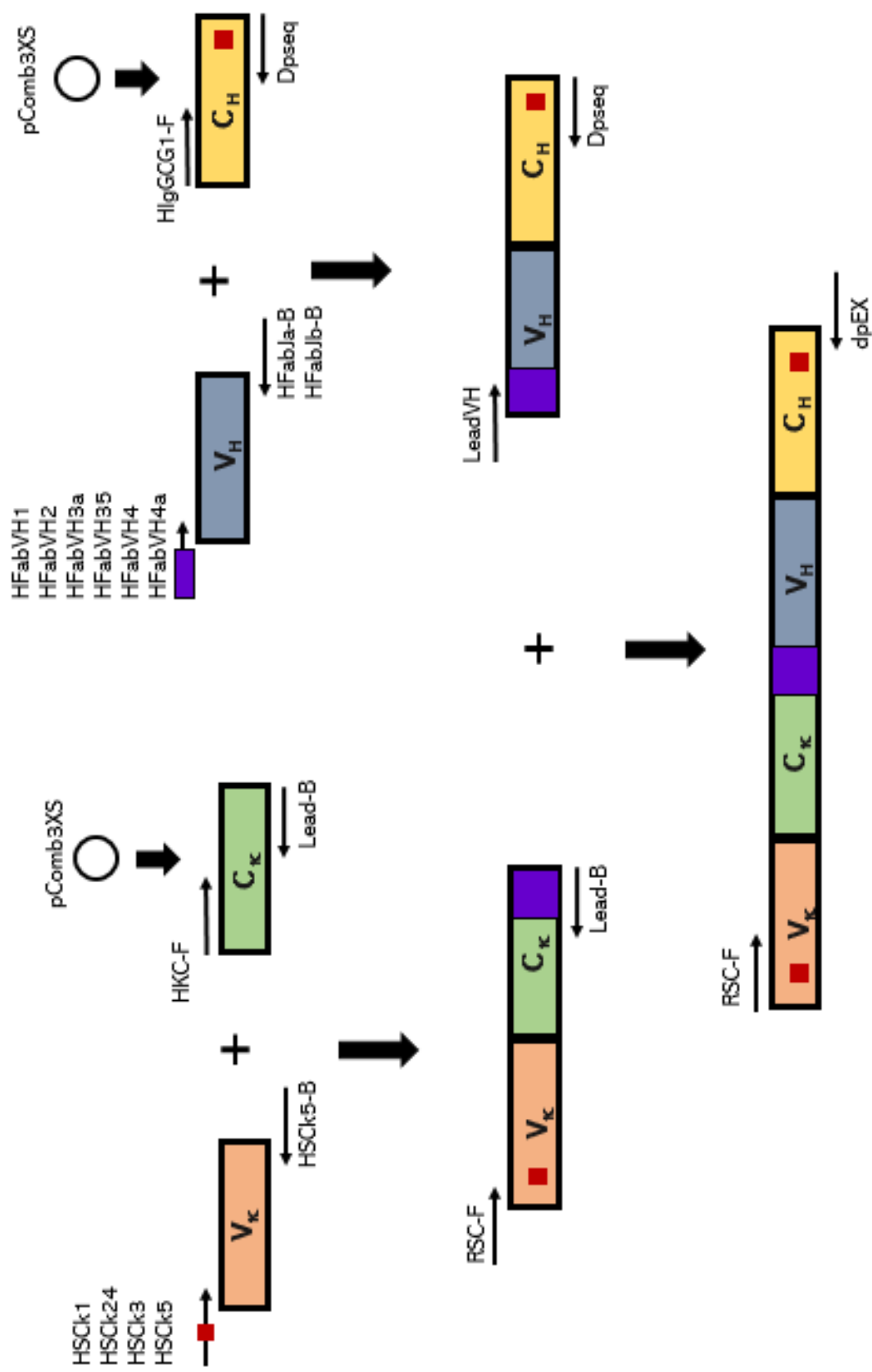


Figura 1. Esquema das amplificações: Primeira, Segunda e Terceira etapas. Primeira PCR amplifica famílias V H e V κ a partir do cDNA gerado do pool de RNA. Segunda PCR consiste na PCR *overlap* de V κ + C κ e PCR *overlap* de V H + C H . Terceira PCR representa a PCR *overlap* para união de V H _CH + V κ _C κ (Fab), evidenciando caudas inseridas pelos primers das cadeias variáveis para permitir a *overlap* dos fragmentos. Em roxo segmento *pe/B leader sequence* que permite a união das cadeias pesadas e leves. Em vermelho, inserido pelos primers sítio de restrição da enzima de restrição SfiI necessário para os estudos que objetivem inserir o Fab gerado posteriormente em vetores. (Adaptado de Barbas et al. 2001)⁹

Especialização necessária para a implementação do método

O método aqui proposto apresenta grande complexidade de forma que o responsável por sua implementação deve apresentar conhecimentos prévios em imunologia e biologia molecular avançadas além de domínio das tecnologias envolvidas em cada etapa.

Limitações

O método aqui proposto apresenta uma principal limitação de gerar parte da região codificadora do anticorpo e não a região completa. No entanto, o fragmento gerado é o responsável pela especificidade da resposta e, para aplicações futuras no desenvolvimento de terapias, vacinas, testes diagnósticos e perfil de anticorpos apresentará a complementaridade necessária uma vez que esta está contida nas regiões hipervariáveis (CDRs).

Na dependência da aplicação pode existir insucesso na última etapa da PCR (PCR *overlap* para geração do Fab) neste caso pode ser avaliada a utilização deste fragmento. Se o fragmento for utilizado para descrição de CDRs expressas, busca de biomarcadores o método pode ser finalizado na segunda etapa. No entanto, se a geração do segmento gênico Fab se destina a uma futura utilização na expressão destes anticorpos deve ser considerada a possibilidade de utilizar a metodologia de geração de *single chain*⁹, uma vez que os produtos da primeira e segunda etapa do método aqui descrito são instáveis para expressão.

PROCEDIMENTOS

Extração de RNA de sangue total e *buffy coat* para obtenção do RNA

1. As amostras devem estar a temperatura ambiente
2. Para cada 300µL de sangue total ou *buffy coat* adicionar 1mL de *Trizol* gelado.
3. Homogeneizar em vortex por 15 segundos e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Adicionar 200µL de clorofórmio gelado a cada mL de *Trizol* e novamente homogeneizar em vortex por 15 segundos, incubar em gelo por 3 minutos e centrifugar à 24.192xg por 15 minutos à 4°C.
5. Transferir a fase aquosa para um novo microtubo. Etapa Crítica Ao pipetar a fase aquosa evitar a contaminação com as outras fases extraídas.
6. Adicionar 500µL de isopropanol, homogeneizar por inversão, incubar por 10 minutos à 20°C e centrifugar em 32.928xg por 10 minutos à 4 °C.
7. Desprezar o sobrenadante, lavar o *pellet* com 1mL etanol 75% gelado e centrifugar à 32.928xg por 5 minutos à 4 °C.
8. Retirar o etanol e secar o pellet à temperatura ambiente.
9. Eluir o RNA extraído em 40µL de água ultrapura.
10. Após a extração, analisar a integridade do RNA por eletroforeses em gel de agarose 1% através da visualização das bandas correspondentes aos tipos de RNA ribossômico (rRNA) celulares 28S, 18S e 5S

Tratamento com DNase

11. A degradação do DNA contaminante deve ser realizada de acordo com as instruções do fabricante. Utilize material RNase-free.
12. Para avaliar a eficiência do método na eliminação da contaminação por DNA realizar eletroforese em gel agarose 1%, com *Gelred* 1X, corrida eletroforética à 90V, 4mA por 50 minutos em tampão Tris-Borato-EDTA 1X (TBE). A visualizar sob luz ultravioleta (UV).
13. Realizar a quantificação pelo fluorímetro *Qubit*® 2.0 com o kit *Qubit*® RNA HS Assay, segundo as especificações do fabricante.

