



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

THALIA LIMA FROTA

**AMPLIFICAÇÃO DE REPERTÓRIO GÊNICO DE VHH DE *Lama glama* COM
VISTAS À CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA *NAIVE* DE ANTICORPOS DE
DOMÍNIO ÚNICO**

FORTALEZA

2022

THALIA LIMA FROTA

AMPLIFICAÇÃO DE REPERTÓRIO GÊNICO DE VHH DE *Lama glama* COM VISTAS À
CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA *NAIVE* DE ANTICORPOS DE DOMÍNIO ÚNICO

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Pedagógico: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.

Orientadora Técnico-científica: Prof.^a Dr.^a Carla Freire Celedonio Fernandes.

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)

F961a Frota, Thalia Lima.
Amplificação de repertório gênico de VHH de lama glama com vistas à construção de biblioteca naive de anticorpos de domínio único / Thalia Lima Frota. – 2022.
38 f. : il. color.

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

Orientação: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.

Coorientação: Profa. Dra. Carla Freire Celedonio Fernandes.

1. Nanocorpo. 2. VHH. 3. Biblioteca naive. I. Título.

CDD 661

THALIA LIMA FROTA

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em 15 de julho de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a. Carla Freire Celedonio Fernandes
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Prof.^a M.^a. Vivian Magalhães Brandão dos Santos
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

À minha mãe, essencial para a minha decisão
de cursar Biotecnologia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Gleides dos Santos Lima Frota** e **Fernando Elísio Frota**, que sempre me mostraram o valor do conhecimento e me apoiaram em minhas decisões.

À minha irmã, **Giulia Lima Frota**, por sempre estar presente e me lembrar que os momentos de lazer são tão importantes quanto os de estudo e trabalho.

Ao meu namorado, **Luciano Tavares Coelho Júnior**, que confia e acredita no meu potencial, sempre me mostrando com otimismo o que está pela frente, sendo assim essencial em todo esse processo.

À Prof.^a Dr.^a **Carla Freire Celedonio Fernandes**, por sempre estar genuinamente disposta a ajudar todos, por ser um exemplo profissional e pessoal a ser seguido e pela oportunidade de concretizar meu sonho de estagiar na Fiocruz.

Ao Prof. Dr. **Márcio Viana Ramos**, por me ajudar desde o início a conseguir uma oportunidade de estágio na Fiocruz, pelos conselhos sobre a vida acadêmica e por ser sempre muito acessível.

À Prof. Ma. **Lívia Coelho de Assis** e a Prof. Ma. **Vivian Magalhães Brandão dos Santos**, pelo tempo disponibilizado, pelo apoio e pelas valiosas colaborações e sugestões.

Às minhas grandes amigas da UFC, **Giovanna Souza** e **Sarah Lutfi**, que estão presentes desde o início do curso e se tornaram amigas para toda a vida.

À minha amiga de infância **Laura Monteiro**, sempre presente nos piores e melhores momentos e que me ensina a ver a vida de uma forma menos exata e mais subjetiva.

A todo o grupo de pesquisa PlatnAb, formado por **Angela Malaquias**, **Anna Carolina**, **Brunheld Maia**, **Vânia Sousa**, **Camila Sillos** e **Eduarda Guedes** pelo acolhimento, pelas conversas e por todo o companheirismo.

À minha companhia durante o último ano, **Yara Silva**, compartilhando momentos de alegria e desespero pelos corredores da Fiocruz.

Aos caméleões que foram cedidos para estudo em trabalhos anteriores e proporcionaram a descoberta dos nanocorpos. Animal nenhum deve ser tratado com inferioridade ou desprezo.

A todos os professores e à coordenação do curso Bacharelado em Biotecnologia pelos conhecimentos adquiridos, pelos ensinamentos e por toda contribuição em minha formação profissional e pessoal.

À Fiocruz, no que concerne à infraestrutura e ao desenvolvimento, e à Fiotec pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto.

"Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite. Que a liberdade seja nossa própria substância, já que viver é ser livre." (Simone de Beauvoir, 1956).

