



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**FRANCISCA YARA SILVA LIMA**

**MODELAGEM COMPUTACIONAL E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE  
NANOCORPOS COM POTENCIAL INIBIDOR DE VLA-4**

**FORTALEZA**

**2022**

FRANCISCA YARA SILVA LIMA

MODELAGEM COMPUTACIONAL E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE NANOCORPOS  
COM POTENCIAL INIBIDOR DE VLA-4

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador Pedagógico: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.

Orientador Técnico-Científico: Prof. Dr. João Herminio Martins da Silva.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

L698m Lima, Francisca Yara Silva.  
Modelagem computacional e expressão heteróloga de nanocorpos com potencial inibidor de VLA-4 /  
Francisca Yara Silva Lima. – 2022.  
63 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,  
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.

Coorientação: Prof. Dr. João Herminio Martins da Silva.

1. Modelagem comparativa. 2. Tecnologia recombinante. 3. VHH. I. Título.

CDD 570

---

FRANCISCA YARA SILVA LIMA

MODELAGEM COMPUTACIONAL E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE NANOCORPOS  
COM POTENCIAL INIBIDOR DE VLA-4

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 13/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. João Herminio Martins da Silva  
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-CE)

---

Ma. Aline De Oliveira Albuquerque  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha mãe, Antonia Maria.

A minha pequena, Yasmin Silva.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de força, discernimento e sustento diário, e a Nossa Senhora, por iluminar e guiar meus caminhos.

À minha mãe, Antonia Maria, base da minha casa, da minha família, da minha vida, e a quem eu devo todas as minhas conquistas.

À minha irmã, Yasmin Silva, meu pontinho de luz e paz, ao meu irmão, Yago Silva, e à minha cunhada, Rogelma Ribeiro, por todo o apoio.

À minha grande amiga Relviane Xavier, por todas as suas orações, por nossas conversas e aventuras, e por todo o cuidado e carinho direcionados a mim e a minha família.

À família Lessa Silva, que me recebeu em seu lar nos primeiros anos da graduação, e à Dalila Lima, que aceitou dividir seu cantinho comigo nos últimos dois.

Aos amigos de graduação e em breve de profissão, por tudo o que compartilhamos.

À Universidade Federal do Ceará, pela formação acadêmica, científica e social.

À profa. Dra. Cristina Paiva, que me proporcionou a primeira vivência prática do dia a dia da pesquisa científica, e ao laboratório de BioMol-UFC, onde tive a oportunidade de dar os primeiros e importantes passos na área de Biologia Molecular.

Às minhas duplas nos estágios de iniciação científica, Luis Flávio, Maiara Queiroz e Thalia Lima, por todas as experiências, preocupações e conquistas compartilhadas.

Ao prof. Dr. André Coelho por sua disponibilidade na orientação pedagógica deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa Biologia estrutural e funcional em Biofármacos, da Fiocruz, por todo o crescimento pessoal e profissional proporcionado por nossas conversas, discussões, trabalhos desenvolvidos e comemorações, em especial ao prof. Dr. João Herminio, por ser um grande líder, por toda orientação e compreensão, e pela confiança em meu trabalho.

Aos Mestres Beatriz Chaves e Disraeli Vasconcelos, por dividirem comigo sua experiência e trabalho com a VLA-4.

Aos colaboradores do Laboratório Multiusuário de Pesquisa e Desenvolvimento (LMPD) da Fiocruz-CE, em especial a Bruni Maia, Igor Studart e Marcos Rafael pelo apoio e discussão técnico-científicos.

A Fiocruz-CE, pela estrutura e por sua importância em minha formação social e científica e na realização deste trabalho.

Ao CNPq, pelas bolsas de iniciação científica concedidas ao longo da graduação, e à FUNCAP, também responsável pela realização deste trabalho.

“Quando olho para o céu, sinto de algum modo que tudo mudará para melhor, que a crueldade também terminará, que a paz e a tranquilidade voltarão.” (O DIÁRIO DE ANNE FRANK, 2017, p. 366).

## RESUMO

A integrina  $\alpha 4\beta 1$  (ou VLA-4) é uma proteína transmembranar amplamente expressa na superfície de células imunes, principalmente em monócitos e linfócitos T, estando envolvida no mecanismo de extravasamento de leucócitos, etapa essencial para o desenvolvimento de processos inflamatórios. Em razão disso, VLA-4 está associada a doenças inflamatórias crônicas de grande impacto na saúde pública, como Asma, Artrite Reumatoide e Esclerose Múltipla, sendo, assim, um importante alvo para terapias de patologias humanas. Um composto anti-VLA-4 comercializado é o Natalizumabe, anticorpo monoclonal utilizado no tratamento de esclerose múltipla, associado, porém, a um alto custo de produção e risco aumentado para a infecção oportunista Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva, além de não ser específico para essa integrina. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é propor uma estrutura tridimensional para três nanocorpos com potencial inibidor de VLA-4 e realizar sua produção em sistema heterólogo de expressão, como estratégias iniciais de desenvolvimento de antagonistas de VLA-4 no formato VHH. Assim, são apresentadas as estruturas tridimensionais desses anticorpos, obtidas por modelagem comparativa usando o programa MODELLER, bem como a expressão solúvel em *E. coli* SHuffle pLysS, a 15 °C, por 16 h, e purificação eficiente por cromatografia de afinidade. Em síntese, os resultados são promissores no desenvolvimento de nanocorpos anti-VLA-4 e orientam as próximas etapas de trabalho, que incluem o refinamento da modelagem das CDRs das estruturas preditas, refinamento da metodologia de purificação, quantificação do rendimento e análise funcional desses nanocorpos.

**Palavras-chave:** Modelagem comparativa; Tecnologia recombinante; VHH.



## ABSTRACT

The  $\alpha 4\beta 1$  (or VLA-4) integrin is a transmembrane protein widely expressed on the surface of immune cells, mainly on monocytes and T lymphocytes, being involved in the mechanism of leukocyte extravasation, an essential step for the development of inflammatory processes. As a result, VLA-4 is associated with chronic inflammatory diseases of great public health impact, such as Asthma, Rheumatoid Arthritis and Multiple Sclerosis, thus being an important target for therapies for human pathologies. A commercialized anti-VLA-4 compound is Natalizumab, a monoclonal antibody used in the treatment of Multiple Sclerosis, associated, however, with high production cost and increased risk for the opportunistic infection of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy, in addition to not being specific for this integrin. In this context, the objective of this work is to propose a three-dimensional structure for three nanobodies with VLA-4 inhibitory potential and carry out their production in a heterologous expression system, as initial strategies for the development of VLA-4 antagonists in the VHH format. Thus, the three-dimensional structures of these antibodies, obtained by comparative modeling using the MODELLER program, are presented, as well as the soluble expression in *E. coli* SHuffle pLysS, at 15 °C, for 16 h, and efficient purification by affinity chromatography. In summary, the results are promising in the development of anti-VLA-4 nanobodies and guide the next work steps, which include the refinement of the modeling of the CDRs of the predicted structures, refinement of the purification methodology, quantification of the yield and functional analysis of these nanobodies.

**Keywords:** Comparative modeling; Recombinant technology; VHH.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Árvore filogenética dos opisthokonts com a origem putativa das integrinas ..	17
Figura 2	– Representação estrutural de uma integrina $\alpha I$ .....	18
Figura 3	– Estados conformacionais e mecanismos de ativação e sinalização bidirecional das integrinas .....	20
Figura 4	– Subfamília de receptores integrinas .....	21
Figura 5	– Representação estrutural das proteínas fibronectina e VCAM-1 .....	22
Figura 6	– Processo de extravasamento de leucócitos mediado por VLA-4 .....	23
Figura 7	– Mecanismo de ação do Natalizumabe .....	24
Figura 8	– Representação estrutural do anticorpo de cadeia pesada e região VHH .....	25
Figura 9	– Gráficos de Ramachandran para os modelos preditos .....	39
Figura 10	– Estruturas tridimensionais preditas para os nanocorpos .....	40
Figura 11	– Estimativa da qualidade local dos modelos preditos .....	42
Figura 12	– Perfil de expressão dos nanocorpos .....	44
Figura 13	– Cromatogramas de purificação dos nanocorpos .....	46
Figura 14	– Perfil proteico de nanocorpos purificados .....	47
Figura 15	– <i>Western Blotting</i> de nanocorpos purificados .....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pontuações MolProbity atribuídas aos modelos preditos .....	37
Tabela 2 – Estatística de ocorrência dos resíduos em diferentes regiões do gráfico de Ramachandran .....	40
Tabela 3 – Percentual de resíduos com pontuação $\geq 0,2$ dos modelos preditos .....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ I	Domínio inserido
ADMIDAS	<i>Adjacent to metal ion-dependent adhesion site</i>
CDRs	<i>Complementarity Determining Regions</i>
CLO	Cloranfenicol
D.O	Densidade óptica
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
Fab	<i>Antigen Binding Fragment</i>
Fc	<i>Fragment Crystallizable</i>
Frs	<i>Frameworks</i>
HCAbs	<i>Heavy-Chain Antibodies</i>
Ig	Imunoglobulina
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
KAN	Canamicina
LB	Luria Bertani
locPREFMD	<i>Local Protein Structure Refinement via Molecular Dynamics</i>
MEC	Matriz extracelular
MIDAS	<i>Metal Ion-dependent Adhesion Site</i>
molPDF	<i>Modeller Objective Probability Density Functions</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PTFE	Politetrafluretileno
RMSD	<i>Root-Mean Square Deviation</i>
SyMBS	<i>Synergistic Metal Ion Binding Site</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
VH	<i>Variable Heavy-Chain</i>
VHH	<i>Variable Domain of the Heavy Chain of Heavy-Chain Antibody</i>
VLA	<i>Very Late Antigen</i>
vWA	Domínio von Willebrand A

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\varphi$	Phi
$\psi$	Psi
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
%	Porcentagem
A	Ampere
Å	Angstrom
g	Gramma
g	Gravidade
kDa	Kilodalton
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPa	Megapascal
rpm	Rotação por minuto
uL	Micro litro
V	Volts

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>1.1</b>	<b>Evolução: integrinas, adesão celular e Metazoa</b> .....	16
<b>1.2</b>	<b>Estrutura das integrinas</b> .....	17
<b>1.3</b>	<b>Sinalização bidirecional e regulação das integrinas</b> .....	19
<b>1.4</b>	<b>Classificação das integrinas e VLA-4</b> .....	21
<b>1.4.1</b>	<i>VLA-4, doenças inflamatórias e agentes terapêuticos</i> .....	23
<b>1.5</b>	<b>Nanocorpos</b> .....	25
<b>1.5.1</b>	<i>Características únicas</i> .....	25
<b>1.5.2</b>	<i>Desenvolvimento e produção</i> .....	26
<b>1.5.3</b>	<i>Aplicações</i> .....	28
<b>1.6</b>	<b>Justificativa</b> .....	29
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	31
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	31
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	31
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	32
<b>3.1</b>	<b>Modelagem comparativa de nanocorpos</b> .....	32
<b>3.1.1</b>	<i>Obtenção dos moldes</i> .....	32
<b>3.1.2</b>	<i>Construção dos modelos</i> .....	32
<b>3.1.3</b>	<i>Refinamento dos modelos e validação das estruturas</i> .....	33
<b>3.2</b>	<b>Produção heteróloga de nanocorpos</b> .....	33
<b>3.2.1</b>	<i>Transformação de células quimiocompetentes de E. coli SHuffle pLysS</i> .....	33
<b>3.2.2</b>	<i>Indução da expressão</i> .....	34
<b>3.2.3</b>	<i>Extração e purificação</i> .....	34
<b>3.2.4</b>	<i>Análise da expressão e purificação por SDS-PAGE</i> .....	35
<b>3.2.5</b>	<i>Detecção de nanocorpos por Western Blotting</i> .....	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>4.1</b>	<b>Modelagem comparativa de nanocorpos anti-VLA-4</b> .....	37
<b>4.2</b>	<b>Produção heteróloga de nanocorpos anti VLA-4</b> .....	43
<b>4.2.1</b>	<i>Expressão de nanocorpos em E. coli SHuffle pLysS</i> .....	43
<b>4.2.2</b>	<i>Purificação de nanocorpos por cromatografia de afinidade</i> .....	44
<b>4.2.3</b>	<i>Detecção de nanocorpos em frações purificadas</i> .....	47

<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>50</b>
	<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As integrinas, proteínas integrais de membrana assim denominadas devido à sua capacidade de ligar a matriz extracelular (MEC) ao citoesqueleto, estão presentes em todos os metazoários, são consideradas os principais receptores de adesão celular e são responsáveis por mediar a transmissão de sinal por meio da membrana plasmática, tanto do interior para o exterior da célula quanto no sentido contrário.<sup>1,2</sup>

A hipótese de existência de um ligante da MEC ao citoesqueleto surgiu ainda na década de 1970, com evidências acumulando-se ao longo dos anos que se seguiram.<sup>2</sup> No entanto, somente em 1986 o primeiro trabalho relatando a estrutura dessa proteína foi publicado, no qual foi proposto um modelo formado por uma porção extracelular longa, um domínio transmembranar de extensão única e uma região citoplasmática curta.<sup>3</sup>

A descoberta dessas proteínas impulsionou uma série de pesquisas, com as integrinas apresentando-se como importante “hotspot” de estudos em biologia celular e molecular, biologia estrutural, fisiologia, genética, patologia e imunologia.<sup>4</sup>

### 1.1 Evolução: integrinas, adesão celular e Metazoa

A origem da multicelularidade animal, e, portanto, dos metazoários, é uma das principais modificações evolutivas, adquirida múltiplas e independentes vezes na árvore de eucariotos, sendo acompanhada de distintos sistemas moleculares com funções semelhantes, incluindo adesão celular, cujas moléculas envolvidas ilustram a grande conservação entre organismos diferentes.<sup>5,6</sup>

A adesão celular e a MEC estão intimamente ligadas à integridade celular dos metazoários, o que sugere que o ancestral comum possuiu, em algum nível, componentes de adesão celular e conexões celulares básicas.<sup>7,8</sup> Entre os mecanismos de adesão celular mais importantes para o desenvolvimento dos metazoários está o mediado por integrinas, cujos genes para as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  são identificados em protistas funcionalmente distintos, como na ameba *Capsaspora owczarzaki*, no flagelado marinho de vida livre *Amastigomona* sp., e em *Sphaeroforma arctica*, parasitas artrópodes formadores de colônia, o que sugere o papel precursor da sinalização clássica das integrinas.<sup>9,10</sup>

Além disso, entre os invertebrados, dois organismos modelos, o verme *Caenorhabditis elegans* e a mosca *Drosophila melanogaster*, apresentam proteínas homólogas ancestrais das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ .<sup>11</sup> O organismo *C. elegans* apresenta duas subunidades alfa, enquanto a *D. melanogaster*, cinco, que encontram correspondentes entre os vertebrados, mas não estão intimamente relacionadas a nenhuma família particular, o que é similar para as subunidades  $\beta$ , com uma ocorrendo em *C. elegans* e duas em *D. melanogaster*.

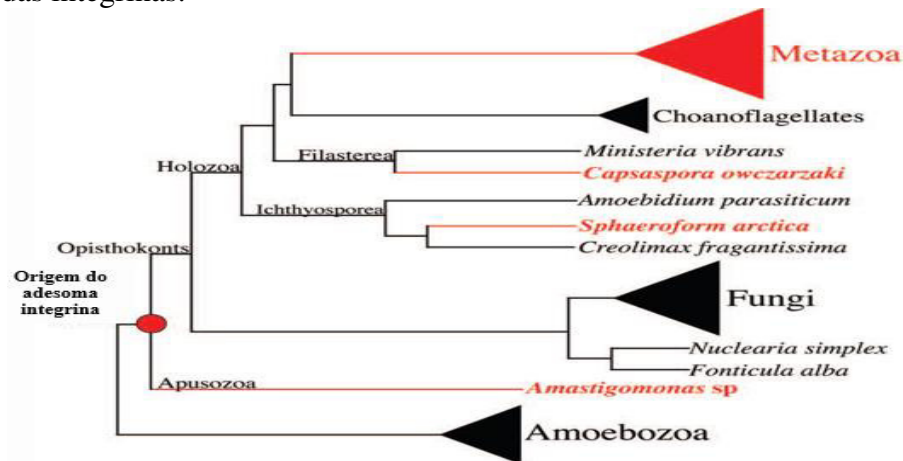


Esse conjunto mínimo de integrinas em invertebrados distintos, portanto, evidencia o processo de adesão mediado por integrina como um processo essencial à vida ao longo da evolução.<sup>12</sup>

Ademais, o subgrupo estrutural e funcionalmente único de algumas subunidades  $\alpha$  de integrinas, denominado domínio  $\alpha I$  (domínio “inserido”) específico ou  $\alpha A$  (por sua similaridade ao fator von Willebrand A – vWA), importante no reconhecimento dos ligantes das integrinas correspondentes, não foram encontrados em *C. elegans* e *D. melanogaster*, mas foram identificados no urocordado *Ciona intestinalis*, indicando que a inserção desse domínio surgiu em um progenitor comum das linhagens de ascídias e dos vertebrados.<sup>11, 13</sup>

Portanto, as evidências genômicas indicam que a origem do conjunto de genes de integrinas dos metazoários antecede a origem desses organismos (figura 1), o que reflete a importância dos mecanismos funcionais associados às integrinas, e que se diversificou entre os metazoários.

Figura 1 – Árvore filogenética dos opisthokonts e origem putativa das integrinas.



Fonte: Adaptado de Sebé-Pedrós e Ruiz-Trillo (2010). Em vermelho são identificados os táxons que apresentam uma maquinaria de adesão mediada por integrinas. A origem das integrinas antecede a origem de Fungi e Metazoa, tendo sido perdida posteriormente em fungos e coanoflagelados.

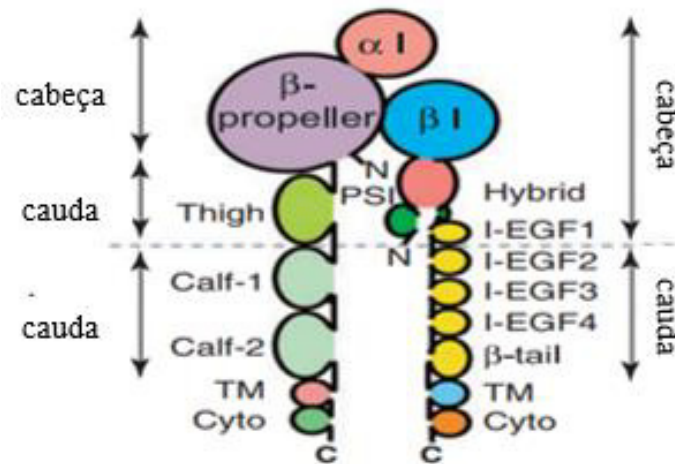
## 1.2 Estrutura das integrinas

As integrinas são proteínas heterodiméricas formadas pelas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  não covalentemente ligadas.<sup>14</sup> Em vertebrados são conhecidas 18 subunidades  $\alpha$  e oito subunidades  $\beta$ , que combinadas resultam em 24 integrinas diferentes, com funções específicas e não redundantes, estando envolvidas em distintos e importantes mecanismos biológicos, o que é evidenciado, por exemplo, pela especificidade de ligantes.<sup>1, 15</sup>

Ambas as subunidades apresentam um grande ectodomínio de 80 a 150 kDa, um único domínio transmembranar sob a forma de  $\alpha$ -hélice, e, excetuando a integrina  $\beta 4$ , uma

cauda citoplasmática curta e amplamente não estruturada formada por 10 a 70 resíduos de aminoácidos (figura 2).<sup>14, 16</sup> A porção extracelular da subunidade  $\alpha$  é formada por >940 resíduos de aminoácidos, sendo constituída por quatro domínios (ou cinco para as subunidades  $\alpha$  que possuem o domínio  $\alpha I$ ), enquanto a subunidade  $\beta$ , composta por >640 resíduos, apresenta oito domínios, incluindo um domínio I ( $\beta I$ ).<sup>16, 17</sup>

Figura 2 – Representação estrutural de uma integrina  $\alpha I$ .