Transcrição reversa

14. Mix para reação de transcrição reversa

Mix 1	Volume (μL)
Água RNase free	3
Primer (10μM)	1
RNA (750ng)	10
Total	14

Etapla Crítica: Preparar um *mix* para cada *primer* (IgG, IgM e Random – Figura 2). Incubar à 70 °C por 5 minutos e colocar imediatamente em gelo por 5 minutos.



Figura 2: Esquema da reação de Transcrição Reversa. Primers: IgG (GTCCACCTTGGTG TTGCTGGGCTT)⁹, IgM (TGGAAGAGGCACGTTCTTTTCTTT)⁹ e *Random* (Random Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Mix 2	Volume (μL)
Água RNase free	1.9
Improm II 5x Reaction Buffer	4
MgCl ₂ (25mM)	1.6
dNTP (10mM)	1
Improm II Reverse Transcriptase	2.5
Total	11

Etapla Crítica: Adicionar o Mix 2 individualmente em cada tubo já com o Mix 1. Total da reação é de 25μL.

15. Execute o seguinte programa de ciclagem:

Step 1 (n=1)	Step 2 (n=1)	Step 3 (n=1)
25 °C – 5 min	42 °C 1 h	4°C ∞

Amplificação das variáveis pesada (VH) e leve (VK)

16. Para amplificação das regiões variáveis tanto da cadeia leve como da cadeia pesada fazer a reação descrita abaixo utilizando as combinações de *primers* descritas no **Material Suplementar C**.

Mix	Volume (µL)
Água ultrapura	20
Master Mix 2x Go Taq Hot Start	25
Primer Reverse (10µM)	2
cDNA (25ng)	1
Total	48

Etapas Críticas: Aliquotar inicialmente no tubo vazio 2µL do *primer forward* e, em seguida aliquotar o mix.

17. Execute o seguinte programa de ciclagem:

Step 1 (n=1)	Step 2 (n=5)	Step 3 (n=40)	Step 4 (n=1)	Step 5 (n=1)
94 °C – 5 min	94 °C – 30 s	94 °C - 30 s	72 °C – 10 min	4°C - ∞
	30% <i>slope</i>	56 °C – 45 s		
	60 °C – 45 s	72 °C – 1 min e 30 s		
	72 °C 1 min e 30 s			

18. Para analisar e purificar os fragmentos, submeta os produtos à eletroforese em gel de agarose 2%, com *GelRed* 1X, com uma corrida eletroforética à 80V, 4mA por 1 hora e 20 minutos em TBE. Visualizar sob luz ultravioleta (UV).
19. Recuperar os fragmentos do gel utilizando o kit *Invisorb® Fragment Clean Up* de acordo com as especificações do fabricante e quantificar utilizando o kit *Qubit® dsDNA HS Assay*, fluorímetro *Qubit® 2.0*. Realizar tantas reações quanto forem necessárias até atingir a concentração mínima (2 a 4µg).
20. Separar os produtos purificados em dois *pools*, um *pool* das variáveis da cadeia leve (Vκ) e um com a cadeia variável pesada (VH).

Extração do fagomídeo com os fragmentos constantes da cadeia pesada (CH) e leve (Cκ) clonados

21. Extrair o DNA do fagomídeo pComb3X clonado em *E. coli* XL1 -Blue, o qual contém um molde *Fab* humano pelo kit *QIAprep Spin Miniprep*, de acordo com as especificações do fabricante.

Amplificação da cadeia CH

22. Para amplificação da cadeia de CH fazer a mistura de reação abaixo utilizando a combinação de *primers* descrita no **Material Suplementar D**.

<i>Mix</i>	Volume para uma reação (µL)
Água ultrapura	20.5
<i>Master Mix 2x Go Taq Hot Start</i>	25
<i>Primer Forward</i> (10µM)	2
<i>Primer Reverse</i> (10µM)	2
pComb purificado (77,2ng)	0.5
Total	50

23. Execute o seguinte programa de ciclagem:

Step 1 (n=1)	Step 2 (n=35)	Step 3 (n=1)	Step 4 (n=1)
94 °C – 5 min	94 °C – 30 s	72 °C – 10 min	4°C - ∞
	56 °C – 30 s		
	72 °C - 1 min e 30 s		

24. Para analisar e purificar os fragmentos, submeta os produtos à eletroforese em gel de agarose 2%, com *GelRed* 1X, com uma corrida eletroforética à 80V, 4mA por 1 hora e 20 minutos em TBE. Visualizar sob luz ultravioleta (UV).

25. Recuperar os fragmentos do gel utilizando o kit *Invisorb® Fragment Clean Up* de acordo com as especificações do fabricante e quantificar utilizando o kit *Qubit® dsDNA HS Assay*, fluorímetro *Qubit® 2.0*.

26. Realizar tantas reações quanto forem necessárias até atingir a concentração mínima (2 a 4µg).

Amplificação da cadeia Cκ

27. Para amplificação da cadeia de CH fazer a reação utilizando a combinação de primers descrita no **Material Suplementar D**.

Mix 2	Volume para uma reação (µL)
Água ultrapura	20.5
Master Mix 2x Go Taq Hot Start	25
Primer Forward (10µM)	2
Primer Reverse (10µM)	2
pComb purificado (77,2ng)	0.5
Total	50

28. Execute o seguinte programa de ciclagem:

Step 1 (n=1)	Step 2 (n=5)	Step 3 (n=40)	Step 4 (n=1)	Step 5 (n=1)
94 °C – 5 min	94 °C – 30 s	94 °C - 30 s	72 °C – 10 min	4°C - ∞
	30% <i>slope</i>	56 °C – 45 s		
	62 °C – 45 s	72 °C – 1 min e 30 s		
	72 °C 1 min e 30 s			

29. Para analisar e purificar os fragmentos, submeta os produtos à eletroforese em gel de agarose 2%, com *GelRed* 1X, com uma corrida eletroforética à 80V, 4mA por 1 hora e 20 minutos em TBE. Visualizar sob luz ultravioleta (UV).

30. Recuperar os fragmentos do gel utilizando o kit *Invisorb® Fragment Clean Up* de acordo com as especificações do fabricante e quantificar utilizando o kit *Qubit® dsDNA HS Assay*, fluorímetro *Qubit® 2.0*.

31. Realizar tantas reações quanto forem necessárias até atingir a concentração mínima (2 a 4µg).

Primeira PCR *overlap* da cadeia pesada (H)

32. Para união dos fragmentos da cadeia pesada VH + CH realizar a seguinte reação utilizando a combinação de *primers* descrita no **Material Suplementar E**.