RESUMO

Os animais da família Camelidae produzem naturalmente imunoglobulinas G funcionais desprovidas de cadeia leve chamadas de anticorpos de cadeia pesada. A região de reconhecimento antigênico desses anticorpos é formada apenas por um domínio, conhecido como VHH ou nanocorpo. Os VHHs são moléculas de aproximadamente 15 kDa, possuem baixa imunogenicidade, alta estabilidade a mudanças de pH e temperatura e podem ser produzidos em sistema microbiano. Assim, se apresentam como ferramenta promissora para aplicações biotecnológicas na pesquisa científica, diagnóstico e terapêutica de doenças. Por conta da ampla aplicabilidade dessa ferramenta, o presente trabalho teve como objetivo amplificar o repertório gênico de VHH de um animal da espécie *Lama glama* com vistas a construção de uma biblioteca *naive* de nanocorpos de camelídeos. Após coleta da amostra de sangue do animal, foi realizado o isolamento de linfócitos periféricos. Essas células foram quantificadas e usadas para extração do RNA total, que subsequentemente foi utilizado para a síntese de cDNA. Em seguida, o material sintetizado foi submetido a duas PCRs sequenciais utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos. Na primeira reação (PCR I), ocorreu a amplificação dos fragmentos gênicos relacionados às regiões VH-CH1-CH2, presente em anticorpos convencionais, e VHH-CH2, presente nos anticorpos de cadeia pesada. O produto da PCR I foi submetido a eletroforese em gel de agarose e o fragmento correspondente a região VHH-CH2 (600 pb) foi excisado do gel, purificado e submetido a PCR II, para amplificação do repertório gênico do VHH (cerca de 400 pb) e inserção dos sítios das enzimas de restrição *Sfi*-I e *Not*-I. As sequências amplificadas representam a variabilidade de nanocorpos do animal e podem ser utilizadas posteriormente para construção de uma biblioteca de VHH para a seleção de nanocorpos contra antígenos de interesse para a saúde pública.

Palavras-chave: Nanocorpo. VHH. Biblioteca *naive*.

ABSTRACT

Animals of the Camelidae family naturally produce functional G immunoglobulin lacking light chains, called heavy chain antibodies. The antigen recognition region of these antibodies is formed by the single domain, known as VHH or nanobody. VHHs are molecules of about 15 kDa, with low immunogenicity, high stability to pH and temperature changes and can be produced in microbial systems. Thus, they are presented as a promising tool for biotechnological applications in the areas of therapeutics, diagnostics and scientific research. Due to the wide applicability of this tool, this work aimed to amplify the VHH gene repertoire of one animal of the *Lama glama* species that may be used to build a naive library of camelid nanobodies. After collecting the blood sample from the animal, peripheral lymphocytes were isolated and quantified. These cells were used to extract total RNA, which was subsequently used for cDNA synthesis. Then, synthesized material was submitted to two sequential PCRs using specific oligonucleotide primers. In the first reaction (PCR I), gene fragments related to VH-CH1-CH2 regions, present in conventional antibodies, and VHH-CH2, present in heavy chain antibodies, were amplified. PCR I product was submitted to agarose gel electrophoresis and the fragment corresponding to VHH-CH2 region (600 bp) was excised from the gel, purified and subjected to PCR II, where VHH gene repertoire was amplified (about 400 bp) and *Sfi*-I and *Not*-I restriction enzyme sites were inserted. Amplified sequences represent the variability of nanobodies of an animal and can be used later for the construction of a library of VHH with the perspective of nanobody selection against relevant antigens for public health.