Fonte: Adaptado de Luo, Carman e Springer (2007). Os domínios extracelulares, transmembranares (TM) e citoplasmáticos (Cyto) são apresentados. Os ectodomínios de ambas as subunidades são divididos em “cabeça” e “cauda”.

Os ectodomínios das subunidades  $\alpha$  consistem em um domínio I, no caso de nove subunidades  $\alpha$ , um domínio  $\beta$ -propeller, um domínio do tipo thigh e dois domínios do tipo calf (calf-1 e calf-2).<sup>18, 19</sup> A porção extracelular da subunidade  $\beta$ , por sua vez, é formada por oito domínios com interconexões flexíveis e complexas, que consistem em um domínio  $\beta I$ , um domínio híbrido, um domínio PSI (Plexina-Semaforina-Integrina), quatro domínios ricos em cisteína EGF (do inglês, *Epidermal Growth Factor*) e um domínio  $\beta$ -tail.<sup>19</sup> Os ectodomínios  $\alpha I$  e  $\beta$ -propeller da subunidade  $\alpha$  e o  $\beta I$  da subunidade  $\beta$  são particularmente importantes devido ao seu envolvimento na interação da integrina com os ligantes extracelulares.

O domínio  $\beta$ -propeller localiza-se na região N-terminal da subunidade  $\alpha$  e é composto por sete folhas- $\beta$  (cerca de 60 aminoácidos cada), em forma de sete lâminas, cada uma contendo quatro fitas  $\beta$  anti-paralelas.<sup>20, 21</sup> Nas regiões de loop das lâminas de quatro a sete são localizados quatro sítios de ligação de  $Ca^{2+}$  expostos a solvente, presentes na região inferior do domínio  $\beta$ -propeller, opostos à interface das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ .<sup>21, 22</sup> Nas integrinas  $\alpha I$ , o domínio I interrompe o  $\beta$ -propeller, apresentando-se entre as lâminas dois e três, sendo caracterizado principalmente pela ocorrência de um sítio de coordenação de cátions bivalentes

( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ ), denominado MIDAS (do inglês *Metal Ion-dependent Adhesion Site*), que se liga a resíduos negativamente carregados presentes em ligantes.<sup>23</sup>

O domínio  $\beta I$  está inserido no domínio híbrido, é homólogo ao domínio  $\alpha I$  e consiste em uma folha- $\beta$  central de seis fitas cercada por oito hélices, que contém um motivo MIDAS, cuja geometria geral de coordenação metal-ligante é semelhante à de  $\alpha I$ .<sup>21, 24</sup> Além disso, dois sítios adicionais importantes são identificados nesse domínio, o ADMIDAS (do inglês *Adjacent to Metal Ion-dependent Adhesion Site*) e o SyMBS (do inglês *Synergistic Metal Ion Binding Site*). O motivo ADMIDAS é um sítio de ligação de íons metálicos, podendo ser ocupado por  $Ca^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ , ligando-se preferencialmente ao primeiro, sendo um sítio inibitório de ligação ao  $Ca^{2+}$  e importante para a estabilização e mudança conformacional da proteína para sua forma ativa, mas não essencialmente para a ligação do ligante ao MIDAS.<sup>27</sup> O domínio SyMBS, por sua vez, é responsável pela sinergia de  $Ca^{2+}$ , em que baixas concentrações de  $Ca^{2+}$  e de  $Mg^{2+}$  cooperam para a ligação do ligante às integrinas, de modo que esses metais são previamente carregados antes da ligação do ligante.<sup>26, 27</sup>

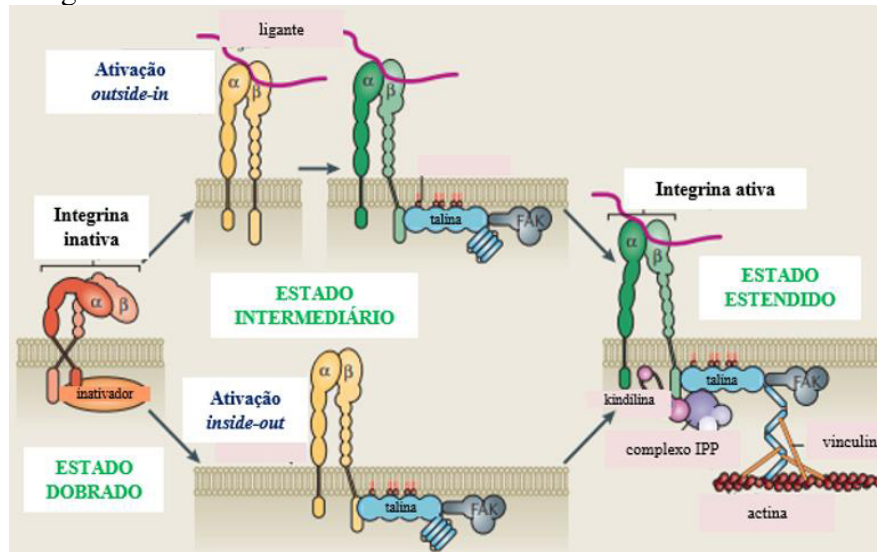
Assim, para as integrinas que apresentam o domínio  $\alpha I$ , este reconhece e interage diretamente com o ligante, enquanto naquelas que não possuem, o sítio de ligação consiste na interface entre o domínio  $\beta$ -propeller da subunidade  $\alpha$  e o  $\beta I$  da subunidade  $\beta$ .<sup>22</sup>

### 1.3 Sinalização bidirecional e regulação das integrinas

As integrinas estabelecem conexão estrutural entre o interior celular e o ambiente extracelular, uma vez que seus ectodomínios reconhecem ligantes expressos na superfície de outras células ou na MEC, e os citoplasmáticos ligam-se a proteínas do citoesqueleto.<sup>28</sup> Assim, os sinais são transmitidos de modo bidirecional através da membrana, ocorrendo de fora para dentro (sinalização *outside-in*) e de dentro para fora da célula (sinalização *inside-out*), que, por sua vez, não é uma via de sinalização comum à maioria dos receptores celulares.<sup>29, 30</sup>

Os mecanismos de sinalização exigem e provocam a constante alteração dos estados conformacionais das integrinas, os quais estão diretamente associados aos estados inativo e ativo desses receptores.<sup>28</sup> Os estados conformacionais (figura 3) incluem um estado dobrado de baixa afinidade, um estado intermediário, caracterizado por uma estrutura estendida, mas também de baixa afinidade, e um estado estendido de alta afinidade, no qual a integrina encontra-se totalmente ativada.<sup>31</sup> Desse modo, a extensão das “caudas” e abertura da “cabeça” das integrinas são duas mudanças estruturais que definem seus estados ativo e inativo e ocorrem em respostas a sinais bidirecionais transmitidos pelo próprio receptor.<sup>28</sup>

Figura 3 – Estados conformacionais e mecanismos de ativação das integrinas.



Fonte: Adaptado de Bouvard *et al.* (2013). **FAK** - Focal Adhesion Kinase. **Complexo IPP** – ILK (do inglês *Integrin-linked Kinase*), **PINCH** e **Parvina**.

A sinalização *inside-out* (figura 3) ativa intracelularmente a integrina e regula a sua afinidade, sendo desencadeada por alterações no ambiente intracelular e dependente da ligação de proteínas intracelulares às caudas citoplasmáticas, principalmente talina e kindilina.<sup>30,31</sup> As proteínas adaptadoras kindilinas interagem com as caudas citoplasmáticas das subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 3$ , facilitando a função da proteína talina, uma macromolécula de ligação à actina que, sob condições fisiológicas normais, apresenta-se em um estado de autoinibição, sendo incapaz de se ligar à integrina.<sup>32, 33, 34</sup> No entanto, uma vez ativada, liga-se à porção citoplasmática da subunidade  $\beta$ , promovendo a ruptura da ponte salina entre as porções citoplasmáticas das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , alterando a topologia do domínio transmembranar e expondo a interface de interação no domínio extracelular.<sup>35</sup> Assim, talina e kindilina ligam-se às caudas citoplasmáticas  $\beta$ , cooperando na ativação e estado de afinidade das integrinas.<sup>36</sup>

A sinalização *outside-in* (figura 3), por sua vez, depende da ligação direta entre um ligante e a integrina, o que implica na transdução de sinal para o citoplasma e em alterações conformacionais da integrina.<sup>37</sup> Os sinais *outside-in* são recebidos por outros receptores como tirosina quinase e receptores acoplados à proteína G, que, ao alcançarem o citoplasma da célula são retransmitidos aos ectodomínios, devido à formação de complexos multiproteicos entorno das caudas citoplasmáticas, que envolvem as anteriormente mencionadas proteínas kindilina e talina, bem como vinculina, recrutada pela proteína talina, importante para a estabilidade da interação talina-actina.<sup>28, 31, 38, 39</sup> Além disso, o complexo

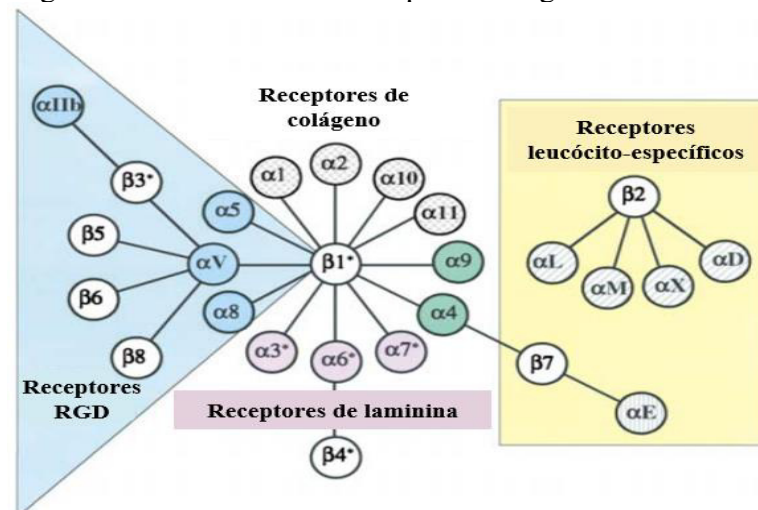
IPP, formado pelas proteínas quinase ligada à integrina (ILK, do inglês *Integrin-linked Kinase*), PINCH e parvina, recruta proteínas de adesão focal (FAK – do inglês *Focal Adhesion Kinase*), que incluem paxilina e  $\alpha$ -actinina, importante para ambas as vias de sinalização.<sup>40</sup>

Tais mecanismos de sinalização são, dessa forma, essenciais para ativação da integrina e regulação de suas funções, as quais devem ser controladas espacial e temporalmente, a fim de modular mecanismos celulares, como proliferação, sobrevivência, apoptose e adesão celular.<sup>1,31</sup>

#### 1.4 Classificação das integrinas e VLA-4

As integrinas podem ser classificadas em subfamílias conforme sua especificidade por componentes da MEC, havendo redundância em algumas interações integrina-MEC, que diferem, no entanto, na afinidade (figura 4).<sup>34</sup>

Figura 4 – Subfamílias de receptores integrinas.



Fonte: Adaptado de Hynes (2002). Representação da associação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  em 24 integrinas agrupadas em subfamílias conforme sua especificidade por ligantes, relações evolutivas (coloração das subunidades  $\alpha$ ) e expressão restrita em glóbulos brancos (receptores leucócito-específicos). Subunidades  $\alpha$  com hachuras e pontilhadas correspondem àquelas que apresentam o domínio I. Asteriscos indicam porções citoplasmáticas com *splicing* alternativo.

Algumas integrinas ligam-se às proteínas fibronectina e vitronectina, componentes da MEC que contêm a sequência RGD (Arginina-Glicina-Aspartato), sendo definidas como receptores RGD, e incluem as integrinas que apresentam as subunidades  $\alpha$ 5-,  $\alpha$ 8-,  $\alpha$ Ib- ou  $\alpha$ V-, principalmente  $\alpha$ 5 $\beta$ 1,  $\alpha$ 8 $\beta$ 1 e  $\alpha$ Ib $\beta$ 3.<sup>1</sup> No conjunto de receptores de laminina, estão as integrinas formadas pelas subunidades  $\alpha$ 3-,  $\alpha$ 6- ou  $\alpha$ 7-, que medeiam a adesão às lamininas da membrana basal, e na subfamília de receptores de colágeno estão as

proteínas formadas por  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\alpha 10$ - e  $\alpha 11$ -.<sup>41</sup> Subunidades com especificidade para laminina ou RGD são encontradas em todos os metazoários.<sup>1</sup>

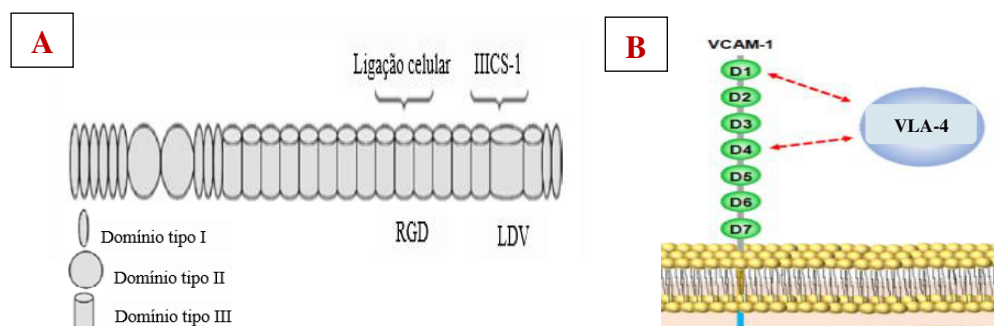
Além disso, duas integrinas relacionadas,  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha 9\beta 1$ , reconhecem proteínas da MEC, como a fibronectina, e contrarreceptores de superfície celular da subfamília Ig, como VCAM-1 (do inglês *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*), uma interação também característica das integrinas do grupo de receptores leucócito-específicos. As subunidades  $\alpha 4$  e  $\alpha 9$ , juntamente com as subunidades  $\alpha$  que apresentam o domínio  $\alpha I$  e as subunidades  $\beta 2$  e  $\beta 8$ , são restritas aos cordados.<sup>1</sup>

Integrina de particular interesse é a  $\alpha 4\beta 1$  (CD49d/CD29) ou VLA-4 (do inglês *Very Late Antigen 4*), que integra a subfamília de integrinas VLAs. Essa subfamília inclui as integrinas que apresentam a subunidade  $\beta 1$ , tendo sido inicialmente identificada em células T ativadas por períodos prolongados.<sup>42</sup>

VLA-4 é predominantemente expressa na superfície de células hematopoiéticas, principalmente em monócitos e linfócitos T, e seus principais ligantes são fibronectina e VCAM-1, presentes na MEC e em células do endotélio ativado, respectivamente, de modo que  $\alpha 4\beta 1$  medeia a adesão célula-MEC e célula-célula.<sup>43</sup> Uma vez que VLA-4 não apresenta o ectodomínio  $\alpha I$ , o sítio de ligação para seus ligantes consiste na interface entre o domínio  $\beta$ -propeller e o MIDAS da subunidade  $\beta I$ .<sup>1</sup>

A fibronectina é uma grande proteína da MEC (220-250 kDa) que consiste em um dímero ligado por pontes dissulfeto próximas ao terminal carboxílico, em que cada monômero contém doze domínios do tipo I, dois do tipo II e quinze a dezessete do tipo III, formados, respectivamente, por 45, 60 e 90 resíduos de aminoácidos (figura 5A).<sup>34, 44</sup> O domínio do tipo III no segmento de conexão 1 (CS-1) apresenta o motivo tripeptídico LVD (Leucina-Valina-Aspartato), o sítio de ligação da integrina VLA-4.<sup>34</sup>

Figura 5 – Representação estrutural das proteínas fibronectina e VCAM-1.



Fonte: Adaptado de **A.** Srichal e Zent (2010) e **B.** Kong *et al.* (2018). Estrutura das proteínas **A.** fibronectina e **B.** VCAM-1 – *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*.

A glicoproteína VCAM-1, por sua vez, é uma macromolécula transmembranar de

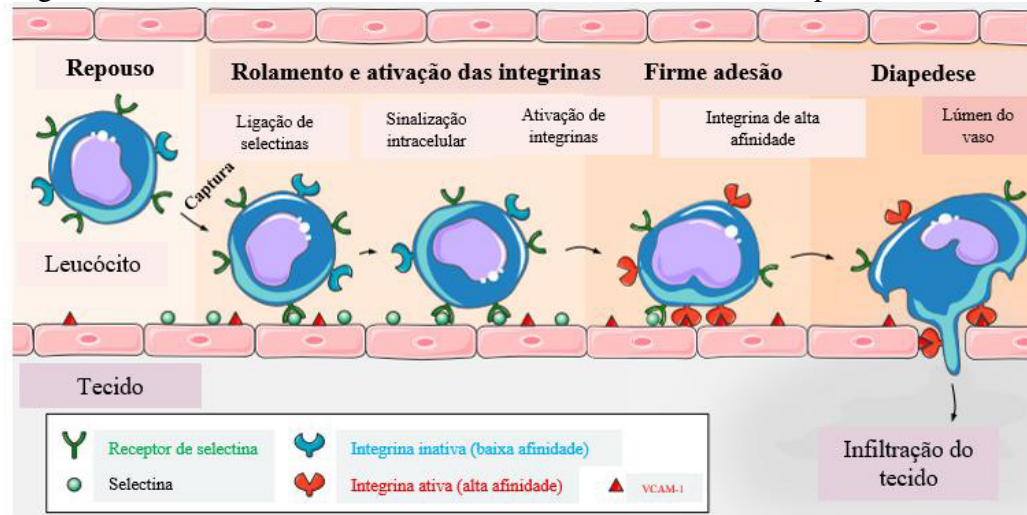
90 kDa, pertencente à família das Igs, expressa predominantemente em células endoteliais e caracterizada por um domínio extracelular com seis ou sete domínios (D1-D7), um domínio transmembranar e um domínio citoplasmático de 19 aminoácidos (figura 5B).<sup>45, 46</sup> A interação entre VCAM-1 e VLA-4 ocorre entre os domínios D1 e D4 da primeira e a interface  $\beta$ -propeller- $\beta$ I da segunda.<sup>47</sup>

Tais interações são essenciais para a adesão de leucócitos à MEC e ao endotélio e estão diretamente relacionadas ao mecanismo de inflamação, dado o seu papel no processo de extravasamento de leucócitos em direção a sítios inflamatórios.<sup>48</sup> Nesse contexto, VLA-4 é capaz de alterar sua adesividade ao longo do processo de migração de células de defesa, aumentando a adesão celular.<sup>49</sup>

#### 1.4.1 VLA-4, doenças inflamatórias e agentes terapêuticos

A integrina VLA-4 está diretamente relacionada aos processos de adesão e retenção celular (figura 6), bem como à sinalização pró-inflamatória, desempenhando, portanto, papel central em doenças inflamatórias crônicas, como, por exemplo, asma, artrite reumatoide e esclerose múltipla.<sup>50</sup> A primeira é uma inflamação alérgica das vias aéreas que tem como importante característica a hiper-responsividade a estímulos inespecíficos, que em indivíduos saudáveis não teriam implicações significativas.<sup>51</sup> Essa doença afeta mais de 300 milhões de pessoas no mundo, com ocorrência estimada em 23,2% dos brasileiros.<sup>51, 52</sup> O processo envolve a ativação e adesão de eosinófilos e linfócitos T mediadas por  $\alpha 4\beta 1$ .