Mix	Volume para uma reação (µL)
Água ultrapura	2.5
<i>Master Mix 2x Go Taq Hot Start</i>	10
<i>Primer Foward</i> (10µM)	1.6
<i>Primer Reverse</i> (10µM)	1.6
dNTP	0.5
Produto VH (20ng)	3
Produto CH (20ng)	0.5
Total	20

33. Execute o seguinte programa de ciclagem:

Step 1 (n=1)	Step 2 (n=15)	Step 3 (n=1)	Step 4 (n=1)
95 °C – 2 min	95 °C – 15 s	72 °C – 10 min	4°C - ∞
	50 °C – 30 s		
	72 °C – 2 min		

34. Para analisar e purificar os fragmentos, submeta os produtos à eletroforese em gel de agarose 2%, com *GelRed* 1X, com uma corrida eletroforética à 80V, 4mA por 1 hora e 20 minutos em TBE. Visualizar sob luz ultravioleta (UV).

35. Recuperar os fragmentos do gel utilizando o kit *Invisorb® Fragment Clean Up* de acordo com as especificações do fabricante e quantificar utilizando o kit *Qubit® dsDNA HS Assay*, fluorímetro *Qubit® 2.0*.

36. Realizar tantas reações quanto forem necessárias até atingir a concentração mínima (2 a 4µg).

Primeira PCR *overlap* da cadeia leve (κ)

37. Para união dos fragmentos da cadeia leve $V_{\kappa} + C_{\kappa}$ realizar a seguinte reação utilizando a combinação de primers descrita no **Material Suplementar E**.

Mix	Volume para uma reação (µL)
Água ultrapura	24.8
Master Mix 2x Go Taq Hot Start	10
Primer Forward (10µM)	1.6
Primer Reverse (10µM)	1.6
dNTP	0.5
Produto V_{κ} (20ng)	1
Produto C_{κ} (20ng)	0.5
Total	20

38. Execute o seguinte programa de ciclagem:

Step 1 (n=1)	Step 2 (n=15)	Step 3 (n=1)	Step 4 (n=1)
95 °C – 2 min	95 °C – 15 s	72 °C – 10 min	4°C - ∞
	56 °C – 30 s		
	72 °C – 2 min		

39. Para analisar e purificar os fragmentos, submeta os produtos à eletroforese em gel de agarose 2%, com *GelRed* 1X, com uma corrida eletroforética à 90V, 4mA por 1 hora e 20 minutos em TBE. Visualizar sob luz ultravioleta (UV).

40. Recuperar os fragmentos do gel utilizando o kit *Invisorb® Fragment Clean Up* de acordo com as especificações do fabricante e quantificar utilizando o kit *Qubit® dsDNA HS Assay*, fluorímetro *Qubit® 2.0*.

41. Realizar tantas reações quanto forem necessárias até atingir a concentração mínima (2 a 4µg).

Segunda PCR overlap - Fab

42. Para união dos fragmentos VH_CH + Vκ_Cκ realizar a seguinte reação utilizando a combinação de primers descrita no **Material Suplementar F**.

Mix	Volume para uma reação (µL)
Água ultrapura	3.27
<i>Master Mix 2x Go Taq Hot Start</i>	10
<i>Primer Foward</i> (10µM)	1.6
<i>Primer Reverse</i> (10µM)	1.6
dNTP	0.5
Produto H (50ng)	1.77
Produto κ (50ng)	1.26
Total	20

43. Execute o seguinte programa de ciclagem:

Step 1 (n=1)	Step 2 (n=15)	Step 3 (n=1)	Step 4 (n=1)
94 °C – 5 min	94 °C – 15 s	72 °C – 10 min	4°C - ∞
	65 °C – 45 s		
	72 °C – 2 min		

44. Para analisar e purificar os fragmentos, submeta os produtos à eletroforese em gel de agarose 2%, com *GelRed* 1X, com uma corrida eletroforética à 90V, 4mA por 1 hora e 20 minutos em TBE. Visualizar sob luz ultravioleta (UV).

45. Recuperar os fragmentos do gel utilizando o *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* de acordo com as especificações do fabricante e quantificar utilizando o kit *Qubit® dsDNA HS Assay*, fluorímetro *Qubit® 2.0*.

46. Realizar tantas reações quanto forem necessárias até atingir a concentração mínima (2 a 4µg).

47. Armazenar a biblioteca de Fab construída em -80°C.

Validação do Fab construído

Ligação ao Vetor de Clonagem

48. Executar a ligação dos fragmentos purificados da segunda PCR *overlap* em uma proporção de 3:1 com o vetor *pGEM-T Easy*. O fragmento deve ser ligado ao vetor de clonagem utilizando 50ng do vetor *pGEM-T-Easy®*, 60ng do DNA purificado, 2x *Rapid Ligation Buffer*, 3 unidades de T4 DNA ligase e água em um volume final de 10µL. Incubar a reação à 4°C *overnight*.

Preparo das células quimiocompetentes

49. Em 3mL de meio de cultura Luria-Bertani - LB liquido inocular 50µL da bactéria *Escherichia coli* linhagem similar a DH10B e incubar à 37°C *overnight* em agitação de 11xg.
50. Para o isolamento das colônias realizar a semeadura por esgotamento em meio LB sólido e colocar em estufa à 37°C *overnight*.
51. Isolar uma colônia e colocar para crescer em 3mL do meio LB liquido *overnight*, adicionar os 3mL de crescimento em mais 500mL do meio LB liquido e deixar sob agitação de 11xg até atingir OD de 620, após atingir a OD centrifugar à 1.512xg por 15 minutos à 4°C e desprezar o sobrenadante.
52. Ressuspender o *pellet* em 1/3 do volume original com FB.
53. Incubar em gelo por 30 minutos, centrifugar à 1.512xg por 15 minutos à 4°C e o desprezar o sobrenadante novamente. Ressuspender as células em 1/12,5 do volume original.

Transformação das células competentes

54. A transformação da *E. coli* linhagem similar a DH10B seguiu as especificações do fabricante.
55. Posteriormente, plaquear as bactérias em meio LB sólido contendo ampicilina 100mg/mL, contendo ainda 2mg/mL de X-Gal e 100mg/mL IPTG.
56. Após a transformação isolar colônias em falcons separados cada um contendo 3mL de meio LB liquido e incubar a *overnight* à 37°C sob agitação à 11xg.

Extração do vetor por lise alcalina

57. Alíquotar 1,5mL do meio com o crescimento das colônias isoladas, centrifugar por 2 minutos à 24.192xg à 4°C, descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em vortex.
58. Adicionar 100µL da solução 1, ressuspender o *pellet* em vortex.
59. Adicionar 200µL da solução 2 e homogeneizar por inversão.
60. Adicionar 150µL da solução 3 novamente homogeneizado por inversão e, em seguida centrifugar por 15 minutos à 24.192xg à 4°C.

61. Colocar o sobrenadante em um tubo limpo e foi adicionar 1 volume de isopropanol e homogeneizar por inversão, centrifugada por 10 minutos à 24.192xg à 4°C, descartar o sobrenadante.
62. Adicionar 500µL de etanol 70%, homogeneizar em vortex e centrifugada por 5 minutos à 24.192xg à 4°C, descartar o sobrenadante e secar o pellet secou em temperatura ambiente.
63. Ressuspender o pellet em 300µL de RNase A em uma concentração de 50µg/mL e incubar à 37°C por 20 minutos.