Keywords: Nanobodies; VHH; *Naive* library.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1— Representação esquemática das estruturas de Igs convencionais e de cadeia pesada de camelídeos e do domínio VHH, respectivamente	13
Figura 2— Representação esquemática da organização das sequências de VH, VHH e suas CDRs	14
Figura 3— Representação esquemática de anticorpos convencionais e engenheirados	15
Figura 4— Fluxograma simplificado da metodologia de isolamento de linfócitos	22
Figura 5— Fluxograma simplificado da obtenção de cDNA a partir dos linfócitos isolados	23
Figura 6— Representação esquemática das regiões amplificadas na PCR I	28
Figura 7— Gel de eletroforese em agarose 1,2% com o produto da PCR I	29
Figura 8— Representação esquemática das regiões amplificadas na PCR II	30
Figura 9— Gel de eletroforese em agarose 1,2% com o produto da PCR II.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1— Resultados obtidos a partir da quantificação das amostras de RNA e cDNA por espectrofotometria à 260 nm no <i>NanoDrop One</i> ® (<i>ThermoFisher Scientific</i>).....	27
Tabela 2— Resultados obtidos a partir da quantificação do produto de PCR I por espectrofotometria à 260 nm no <i>NanoDrop One</i> ® (<i>ThermoFisher Scientific</i>)..	30
Tabela 3— Resultados obtidos a partir da quantificação do produto de PCR II por espectrofotometria à 260 nm no <i>NanoDrop One</i> ® (<i>ThermoFisher Scientific</i>)..	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CDR	do inglês, <i>Complementarity Determining Region</i>
CH	Região constante da cadeia pesada
CIBIO	Comissão Interna de Biossegurança
COVID	do inglês, <i>Corona Virus Disease</i>
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DNA	do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, ethylenediaminetetraacetic acid)
Fab	do inglês, <i>Fragment antigen-binding</i>
Fc	Fragmento Cristalizável
FGFR1	do inglês, <i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
FR	do inglês, <i>Framework Region</i>
HCAb	do inglês, <i>Heavy Chain Antibody</i>
IgG	Imunoglobulina G
OGM	Organismos Geneticamente Modificados
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, <i>Polimerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PTT	Púrpura Trombocitopénica Trombótica
q.s.p.	Quantidade Suficiente Para
RNA	do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
SCPH	Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus
VL	Região variável da cadeia leve do anticorpo (VL, do inglês <i>variable light chain</i>)
VH	Região variável da cadeia pesada do anticorpo (VH, do inglês <i>variable heavy chain</i>)
VHH	do inglês, <i>Variable domain of the Heavy chain of a Heavy-chain antibody</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetros
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
KCl	Cloreto de Potássio
NaCl	Cloreto de Sódio
Da	Dalton
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
g	Gramma
°C	Grau Celsius
L	Litros
®	Marca Registrada
μ	Micro
kb	Mil Pares de Bases
m	Mili
M	Molar
n	nano
pb	Pares de Base
%	Porcentagem
™	<i>Trade Mark</i>
xg	Veze a Força Gravitacional da Terra
v	Volume
V	Volts

SUMÁRIO

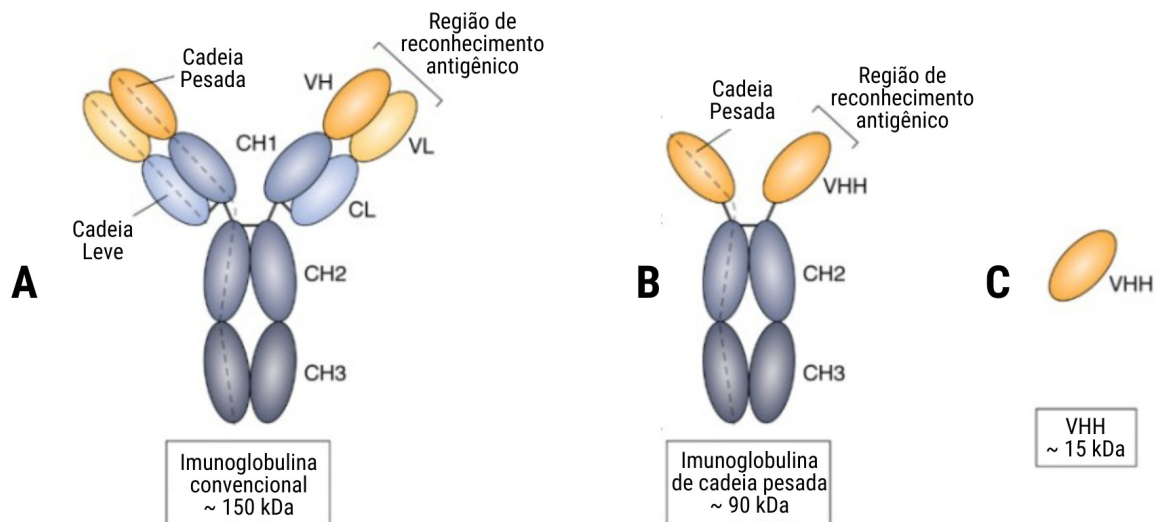
1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Anticorpos de domínio único de camelídeos	13
1.2	Aplicabilidade dos VHHs na produção de imunobiológicos	15
1.3	Biblioteca de nanocorpos de camelídeos	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivos gerais	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	METODOLOGIA	20
3.1	Aspectos éticos	20
3.2	Coleta de sangue	20
3.3	Isolamento de linfócitos	20
3.4	Extração de RNA	22
3.5	Síntese de cDNA	23
3.6	Amplificação da região variável do VHH	24
3.6.1	<i>PCR I</i>	24
3.6.2	<i>PCR II</i>	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	Preparo das amostras	26
4.2	Análises do produto da PCR I	28
4.3	Análises do produto da PCR II	30
5	CONCLUSÃO	33