Figura 6 – Processo de extravasamento de leucócitos mediado por VLA-4.



Fonte: Adaptado de Lagarrigue, Kim e Ginsberg (2016). A imagem ilustra o processo de ativação das integrinas à medida que ocorre o rolamento de leucócitos sobre o endotélio ativado.

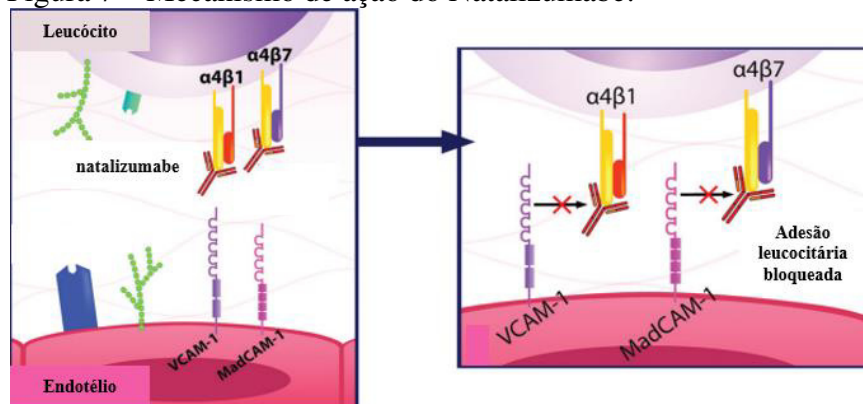
No que diz respeito à artrite reumatoide, esta apresenta prevalência de aproximadamente 0,5% na população global, sendo caracterizada pela inflamação da

membrana sinovial das articulações devido ao influxo de células imunes para os locais de lesão tecidual, que resulta na invasão do osso adjacente e consumo de cartilagem.<sup>53, 54</sup> Nos infiltrados inflamatórios, células T são localizadas em alta proporção, cuja migração e permanência é favorecida por VLA-4.<sup>55</sup>

A esclerose múltipla, por sua vez, consiste em uma doença neurodegenerativa que atinge cerca de 2,8 milhões de pessoas em todo o mundo e aproximadamente 40 mil brasileiros.<sup>56</sup> É caracterizada por duas fases principais, uma de inflamação, mediada por  $\alpha 4\beta 1$ , na qual ocorre a adesão de células T às células endoteliais cerebrovasculares, superação da barreira hematoencefálica e reativação local do infiltrado de células T, gerando lesões “silenciosas”, que, posteriormente, caracterizam a fase de neurodegeneração, marcada por lesões axonais, danos difusos à substância branca e envolvimento da substância cinzenta.<sup>57</sup>

Tais doenças, portanto, exemplificam algumas das patologias humanas com papel importante da integrina  $\alpha 4\beta 1$  em seus mecanismos, o que justifica o interesse biomédico contínuo no desenvolvimento de novos inibidores de VLA-4. Nesse sentido, um antagonista disponível no mercado é o Natalizumabe (Tysabri), um anticorpo monoclonal IgG4 humanizado recombinante, formado por seis CDRs (do inglês *Complementarity Determining Regions*) derivadas de um anticorpo murino inseridas na IgG4 humana.<sup>58</sup> O alvo desse anticorpo é a subunidade  $\alpha 4$ , cuja ligação inibe as adesões mediadas por integrinas  $\alpha 4$  de leucócitos aos seus contrarceptores (figura 7), sendo utilizado, desse modo, no tratamento de esclerose múltipla.<sup>59</sup> Entretanto, o tratamento da esclerose múltipla com esse medicamento está associado ao risco de Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LMP), infecção cerebral oportunista provocada pelo vírus JC (John Cunningham).<sup>60</sup>

Figura 7 – Mecanismo de ação do Natalizumabe.



Fonte: Adaptado de Selewski *et al* (2010). Natalizumabe interage com a subunidade  $\alpha 4$ , não sendo, em razão disso, específico para VLA-4. **VCAM-1** – *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*; **MadCAM-1** – *Mucosal vascular Addressin Cell Adhesion Molecule 1*.

Apesar disso, o uso do anticorpo Natalizumabe ilustra a importância de moléculas

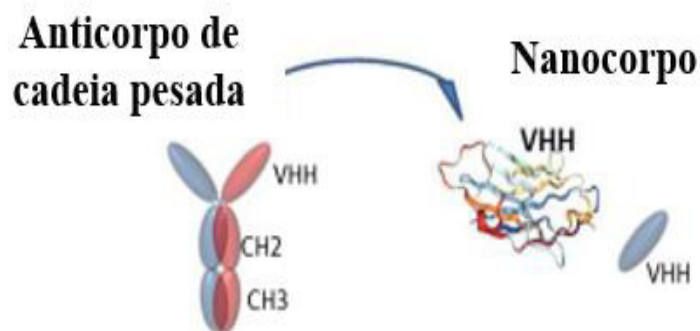


dessa natureza como estratégia para o tratamento de diversas patologias. Nessa perspectiva, uma classe de anticorpos que têm despertado interesse de laboratórios e farmacêuticas é a dos nanocorpos, os menores fragmentos de anticorpos conhecidos.

## 1.5 Nanocorpos

Nanocorpos são os menores fragmentos de anticorpos capazes de se ligar a um antígeno e surgiram como produtos biológicos derivados de anticorpos de cadeia pesada (HCAbs, do inglês *Heavy-Chain Antibodies*) (figura 8), presentes no soro de todos os membros da família Camelidae, como nos camelos (*Camelus dromedarius* e *Camelus bactrianus*) e lhamas (*Lama glama* e *Lama guanicoe*).<sup>61,62</sup>

Figura 8 – Representação estrutural do anticorpo de cadeia pesada e região VHH.



Fonte: Adaptado de Salvador, Vilaplana e Marco (2019). Representação da IgG de Camelidae desprovida dos domínios CL e CH1 e estrutura tridimensional da porção VHH. Nanocorpo é o termo atribuído a VHH recombinante.

Os HCAbs são IgGs desprovidas de cadeia leve (CL) e do domínio constante de cadeia pesada 1 (CH1, do inglês *Constante Heavy-Chain 1*), e apresentam, na região N-terminal da cadeia pesada, um domínio variável responsável pelo reconhecimento e associação ao antígeno para o qual apresenta especificidade, denominado VHH (do inglês *Variable Domain of the Heavy Chain of Heavy-Chain Antibody*), que equivale estrutural e funcionalmente aos fragmentos de ligação ao antígeno (Fab, do inglês *Antigen Binding Fragment*) das IgGs convencionais, as quais também são identificadas nos camelídeos.<sup>63</sup> Por convenção, o termo nanocorpo, é usado para VHH recombinante.<sup>64</sup>

### 1.5.1 Características únicas

Os VHHs são os menores fragmentos de anticorpos conhecidos, com tamanho

entre 12-15 kDa.<sup>65</sup> Estruturalmente, são formados por quatro regiões conservadas, as *frameworks* (FRs), e três CDRs, altamente variáveis e constituintes da região de reconhecimento de antígenos, cuja alta especificidade e afinidade estão relacionadas à uma CDR3 muito longa e variabilidade aumentada da sequência CDR1.<sup>66, 67</sup>

Assim, tais características estão associadas à possibilidade de penetração tecidual mais profunda, bem como à capacidade do nanocorpo de ligar epítomos estruturados e crípticos, frequentemente inacessíveis aos anticorpos completos e seus derivados, isso porque a arquitetura de paratopo plana ou convexa do VHH permite a interação com epítomos côncavos, por exemplo, fendas, nas moléculas alvo.<sup>65, 68, 69</sup>

Além disso, apresentam propriedades físico-químicas de particular interesse como a alta solubilidade em solução aquosa e estabilidade conformacional.<sup>65</sup> A primeira resulta da combinação entre o tamanho e dobramento da alça CDR3 sobre a FR2 e a presença de aminoácidos hidrofílicos nessa FR, cujos correspondentes nas IgGs convencionais são resíduos hidrofóbicos.<sup>70, 71</sup> Além disso, tais fragmentos de anticorpos requerem altas pressões (<400 MPa) para que ocorra seu desdobramento e são bastante resistentes à desnaturação sob altas temperaturas (60-90 °C).<sup>72, 73</sup>

Ademais, os domínios VHHs apresentam alta homologia com os VH humanos, diferindo em aproximadamente 10 resíduos espalhados em sua superfície, o que reduz a probabilidade de ocorrência de imunogenicidade.<sup>65</sup> Apesar disso, esses anticorpos requerem uma etapa de humanização para serem empregados como agentes terapêuticos, de modo que os resíduos que não estão envolvidos em interações antígeno-anticorpos e/ou não são importantes para suas características físico-químicas podem ser mutados para seus equivalentes em VH humanos.<sup>71, 74</sup>

Em suma, tais fatores associados à possibilidade de produção de nanocorpos em sistemas procarióticos fazem desses fragmentos de anticorpo uma alternativa aos anticorpos tradicionais e uma classe de produtos biológicos promissores com aplicações em diferentes áreas da biotecnologia e biomedicina.

### ***1.5.2 Desenvolvimento e produção***

Os nanocorpos apresentam-se naturalmente como um pequeno domínio monomérico, porém podem ser geneticamente modificados a fim de produzir formatos que

permitam uma multiespecificidade e versatilidade biológica.<sup>74, 75</sup> Além disso, a multiplicidade de aplicações requer diferentes métodos de expressão, que incluem sistemas eucarióticos, como leveduras, células de mamíferos e plantas, e procarióticos, principalmente *E. coli*, cuja utilização varia conforme a finalidade estrutural e funcional do nanocorpo.<sup>75</sup>

A levedura *Pichia pastoris* é o sistemas mais utilizado entre os eucarióticos, pois apresenta características similares às de *E. coli* no que diz respeito ao crescimento e facilidade de manipulação, além de favorecer a formação de pontes dissulfeto e o possível enovelamento correto dos nanocorpos, sendo empregada na produção, por exemplo, de nanocorpos ligados ao domínio Fc (do inglês *Fragment Crystallizable*) de IgGs convencionais, embora seja economicamente menos vantajosa e esteja associada a menor eficiência de ligação nanocorpo-antígeno do anticorpo obtido.<sup>76, 77</sup>

Além disso, formatos nanocorpo-Fc também são produzidos em células de mamíferos, como em células HEK (do inglês *Human Embryonic Kidney*) e CHO (do inglês *Chinese hamster ovary*), um sistema, no entanto, associado a alto custo de produção e contaminação por patógenos, além de mostrar-se mais sensível a alterações de cultivo e manipulação.<sup>76, 78, 79</sup> As plantas, por sua vez, como *Nicotiana benthamiana* e *Arabidopsis thaliana*, também se apresentam como hospedeiros viáveis devido à fácil transformação e cultivo, produção de proteína em grande quantidade e em diferentes tecidos e capacidade de realizar modificações pós-traducionais eficientes, embora a diferença nos padrões de glicosilação, quando necessária, seja uma limitação.<sup>76, 80, 81</sup>

Entretanto, apesar dos diferentes sistemas conhecidos para a produção de proteínas recombinantes, dada as características basais dos VHHs, a plataforma mais simples e com resultados satisfatórios é *E. coli*. Esse hospedeiro apresenta vantagens que incluem genética conhecida, rápido crescimento, fácil manipulação, redução dos custos de produção e expressão proteica com alto rendimento e grau de pureza, bem como disponibilidade de diferentes vetores de clonagem e expressão.<sup>76, 82, 83</sup> Por outro lado, *E. coli* não é capaz de realizar processamento pós-traducional, pode produzir endotoxinas e a expressão proteica pode ocorrer sob a forma de corpos de inclusão.<sup>76, 82</sup>

Em síntese, todos os sistemas apresentam vantagens e desvantagens e seu emprego depende das finalidades de produção. Contudo, *E. coli* apresenta-se como o padrão ouro procariótico de expressão heteróloga de proteínas recombinantes, incluindo pequenos

fragmentos de anticorpos.

### **1.5.3 Aplicações**

Os nanocorpos são alvos de pesquisas em diferentes áreas da biotecnologia e biomedicina devido às características únicas e possibilidade de diferentes aplicações, além do crescente interesse farmacêutico por anticorpos no formato VHH. Na medicina, os nanocorpos são empregados com fins terapêuticos para um amplo espectro de doenças humanas, tais como cânceres, inflamações e doenças neurológicas, bem como em diagnóstico e imagem.<sup>84</sup>

Nesse sentido, nanocorpos são relatados em sistemas de detecção de protozoários, de bactérias e de biomoléculas, como enzimas, sendo empregados, por exemplo, como sondas em biossensores, nesse caso, principalmente em razão de sua estabilidade e resistência.<sup>85, 86, 87</sup> Além disso, podem ser utilizados como sondas para obtenção de imagens moleculares de tumores devido à capacidade de se ligar firmemente à superfície de células cancerígenas.<sup>88</sup>

Além disso, a aplicação de nanocorpos no tratamento do câncer inclui o uso como drogas antagonistas de receptores ou ligantes de receptores alvos, agente de direcionamento de domínios efetores, como toxinas e enzimas, para a célula alvo e carreadores em sistemas de entrega de drogas.<sup>88</sup> Ademais, outras investigações incluem aplicações, por exemplo, para artrite reumatoide, osteoartrite, doença renal e inflamação intestinal, cujo objetivo, em geral, é inibir ligantes e/ou receptores associados a tais doenças.<sup>89, 90</sup>

Similarmente, diante da emergência global provocada pelo coronavírus SARS-CoV-2 (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*), a busca por agentes imunológicos capazes de promover imunidade e/ou neutralizar esse agente infeccioso foi e permanece sendo de enorme interesse. Nesse sentido, nanocorpos profiláticos no formato nanocorpo-Fc exibiram alta afinidade ( $K_D < 0,55$  nM) pelo domínio de ligação ao receptor (RBD, do inglês *Receptor-binding Domain*), com o qual se liga, interrompendo sua interação com o receptor humano ACE2 (do inglês *Angiotensin-Converting Enzyme 2*), que é, por sua vez, essencial para o curso do processo de infecção.<sup>91</sup>

De fato, distintos nanocorpos estão em diferentes estágios de pesquisa laboratorial e clínica, cujos trabalhos tendem a ser impulsionados à medida que resultados práticos são alcançados, saindo das bancadas e ensaios testes para o tratamento efetivo de doenças

humanas. Frente a isso, o primeiro nanocorpo foi aprovado, em 2018 na União Europeia (UE) e em 2019 nos Estados Unidos (EUA), o caplacizumabe (Cabliivi™), para tratamento de um distúrbio de coagulação sanguínea autoimune, a Púrpura Trombocitopênica Trombótica Adquirida (aTTP) caracterizada por obstrução de pequenos vasos sanguíneos e baixos níveis de plaquetas na corrente sanguínea.<sup>92, 93</sup>

A aTTP é causada pela deficiência da metaloproteinase ADAMTS13 devido à ação de autoanticorpos anti-ADAMTS13, que a neutralizam ou induzem sua depuração. Essa enzima é responsável pela clivagem dos multímeros ultragrandes do fator de vWA, que, na ausência de ADAMTS13, acumulam-se no sangue e induzem a ligação e ativação excessiva das plaquetas, o que resulta na formação de coágulos ricos nessas células na microvasculatura.<sup>94</sup> Assim, o caplacizumabe é usado no tratamento de aTTP por ter como alvo o fator vWA, que, uma vez em complexo com o nanocorpo, tem sua capacidade de interação com plaquetas inibidas, o que impede a adesão plaquetária.<sup>95</sup>

Diante disso, além do impacto na saúde humana, a aprovação do caplacizumabe em 2018 impulsionou um setor farmacêutico que se mostrou proeminente a partir de 2001, quando a biofarmacêutica Ablynx passou a desenvolver e comercializar a tecnologia de nanocorpos, cujo resultado prático mais atual é o próprio caplacizumabe.<sup>89</sup> Ademais, no ano de aprovação desse nanocorpo, a grande empresa farmacêutica Sanofi adquiriu a Ablynx por aproximadamente 3,8 bilhões de euros, evidenciando o valor monetário associado ao mercado de nanocorpos.<sup>89</sup> Além disso, há uma série de nanocorpos em diferentes estágios de desenvolvimento, com parceria entre a Ablynx e outras importantes empresas do mercado como Pfizer, Merck e Janssen.<sup>96</sup>

Portanto, a estrutura dos nanocorpos em conjunto com as tecnologias disponíveis e potenciais aplicações, fazem desses fragmentos de anticorpos importantes alvos no desenvolvimento de compostos terapêuticos, sendo inclusive caracterizados como terapêutica de próxima geração (Nano-BioDrugs).<sup>96</sup>

## **1.6 Justificativa**

Diante do exposto, é evidenciada o potencial do desenvolvimento de antagonistas de VLA-4 no formato VHH. Em verdade, o anticorpo Natalizumabe apresenta-se como um antagonista de  $\alpha 4\beta 1$  por ter como alvo a subunidade  $\alpha 4$ , mas não é específico para essa integrina. Este trabalho, por outro lado, apresenta os resultados iniciais, oriundos de técnicas

computacionais e experimentais, do desenvolvimento de três nanocorpos específicos e potenciais inibidores de VLA-4.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Propor uma estrutura tridimensional para cada nanocorpo anti-VLA-4 trabalhado, e produzi-los em sistema heterólogo de expressão.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Modelar por meio de técnica computacional três nanocorpos anti-VLA-4;
- Validar as estruturas tridimensionais obtidas;
- Produzir nanocorpos em *E. coli* SHuffle pLysS;
- Purificar nanocorpos por cromatografia de afinidade;
- Obter proteínas solúveis.

### 3 METODOLOGIA

Três nanocorpos, derivados de um scFv (do inglês *Single Chain Variable Fragment*) anti-VLA-4, distintos quanto à composição de CDRs, foram modelados computacionalmente por modelagem comparativa e produzidos *in vitro* por técnicas recombinantes.

#### 3.1 Modelagem comparativa de nanocorpos

##### 3.1.1 Obtenção dos moldes

A fim de obter os moldes para modelagem dos nanocorpos, as sequências parcialmente humanizadas correspondentes aos VHHs humanizados trabalhados *in vitro*, foram modeladas por meio do SabPred, um servidor *on-line* que agrupa ferramentas de predição de anticorpos.<sup>97</sup>

O SabPred inclui um *pipeline* de modelagem computacional denominado, *AbodyBuilder*, cuja metodologia é similar a outras ferramentas de modelagem, diferindo, entretanto, porque anota a confiança da estrutura gerada com a probabilidade das regiões modeladas estarem dentro de um limite RMSD (do inglês *Root-Mean Square Deviation*) específico, sendo de particular interesse devido à capacidade de gerar estruturas de nanocorpos, uma limitação para muitos dos servidores e programas disponíveis, e por sua rapidez, com geração de modelos em menos de um minuto.<sup>97</sup>

No entanto, *AbodyBuilder* não foi capaz de gerar um modelo para as sequências humanizadas, de modo que a estrutura gerada para cada uma das sequências parcialmente humanizadas foi utilizada como molde.