Sequenciamento de capilar (Sanger)

64. Sequenciar os vetores extraídos dos clones através do equipamento ABI 3500 com kit *ABI Prism® Big Dye™ terminator Cycle Sequencing v.3.1*, segundo as especificações do fabricante.

Resultados Antecipados de aplicações futuras

A utilização do Fab aqui apresentada (construída a partir de amostras de pacientes com infecção ativa por ZIKV) pode ser utilizada para a construção de bibliotecas conformacionais de anticorpos para estudos de desenvolvimento de terapias, vacinas, testes diagnósticos e prognósticos, todos baseados em anticorpos. Além disso, a biblioteca dos fragmentos construídos Fab e frações variáveis dos anticorpos anti-ZIKV podem ser triados por sequenciamento em larga escala para identificação de CDRs e busca de biomarcadores para a doença.

Assim, considerando a necessidade emergente de novas tecnologias para a identificação de biomarcadores na infecção por ZIKV a aplicabilidade do protocolo aqui apresentado é muito grande além do fato que o presente método pode ser utilizado em outras arboviroses e, outras infecções virais, principalmente.

O presente protocolo pode ser aplicado à outras situações biológicas que não à infecção por vírus embora nestes casos deve ser avaliada a similaridade da resposta imunológica humoral em questão.

Referências Bibliográficas

1. Lu, Y. *et al.* Using overlap-extension PCR technique to fusing genes for constructing recombinant plasmids. *J. Basic Microbiol.* **58**, 273–276 (2018).
2. Liu, Z., Zhang, T. & Xu, K. Efficient and flexible strategies for gene cloning and vector construction using overlap PCR. *bioRxiv* 101147 (2017). doi:10.1101/101147
3. Jones, M. L. & Barnard, R. T. Chimerization of multiple antibody classes using splice overlap extension PCR. *Biotechniques* **38**, 181–182 (2005).
4. Gitlin, D. Current Aspects of the Structure, Function, and Genetics of the Immunoglobulins. *Annu. Rev. Med.* **17**, 1–22 (1966).
5. Carmona, L. M. & Schatz, D. G. New insights into the evolutionary origins of the recombination-activating gene proteins and V(D)J recombination. *FEBS J.* **284**, 1590–1605 (2017).
6. Tomlinson, I. M., Walter, G., Marks, J. D., Llewelyn, M. B. & Winter, G. The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. *J. Mol. Biol.* **227**, 776–98 (1992).
7. van Dijk, K. W., Mortari, F., Kirkham, P. M., Schroeder, H. W. & Milner, E. C. B. The human immunoglobulin VH7 gene family consists of a small, polymorphic group of six to eight gene segments dispersed throughout the VH locus. *Eur. J. Immunol.* **23**, 832–839 (1993).
8. Honjo, T. & Matsuda, F. *Immunoglobulin heavy chain loci of mouse and human. Immunoglobulin Genes* (Academic Press, 1995). doi:10.1016/B978-012053640-5/50010-0
9. Barbas, C. F. *Phage display: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).
10. Posner, B., Smiley, J., Lee, I. & Benkovic, S. Catalytic antibodies: perusing combinatorial libraries. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 145–50 (1994).
11. Wang, H. *et al.* Tetanus Neurotoxin Neutralizing Antibodies Screened from a Human Immune scFv Antibody Phage Display Library. *Toxins (Basel)*. **8**, (2016).

12. van Lith, S. A. M. *et al.* In vivo phage display screening for tumor vascular targets in glioblastoma identifies a llama nanobody against dynactin-1-p150Glued. *Oncotarget* **7**, 71594–71607 (2016).
13. Zhang, H., Wang, X., Li, X., Ma, Z. & Feng, R. Construction, expression, and characterization of a single-chain variable fragment (ScFv) antibody targeting to the encephalomyocarditis virus. *J. Med. Virol.* **90**, 1184–1191 (2018).
14. Shriver-Lake, L. C. *et al.* Selection and Characterization of Anti-Dengue NS1 Single Domain Antibodies. *Sci. Rep.* **8**, 18086 (2018).
15. Manoutcharian, K., Perez-Garmendia, R. & Gevorkian, G. Recombinant Antibody Fragments for Neurodegenerative Diseases. *Curr. Neuropharmacol.* **15**, 779–788 (2017).
16. Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. & Baty, D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 220–33 (2009).
17. ElBakri, A., Nelson, P. N. & Abu Odeh, R. O. The state of antibody therapy. *Hum. Immunol.* **71**, 1243–1250 (2010).
18. Galán, A. *et al.* Library-based display technologies: where do we stand? *Mol. Biosyst.* **12**, 2342–58 (2016).
19. Gessoni, G. *et al.* Biological qualification of blood units. *Transfus. Apher. Sci.* **30**, 197–203 (2004).
20. Kågedal, B., Lindqvist, M., Farneback, M., Lenner, L. & Peterson, C. Failure of the PAXgene Blood RNA System to maintain mRNA stability in whole blood. *Clin. Chem. Lab. Med.* **43**, 1190–2 (2005).
21. Ando, T., Yamashiro, T., Takita-Sonoda, Y., Mannen, K. & Nishizono, A. Construction of human Fab library and isolation of monoclonal Fabs with rabies virus-neutralizing ability. *Microbiol. Immunol.* **49**, 311–22 (2005).
22. Nelson, R. S. & Valadon, P. A universal phage display system for the seamless construction of Fab libraries. *J. Immunol. Methods* **450**, 41–49 (2017).
23. Harju, S. & Peterson, K. R. Sensitive Ribonuclease Protection Assay Employing

- Glycogen as a Carrier and a Single Inactivation/Precipitation Step. *Biotechniques* **30**, 1198–1204 (2001).
24. Monteiro, M. B. *et al.* Optimization of total RNA isolation from human urinary sediment. *Clin. Chim. Acta.* **462**, 158–161 (2016).
 25. Ridgeway, J. A. & Timm, A. E. Comparison of RNA isolation methods from insect larvae. *J. Insect Sci.* **14**, (2014).
 26. Phongsisay, V., Perera, V. N. & Fry, B. N. Evaluation of eight RNA isolation methods for transcriptional analysis in *Campylobacter jejuni*. *J. Microbiol. Methods* **68**, 427–9 (2007).
 27. Munshaw, S. & Kepler, T. B. SoDA2: a Hidden Markov Model approach for identification of immunoglobulin rearrangements. *Bioinformatics* **26**, 867–72 (2010).
 28. Kim, Y. J. *et al.* Overexpression and unique rearrangement of VH2 transcripts in immunoglobulin variable heavy chain genes in ankylosing spondylitis patients. *Exp. Mol. Med.* **42**, 319–26 (2010).
 29. Kerzel, S. *et al.* Unlike in Children with Allergic Asthma, IgE Transcripts from Preschool Children with Atopic Dermatitis Display Signs of Superantigen-Driven Activation. *J. Immunol.* **196**, 4885–92 (2016).
 30. Vargas-Madrado, E., Lara-Ochoa, F. & Almagro, J. C. Canonical structure repertoire of the antigen-binding site of immunoglobulins suggests strong geometrical restrictions associated to the mechanism of immune recognition. *J. Mol. Biol.* **254**, 497–504 (1995).
 31. Hussain, H. & Chong, N. F.-M. Combined Overlap Extension PCR Method for Improved Site Directed Mutagenesis. *Biomed Res. Int.* **2016**, 1–7 (2016).
 32. Thornton, J. A. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1373**, 43–49 (2014).
 33. Tan, L. *et al.* A SOE-PCR method of introducing multiple mutations into *Mycoplasma gallisepticum* neuraminidase. *J. Microbiol. Methods* **94**, 117–120 (2013).
 34. Andris-Widhopf, J., Steinberger, P., Fuller, R., Rader, C. & Barbas, C. F. Generation of Human Fab Antibody Libraries: PCR Amplification and Assembly of Light- and Heavy-

Chain Coding Sequences. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2011**, pdb.prot065565-pdb.prot065565 (2011).