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anticorpos de domínio único de caméleões

Os caméleões são animais pertencentes à família *Camelidae*, ordem *Artiodactyla* e subordem *Tylopoda*, entre os quais estão os camelos, dromedários, lhamas e vicunhas. Esses animais apresentam características singulares em sua resposta imunológica. Em 1993, Hamers-Casterman e colaboradores identificaram que caméleões produzem, além de imunoglobulinas G convencionais (IgG₁), constituídas de duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, IgGs funcionais desprovidas das cadeias leves e do domínio CH1 (IgG₂ e IgG₃). Essas IgGs foram denominadas anticorpos de cadeia pesada (HCAb). A região de interação antigênica dos HCAb é formada apenas pelo domínio variável da cadeia pesada, chamado de VHH (do inglês, *Variable Heavy chain domain of Heavy chain antibody*) ou de nanocorpo (HAMERS-CASTERMAN *et al.*, 1993; MUYLDERMANS, 2013) (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática das estruturas de IgG convencionais, de IgG de cadeia pesada de caméleões e do domínio VHH, respectivamente.

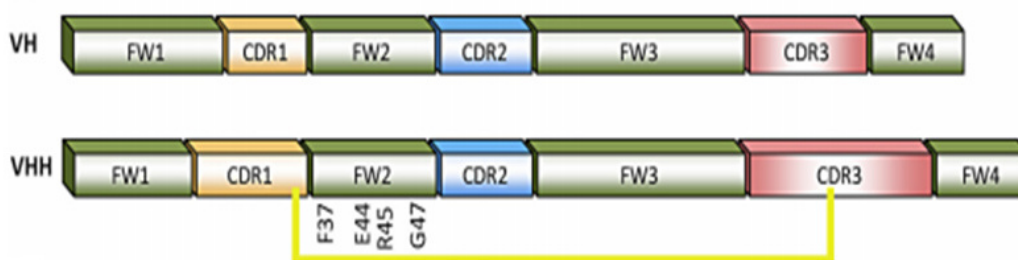


Fonte: adaptado de CHELOHA *et al.* (2020). A: Imunoglobulina G convencional (IgG₁), constituída por 2 cadeias leves e 2 pesadas. B: Anticorpos de cadeia pesada de caméleões (IgG₂ e IgG₃), constituídos apenas por cadeias pesadas. C: Anticorpo de domínio único denominado VHHs ou nanocorpos.

Os nanocorpos de caméleões apresentam 4 regiões conservadas chamadas de FR (do inglês, *framework regions*) intercaladas por 3 regiões determinantes de complementaridade (CDRs). As FRs formam o arcabouço estrutural, enquanto as CDRs estão envolvidas nas interações antígeno-anticorpo (HARMSSEN; HAARD, 2007). Para compensar