##### 3.1.2 Construção dos modelos

Para obtenção dos modelos dos nanocorpos humanizados foi utilizado o programa MODELLER, baseado no método de satisfação de restrições espaciais oriundas do alinhamento entre a sequência alvo e a(s) sequência(s) modelo(s), que são expressas como uma função objetiva (molpdf, do inglês *Modeller Objective Probability Density Functions*) para as características restritas, a fim de que informações estruturais, como a distância entre carbonos-alfa ( $C\alpha - C\alpha$ ) e distâncias entre os ângulos diedros da cadeia principal e lateral, sejam transferidas do molde para o alvo, de modo que o modelo gerado viole o mínimo possível as restrições identificadas.<sup>98</sup>

Para tanto, as sequências molde e alvo foram alinhadas usando um *script* padrão do MODELLER, modificado com as informações das sequências trabalhadas. Em seguida, 100 modelos foram gerados para cada um dos três nanocorpos, dos quais os cinco com menor valor de função objetiva seguiram para a etapa de refinamento.



### 3.1.3 Refinamento dos modelos e validação das estruturas

O refinamento das estruturas foi realizado por meio do servidor locPREFMD (do inglês *Local Protein Structure Refinement via Molecular Dynamics*), que melhora a qualidade das estruturas através do refinamento da estrutura local sem alterar a dobra geral, usando minimização e amostragem via dinâmica molecular e reconstrução de resíduos problemáticos, gerando modelos com pontuações MolProbity melhoradas.<sup>99</sup>

Assim, as estruturas foram submetidas ao servidor, cujos arquivos de saída consistiram na estrutura refinada e dados de validação, incluindo pontuações do MolProbity, empregadas na validação das estruturas refinadas, que também foram avaliadas nos servidores PROCHECK, Verify3D e QMEANDisCo, visando a seleção do modelo de melhor qualidade para cada nanocorpo.

Os servidores de validação são empregados para verificar se os modelos obtidos estão em conformidade com os parâmetros estruturais esperados para proteínas de alta resolução.<sup>99</sup> MolProbity e PROCHECK avaliam a qualidade estereoquímica das estruturas, incluindo análise de contato dos átomos, problemas estéricos dentro das moléculas e valores dos ângulos diedros.<sup>100, 101</sup> O servidor Verify3D, por sua vez, indica a compatibilidade de um modelo com sua estrutura primária,<sup>102</sup> enquanto QMEANDisCo gera uma pontuação que consiste na qualidade do modelo local e global a partir da pontuação de qualidade de cada resíduo e a média dessas estimativas, respectivamente.<sup>103</sup>

## 3.2 Produção heteróloga de nanocorpos

### 3.2.1 Transformação de células quimiocompetentes de *E. coli* SHuffle pLysS

Células quimiocompetentes de *E. coli* SHuffle pLysS foram transformadas com os plasmídeos recombinantes pET-SUMO\_VHH-1, pET-SUMO\_VHH-3 e pET-SUMO\_VHH-4. Para isso, foi adicionado 3 uL do plasmídeo pET-SUMO\_VHH a microtubo (1,5 mL) contendo 50 uL de células quimiocompetentes de *E. coli* SHuffle pLysS.

Para a transformação das células foi aplicada a metodologia de choque térmico, da seguinte forma: 1°. 30 min em gelo; 2°. 60 s a 42 °C; 3°. um min no gelo. Feito isso, foi adicionado a cada microtubo 900 uL de LB-caldo (Luria-Bertani), os quais foram incubados a 37 °C, 200 rpm, por uma hora. Decorrido o tempo de incubação, as culturas foram centrifugadas a 4 °C, 4000 rpm, por um minuto. Logo após, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 100 uL de meio LB-caldo, dos quais 10 uL foram esgotados em meio LB-ágar combinado aos antibióticos cloranfenicol (CLO) e canamicina (KAN), ambos a 50 ug/mL. As placas foram incubadas a 37 °C, *overnight* (~16 h).

Após o tempo de crescimento celular, uma colônia de cada cultura foi selecionada

para realização dos pré-inóculos visando a utilização na indução da expressão. Assim, cada colônia foi inoculada em 5 mL de meio LB-caldo suplementado com KAN (50 ug/mL) e CLO (50 ug/mL), e, então, incubadas a 37 °C, *overnight*, 200 rpm. Após esse período, foi iniciada a etapa de indução da expressão.

### 3.2.2 *Indução da expressão*

Cada pré-inóculo foi vertido em um *erlenmeyer* de 1 L com 250 mL de meio LB-caldo combinado a KAN (50 ug/mL) e CLO (50 ug/mL). As culturas foram incubadas a 37 °C, 200 rpm, até atingirem a D.O<sub>600nm</sub> entre 0,4 e 0,6, quando, então, foi coletado 1 mL de cada cultura, para análise posterior, seguida pela adição do indutor da expressão, IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) a 0,3 mM. As culturas foram mantidas a 15 °C, *overnight*, 210 rpm.

Finalizado o período de indução da expressão, a D.O<sub>600nm</sub> foi verificada e 1 mL de cultura coletada, para análise posterior, e o volume final de cada cultura induzida foi centrifugado a 10000 x g, por 15 min, 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* submetidos a etapa de extração e purificação proteica.

As amostras coletadas antes da indução (N.I – não induzida) e após as 16 horas de expressão (I – induzida) foram analisadas por SDS-PAGE (item 3.2.4).

### 3.2.3 *Extração e purificação*

Os *pellets* obtidos na etapa de indução da expressão foram ressuspensos em 30 mL de tampão A (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM e imidazol 20 mM) combinado a TritonX100 e PMSF (do inglês *Phenylmethylsulfonyl fluoride*) 100 mM, ambos para uma concentração final de 1%. Em seguida, as amostras, sempre mantidas em gelo, foram submetidas à metodologia de extração proteica por sonicação, usando *Q700 Sonicator*, com amplitude de 30%, por 15 min *ON*, em ciclos de pulsação de 20 s *ON* e 40 s *OFF*. Após o processo de extração, as amostras foram centrifugadas a 10000 x g, por 30 min, 4 °C.

O sobrenadante obtido foi filtrado em filtro PTFE 0,22 μM, e, então, purificado por cromatografia de afinidade de metal imobilizado (IMAC, do inglês *Immobilized Metal Affinity Chromatography*), em sistema cromatográfico *AKTA pure* e coluna *HisTrap* 1 mL. Inicialmente, a coluna foi equilibrada com tampão A, a uma taxa de fluxo de 1 mL/min, por 5 min. Logo após, a amostra foi injetada a 0,5 mL/min de fluxo, sendo seguida pela lavagem da coluna com tampão A, para remoção do conteúdo não ligado à matriz. Por fim, a eluição dos nanocorpos foi realizada com tampão B (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM e imidazol 500 mM), com frações de 1 mL coletadas em microtubos de 2 mL. Esse processo foi realizado sequencialmente para as três amostras trabalhadas, gerando gráficos com o perfil de eluição. Além disso, as frações eluídas foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE (item 3.2.4).

### 3.2.4 Análise da expressão e purificação por SDS-PAGE

As amostras correspondentes às alíquotas (*pellets*) coletadas antes da indução da expressão (N.I.) e após o tempo de indução (I.), bem como às frações eluídas na etapa de purificação foram analisadas em gel SDS-PAGE 12,5%.

Para análise da expressão, os *pellets* foram ressuspensos em tampão de amostra 1X (TRIS-HCl 50 mM pH 6,8, dodecil sulfato de sódio (SDS) 2% (m/v), azul de bromofenol 0,1% (m/v), glicerol 10% (v/v), e 2-mercaptoetanol 100 mM), conforme a fórmula:

**volume de tampão de amostra 1X (uL) = D.O x 25 uL / 0,1 uL x volume coletado**

As frações eluídas na etapa de purificação, por sua vez, foram combinadas a tampão de amostra 5X, para uma concentração final igual a 1X.

Em seguida, as amostras foram expostas a uma temperatura de 100 °C, por cinco minutos, quando, então, 10 uL das amostras correspondentes aos *pellets* e 12 uL das amostras correspondentes às frações eluídas foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5%. A corrida foi realizada a 90-120 V, por aproximadamente uma hora e 30 minutos. Ao término da corrida eletroforética, os géis foram corados com Comassie Blue, descorados com solução descorante (10% ácido acético + 30% etanol) e visualizados em fotodocumentador *iBright™ FL1500 Imaging System*.

### 3.2.5 Detecção de nanocorpos por Western Blotting

As frações purificadas, cujo perfil proteico observado por SDS-PAGE corresponde ao esperado para os nanocorpos trabalhados, foram analisadas por *Western Blotting* a fim de detectar a presença dessas proteínas. As amostras purificadas foram aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE 12,5%, conforme protocolo descrito no item 3.2.4.

Após a corrida eletroforética, o sistema de transferência foi montado para transferência das proteínas do gel de eletroforese para a membrana de nitrocelulose. Para isso, 20 folhas de papel filtro, o gel de eletroforese e a membrana de nitrocelulose foram embebidos em tampão de transferência (tampão 1X (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, glicina 1,92 M e SDS 1%) combinado a 20% de metanol) e posicionados na cuba de transferência da seguinte forma: 10 folhas de papel filtro, sobre as quais foram empilhadas a membrana de nitrocelulose, o gel de eletroforese e as demais 10 folhas de papel filtro. Em seguida, a transferência foi realizada por meio do BIO-RAD *Trans-Blot Transfer System* a 1,3 A, 25 V, 5 min, para transferência de proteínas de até 30 kDa.

Realizada a transferência, a membrana foi corada com 15 mL de corante *Ponceau* em temperatura ambiente, leve agitação, por 10 min, quando, então, foi possível visualizar as

bandas proteicas. Em seguida, a membrana foi lavada com água destilada e bloqueada com 15 mL de leite desnatado Mólico 5% em PBS 1X-Tween 0,05%, por 2 h, sob leve agitação. Decorrido esse tempo, a membrana foi submetida a três lavagens, consecutivas e intercaladas, com 10 mL de PBS 1X-Tween 0,05%, por 10 min cada uma, sempre sob agitação leve e em temperatura ambiente.

As lavagens foram seguidas por incubação da membrana com o anticorpo primário não conjugado, Anti-his produzido em rato (sigma-SAB1305538), na proporção de 1:6000 em 15 mL de PBS 1X-Tween 0,05%, *overnight* (~16 h), a 4 °C. Posteriormente, novas lavagens foram realizadas seguindo a metodologia descrita anteriormente, seguidas pela incubação da membrana com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase, Anti-mouse IgG produzido em coelho, na proporção de 1:30000 em 15 mL de PBS 1X-Tween 0,05%, por 4 h, leve agitação, no escuro e temperatura ambiente.

Logo após, a membrana foi lavada, seguindo protocolo padrão, e revelada usando substrato de *Western blotting Pierce™ ECL* (Thermo-32209). A membrana foi visualizada usando *iBright™ FL1500 Imaging System*.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho são apresentados os modelos estruturais obtidos *in silico* para os nanocorpos VHH-1, VHH-3 e VHH-4, bem como os resultados da produção recombinante dessas proteínas *in vitro*.

### 4.1 Modelagem comparativa de nanocorpos anti-VLA-4

As estruturas tridimensionais dos nanocorpos foram obtidas por modelagem comparativa, por meio da ferramenta MODELLER, o *software* mais utilizado para modelar nanocorpos em estudos teóricos,<sup>104</sup> usando como molde estruturas obtidas por modelagem computacional no servidor SabPred, portanto, sem o uso de um cristal.

Foram gerados 100 modelos para cada nanocorpo, dos quais os cinco de menor função objetiva (ver apêndice A) foram refinados. A função objetiva indica quão próximo está o modelo predito da estrutura molde, de modo que quanto menor, mais próximos estatisticamente estão o molde e a estrutura obtida.<sup>105</sup> Assim, os modelos selecionados foram refinados no servidor locPREFMD e o que exibiu melhor qualidade para cada VHH, conforme as análises realizadas, é apresentado neste trabalho.

O servidor de refinamento locPREFMD tem como objetivo melhorar as pontuações do MolProbity, como uma medida da qualidade estrutural local preservando as coordenadas iniciais do C $\alpha$  o máximo possível.<sup>99</sup> Desse modo, as pontuações dos modelos refinados escolhidos podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1 – Pontuações MolProbity atribuídas aos modelos preditos.

Pontuações MolProbity	VHH-1	VHH-3	VHH-4
Pontuação total Ideal: <1,0	1,002	0,941	1,025
Pontuação de confronto Ideal: 0	0,000	0,000	0,000
Desvios de C $\beta$ Ideal: 0	0	0	0
Rotâmeros de cadeia lateral atípicos Ideal: <0,3%	1,020	0,000	1,000
Ramachandran atípico Ideal: <0,3%	4,130	0,000	1,670

Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores de pontuação total consistem em uma pontuação geral que resulta da combinação ponderada em *log* da pontuação de confronto, porcentagem de Ramachandran não favorecida e porcentagem de rotâmeros da cadeia lateral ruins, e reflete a qualidade da estrutura local.<sup>106</sup> Em geral, estruturas que apresentam pontuação entre 1 e 2 são consideradas

de qualidade, sendo de alta qualidade aquelas com pontuação <1.<sup>99</sup>

A pontuação de confronto, por sua vez, reflete a sobreposição de átomos não ligados em mais de 0,4 Å em uma entrada normalizada por 1000 átomos. A ocorrência dessa sobreposição caracteriza confrontos sérios, pois não podem ocorrer nas moléculas nativas.<sup>106</sup> Os desvios de  $C_{\beta}$  medem a distância da posição  $C_{\beta}$  modelada à posição ideal esperada, de modo que um desvio é considerado grande quando é maior que 0,25 Å.<sup>101</sup> No que diz respeito aos rotâmeros de cadeia lateral atípicos e Ramachandran atípico, o primeiro indica a fração de resíduos polipeptídicos da cadeia lateral não rotamérica e o segundo a fração de resíduos de polipeptídeos da cadeia principal que apresenta conformação incomum.<sup>106</sup>

Em síntese, os valores MolProbity indicam a boa qualidade das estruturas previstas, dada a pontuação total menor que 2, a ausência de confrontos sérios e a ausência de desvios nas estruturas, sinalizando que não há incompatibilidade entre a conformação da cadeia lateral e da cadeia principal das estruturas apresentadas. Além disso, apesar dos valores para as conformações atípicas da cadeia principal e lateral estarem acima da ideal para os modelos VHH-1 e VHH-4, há espaço para valores atípicos tanto para rotâmeros de cadeia lateral quanto de cadeia principal, uma vez que mesmo o conjunto de dados de referência do servidor apresentam valores discrepantes.<sup>107</sup>

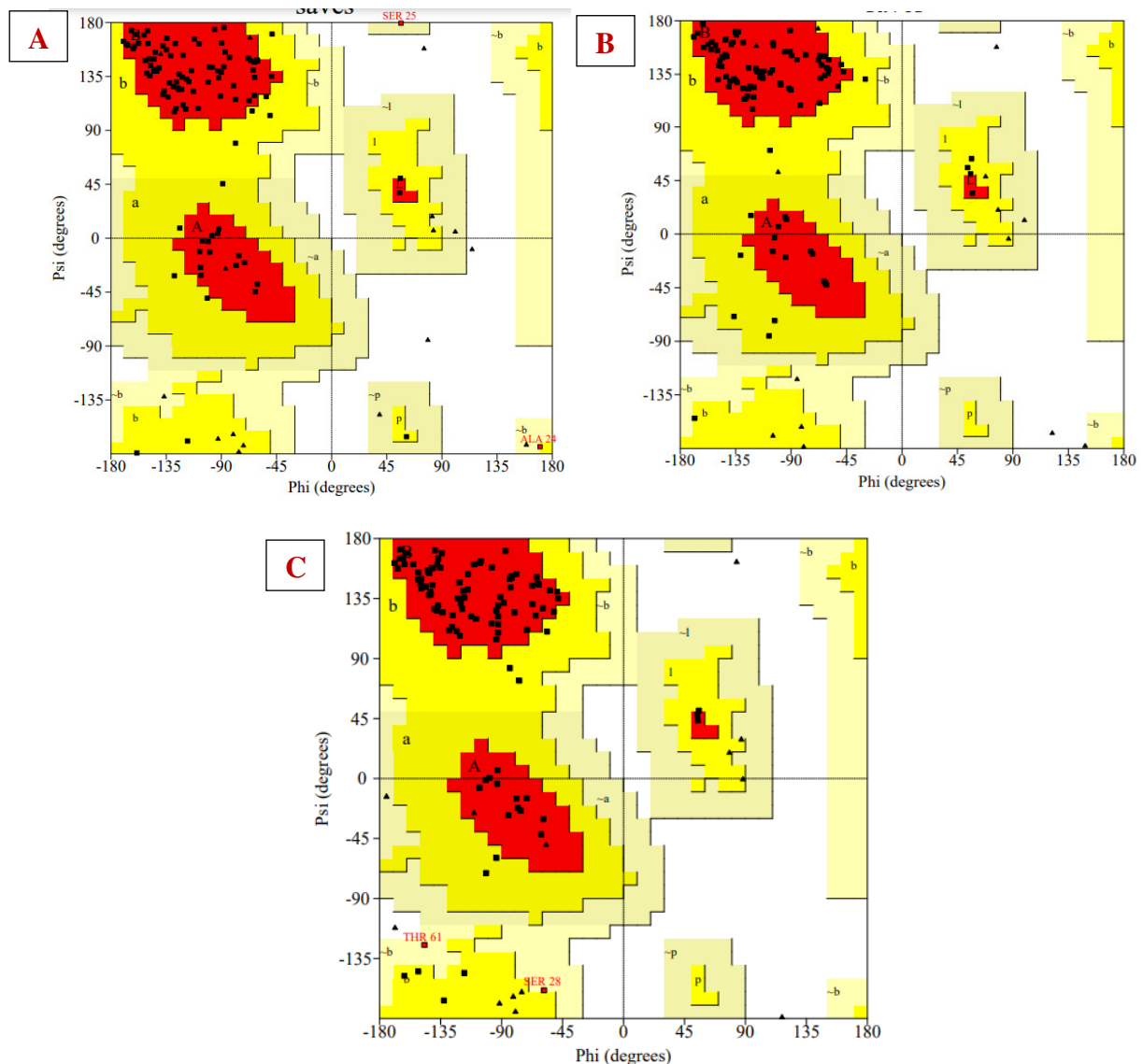
Além disso, a fim de complementar a avaliação da qualidade estereoquímica local das estruturas, por meio de suas propriedades geométricas, foram obtidos os gráficos de Ramachandran de distribuição dos ângulos de torção  $\phi$  (phi) e  $\psi$  (psi) no servidor PROCHECK. Nessa análise, os valores dos modelos analisados são comparados com os considerados ideais obtidos de banco de dados de estruturas de proteínas de alta resolução no PDB.<sup>100</sup> Essa avaliação favorece a identificação das conformações atípicas do Ramachandran.