35. Li, C. *et al.* Generation and characterization of the human neutralizing antibody fragment Fab091 against rabies virus. *Acta Pharmacol. Sin.* **32**, 329–37 (2011).
36. Johnson, P. H. & Grossman, L. I. Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. *Biochemistry* **16**, 4217–25 (1977).
37. Olavarrieta, L., Martínez-Robles, M. L., Hernández, P., Krimer, D. B. & Schwartzman, J. B. Knotting dynamics during DNA replication. *Mol. Microbiol.* **46**, 699–707 (2002).
38. Weber, C., Rios, P. D. L., Dietler, G. & Stasiak, A. Simulations of electrophoretic collisions of DNA knots with gel obstacles. *J. Phys. Condens. Matter* **18**, S161–S171 (2006).
39. Cebrián, J. *et al.* Electrophoretic mobility of supercoiled, catenated and knotted DNA molecules. *Nucleic Acids Res.* **43**, e24–e24 (2015).

4. Material Suplementar

Material Suplementar A: Amostras incluídas no estudo

As coletas das amostras tiveram seu início em janeiro de 2016 e, foram realizadas até agosto de 2017. A coleta de amostras foi realizada durante a Força Tarefa para o acompanhamento em Tempo-Real do ZIKV no estado de São Paulo, rotina assistencial emergencial estabelecida durante a disseminação do vírus no país, sendo o Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina, Unesp laboratório executor desta força tarefa.

Durante este período, dezenove amostras clínicas foram incluídas no fluxo assistencial para a detecção molecular do vírus ZIKA. Ampliação desta amostragem foi solicitada aos clínicos, no entanto, a região de Botucatu apresentou baixa incidência da infecção por ZIKA Vírus.

Toda padronização metodológica para a detecção do vírus por PCR em tempo real foi realizada durante a Força Tarefa ZIKV no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina, Unesp.

A detecção do vírus por RT-qPCR é fundamental para o diagnóstico devido a reação cruzada com outros flavivírus no diagnóstico sorológico (Gourinat, 2015). As metodologias empregadas para extração e detecção do RNA viral da urina e do plasma já haviam sido padronizadas pelo mesmo grupo de pesquisa. As amostras foram submetidas RT-qPCR e, a tabela 1 mostra o *Cycle Threshold* – CT das amostras consideradas detectáveis (CT até 38) uma vez que de acordo com a literatura o CT de até 38 deve ser considerado positivo¹.

Embora originalmente o presente estudo pretendia incluir apenas amostras detectadas para ZIKV por RT-qPCR a partir de plasma (amostras Z17/16 e Z20/17) a inclusão das amostras Z02/16, Z03/16 e Z09/16, as quais apresentaram resultado da RT-qPCR detectado apenas quando o exame foi realizado a partir da urina, se justifica pelo fato de estudos recentes terem demonstrado que a urina constitui um fluido biológico de maior sensibilidade para detecção do vírus, uma vez que os

títulos virais permanecerem mais elevados e, por um mais longo tempo neste fluido biológico².

Tabela 1. Amostras com carga viral detectável por RT-qPCR para ZIKV

Amostras	CT	Material Biológico
Z02/16	35,43	Urina
Z03/16	30,62	Urina
Z09/16	35,30	Urina
Z17/16	37,70	Plasma
Z20/17	37,20	Plasma

RT-qPCR realizado segundo protocolo descrito por Lanciotti et al., 2007¹. Extração do RNA realizada pelo *QIAamp RNA Viral Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA) e, RT-qPCR com o kit *QuantiNovaTProbe RT-PCR* (Qiagen, Valencia, CA, USA) no equipamento no equipamento 7500 *Real Time PCR System* (AppliedBiosystems™, Foster City, CA, USA).

MATERIAIS

Reagentes

Primers sintetizados na concentração de 100nM (*Integrated DNA Technologies*)

TRIzol Reagent (Invitrogen, cat. 15596026). **Cuidado:** Trizol é tóxico. Manuseie com luvas, máscara e proteção para os olhos.

GelRed Nucleic Acid Gel (Stain-Biotium, cat. 41003)

Tris base (Himedia, cat. MB029)

Ácido Bórico (Dinâmica, cat. 15576028)

EDTA (Invitrogen, cat. 15576-028)

Glicogênio (Invitrogen, cat. 10814-010)

Turbo DNase (Invitrogen, cat. M1907)

Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen, cat. Q32854)

Qubit RNA HS Assay (Invitrogen, cat. Q32855)

Improm II Reverse Transcriptase (Promega, cat. 03803)

Master Mix 2x Go Taq Hot Start (Promega, cat. M5138)

Invisorb Fragment Clean Up (Stratec, cat. 1020300300)

QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, cat. 27104)

Wizard SV Geland PCR Clean-UP System (Promega, cat. A9285)

pGEM-T Easy (Promega, cat. A137A)

Etanol absoluto (Vetec, cat. V000103-11). **Cuidado:** Altamente inflamável

Meio LB sólido (Serva, cat. 48502)

Meio LB líquido (Serva, cat. 48501)

Agarose para eletroforese (Avati, cat. AV-0110)

DH10B TOP10 (Invitrogen, cat. C404003)

KCl (USB, cat. 20598)

CaCl₂ (Merck, cat. TA58482914)

Glicerol (PlusOne, cat. 17-1325-01)

CH₃CO₂K (Merck, cat. 104820)

Ampicilina (Calbiochem, cat. 171254)

X-Gal (Calbiochem, cat. 203782)

IPTG (Gibco Brl, cat. 15529-019)

Glicose (Dinâmica, cat. 1673)

SDS (Sigma, cat. L3771)

NaOH (Dinâmica, cat. 1143)

CH₃OOH (Vetec, cat. 141). **Cuidado:** CH₃OOH é tóxico. Manuseie com luvas, máscara e proteção para os olhos.

Rnase A (Sigma, cat. R4875)

ABI Prism Big Dye (AppliedBiosystem, cat. 4336917)

pComb3X clonado em *E. coli* XL1 -Blue (cedido pelo Laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB), originalmente obtido do Dr. C. Barbas III, Scripps Research Institute)

Clorofórmio (Merck, cat. 1.024.451.000). **Cuidado:** Clorofórmio é tóxico. Manuseie com luvas, máscara e proteção para os olhos.

Isopropanol (Sigma, cat. I-9516). **Cuidado:** Altamente inflamável e tóxico. Manuseie com luvas, máscara e proteção para os olhos.