a perda da cadeia leve, as CDRs de VHH, especialmente CDR1 e CDR3, são normalmente mais extensas quando comparadas as CDRs de VH humano ou murino, o que facilita o alcance de sítios inacessíveis aos anticorpos convencionais. Além disso, os VHHs possuem similaridade de aproximadamente 80% com o VH humano, indicando baixa imunogenicidade (GENST *et al.*, 2006). O estudo de Rossoti e colaboradores (2021), afirma que mais de 35 testes clínicos com imunobiológicos baseados em VHH envolvendo mais de 1000 pacientes foram realizados e que a maioria deles relatou baixa ou nenhuma imunogenicidade. As principais diferenças são substituições de aminoácidos hidrofóbicos por hidrofílicos ou menores nas regiões FR (FR2), o que explica a ausência de associação com o domínio VL presente em anticorpos convencionais e o comportamento solúvel da molécula (HAMERS-CASTERMAN *et al.*, 1997) (Figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática da organização das sequências de VH, VHH e suas CDRs.



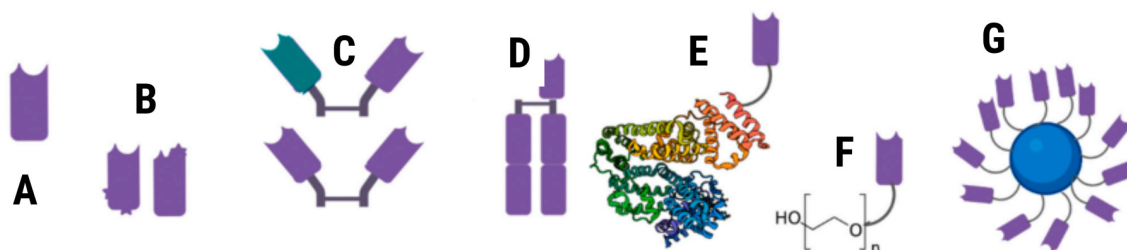
Fonte: adaptado de SABIR *et al.* (2014). Os aminoácidos marcados na estrutura do VHH são dados (Phe/Tyr37, Glu/Gln44, Arg45, Gly/Phe/Leu47). A ligação dissulfeto inter-CDR presente no VHH está representada em amarelo.

Ademais, além do pequeno tamanho, cerca de 15 kDa, os nanocorpos de camélídeos apresentam alta estabilidade a variações de temperatura e pH. Assim como foi observado nos resultados discutidos no trabalho de Van der Linden e colaboradores (1999), onde a capacidade de reconhecimento VHH antígeno específico foi comparada com a de anticorpos monoclonais de camundongo. As moléculas foram avaliadas quanto a afinidade, especificidade e estabilidade e, ao contrário dos anticorpos convencionais, os VHHs permaneceram funcionais mesmo após serem submetidos a temperaturas de 90 °C. Assim, a maior resistência à desnaturação por mudanças de pH ou de temperatura conferem aos nanocorpos de camélídeo uma alta estabilidade (PEREZ *et al.*, 2001; DUMOULIN *et al.*, 2002; EWERT *et al.*, 2002;).

1.2 Aplicabilidade dos VHHs na produção de imunobiológicos

Dadas as características e a versatilidade biotecnológica, os nanocorpos de camelídeos têm sido amplamente propostos na pesquisa científica, no desenvolvimento de dispositivos de diagnóstico rápido e para fins terapêuticos (CORTEZ-RETAMOZO *et al.*, 2002; RICHARD *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2017). Em adição a isso, o avanço das técnicas moleculares permite a obtenção de VHHs em diferentes formatos, podendo ser produzidos como monômeros, dímeros (mono ou biespecíficos), conjugados com o domínio Fc de IgG ou a proteína albumina, ou também associados a nanopartículas de metal (FERNANDES *et al.*, 2021) (Figura 3). Além disso, para aplicações terapêuticas, há também a possibilidade de humanização do VHH, substituindo genes de aminoácidos presentes na sequência do VHH por genes de aminoácidos equivalentes presentes em sequências de VH humano (VINCKE *et al.*, 2009). Assim, o uso de tais moléculas é proposto para a terapêutica de doenças inflamatórias, autoimunes, neurodegenerativas e cancerosas, bem como contra infecções virais e envenenamentos ofídicos (BANNAS *et al.*, 2017).

Figura 3 - Representação esquemática de anticorpos convencionais e engenheirados.