O gráfico de Ramachandran fornece uma representação simples da conformação de uma proteína, em que os ângulos diedrais  $\phi$  e  $\psi$  dos resíduos alanina-like (que não são glicina – gly – nem prolina – Pro) agrupam-se em regiões distintas, cujas conformações dão origem às  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$ .<sup>108, 109</sup> Os resíduos Gly e Pro são exceções no gráfico clássico de Ramachandran pelas características únicas de suas cadeias laterais, uma vez que o resíduo glicina apresenta tamanho e composição que permitem a ocorrência em qualquer conformação, e o de prolina, por sua vez, pode assumir conformações inesperadas devido à rigidez de sua cadeia lateral e possibilidade de realizar ligações CIS e TRANS.<sup>108</sup>

Diante disso, os gráficos de Ramachandran dos nanocorpos podem ser visualizados na figura 9 e a porcentagem de resíduos em cada região na tabela 2. Os resultados reforçam a boa qualidade das estruturas, uma vez que, para todos os nanocorpos,

100% dos resíduos ocorrem em regiões permitidas, que incluem regiões favoráveis, permitidas e generosamente permitidas. O VHH-3, em particular, não exibe resíduos na região generosamente permitida, onde há leves restrições conformacionais, enquanto os VHH-1 e VHH-4 apresentam 2,0 e 1,9%, respectivamente, o que corrobora à porcentagem de conformações atípicas, identificadas na análise do Molprobit (tabela 1). Ainda, os resíduos que ocorrem em regiões generosamente permitidas da estrutura VHH-1 (ALA24 e SER25), bem como aqueles da estrutura VHH-4 (SER28 e THR61), são resíduos que ocorrem em regiões de *loop*, cuja identificação da conformação mais favorável é uma limitação para a maioria dos *softwares*, incluindo MODELLER (figura 10).<sup>110</sup>

Figura 9 – Gráficos de Ramachandran para os modelos preditos.



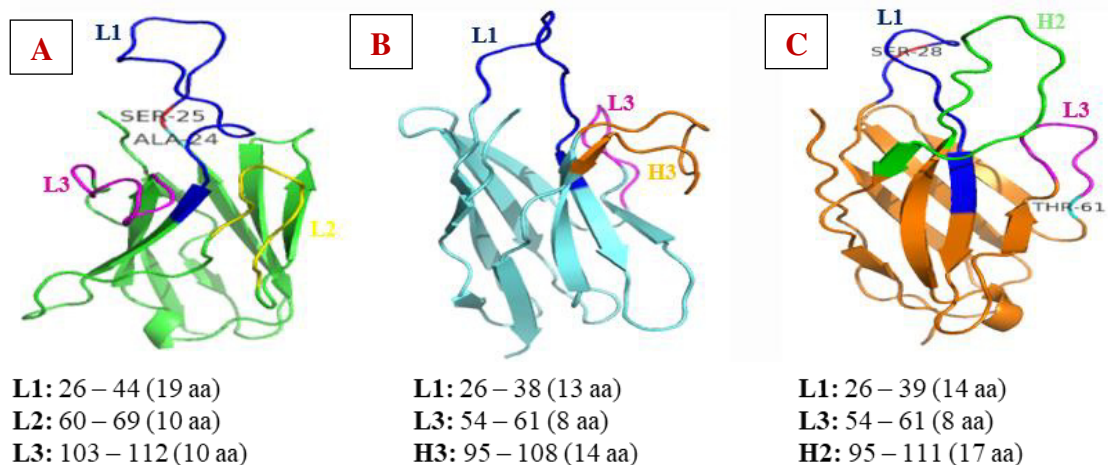
Fonte: Dados da pesquisa. Os gráficos correspondem aos **A.** VHH-1, **B.** VHH-3 e **C.** VHH-4. Regiões sombreadas em vermelho, amarelo, levemente sombreada e branca são, respectivamente, as regiões favoráveis, permitidas, generosamente permitidas e não permitidas.

Tabela 2 – Estatística de ocorrência dos resíduos em diferentes regiões do gráfico de Ramachandran.

RAMACHANDRAN	VHH-1	VHH-3	VHH-4
Resíduos em regiões favoráveis (%)	87,1	88,9	88,3
Resíduos em regiões permitidas (%)	10,9	11,1	9,7
Resíduos em regiões generosamente permitidas (%)	2,0	0,0	1,9
Resíduos em regiões não permitidas (%)	0,0	0,0	0,0

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 10 – Estruturas tridimensionais previstas para os nanocorpos.



Fonte: Dados da pesquisa. As estruturas, representadas em *cartoon*, correspondem aos nanocorpos **A**. VHH-1, **B**. VHH-3 e **C**. VHH-4. Os resíduos em regiões generosamente permitidas nas estruturas VHH-1 e VHH-4 e as CDRs que compõem cada nanocorpo são identificadas. Em azul, CDRL1; em amarelo, CDRL2; em rosa, CDRL3; em verde, CDRH2; em laranja, CDRH3. A numeração dos resíduos que compõem as CDRs e seus tamanhos são exibidas abaixo de cada estrutura. **aa** – aminoácidos.

Avaliações adicionais foram realizadas nos servidores Verify3D e QMEANDisCo.

O primeiro mede a compatibilidade do modelo predito com sua própria estrutura primária, a partir da caracterização do ambiente químico de cada resíduo no modelo tridimensional, que é definido pela área do resíduo enterrada na proteína e inacessível ao solvente, fração da área da cadeia lateral coberta por átomos polares oxigênio e nitrogênio e estrutura secundária, gerando um perfil 3D para o modelo predito.<sup>111</sup> O ideal é que cada aminoácido pontue acima de 0,2, pois é o valor estimado para resíduos de estruturas bem modeladas, e que a média de resíduos com essa pontuação esteja acima de 80%.<sup>112</sup> Desse modo, os valores atribuídos aos



nanocorpos são apresentados na tabela 3. Todos os modelos apresentam média acima de 80%, com o VHH-3 exibindo o melhor resultado, dado o percentual de resíduos com essa pontuação (100%).

Tabela 3 – Percentual de resíduos com pontuação  $\geq 0,2$  dos modelos preditos.

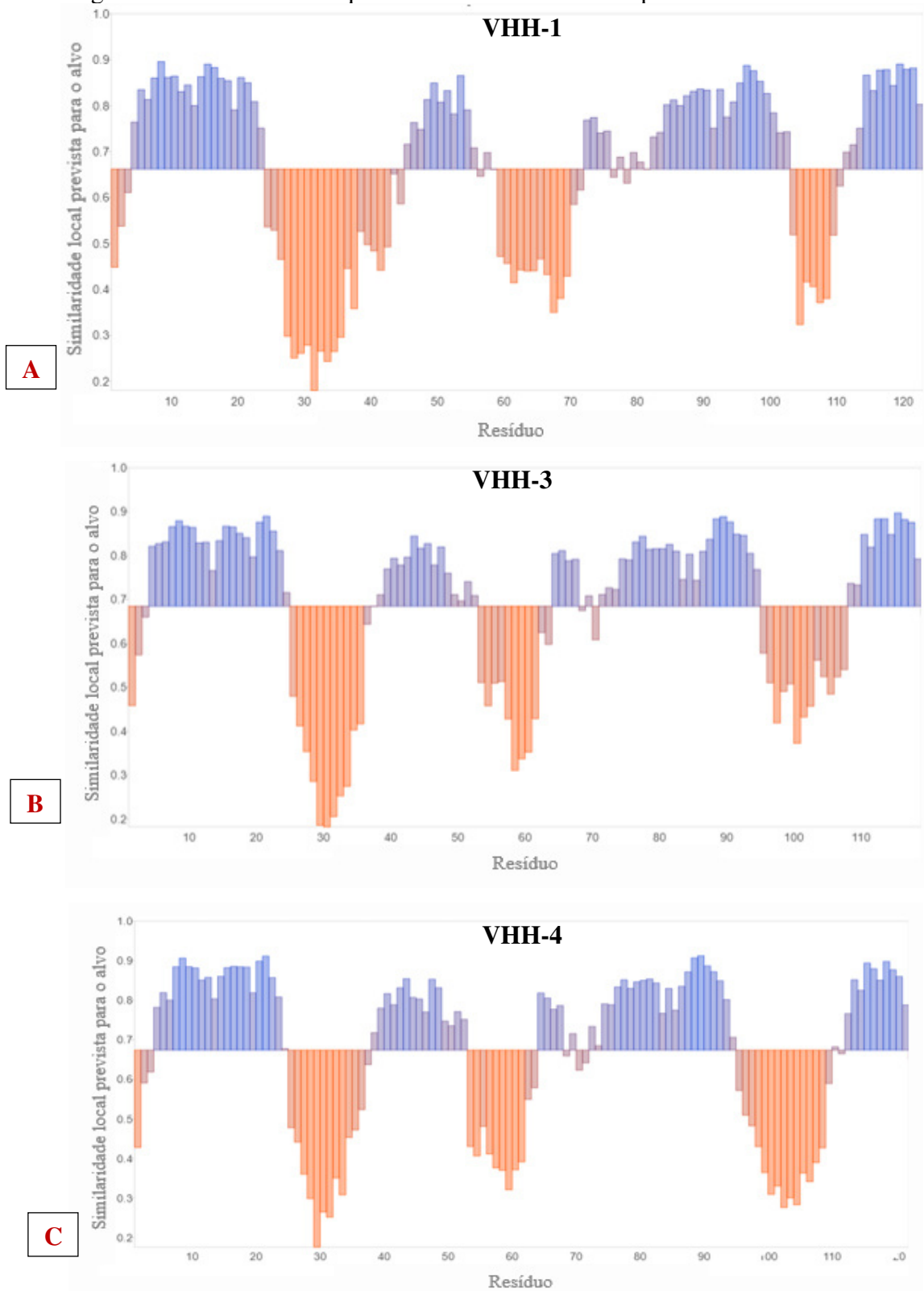
<b>Nanocorpos</b>	<b>Resíduos com pontuação média <math>\geq 0,2</math> (%)</b>
VHH-1	94,31
VHH-3	100,00
VHH-4	87,70

Fonte: Dados da pesquisa.

O QMEANDisCo é uma abordagem baseada em aprendizado de máquina, cujo objetivo é a previsão de estimativas da qualidade dos resíduos modelados, que impacta na pontuação global, obtida pela média das pontuações por resíduo, sendo uma aproximação satisfatória da qualidade total global, e emprega pontuações de modelo único (QMEAN), adequados para avaliar modelos individuais, combinado a um componente de consenso (DisCo), que adiciona informações de proteínas homólogas à investigada determinadas experimentalmente.<sup>103</sup>

Assim, com o propósito de identificar resíduos modelados que podem ser melhorados, essa ferramenta foi empregada e a pontuação global das estruturas foi obtida. Os modelos VHH-1, VHH-3 e VHH-4 apresentaram, respectivamente, valores iguais a 0,66 ( $\pm 0,07$ ), 0,69 ( $\pm 0,08$ ) e 0,67 ( $\pm 0,08$ ), pontuações pouco acima do mínimo ideal (0,6). Para as estimativas locais, resíduos com pontuação  $>0,6$  são classificados como corretamente modelados. Assim, os resíduos dos modelos preditos (figura 11), aos quais são atribuídas pontuações abaixo de 0,6, compõem regiões de *loop*, que, em geral, são um problema para geração de modelos teóricos de alta qualidade. No entanto, como tais resíduos compõem regiões de CDRs, estão sob investigação alternativas para melhorar a modelagem dessas regiões, incluindo uso de uma segunda ferramenta de modelagem, como AlphaFold<sup>113</sup> e NanoNet<sup>114</sup>, e de refinamento, como GalaxyWeb.<sup>115</sup>

Figura 11 – Estimativa da qualidade local dos modelos preditos.



Fonte: Dados da pesquisa. Os gráficos correspondem aos A. VHH-1, B. VHH-3 e C. VHH-4. O eixo y indica a pontuação atribuída aos resíduos da estrutura indicados no eixo x. A pontuação por resíduo vai de 0 a 1, sendo mais desejável valores próximos de 1.

Em síntese, as análises do MolProbity, PROCHECK e Verify3D sugerem que os modelos preditos são de boa qualidade. No entanto, a análise de estimativa local do QMEANDisCo indica a necessidade de melhorar a modelagem das regiões de *loop*, principalmente porque correspondem às regiões de CDRs dos nanocorpos, importantes para a interação com VLA-4.

## 4.2 Produção heteróloga de nanocorpos anti-VLA-4

### 4.2.1 Expressão de nanocorpos em *E. coli* SHuffle pLysS

O sistema de produção *E. coli* é o método de escolha mais comum para o estudo estrutural e funcional de proteínas em laboratório, bem como para a produção em larga escala, devido à relação custo-benefício e ferramentas biotecnológicas disponíveis que incluem diferentes cepas, vetores de clonagem e expressão e caudas de fusão.<sup>116, 117</sup>

A cepa *E. coli* SHuffle pLysS é de particular interesse para a produção de nanocorpos por favorecer a produção de proteínas ativas ligadas por pontes dissulfetos com alto rendimento e solúveis em seu citoplasma.<sup>118</sup> Cepas SHuffle são baseadas na estirpe supressora SMG96, duplo-mutante para as redutases tiorredoxina (*trxB*) e glutationa (*gor*), que, no citoplasma de *E. coli* selvagem, atuam na redução de pontes dissulfeto, mantendo as cisteínas em seu estado reduzido e, conseqüentemente, incapazes de formar pontes dissulfeto.<sup>119</sup> A modificação adicional em SHuffle é a capacidade de superexpressar a isomerase DsbC (do inglês, *disulfide bond C*), sem sequência sinal, no citoplasma, a fim de favorecer a isomerização, de proteínas mal oxidadas, em seus estados nativos.<sup>118</sup>

Além disso, Shuffle pLysS apresenta o plasmídeo pLysS, para o controle da expressão basal de proteínas, que é compatível com os vetores da família pET,<sup>120</sup> por sua vez, usado para montar o cassete de expressão, sob o controle do promotor T7 do bacteriófago T7, dos nanocorpos trabalhados. Desse modo, para expressão dos nanocorpos, foi utilizado o vetor de expressão pET-SUMO, que utiliza a tecnologia de fusão SUMO (do inglês, *Small Ubiquitin-related Modifier*), uma proteína produzida na região N-terminal das proteínas alvos, que favorece o dobramento correto da molécula e melhora a solubilidade e rendimento.<sup>121</sup> O vetor de expressão pET-SUMO-VHH foi construído com uma sequência gênica que codifica o marcador hexa-histidina (His<sub>6</sub>) na porção C-terminal dos VHHs, importante para as etapas de purificação por cromatografia de afinidade e detecção proteica por *Western Blotting*.

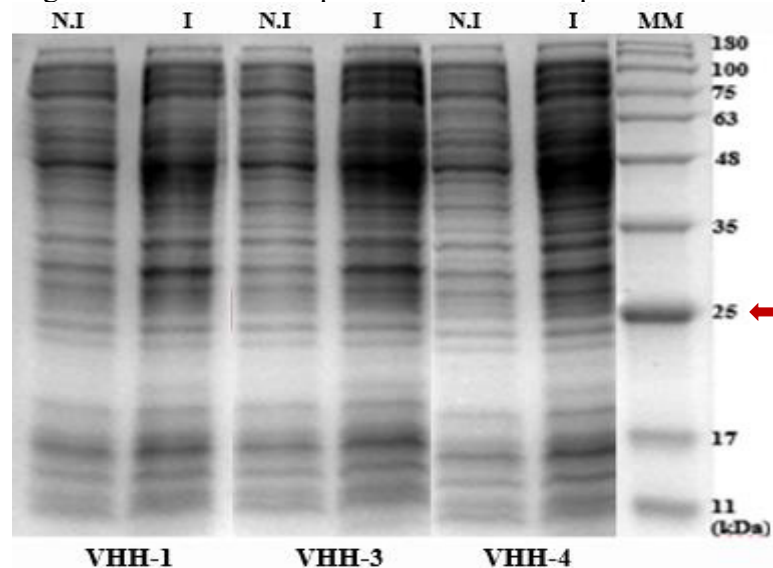
Ademais, as condições de cultivo também são essenciais para a produção eficiente de nanocorpos no sistema apresentado. O meio de cultivo usado foi o LB, comumente empregado para cultivo de *E. coli*, por ser rico em nutrientes e apresentar

osmolaridade ideal para o crescimento na fase inicial de *log*, o que compensa o fato de não ser a melhor opção para obtenção de cultura de alta densidade celular.<sup>122</sup>

Dois fatores adicionais importantes são a temperatura e tempo de indução que afetam diretamente a expressão e solubilidade de proteínas. Temperaturas baixas são indicadas, entre 15 e 25 °C, sendo aliadas a um maior tempo de cultivo, a fim de reduzir a possibilidade de formação de corpos de inclusão, favorecendo o dobramento correto das proteínas.<sup>122, 123</sup> Outro parâmetro relevante é a concentração de IPTG, que, em altas concentrações, pode ser tóxico à célula, com concentrações até 1 mM sendo indicadas.<sup>123</sup>

Desse modo, as condições de expressão dos nanocorpos VHH-1, VHH-3 e VHH-4 incluíram o uso de meio de cultura LB, indução à 0,3 mM, a 15 °C, por ~16 horas. O perfil de expressão pode ser observado na figura 12. Os nanocorpos apresentam tamanho em torno de 25 kDa, considerando o VHH e as caudas SUMO e His<sub>6</sub>. Uma vez que as amostras incluem a fração total de proteínas de cada cultura, a visualização dos nanocorpos alvos é comprometida, sendo melhor visualizados na análise de purificação (figura 14).

Figura 12 – Perfil de expressão dos nanocorpos.



Fonte: Dados da pesquisa. Análise da expressão das culturas de VHH-1, VHH-3 e VHH-4 não induzidas (N.I) e induzidas (I) a 0,3 mM de IPTG. MM – marcador molecular *HighRange True Color Protein Marker Sinapse*.