C₂H₃NaO₂ (Merck, cat. 1062680250)

MgCl₂ (Invitrogen, cat. 10966-020)

dNTP (Thermo Fisher, cat. R0181)

Equipamentos

Termociclador (GeneAmp PCR System, modelo 9700)

Incubator Shaker, 37 °C, 11xg, para células de *E. coli* DH10B (New Brunswick Scientific, modelo C24)

Vortex (Daigger, modelo Genie 2)

Milli-Q (Synthesis, modelo Millipore)

Transiluminador UV (UVP)

Centrífuga refrigerada (Eppendorf, modelo 5804R)

Cuba para Eletroforese (CBS Scientific, modelo MGV502T)

Fonte para Eletroforese (Pharmacia Biotech, modelo EPS200)

Estufa, 37 °C, para células de *E. coli* DH10B (Lab Trade, modelo EB60)

Fluxo Laminar Vertical, (Pachane)

Qubit 2.0 (Invitrogen)

pHmetro digital (Gehaka, modelo PG1800)

Balança (AND, modelo GF-1200)

Sequenciador (Applied Biosystems, modelo 3500 Series Genetic Analyzers)

Leitor de microplaca (Biochrom, modelo Asys Expert Plus)

Placas de Petri (Precision)

Microtubos de 1.5mL (Eppendorf)

Microfiltro 22µM (Millipore)

Termobloco (Eppendorf, modelo Thermo Mixer Compact)

Tempo Real (Applied Biosystem, modelo 7500)

Autoclave (Phoenix, modelo vertical)

Material Suplementar B: Avaliação da qualidade do RNA

A extração do RNA foi realizada inicialmente de sangue total congelado à -80°C dos cinco pacientes com RNA detectável por RT-qPCR, a qualidade do RNA total foi avaliada em gel de agarose 1% no qual deveriam ser observadas bandas representativas do RNA ribossômico (rRNA) 28S, 18S e 5S, mas o resultado inicial demonstrou que o material genético estava degradado (Figura 1). A partir do gel também foi possível analisar a contaminação com DNA genômico (gDNA), a contaminação por gDNA pode produzir amplificação inespecífica que pode interferir no resultado real da expressão das sequências de anticorpos³.

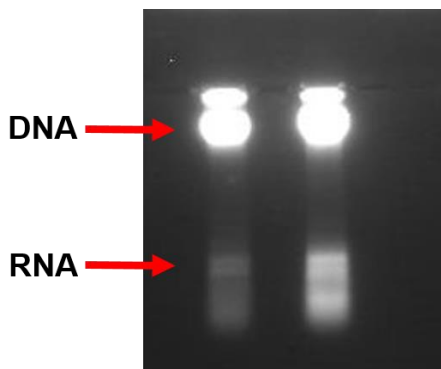


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% com GelRed™ para análise da qualidade do RNA, o rastro indica degradação do RNA, e as bandas com maior intensidade acima mostram contaminação por DNA genômico.

Para tentar aumentar a concentração do RNA de cada paciente foi realizada as extrações de RNA do *buffy coat*, armazenados à -80°C, o material extraído foi acrescentado ao RNA extraído de sangue total.

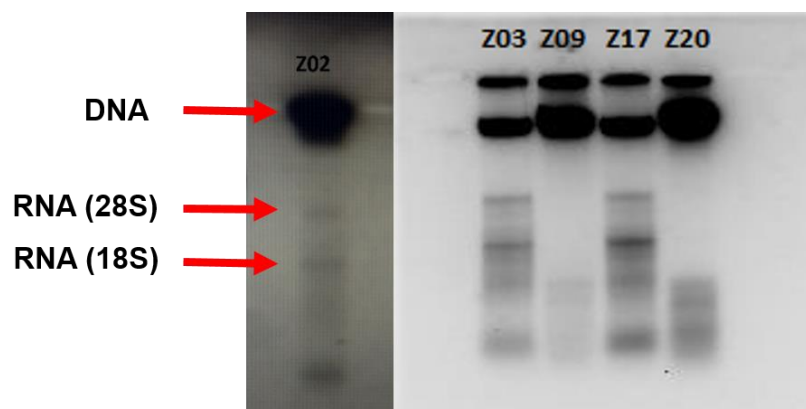


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1% com GelRed™ do RNA extraído a partir do *buffy coat* e sangue total das amostras incluídas no presente estudo: Z02, Z03 e Z17 presença das bandas dos rRNAs 28S e 18S; Z09 e Z20 ausência das bandas representativas dos rRNA. Presença em todas as amostras de DNA genômico contaminante.

Após a junção das extrações é possível visualizar no gel as bandas das amostras Z02, Z03 e Z17, porém o efeito de arraste permaneceu. Nas amostras Z09 e Z20 não foi possível visualizar as bandas do rRNA.

Um *pool* foi feito com as amostras Z02, Z03 e Z17, e tratamento com Turbo DNase (Ambion® - AppliedBiosystem™) foi realizado

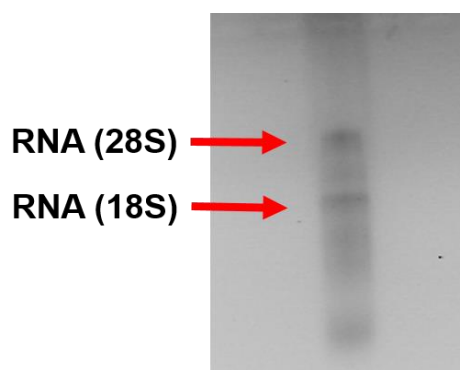


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1% com GelRed™ para análise da qualidade do *pool* de RNA e grau de pureza do material após tratamento com Turbo DNase.

Material Suplementar C: Amplificação dos fragmentos das variáveis V κ e VH

Primers Forward para amplificação das diferentes famílias da cadeia variável pesada: HFabVH1-F (GCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCA GTCTGG), HFabVH2-F (GCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAGATCACCTTGAAG GAGTCTGG), HFabVH35-F (GCTGCCCAACCAGCCATGGCCGAGGTGCAGCTG GTGSAGTCTGG), HFabVH3a-F (GCTGCCCAACCAGCCATGGCCGAGGTGCAGC TGKTGGAGTCTG), HFabVH4-F (GCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAGGTGCA GCTGCAGGAGTCGGG), HFabVH4a-F (GCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAGGT GCAGCTACAGCAGTGGGG)⁵.

Primers Reverse para amplificação da cadeia pesada: HFabVHJa-B (CGATGGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC) e FabVHJb-B (CGATGGGGCCCTTGGTGGAGGCWGRGGAGACGGTGACCAGGGTB CC)⁵.

Combinações dos *primers* VH: HFabVH1-F com HFabVHJa-B, HFabVH2-F com HFabVHJa-B, HFabVH35-F com HFabVHJa-B, HFabVH3a-F com HFabVHJa-B, HFabVH4-F com HFabVHJa-B, HFabVH4a-F com HFabVHJa-B, HFabVH1-F com HFabVHJb-B, HFabVH2-F com HFabVHJb-B, HFabVH35-F com HFabVHJb-B, HFabVH3a-F com HFabVHJb-B, HFabVH4-F com HFabVHJb-B, HFabVH4a-F com HFabVHJb-B⁵.

Primers Forward para amplificação das diferentes famílias da cadeia leve do tipo kappa: HSCC κ 1-F (GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCCAGATGACCCAGTCT CC), HSCC κ 24-F (GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGTGATGACYCAGTCTCC), HSCC κ 3-F (GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGTGATGACYCAGTCTCC), HSCC κ 5-F (GGGC CCAGGCGGCCGAGCTCACACTCACGCAGTCTC)⁵.

Primer reverse para amplificação das diferentes famílias da cadeia leve do tipo kappa: HC κ 5-B (GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGT)⁵.

Combinações dos primers V_{κ} : HSCC κ 1-F com HC κ 5-B, HSCC κ 24-F com HC κ 5-B, HSCC κ 3-F com HC κ 5-B, HSCC κ 5-F com HC κ 5-B⁵.

As figuras 4 e 5 mostram resultados da primeira etapa da PCR para diferentes famílias de VH.

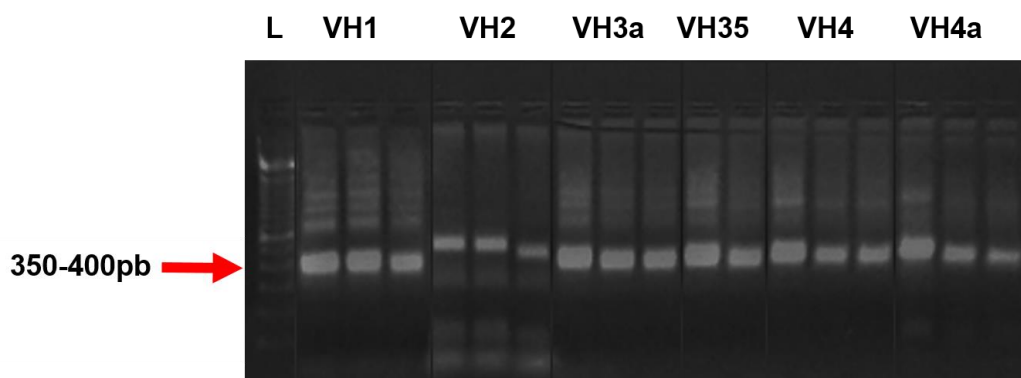


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados obtidos para as regiões codificadoras das cadeias variáveis VH (combinação dos *primers forward* VH1, VH2, VH3a, VH35, VH4 e VH4a com *primer reverse* Ja-B). *Ladder* (L) de 100pb (Thermo Fisher Scientific, CA, USA).

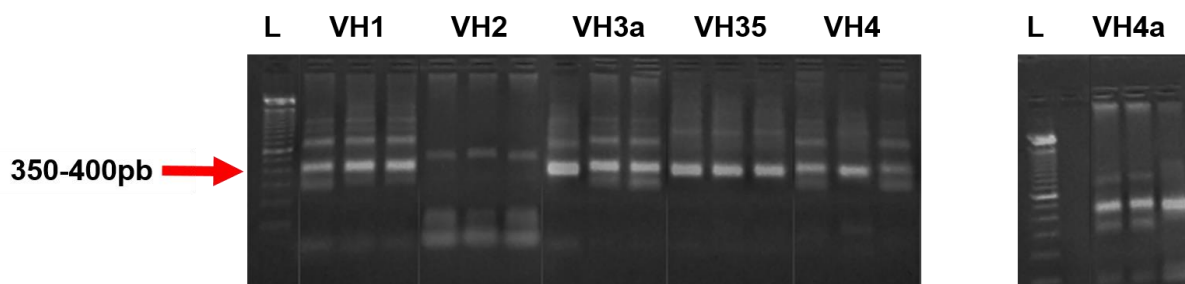


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados obtidos para as regiões codificadoras das cadeias variáveis VH (combinação dos *primers forward* VH1, VH2, VH3a, VH35, VH4 e VH4a com *primer reverse* Jb-B). *Ladder* (L) de 100pb (Thermo Fisher Scientific, CA, USA).

A figura 6 mostra resultados da primeira etapa da PCR para diferentes famílias de V_{κ} .

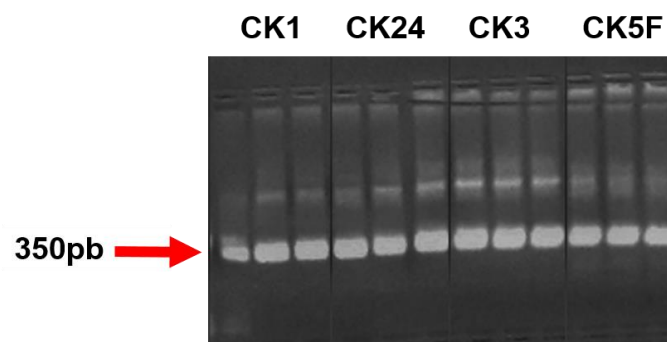


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados obtidos para as regiões codificadoras das cadeias variáveis V_{κ} (combinação dos *primers forward* CK1, CK24, CK3, CK5F com *primer reverse* CK5-B).

Material Suplementar D: Amplificação dos fragmentos das constantes C κ e CH

Primers para amplificação da cadeia pesada constante (CH): HlgGCG1-F (G CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC) e Dpseq (AGAAGCGTAGTCCGGAACGTC)⁵.

Primers para amplificação da cadeia pesada leve (C κ): HKC-F (CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC) e Lead-B (GGCCATGGCTGGTTGGGCAG C)⁵.

As figuras 7 e 8 ilustram as amplificações de C κ e CH

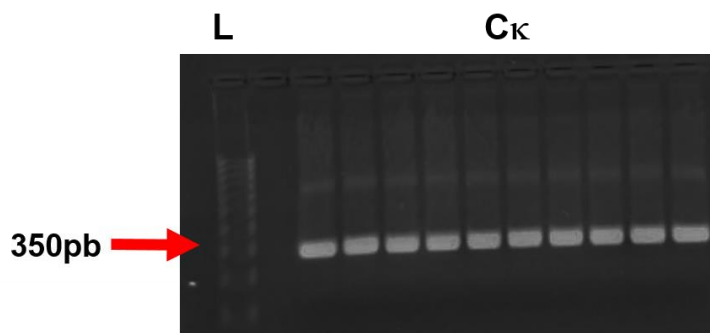


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados obtidos para as regiões codificadoras da cadeia C κ a partir de um molde Fab. *Ladder* (L) de 100pb (Thermo Fisher Scientific, CA, USA).

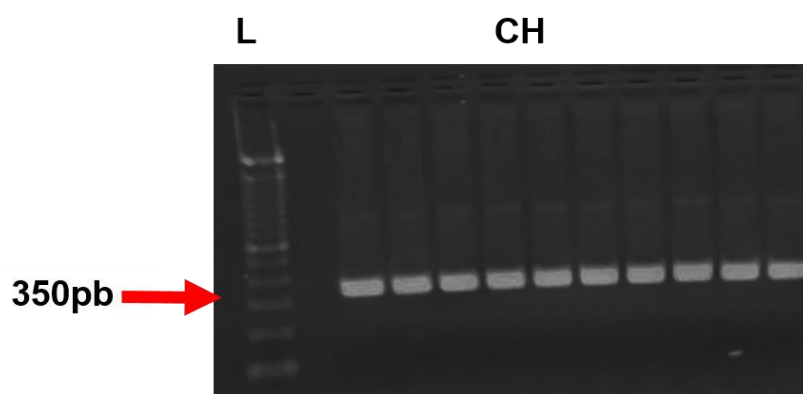


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados obtidos para as regiões codificadoras da cadeia CH a partir de um molde Fab. *Ladder* (L) de 100pb (Thermo Fisher Scientific, CA, USA).