#### 4.2.2 Purificação de nanocorpos por cromatografia de afinidade

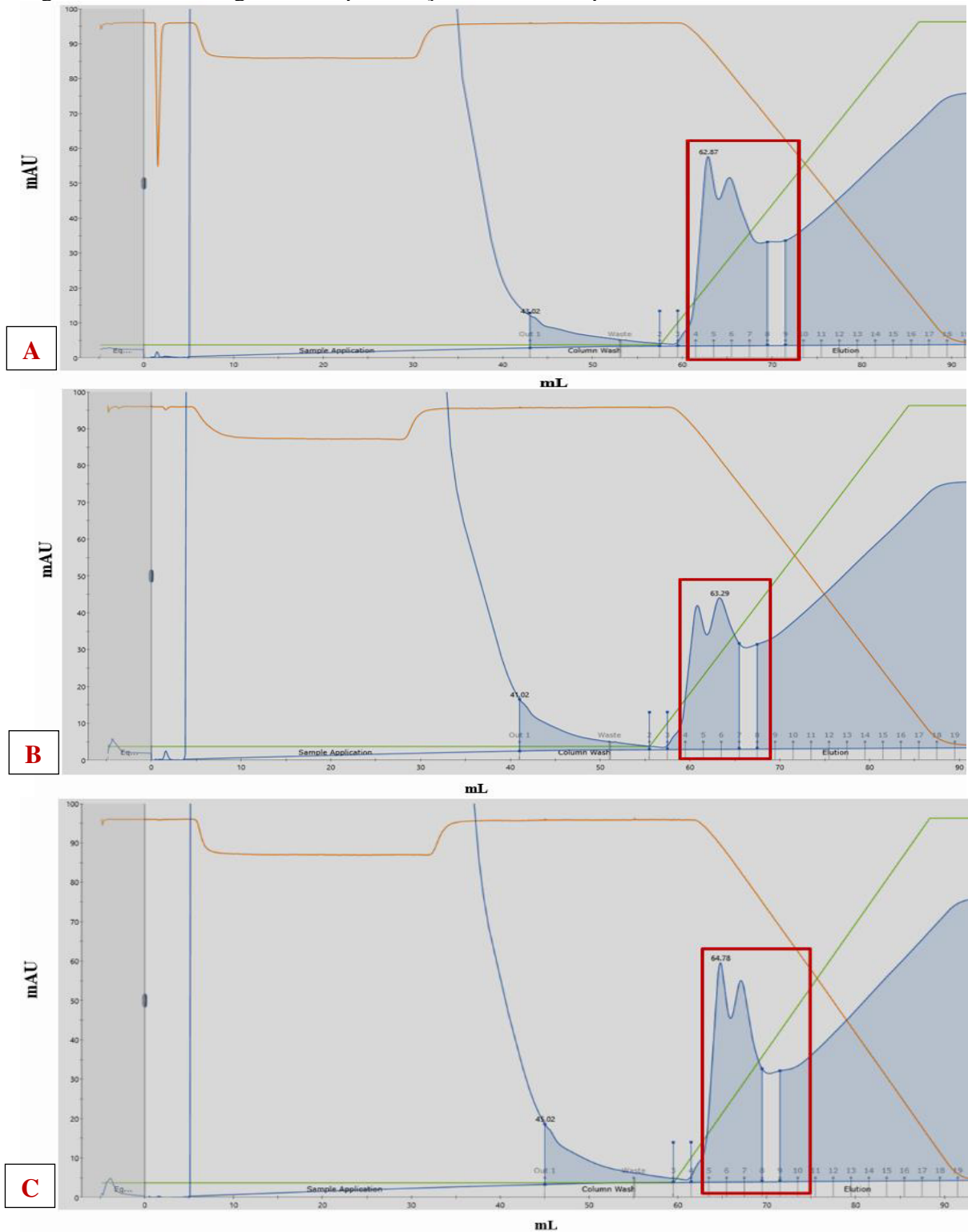
Após o evento de indução da expressão, a purificação da fração solúvel dos nanocorpos por cromatografia IMAC foi realizada. Baseada na afinidade da cauda His<sub>6</sub> por cátions metálicos bivalentes, foi utilizada coluna HisTrap de 1 mL, que apresenta cátions Ni<sup>2+</sup> imobilizado em resina cromatográfica. A eluição dos nanocorpos ocorreu em um gradiente de

0 a 100% de concentração de imidazol 500 mM. O perfil de eluição dos nanocorpos pode ser visualizado na figura 13.

Os picos visualizados no cromatograma do VHH-1 (figura 13A) correspondem às frações 5 e 6, com o maior pico ocorrendo em F5. No entanto, com base no gel de análise da purificação (figura 14A), a fração que apresenta a banda mais forte, na altura de 25 kDa, é a de número 6, indicando que a maior concentração de proteína foi obtida nessa fração. Esse resultado é atribuído à eluição de proteínas que não correspondem ao alvo, ou seja, de contaminantes, na mesma fração<sup>135</sup>, o que é corroborado pela presença de bandas em torno de 28 kDa no mesmo poço, sugerindo que há sobreposição de picos de proteínas purificadas. Além disso, com base no tamanho esperado para os nanocorpos trabalhados, a proteína de interesse está presente em três frações, estas sendo F5, F6 e F7.

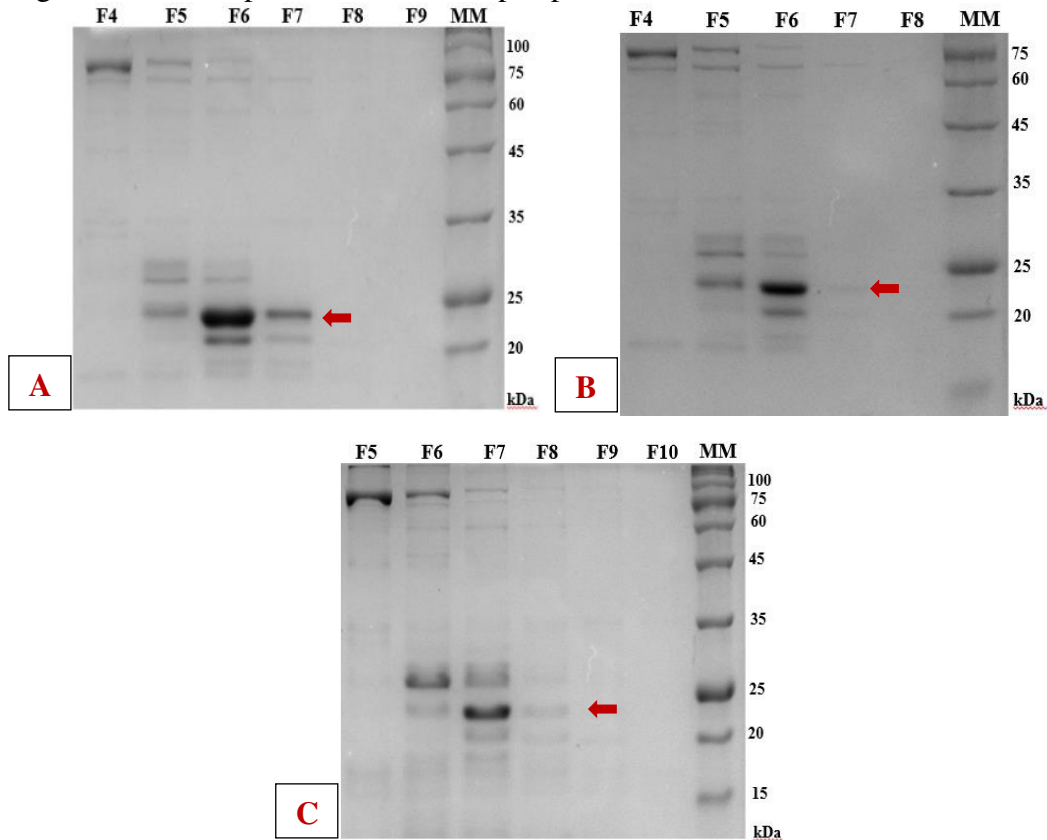
No que diz respeito ao VHH-3, os picos obtidos nas frações 5 e 6 (figura 13B) correspondem ao perfil proteico visualizado no gel (figura 14B). No entanto, similar ao que ocorre para o VHH-1, contaminantes foram eluídos juntamente com a proteína de interesse. No caso do VHH-4, o padrão cromatográfico (figura 13C) e perfil proteico (figura 14C) são similares ao que ocorre para o VHH-1. Os picos, nesse caso, correspondem às frações F6 e F7, de modo que o maior pico é visualizado em F6. No entanto, no gel de eletroforese, a banda mais forte corresponde à fração 7, sugerindo a sobreposição de picos correspondentes aos contaminantes e ao alvo VHH-4. Além disso, é provável que a proteína também tenha sido eluída em três frações consecutivas (F6, F7 e F8).

Figura 13 – Cromatogramas de purificação dos nanocorpos.



Fonte: Dados da pesquisa. Cromatogramas de purificação dos nanocorpos **A.** VHH-1, **B.** VHH-3 e **C.** VHH-4 em IMAC. O eixo y indica a absorvância de luz UV em mAU ( $\lambda=280$  nm) e o eixo x o volume de líquido injetado no sistema ao longo das etapas de purificação. A linha em azul corresponde à absorvância, a linha verde à concentração de imidazol (tampão B) e a linha laranja à condutividade. O retângulo em vermelho inclui as frações analisadas por SDS-PAGE. Os cromatogramas são gerados pelo próprio sistema AKTA pure.

Figura 14 – Perfil proteico de nanocorpos purificados



Fonte: Dados da pesquisa. Perfil proteico dos nanocorpos purificados **A.** VHH-1, **B.** VHH-3 e **C.** VHH-4 em SDS-PAGE. **F** – Frações eluídas; **MM** - *HighRange True Color Protein Marker Sinapse*.

#### 4.2.3 Detecção dos nanocorpos em frações purificadas

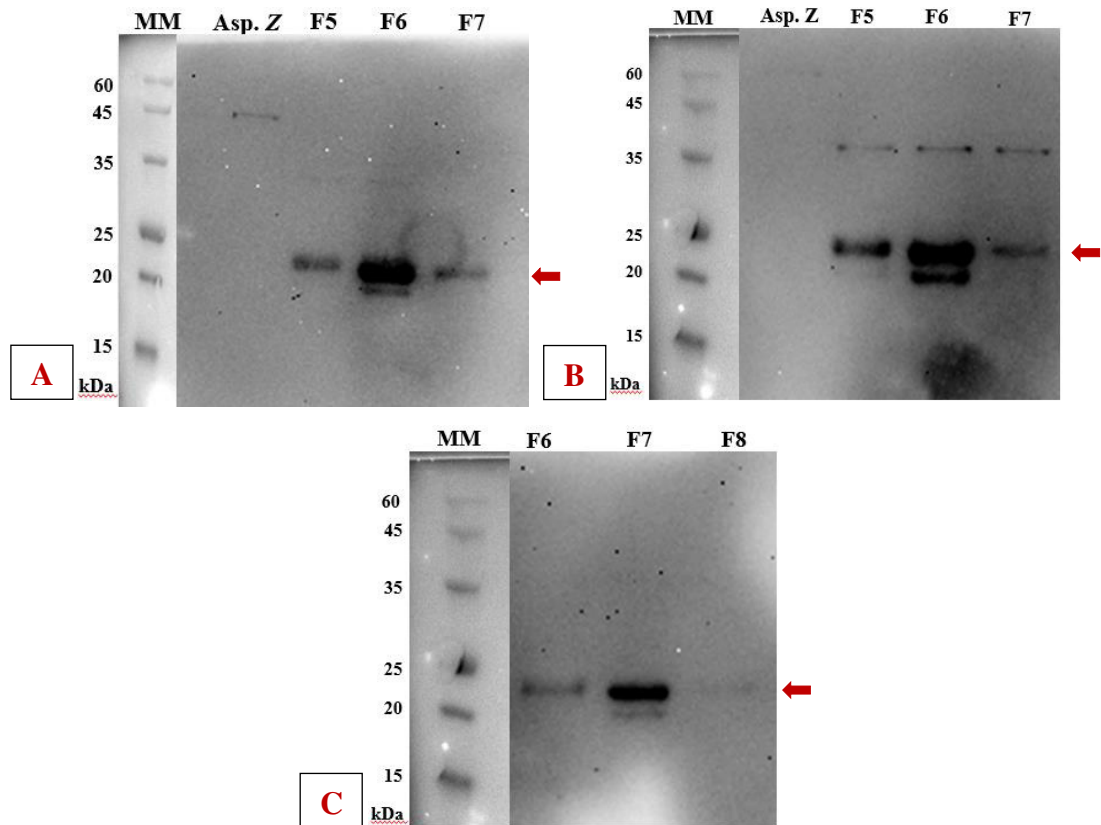
A fim de confirmar a presença dos nanocorpos nas frações purificadas, foi realizado *Western Blotting* usando anticorpo anti-his, devido à presença da cauda His<sub>6</sub> fusionada ao VHH. O resultado é apresentado na figura 15.

As bandas proteicas na altura de 25 kDa foram marcadas nas membranas para os três nanocorpos investigados. A detecção de sinal na membrana do VHH-1 corresponde ao perfil proteico observado na análise de purificação, sendo detectado nas frações 5, 6 e 7. O mesmo ocorre para os nanocorpos VHH-3 e VHH-4, com detecção de sinal nas frações 5 e 6 (VHH-3) e 6, 7 e 8 (VHH-4). A asparaginase *Z* de *Bacillus* sp. foi utilizada como controle, porém, devido à metodologia de transferência, cujos parâmetros estabelecidos favorecem a transferência de proteínas de até 30 kDa, a asparaginase aparece fracamente nas membranas dos VHH-1 e VHH-3.

Além disso, na membrana dos três VHHs, uma banda menor logo abaixo da mais forte é observada nas frações F6 (VHH-1 e VHH-3) e F7 (VHH-4). É possível que tenha ocorrido degradação do nanocorpo por enzimas do sistema de expressão, uma problemática

associada à produção de proteínas recombinantes em *E. coli*.<sup>82</sup> Ainda, no que diz respeito à detecção de proteínas na membrana do VHH-3, são visualizadas bandas fracas na altura de 35 kDa nas três frações analisadas, indicando a presença de contaminantes aos quais o anticorpo anti-his ligou-se.

Figura 15 – Western Blotting de nanocorpos purificados.



Fonte: Dados da pesquisa. Membranas de nitrocelulose reveladas por quimioluminescência correspondentes aos **A.** VHH-1, **B.** VHH-3 e **C.** VHH-4. **MM** - *HighRange True Color Protein Marker Sinapse*; **Asp. Z** – Asparaginase Z de *Bacillus* sp. **F** – Frações eluídas na etapa de purificação.

Assim, os resultados indicam que o sistema heterólogo *E. coli* SHuffle pLysS foi eficiente para a produção dos nanocorpos alvos em sua forma solúvel, uma característica desejada pois sugere que a proteína foi devidamente enovelada e, portanto, produzida em sua forma funcional,<sup>124</sup> o que, posteriormente, será validado com a análise de interação VHH-VLA-4 por meio da técnica de ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Por outro lado, os resultados de purificação indicam a presença de contaminantes, algo indesejado na produção de proteínas recombinantes. No entanto, é um fato comum nas primeiras etapas de expressão de macromoléculas dessa natureza, sendo necessário o refinamento da metodologia,<sup>125</sup> o que inclui a redução do gradiente de concentração de imidazol. Tal alternativa está inclusa no desenho de refinamento da purificação dos nanocorpos de interesse, uma próxima etapa no trabalho com essas moléculas.



## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho são apresentados os dados iniciais da pesquisa de desenvolvimento de três potenciais inibidores da integrina VLA-4, uma proteína envolvida em importantes patologias humanas. Assim, o trabalho com os nanocorpos VHH-1, VHH-3 e VHH-4 inclui abordagem computacional e experimental, a fim de alcançar uma pesquisa robusta e que servirá de referência para as próximas etapas de trabalho.

Nesse sentido, por meio da técnica de modelagem comparativa, os objetivos de obter e validar as estruturas tridimensionais desses anticorpos foram alcançados, sendo necessária, porém, a melhoria da modelagem das regiões de CDRs, uma limitação para a maioria, ou todas, as ferramentas de modelagem computacional.

Além disso, através das técnicas recombinantes empregadas, os nanocorpos foram produzidos e purificados, o que permitiu alcançar o objetivo de produzir e obter os nanocorpos sob a forma solúvel. Por outro lado, a realização de uma etapa adicional de refinamento da metodologia de purificação, visando a obtenção pura dos anticorpos e análise de rendimento, é necessária.

De fato, a combinação de técnicas computacionais e experimentais permite que seja alcançado um trabalho altamente robusto e reflete o interesse de se desenvolver anticorpos no formato VHH. Desse modo, a partir das estruturas tridimensionais será possível realizar a análise *in silico* do papel biológico que é explorado, por exemplo, e, posteriormente, validar experimentalmente, uma vez que as metodologias de produção e purificação se mostraram eficientes.

Em síntese, o trabalho apresenta resultados promissores no desenvolvimento de nanocorpos anti-VLA-4, com potencial aplicação no tratamento de doenças humanas nas quais VLA-4 apresenta papel essencial, como na esclerose múltipla, a partir de uma tecnologia que se consolida no setor farmacêutico como terapia de próxima geração.

## REFERÊNCIAS

- 1 HYNES, Richard O.. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, [S.l.], v. 110, n. 6, p. 673-687, set. 2002. Elsevier BV. DOI 10.1016/s0092-8674(02)00971-6. Disponível em: [sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867402009716](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867402009716). Acesso em: 17 fev. 2022.
- 2 HYNES, Richard O.. The emergence of integrins: a personal and historical perspective. **Matrix Biology**, [S.l.], v. 23, n. 6, p. 333-340, out. 2004. Elsevier BV. DOI 10.1016/j.matbio.2004.08.001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3493146/#R70>. Acesso em: 28 fev. 2022.
- 3 TAMKUN, John W. *et al.* Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. **Cell**, [S.l.], v. 46, n. 2, p. 271-282, jul. 1986. Elsevier BV. DOI 10.1016/0092-8674(86)90744-0. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0092867486907440>. Acesso em: 28 fev. 2022.
- 4 PAN, Li *et al.* Research advances on structure and biological functions of integrins. **SpringerPlus**, [S.l.] v. 5, n. 1094, p. 1-11, julho 2016. DOI 10.1186/s40064-016-2502-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s40064-016-2502-0#citeas>. Acesso em: 11 março 2022.
- 5 SEBÉ-PEDRÓS, A.; DEGNAN, Bernard M.; RUIZ-TRILLO, I. The origin of Metazoa: a unicellular perspective. **Nat Rev Genet**, [S.l.], v. 18, p. 498-512, agosto. 2017. DOI 10.1038/nrg.2017.21. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrg.2017.21#citeas>. Acesso em: 12 março 2022.
- 6 HYNES, Richard O.; ZHAO, Q. The evolution of cell adhesion. **Journal of Cell Biology**, [S.l.], v. 150, n. 2, p. 89-96, julho 2000. DOI 10.1083/jcb.150.2.F89. Disponível em: <https://rupress.org/jcb/article/150/2/F89/47909/The-Evolution-of-Cell-Adhesion>. Acesso em: 17 fev 2022.
- 7 ABEDIN, Monika; KING, Nicole. Diverse evolutionary paths to cell adhesion. **Trends In Cell Biology**, [S.l.], v. 20, n. 12, p. 734-742, dez. 2010. Elsevier BV. DOI 10.1016/j.tcb.2010.08.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892410001522#bibl0005>. Acesso em: 12 mar. 2022.
- 8 HYNES, Richard O.. The Extracellular Matrix: not just pretty fibrils. **Science**, [S.l.], v. 326, n. 5957, p. 1216-1219, 27 nov. 2009. American Association for the Advancement of Science (AAAS). DOI 10.1126/science.1176009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3536535/>. Acesso em: 18 mar. 2022.
- 9 SEBÉ-PEDRÓS, Arnau *et al.* Ancient origin of the integrin-mediated adhesion and signaling machinery. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.l.], v. 107, n. 22, p. 10142-10147, 17 maio 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences. DOI 10.1073/pnas.1002257107. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1002257107>. Acesso em: 18 mar. 2022.

10 SEBÉ-PEDRÓS, Arnau; RUIZ-TRILLO, Iñaki. Integrin-mediated adhesion complex. **Communicative & Integrative Biology**, [S.l.], v. 3, n. 5, p. 475-477, set. 2010. Informa UK Limited. DOI 10.4161/cib.3.5.12603. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/cib.3.5.12603>. Acesso em: 15 abr. 2022.

11 JOHNSON, Mark S. *et al.* Integrins during evolution: evolutionary trees and model organisms. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes**, [S.l.], v. 1788, n. 4, p. 779-789, abr. 2009. Elsevier BV. DOI 10.1016/j.bbamem.2008.12.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273608004288#bib28>. Acesso em: 11 mar. 2022.