Material Suplementar E: PCR *overlap* para cadeias H e κ

Primers para PCR overlap H (CH + VH): LeadVH (GCTGCCCAACCAGC CATGGCC) e Dpseq (AGAAGCGTAGTCCGGAACGTC)⁵.

Primers para PCR overlap κ (C κ + V κ): RSC-F (GAGGAGGAG GAGGAGGAGGCGGGGCCAGGCGGCCGAGCTC) e Lead-B (GGCCATGG CTGGTTGGGCAGC)⁵.

A figura 9 mostra a PCR *overlap* realizada de acordo com o proposto por este método.

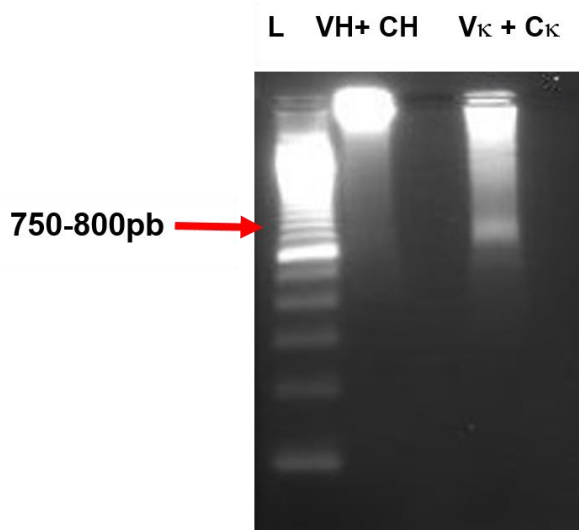


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados obtidos na PCR *overlap* para H (VH + CH) e κ (V κ + C κ). *Ladder* (L) de 100pb (Thermo Fisher Scientific, CA, USA), evidenciando ausência dos fragmentos de interesse (750-800pb) e presença de excesso de produto da reação no poço.

A figura 10 ilustra a mesma reação anterior com a corrida eletroforética realizada depois de diluição dos produtos da PCR *overlap*.

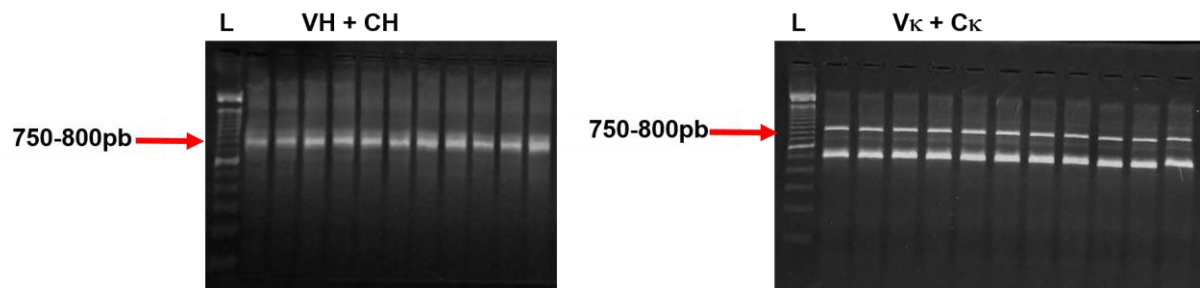


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados obtidos na PCR *overlap* para H (VH + CH) e κ (V κ + C κ). *Ladder* (L) de 100pb (Thermo Fisher Scientific, CA, USA).

Material Suplementar F: PCR *overlap* para o Fab (H+κ)

Primers para PCR *overlap* para o Fab: RSC-F (GAGGAGGAG GAGGAGGAGGCGGGGCCCAGGCGGCCGAGCTC) e dp-EX (GAGGAGGAGGA GGAGGAGAGAAGCGTAGTCCGGAACGTC)⁵.

A figura 11 ilustra o resultado da PCR *overlap* para geração do Fab

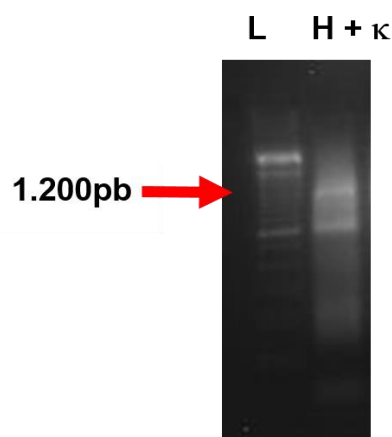


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados obtidos na PCR *overlap* para Fab (H + κ). *Ladder* (L) de 100pb (Thermo Fisher Scientific, CA, USA).

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.

6. Artigo Submetido

**HPA -1a/1b could be considered molecular predictor of poor prognostic in chronic
Hepatitis C**

Grotto RMT - HPA -1a/1b and chronic Hepatitis C

*Rejane Maria Tommasini Grotto^{[1],[2]}, Francielle Martins Santos^[1], Natália Picelli^[1],
Giovanni Faria Silva^[3], Adriana Camargo Ferrasi^[1], Valéria Cristina Rodrigues
Sarnighausen^[2], Maria Inês de Moura Campos Pardini^{[1],[3]}*

*[1]. Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro, Faculdade de Medicina de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil. [2]. Departamento
de Bioprocessos e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade
Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil. [3]. Departamento de Clínica Médica,
Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo,
Brasil.*

Corresponding author: Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto. Departamento de
Bioprocessos e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual
Paulista. Fazenda Experimental Lageado, 18610-307 Botucatu, São Paulo, Brasil.

Phone: 55 14 3880-7162; **Mobile:** 55 14 981447615

e-mail: regrotto@uol.com.br

Abstract

Introduction: The HPA polymorphism has already associated with HCV presence and with fibrosis progression in Chronic Hepatitis C. It is unknown if there are association between HPA-1 polymorphism and Hepatocellular Carcinoma (HCC). The goal of this study was to evaluate the HPA-1 polymorphism in HCC presence. **Methods:** HPA genotyping was performed from 76 HCV infected patients using PCR-SSP. **Results:** There was no association between patients with and without HCC. There was significant difference in HPA -1 genotypic frequency distribution between HCC and F1/F2 fibrosis degree. **Conclusions:** The results suggest that the HPA -1a/1b polymorphism seems to be more associated with liver damage progression than the presence of HCC

Key Words: Hepatitis C Virus - Human Platelets Antigens - Hepatocellular Carcinoma.

Para: martins.fran@bol.com.br;

Cc: regrotto; martins.fran@bol.com.br; Natália Picelli; Prof. Giovanni Faria Silva; Adriana Ferrasi; valeriacr@fca.unesp.br; Maria Inês Pardini;

23-May-2018

Dear Miss Santos:

Your manuscript entitled "HPA - 1a/1b could be considered molecular predictor of poor prognosis in chronic Hepatitis C" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.

Your manuscript ID is RSBMT-2017-0427.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.

Sincerely,

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine Editorial Office