12 BROWN, Nicholas H.. Cell-cell adhesion via the ECM: integrin genetics in fly and worm. **Matrix Biology**, [S.l.], v. 19, n. 3, p. 191-201, jul. 2000. Elsevier BV. DOI 10.1016/s0945-053x(00)00064-0. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X00000640>. Acesso em: 16 mar. 2022.

13 EWAN, Richard *et al.* The integrins of the urochordate *Ciona intestinalis* provide novel insights into the molecular evolution of the vertebrate integrin family. **Bmc Evolutionary Biology**, [S.l.], v. 31, n. 5, p. 1-18, 13 maio 2005. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1186/1471-2148-5-31. Disponível em: <https://bmcecolvol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-5-31#Abs1>. Acesso em: 30 abr. 2022.

14 WEGENER, Kate L.; CAMPBELL, Iain D.. Transmembrane and cytoplasmic domains in integrin activation and protein-protein interactions (Review). **Molecular Membrane Biology**, [S.l.], v. 25, n. 5, p. 376-387, jan. 2009. Informa UK Limited. DOI 10.1080/09687680802269886. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09687680802269886>. Acesso em: 19 mai. 2022.

15 LUO, Bing-Hao; CARMAN, Christopher V.; SPRINGER, Timothy A.. Structural basis of integrin regulation and signaling. **Annual Review Of Immunology**, [S.l.], v. 25, n. 1, p. 619-647, 1 abr. 2007. Annual Reviews. DOI 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618>. Acesso em: 17 fev. 2022.

16 SHIMAOKA, Motomu; SPRINGER, Timothy A.. Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.l.], v. 2, n. 9, p. 703-716, set. 2003. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1038/nrd1174. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrd1174#Abs2>. Acesso em: 14 mai. 2022.

17 SHIMAOKA, Motomu; TAKAGI, Junichi; SPRINGER, Timothy A.. Conformational regulation of integrin structure and function. **Annual Review Of Biophysics And Biomolecular Structure**, [S.l.], v. 31, n. 1, p. 485-516, jun. 2002. Annual Reviews. DOI 10.1146/annurev.biophys.31.101101.140922. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.biophys.31.101101.140922>. Acesso em: 1 mai. 2022.

- 18 LARSON, R *et al.* Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. **Journal Of Cell Biology**, [S.l.], v. 108, n. 2, p. 703-712, 1 fev. 1989. Rockefeller University Press. DOI 10.1083/jcb.108.2.703. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2115430/>. Acesso em: 14 mai. 2022.
- 19 CAMPBELL, I. D.; HUMPHRIES, M. J.. Integrin structure, activation, and interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, [S.l.], v. 3, n. 3, p. 1-14, 19 jan. 2011. Cold Spring Harbor Laboratory. DOI 10.1101/cshperspect.a004994. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3039929/>. Acesso em: 15 mai. 2022.
- 20 CORBI, A. L. *et al.* cDNA cloning and complete primary structure of the alpha subunit of a leukocyte adhesion glycoprotein, p150,95. **The Embo Journal**, [S.l.], v. 6, n. 13, p. 4023-4028, dez. 1987. Wiley. DOI 10.1002/j.1460-2075.1987.tb02746.x. Disponível em: <https://www.embojournal.org/doi/abs/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02746.x>. Acesso em: 14 mai. 2022.
- 21 XIONG, Jian-Ping *et al.* Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha V\beta 3$ . **Science**, [S.l.], v. 294, n. 5541, p. 339-345, 12 out. 2001. American Association for the Advancement of Science (AAAS). DOI 10.1126/science.1064535. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2885948/>. Acesso em: 15 mai. 2022.
- 22 ZHANG, Kun; CHEN, Jianfeng. The regulation of integrin function by divalent cations. **Cell Adhesion & Migration**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 20-29, jan. 2012. Informa UK Limited. DOI 10.4161/cam.18702. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/cam.18702>. Acesso em: 14 mai. 2022.
- 23 SPRINGER, Timothy A.. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin  $\alpha$ -subunits into a  $\beta$ -propeller domain. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.l.], v. 94, n. 1, p. 65-72, 7 jan. 1997. Proceedings of the National Academy of Sciences. DOI 10.1073/pnas.94.1.65. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8990162/>. Acesso em: 19 mai. 2022.
- 24 LEE, Jie-Oh *et al.* Crystal structure of the A domain from the  $\alpha$  subunit of integrin CR3 (CD11 b/CD18). **Cell**, [S.l.], v. 80, n. 4, p. 631-638, fev. 1995. Elsevier BV. DOI 10.1016/0092-8674(95)90517-0. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867495905170>. Acesso em: 15 mai. 2022.
- 25 MOULD, A. Paul *et al.* Role of ADMIDAS cation-binding site in ligand recognition by integrin  $\alpha 5\beta 1$ . **Journal Of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 278, n. 51, p. 51622-51629, dez. 2003. Elsevier BV. DOI 10.1074/jbc.m306655200. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)75428-1/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)75428-1/fulltext). Acesso em: 15 mai. 2022.
- 26 MARLIN, Steven D. *et al.* Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). **Cell**, [S.l.], v. 51, n. 5, p. 813-819, dez. 1987. Elsevier BV. DOI 10.1016/0092-8674(87)90104-8. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(87\)90104-8.pdf?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867487901048%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(87)90104-8.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867487901048%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 19 mai. 2022.

- 27 ZHU, Jianghai *et al.* Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. **Molecular Cell**, [S.l.], v. 32, n. 6, p. 849-861, dez. 2008. Elsevier BV. DOI 10.1016/j.molcel.2008.11.018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276508008393>. Acesso em: 15 mai. 2022.
- 28 A SPRINGER, Timothy; DUSTIN, Michael L. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. **Current Opinion In Cell Biology**, [S.l.], v. 24, n. 1, p. 107-115, fev. 2012. Elsevier BV. DOI 10.1016/j.ceb.2011.10.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067411001347>. Acesso em: 30 maio 2022.
- 29 WEGENER, Kate L.; CAMPBELL, Iain D.. Transmembrane and cytoplasmic domains in integrin activation and protein-protein interactions (Review). **Molecular Membrane Biology**, [S.l.], v. 25, n. 5, p. 376-387, jan. 2009. Informa UK Limited. DOI 10.1080/09687680802269886. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09687680802269886>. Acesso em: 19 maio 2022.
- 30 TAKADA, Yoshikazu; YE, Xiaojing; SIMON, Scott. The integrins. **Genome Biology**, [S.l.], v. 8, n. 5, p. 215, 2007. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1186/gb-2007-8-5-215. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/gb-2007-8-5-215#Abs1>. Acesso em: 17 fev. 2022.
- 31 BOUVARD, Daniel *et al.* Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.l.], v. 14, n. 7, p. 430-442, 30 maio 2013. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1038/nrm3599. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm3599#citeas>. Acesso em: 20 maio 2022.
- 32 USSAR, Siegfried *et al.* Loss of kindlin-1 causes skin atrophy and lethal neonatal intestinal epithelial dysfunction. **Plos Genetics**, [S.l.], v. 4, n. 12, p. 1-12, 5 dez. 2008. Public Library of Science (PLoS). DOI 10.1371/journal.pgen.1000289. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1000289>. Acesso em: 04 jun. 2022.
- 33 MOSER, Markus *et al.* Kindlin-3 is required for  $\beta$ 2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. **Nature Medicine**, [S.l.], v. 15, n. 3, p. 300-305, 22 fev. 2009. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1038/nm.1921. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm.1921#citeas>. Acesso em: 04 jun. 2022.
- 34 SRICHAJ, Manakan Betsy; ZENT, Roy (ed.). **Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer**. New York: Springer, 2010. 316 p.
- 35 KIM, Chungho *et al.* Talin activates integrins by altering the topology of the  $\beta$  transmembrane domain. **Journal Of Cell Biology**, [S.l.], v. 197, n. 5, p. 605-611, 28 maio 2012. Rockefeller University Press. DOI 10.1083/jcb.201112141. Disponível em: <https://rupress.org/jcb/article/197/5/605/36813/Talin-activates-integrins-by-altering-the-topology>. Acesso em: 03 jun. 2022.

- 36 HAYDARI, Zainab *et al.* Kindlin assists talin to promote integrin activation. **Biophysical Journal**, [S.l.], v. 118, n. 8, p. 1977-1991, abr. 2020. Elsevier BV. DOI 10.1016/j.bpj.2020.02.023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349520302022>. Acesso em: 04 jun. 2022.
- 37 GINSBERG, Mark H; PARTRIDGE, Anthony; SHATTIL, Sanford J. Integrin regulation. **Current Opinion In Cell Biology**, [S.l.], v. 17, n. 5, p. 509-516, out. 2005. Elsevier BV. DOI 10.1016/j.ceb.2005.08.010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067405001134> Acesso em: 03 jun. 2022
- 38 HARBURGER, David S.; CALDERWOOD, David A.. Integrin signalling at a glance. **Journal Of Cell Science**, [S.l.], v. 122, n. 2, p. 159-163, 15 jan. 2009. The Company of Biologists. DOI 10.1242/jcs.018093. Disponível em: <https://journals.biologists.com/jcs/article/122/2/159/30610/Integrin-signalling-at-a-glance>. Acesso em: 04 jun. 2022.
- 39 HUMPHRIES, Jonathan D. *et al.* Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. **Journal Of Cell Biology**, [S.l.], v. 179, n. 5, p. 1043-1057, 3 dez. 2007. Rockefeller University Press. DOI 10.1083/jcb.200703036. Disponível em: <https://rupress.org/jcb/article/179/5/1043/45072/Vinculin-controls-focal-adhesion-formation-by>. Acesso em: 04 jun. 2022.
- 40 WEHRLE-HALLER, Bernhard. Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. **Current Opinion In Cell Biology**, [S.l.], v. 24, n. 5, p. 569-581, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2012.06.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067412001019>. Acesso em: 04 jun. 2022.
- 41 FLIER, Arjan van Der; SONNENBERG, Arnoud. Function and interactions of integrins. **Cell And Tissue Research**, [S.l.], v. 305, n. 3, p. 285-298, 1 set. 2001. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1007/s004410100417. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s004410100417>. Acesso em: 14 jun. 2022.
- 42 HEMLER, M.e.; HUANG, C.; SCHWARZ, L.. The VLA protein family: Characterization of five distinct cell surface heterodimers each with a common 130,000 molecular weight beta subunit. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 262, n. 7, p. 3300-3309, mar. 1987. Elsevier BV. DOI 10.1016/s0021-9258(18)61504-2. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)61504-2/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)61504-2/fulltext). Acesso em: 15 jun. 2022.
- 43 CHAN, P y; A RUFFO,. VLA-4 integrin mediates lymphocyte migration on the inducible endothelial cell ligand VCAM-1 and the extracellular matrix ligand fibronectin. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 268, n. 33, p. 24655-24664, nov. 1993. Elsevier BV. DOI 10.1016/s0021-9258(19)74516-5. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)74516-5/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)74516-5/fulltext). Acesso em: 28 jun. 2022.
- 44 POTTS, Jennifer R.; CAMPBELL, Iain D.. Fibronectin structure and assembly. **Current Opinion In Cell Biology**, [S.l.], v. 6, n. 5, p. 648-655, out. 1994. Elsevier BV. DOI 10.1016/0955-0674(94)90090-6. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0955067494900906>. Acesso em: 16 jun. 2022.

45 MARCHESE, Michelle E.; BERDNIKOV, Sergejs; COOK-MILLS, Joan M.. Distinct sites within the vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) cytoplasmic domain regulate vcam-1 activation of calcium fluxes versus rac1 during leukocyte transendothelial migration. **Biochemistry**, [S.l.], v. 51, n. 41, p. 8235-8246, 1 out. 2012. American Chemical Society (ACS). DOI 10.1021/bi300925r. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bi300925r>. Acesso em: 17 jun. 2022.

46 KONG, Deok-Hoon *et al.* Emerging roles of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in immunological disorders and cancer. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 19, n. 4, p. 1057, 2 abr. 2018. MDPI AG. DOI 10.3390/ijms19041057. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/4/1057/htm#B22-ijms-19-01057>. Acesso em: 17 jun. 2022.

47 OSBORN, L; VASSALLO, C; BENJAMIN, C D. Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternately spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. **Journal Of Experimental Medicine**, [S.l.], v. 176, n. 1, p. 99-107, 1 jul. 1992. Rockefeller University Press. DOI 10.1084/jem.176.1.99. Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/176/1/99/24866/Activated-endothelium-binds-lymphocytes-through-a>. Acesso em: 17 jun. 2022.

48 HEMLER, Martin E. *et al.* Structure of the integrin  $\alpha 4$  and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. **Immunological Reviews**, [S.l.], v. 114, n. 1, p. 45-65, abr. 1990. Wiley. DOI 10.1111/j.1600-065x.1990.tb00561.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1600-065X.1990.tb00561.x>. Acesso em: 14 jun. 2022.

49 GONZALEZ-AMARO, Roberto; MITTELBRUNN, Maria; SANCHEZ-MADRID, Francisco. Therapeutic anti-integrin ( $\alpha 4$  and  $\alpha L$ ) monoclonal antibodies: two-edged swords?. **Immunology**, [S.l.], v. 116, n. 3, p. 289-296, nov. 2005. Wiley. DOI 10.1111/j.1365-2567.2005.02225.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2567.2005.02225.x>. Acesso em: 15 jun. 2022.

50 SIEGELMAN, Mark H. *et al.* The CD44-initiated pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.l.], v. 105, n. 5, p. 683-691, 1 mar. 2000. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci8692>. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/8692#SEC4>. Acesso em: 17 jun. 2022.

51 BOONPIYATHAD, Tadech *et al.* Immunologic mechanisms in asthma. **Seminars In Immunology**, [S.l.], v. 46, p. 101333, dez. 2019. Elsevier BV. DOI 10.1016/j.smim.2019.101333. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532319300557>. Acesso em: 17 jun. 2022.

52 BRASIL. Laísa Queiroz. Secretária de Atenção Primária À Saúde. **Em um ano, SUS registrou 1,3 milhão de atendimentos a casos de asma na Atenção Primária**. 2022. Disponível em: <https://aps.saude.gov.br/noticia/17036>. Acesso em: 17 jun. 2022.

- 53 ALETAHA, Daniel; SMOLEN, Josef S.. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. **Jama**, [S.l.], v. 320, n. 13, p. 1360, 2 out. 2018. American Medical Association (AMA). DOI 10.1001/jama.2018.13103. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/2705192>. Acesso em: 18 jul. 2022.
- 54 ALETAHA, D.; FUNOVITS, J.; SMOLEN, J. S.. Physical disability in rheumatoid arthritis is associated with cartilage damage rather than bone destruction. **Annals Of The Rheumatic Diseases**, [S.l.], v. 70, n. 5, p. 733-739, 14 fev. 2011. BMJ. DOI 10.1136/ard.2010.138693. Disponível em: <https://ard.bmj.com/content/70/5/733>. Acesso em: 17 jun. 2022.
- 55 A LAFFÓN, *et al.* Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.l.], v. 88, n. 2, p. 546-552, 1 ago. 1991. American Society for Clinical Investigation. DOI 10.1172/jci115338. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/115338>. Acesso em: 16 jun. 2022.
- 56 BRASIL. Biblioteca Virtual em saúde. **Eu me conecto, nós nos conectamos: 30/5 - dia mundial da esclerose múltipla**. 2020. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/eu-me-conecto-nos-nos-conectamos-30-5-dia-mundial-da-esclerose-multipla/>. Acesso em: 17 jun. 2022.
- 57 MCFARLAND, Henry F; MARTIN, Roland. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. **Nature Immunology**, [S.l.], v. 8, n. 9, p. 913-919, set. 2007. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1038/ni1507. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni1507#Abs1>. Acesso em: 30 maio 2022.
- 58 ZOHREN, Fabian *et al.* The monoclonal anti-VLA-4 antibody natalizumab mobilizes CD34+ hematopoietic progenitor cells in humans. **Blood**, [S.l.], v. 111, n. 7, p. 3893-3895, 1 abr. 2008. American Society of Hematology. DOI 10.1182/blood-2007-10-120329. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/111/7/3893/25224/The-monoclonal-anti-VLA-4-antibody-natalizumab>. Acesso em: 17 fev. 2022.
- 59 SELEWSKI, D.T. *et al.* Natalizumab (Tysabri). **American Journal Of Neuroradiology**, [S.l.], v. 31, n. 9, p. 1588-1590, 5 ago. 2010. American Society of Neuroradiology (ASNR). DOI 10.3174/ajnr.a2226. Disponível em: <http://www.ajnr.org/content/31/9/1588#ref-7>. Acesso em: 31 maio 2022.
- 60 WARNKE, Clemens *et al.* Natalizumab and progressive multifocal leukoencephalopathy. **Archives Of Neurology**, [S.l.], v. 67, n. 8, p. 923-930, 1 ago. 2010. American Medical Association (AMA). DOI 10.1001/archneurol.2010.161. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/article-abstract/800859>. Acesso em: 30 maio 2022.
- 61 MUYLDERMANS, Serge. Nanobodies: natural single-domain antibodies. **Annual Review Of Biochemistry**, [S.l.], v. 82, n. 1, p. 775-797, 2 jun. 2013. Annual Reviews. DOI 10.1146/annurev-biochem-063011-092449. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>. Acesso em: 10 dez. 2021.



62 WANG, Yongzhong *et al.* Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications. **International Journal Of Nanomedicine**, [S.l.], v. 11, p. 3287-3303, jul. 2016. Informa UK Limited. DOI10.2147/ijn.s107194. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4959585/>. Acesso em: 06 jun. 2022.

63 HAMERS-CASTERMAN, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. **Nature**, [S.l.], v. 363, n. 6428, p. 446-448, jun. 1993. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1038/363446a0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/363446a0#citeas>. Acesso em: 09 maio 2022.

64 LIU, Wenshuai *et al.* Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies. **Molecular Immunology**, [S.l.], v. 96, p. 37-47, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2018.02.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589018300427>. Acesso em: 26 maio 2022.

65 SALVADOR, J.-Pablo; VILAPLANA, Lluïsa; MARCO, M.-Pilar. Nanobody: outstanding features for diagnostic and therapeutic applications. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [S.l.], v. 411, n. 9, p. 1703-1713, 8 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1007/s00216-019-01633-4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-019-01633-4#Abs1>. Acesso em: 09 maio 2022.

66 NOËL, Floriane; MALPERTUY, Alain; BREVERN, Alexandre G. de. Global analysis of VHHs framework regions with a structural alphabet. **Biochimie**, [S.l.], v. 131, p. 11-19, dez. 2016. Elsevier BV. DOI 10.1016/j.biochi.2016.09.005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908416301729>. Acesso em: 10 dez. 2021.

67 VUCHELEN, Anneleen *et al.*  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  assignments of a camelid nanobody directed against human  $\alpha$ -synuclein. **Biomolecular Nmr Assignments**, [S.l.], v. 3, n. 2, p. 231-233, 18 set. 2009. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1007/s12104-009-9182-4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12104-009-9182-4#Abs1>. Acesso em: 12 jun. 2022.

68 KUNZ, Patrick *et al.* The structural basis of nanobody unfolding reversibility and thermoresistance. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 1-10, 21 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1038/s41598-018-26338-z. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-26338-z#citeas>. Acesso em: 26 maio 2022.

69 GENST, Erwin de *et al.* Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.l.], v. 103, n. 12, p. 4586-4591, 13 mar. 2006. Proceedings of the National Academy of Sciences. DOI 10.1073/pnas.0505379103. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0505379103>. Acesso em: 12 jun. 2022.

70 CONRATH, Katja *et al.* Antigen binding and solubility effects upon the veneering of a camel VHH in framework-2 to mimic a VH. **Journal Of Molecular Biology**, [S.l.], v. 350, n. 1, p. 112-125, jul. 2005. Elsevier BV. DOI 10.1016/j.jmb.2005.04.050. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283605004845>. Acesso em: 10 dez. 2021.

71 SANG, Zhe *et al.* Llamade: an open-source computational pipeline for robust nanobody humanization. **Structure**, [S.l.], v. 30, n. 3, p. 418-429, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2021.11.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212621004184>. Acesso em: 11 abr. 2022.

72 PÉREZ, Janice M. J. *et al.* Thermal unfolding of a llama antibody fragment: a two-state reversible process. **Biochemistry**, [S.l.], v. 40, n. 1, p. 74-83, 13 dez. 2000. American Chemical Society (ACS). DOI 10.1021/bi0009082. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bi0009082>. Acesso em: 12 jun. 2022.

73 DUMOULIN, Mireille *et al.* Single-domain antibody fragments with high conformational stability. **Protein Science**, [S.l.], v. 11, n. 3, p. 500-515, 13 abr. 2002. Wiley. DOI 10.1110/ps.34602. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1110/ps.34602>. Acesso em: 10 dez. 2021.

74 VINCKE, Cécile *et al.* General strategy to humanize a Camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody ccaffold. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 284, n. 5, p. 3273-3284, jan. 2009. Elsevier BV. DOI 10.1074/jbc.m806889200. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)81891-4/fulltext#seccesstitle10](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)81891-4/fulltext#seccesstitle10). Acesso em: 07 jun. 2022.

75 MARCO, Ario de. Recombinant antibody production evolves into multiple options aimed at yielding reagents suitable for application-specific needs. **Microbial Cell Factories**, [S.l.], v. 14, n. 1, p. 1-17, 2 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1186/s12934-015-0320-7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-015-0320-7#Abs1>. Acesso em: 13 jun. 2022.

76 LIU, Yongkang; HUANG, He. Expression of single-domain antibody in different systems. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.l.], v. 102, n. 2, p. 539-551, 25 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1007/s00253-017-8644-3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-017-8644-3>. Acesso em: 13 jun. 2022.

77 ZHAO, Guangyu *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. **Journal Of Virology**, [S.l.], v. 92, n. 18, p. 1-15, 15 set. 2018. American Society for Microbiology. DOI 10.1128/jvi.00837-18. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JVI.00837-18>. Acesso em: 13 jun. 2022.

78 BOBKOV, Vladimir *et al.* Nanobody-Fc constructs targeting chemokine receptor CXCR4 potently inhibit signaling and CXCR4-mediated HIV-entry and induce antibody effector functions. **Biochemical Pharmacology**, [S.l.], v. 158, p. 413-424, dez. 2018. Elsevier BV. DOI 10.1016/j.bcp.2018.10.014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295218304350>. Acesso em: 13 jun. 2022.

79 DHARA, Venkata Gayatri et al. Recombinant antibody production in CHO and NS0 Cells: differences and similarities. **Biodrugs**, [S.l.], v. 32, n. 6, p. 571-584, 30 nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1007/s40259-018-0319-9. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40259-018-0319-9#Abs1>. Acesso em: 13 jun. 2022.

80 WANG, Wenyi; YUAN, Jumao; JIANG, Changan. Applications of nanobodies in plant science and biotechnology. **Plant Molecular Biology**, [S.l.], v. 105, n. 1-2, p. 43-53, 10 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1007/s11103-020-01082-z. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11103-020-01082-z#Abs1>. Acesso em: 13 jun. 2022.

81 TEH, Yi-Hui Audrey; KAVANAGH, Tony A.. High-level expression of Camelid nanobodies in *Nicotiana benthamiana*. **Transgenic Research**, [S.l.], v. 19, n. 4, p. 575-586, 28 out. 2009. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1007/s11248-009-9338-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11248-009-9338-0#Abs1>. Acesso em: 13 jun. 2022.

82 SANDOMENICO, Annamaria; SIVACCUMAR, Jwala P.; RUVO, Menotti. Evolution of *Escherichia coli* expression system in producing antibody recombinant fragments. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 21, n. 17, p. 6324, 31 ago. 2020. MDPI AG. DOI 10.3390/ijms21176324. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/17/6324>. Acesso em: 02 abr. 2022.

83 MARCO, Ario de. Recombinant expression of nanobodies and nanobody-derived immunoreagents. **Protein Expression And Purification**, [S.l.], v. 172, p. 105645, ago. 2020. Elsevier BV. DOI 10.1016/j.pep.2020.105645. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592820301650>. Acesso em: 07 dez. 2021.

84 STEELAND, Sophie; VANDENBROUCKE, Roosmarijn E.; LIBERT, Claude. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. **Drug Discovery Today**, [S.l.], v. 21, n. 7, p. 1076-1113, jul. 2016. Elsevier BV. DOI 10.1016/j.drudis.2016.04.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644616301076>. Acesso em: 07 jun. 2022.

85 TORRES, Joar E. Pinto *et al.* Development of a Nanobody-based lateral flow assay to detect active *Trypanosoma congolense* infections. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 1-15, 13 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1038/s41598-018-26732-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-26732-7#citeas>. Acesso em: 14 jun. 2022.

86 TU, Zhui *et al.* Identification and characterization of species-specific nanobodies for the detection of *Listeria monocytogenes* in milk. **Analytical Biochemistry**, [S.l.], v. 493, p. 1-7, jan. 2016. Elsevier BV. DOI 10.1016/j.ab.2015.09.023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269715004650>. Acesso em: 14 jun. 2022.

87 ZAFRA, Olga *et al.* Monitoring biodegradative enzymes with nanobodies raised in *Camelus dromedarius* with mixtures of catabolic proteins. **Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 13, n. 4, p. 960-974, 10 jan. 2011. Wiley. DOI 10.1111/j.1462-2920.2010.02401.x.

Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2010.02401.x>. Acesso em: 14 jun. 2022.

88 OLIVEIRA, Sabrina *et al.* Targeting tumors with nanobodies for cancer imaging and therapy. **Journal Of Controlled Release**, [S.l.], v. 172, n. 3, p. 607-617, dez. 2013. Elsevier BV. DOI 10.1016/j.jconrel.2013.08.298. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365913007876>. Acesso em: 14 jun. 2022.

89 MORRISON, Chris. Nanobody approval gives domain antibodies a boost. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.l.], v. 18, n. 7, p. 485-487, 12 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1038/d41573-019-00104-w. Disponível em: <https://go.gale.com/ps/i.do?id=GALE%7CA592073069&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=fulltext&issn=14741776>. Acesso em: 11 jun. 2022.

90 BALCHEN, T. *et al.* Study design of a phase I, placebo-controlled, First-in-human trial to assess safety and tolerability, immunogenicity, and pharmacokinetics and pharmacodynamics of single ascending doses of the anti-ADAMTS-5 Nanobody®, M6495, in healthy male subjects. **Osteoarthritis And Cartilage**, [S.l.], v. 26, p. 276-277, abr. 2018. Elsevier BV. DOI 10.1016/j.joca.2018.02.561. Disponível em: [https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584\(18\)30661-7/fulltext](https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584(18)30661-7/fulltext). Acesso em: 14 jun. 2022.

91 PYMM, Phillip *et al.* Nanobody cocktails potently neutralize SARS-CoV-2 D614G N501Y variant and protect mice. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.l.], v. 118, n. 19, p. 1-12, 23 abr. 2021. Proceedings of the National Academy of Sciences. DOI 10.1073/pnas.2101918118. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2101918118>. Acesso em: 14 jun. 2022.

92 DUGGAN, Sean. Caplacizumab: first global approval. **Drugs**, [S.l.], v. 78, n. 15, p. 1639-1642, out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1007/s40265-018-0989-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40265-018-0989-0>. Acesso em: 07 jun. 2022.

93 SADLER, J. Evan. What's new in the diagnosis and pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. **Hematology**, [S.l.], v. 2015, n. 1, p. 631-636, 5 dez. 2015. American Society of Hematology. DOI 10.1182/asheducation-2015.1.631. Disponível em: <https://ashpublications.org/hematology/article/2015/1/631/20558/What-s-new-in-the-diagnosis-and-pathophysiology-of>. Acesso em: 11 jun. 2022.

94 HANLON, Ashley; METJIAN, Ara. Caplacizumab in adult patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. **Therapeutic Advances In Hematology**, [S.l.], v. 11, p. 204062072090290, jan. 2020. SAGE Publications. DOI 10.1177/2040620720902904. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2040620720902904>. Acesso em: 11 jun. 2022.

95 SARGENTINI-MAIER, Maria Laura *et al.* Clinical pharmacology of caplacizumab for the treatment of patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. **Expert Review Of Clinical Pharmacology**, [S.l.], v. 12, n. 6, p. 537-545, 28 abr. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17512433.2019.1607293>. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17512433.2019.1607293>. Acesso em: 11 jun. 2022.

96 BATHULA, Nuthan V.; BOMMADEVARA, Hemashree; HAYES, Jerrard M.. Nanobodies: the future of antibody-based immune therapeutics. **Cancer Biotherapy And Radiopharmaceuticals**, [S.l.], v. 36, n. 2, p. 109-122, 1 mar. 2021. Mary Ann Liebert Inc. DOI 10.1089/cbr.2020.3941. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/cbr.2020.3941>. Acesso em: 11 jun. 2022.

97 LEEM, Jinwoo *et al.* ABodyBuilder: automated antibody structure prediction with data driven accuracy estimation. **Mabs**, [S.l.], v. 8, n. 7, p. 1259-1268, 30 ago. 2016. Informa UK Limited. DOI 10.1080/19420862.2016.1205773. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19420862.2016.1205773>. Acesso em: 01 mar. 2022.

98 SALI, Andrej; BLUNDELL, Tom L.. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal Of Molecular Biology**, [S.l.], v. 234, n. 3, p. 779-815, dez. 1993. Elsevier BV. DOI 10.1006/jmbi.1993.1626. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283683716268>. Acesso em: 05 mar. 2022.

99 FEIG, Michael. Local Protein Structure Refinement via Molecular Dynamics Simulations with locPREFMD. **Journal Of Chemical Information And Modeling**, [S.l.], v. 56, n. 7, p. 1304-1312, 13 jul. 2016. American Chemical Society (ACS). DOI 10.1021/acs.jcim.6b00222. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jcim.6b00222>. Acesso em: 21 fev. 2022.

100 LASKOWSKI, R. A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal Of Applied Crystallography**, [S.l.], v. 26, n. 2, p. 283-291, 1 abr. 1993. International Union of Crystallography (IUCr). DOI 10.1107/s0021889892009944. Disponível em: <http://www.scfbio-iitd.res.in/software/proteomics/newProsav/Pdf/Procheck.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2022.

101 DAVIS, I. W. *et al.* MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, [S.l.], v. 35, p. 375-383, 8 maio 2007. Oxford University Press (OUP). DOI 10.1093/nar/gkm216. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1933162/>. Acesso em: 01 mar. 2022.

102 LUTHY, Roland; BOWIE, James U.; EISENBERG, David. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, [S.l.], v. 356, n. 6364, p. 83-85, mar. 1992. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1038/356083a0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/356083a0#Abs1>. Acesso em: 05 mar. 2022.

103 STUDER, Gabriel *et al.* QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. **Bioinformatics**, [S.l.], v. 36, n. 6, p. 1765-1771, 7 nov. 2019. Oxford University Press (OUP). DOI 10.1093/bioinformatics/btz828. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/36/6/1765/5614424#200822167>. Acesso em: 30 mar. 2022.

- 104 VISHWAKARMA, Poonam *et al.* VHH Structural Modelling Approaches: a critical review. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 23, n. 7, p. 3721, 28 mar. 2022. MDPI AG. DOI 10.3390/ijms23073721. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/7/3721/htm>. Acesso em: 18 jun. 2022.
- 105 WEBB, Benjamin; SALI, Andrej. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current Protocols In Bioinformatics**, [S.l.], v. 54, n. 1, p. 1-55, jun. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cpbi.3>. Disponível em: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cpbi.3>. Acesso em: 07 mar. 2022.
- 106 CHEN, Vincent B. *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, [S.l.], v. 66, n. 1, p. 12-21, 21 dez. 2009. International Union of Crystallography (IUCr). DOI 10.1107/s0907444909042073. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/iucr/doi/10.1107/S0907444909042073>. Acesso em: 08 mar. 2022.
- 107 HINTZE, Bradley J. *et al.* Molprobity's ultimate rotamer-library distributions for model validation. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S.l.], v. 84, n. 9, p. 1177-1189, 23 jun. 2016. Wiley. DOI 10.1002/prot.25039. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/prot.25039>. Acesso em: 14 março 2022.
- 108 HO, Bosco K; BRASSEUR, Robert. The Ramachandran plots of glycine and pre-proline. **Bmc Structural Biology**, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 1-11, 16 ago. 2005. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1186/1472-6807-5-14. Disponível em: <https://bmestructbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6807-5-14#Abs1>. Acesso em: 11 mar. 2022.
- 109 HOLLINGSWORTH, Scott A.; KARPLUS, P. Andrew. A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins. **Biomolecular Concepts**, [S.l.], v. 1, n. 3-4, p. 271-283, 1 out. 2010. Walter de Gruyter GmbH. DOI 10.1515/bmc.2010.022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3061398/>. Acesso em: 11 mar. 2022.
- 110 ALMAGRO, Juan C. *et al.* Antibody modeling assessment. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S.l.], v. 79, n. 11, p. 3050-3066, 21 set. 2011. Wiley. DOI 10.1002/prot.23130. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/prot.23130>. Acesso em: 18 jun. 2022.
- 111 BOWIE, James U.; LUTHY, Roland; EISENBERG, David. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**, [S.l.], v. 253, n. 5016, p. 164-170, 12 jul. 1991. American Association for the Advancement of Science (AAAS). DOI 10.1126/science.1853201. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1853201>. Acesso em: 05 mar. 2022.
- 112 EISENBERG, David; LÜTHY, Roland; BOWIE, James U.. [20] VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods In Enzymology**, [S.l.], p. 396-404, 1997. Elsevier. DOI 10.1016/s0076-6879(97)77022-8. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687997770228>. Acesso em: 16 mar. 2022.

113 JUMPER, John *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, [S.l.], v. 596, n. 7873, p. 583-589, 15 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1038/s41586-021-03819-2. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03819-2#citeas>. Acesso em: 13 abr. 2022.

114 OHEN, Tomer; HALFON, Matan; SCHNEIDMAN-DUHOVNY, Dina. NanoNet: rapid end-to-end nanobody modeling by deep learning at sub angstrom resolution. **Biorxiv**, [S.l.], p. 1-16, 4 ago. 2021. Cold Spring Harbor Laboratory. DOI 10.1101/2021.08.03.454917. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.08.03.454917v1.abstract>. Acesso em: 21 jun. 2022.

115 KO, J. *et al.* GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. **Nucleic Acids Research**, [S.l.], v. 40, n. 1, p. 294-297, 30 maio 2012. Oxford University Press (OUP). DOI 10.1093/nar/gks493. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/40/W1/W294/1078340>. Acesso em: 13 mar. 2022.

116 ROSANO, Germán L.; MORALES, Enrique S.; CECCARELLI, Eduardo A.. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. **Protein Science**, [S.l.], v. 28, p. 1412-1422, 2019. Wiley. DOI 10.1002/pro.3668. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pro.3668>. Acesso em: 14 dez. 2021.

117 SØRENSEN, Hans Peter; MORTENSEN, Kim Kusk. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal Of Biotechnology**, [S.l.], v. 115, n. 2, p. 113-128, jan. 2005. Elsevier BV. DOI 10.1016/j.jbiotec.2004.08.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165604004560>. Acesso em: 22 jun. 2022.

118 LOBSTEIN, Julie *et al.* SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. **Microbial Cell Factories**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 1-16, 8 maio 2012. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1186/1475-2859-11-56. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1475-2859-11-56#citeas>. Acesso em: 26 mai. 2022.

119 FAULKNER, Melinda J. *et al.* Functional plasticity of a peroxidase allows evolution of diverse disulfide-reducing pathways. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.l.], v. 105, n. 18, p. 6735-6740, 6 maio 2008. Proceedings of the National Academy of Sciences. DOI 10.1073/pnas.0801986105. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0801986105>. Acesso em: 22 jun. 2022.

120 STUDIER, F. William. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. **Journal Of Molecular Biology**, [S.l.], v. 219, n. 1, p. 37-44, maio 1991. Elsevier BV. DOI 10.1016/0022-2836(91)90855-z. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/002228369190855Z>. Acesso em: 22 jun. 2022.

121 SUN, Ziyong *et al.* Expression and purification of human urodilatin by small ubiquitin-related modifier fusion in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.l.],

v. 78, n. 3, p. 495-502, mar. 2008. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1007/s00253-007-1330-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-007-1330-0#Abs1>. Acesso em: 22 jun. 2022.

122 ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A.. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers In Microbiology**, [S.l.], v. 5, p. 1-17, 17 abr. 2014. Frontiers Media SA. DOI 10.3389/fmicb.2014.00172. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00172/full>. Acesso em: 22 jun. 2022.

123 HAYAT, Seyed Mohammad Gheibi *et al.* Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E.coli*): what we need to know. **Current Pharmaceutical Design**, [S.l.], v. 24, n. 6, p. 718-725, 10 maio 2018. Bentham Science Publishers Ltd.. DOI 10.2174/1381612824666180131121940. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd/2018/00000024/00000006/art00013>. Acesso em: 22 jun. 2022.

124 GOPAL, Gopal Jee; KUMAR; Awanish. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. **The Protein Journal**, [S.l.], v. 32, n. 6, p. 419-425, 30 jul. 2013. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1007/s10930-013-9502-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10930-013-9502-5#citeas>. Acesso em: 24 jun. 2022.

125 WINGFIELD, Paul T.. Overview of the purification of recombinant proteins. **Current Protocols In Protein Science**, [S.l.], v. 80, n. 1, p. 1-50, abr. 2015. Wiley. DOI 10.1002/0471140864.ps0601s80. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4410719/>. Acesso em: 24 jun. 2022.



**APÊNDICE A – FUNÇÃO OBJETIVA DAS ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS  
PREDITAS PARA OS NANOCORPOS**

Tabela 1 – Função objetiva de cinco modelos preditos para cada VHH.

<b>MODELOS</b>	<b>FUNÇÃO OBJETIVA VHH-1</b>	<b>FUNÇÃO OBJETIVA VHH-3</b>	<b>FUNÇÃO OBJETIVA VHH-4</b>
1	865,37122	808,72870	<b>800,34583</b>
2	<b>878,54346</b>	797,44922	779,13123
3	903,33716	796,61121	778,17761
4	878,40363	<b>799,85083</b>	798,67761
5	893,57745	807,87457	774,44897

Legenda: Dados da pesquisa. Os cinco modelos de menor função objetiva entre os 100 preditos são numerados de 1 a 5 para cada VHH. Em amarelo está destacada a função objetiva do modelo de melhor qualidade, com base nas análises realizadas, para cada VHH.