Fonte: adaptado de FERNANDES *et al.* (2021). A: nanocorpo VHH. B: nanocorpo com mutações pontuais (estratégia para aumentar afinidade). C: VHH bivalente e biespecífico. D: VHH conjugado a porção Fc humana. E: nanocorpo conjugado com albumina. F: nanocorpo PEGlado. G: nanopartícula associada a VHHs.

Assim, os VHHs surgem como uma alternativa ao uso de anticorpos convencionais e de fragmentos Fab, que muitas vezes apresentam limitações, como baixa estabilidade, alto potencial de agregação, baixa penetração em tecidos e maior imunogenicidade, além de frequentemente mostrarem um baixo rendimento de expressão em sistemas microbianos (SAERENS *et al.*, 2008; MUYLDERMANS, 2013). Recentemente, Xu e colaboradores (2021) demonstraram a capacidade de neutralização dos VHHs para diferentes linhagens do vírus SARS-CoV-2, em virtude da pandemia de COVID-19, e propuseram a produção dessas moléculas em camundongo.

O Caplacizumab, *anti-vWF Nanobody*®, é um nanocorpo humanizado bivalente utilizado no tratamento de Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT). Ele inibe a interação entre plaquetas e multímeros do fator de von Willebrand, prevenindo assim a adesão plaquetária excessiva mediada por essa glicoproteína (PEYVANDI *et al.*, 2016).

Em 2020, Hollifield e colaboradores explicam que a formação desses agregados ocorre por conta de um distúrbio na atividade da proteína ADAMTS13, responsável por clivar multímeros do fator de von Willebrand que se tornam muito extensos e induzem a agregação entre plaquetas e essa glicoproteína. Esse estudo também elucidou o mecanismo de funcionamento do Caplacizumab, mostrando que ele interage com o fator de von Willebrand impedindo a interação dele com as plaquetas e evitando a formação dos agregados. Já em 2021, Lee e colaboradores demonstraram como ocorre a interação entre esse nanocorpo e a glicoproteína envolvida na PTT, mostrando que não ocorre competição direta entre o caplacizumab e as plaquetas, mas sim uma estabilização de estrutura quando há a interação entre o nanocorpo e o fator de von Willebrand, inibindo a interação excessiva entre o fator de von Willebrand e as plaquetas característica da Púrpura Trombocitopénica Trombótica doença hematológica grave, chamada de (PTT).

Como grande parte dos coágulos dessa condição se formam em pequenos vasos, podendo levar ao bloqueio do fluxo sanguíneo para órgãos, o uso de nanocorpos se mostra bastante interessante visto que o reduzido tamanho confere ao VHH uma melhor penetração tecidual (PEYVANDI *et al.*, 2016; PINHEIRO, 2021). O tratamento desse distúrbio sanguíneo com Caplacizumab tem apresentado melhor controle da doença com menor tempo de restauração da contagem de plaquetas, além de um menor tempo de internação, quando comparado à terapia padrão. Assim, o Caplacizumab representa um avanço significativo no tratamento do PTT, especialmente nos casos de recidivas recorrentes (PALANQUES-PASTOR *et al.*, 2021).

Outra aplicabilidade amplamente estudada dos VHHs, é a utilização em metodologias alternativas para a soroterapia convencional no tratamento de acidentes ofídicos, apresentando resultados extremamente promissores para auxiliar no tratamento atual (LUIZ, 2018). Os anticorpos de domínio único são moléculas de reconhecimento antigênico que apresentam alta penetração tecidual em virtude do seu tamanho reduzido, característica importante para neutralização de toxinas de baixo peso molecular (LUIZ, 2014).

É válido ressaltar que por conta do pequeno tamanho, os VHHs possuem meia vida curta, sendo eliminados rapidamente por filtração glomerular. O que pode ser uma vantagem, quando se pretende usar a ferramenta como radiofármaco e/ou no diagnóstico por

imagem (CORTEZ-RETAMOZO *et al.*, 2002; HARRISON *et al.*, 2006). No entanto, para abordagens como imunobiológico, muitas vezes é interessante aumentar o tempo de meia vida dos nanocorpos no organismo, e para isso são utilizadas técnicas como a conjugação do VHH a à porção Fc do anticorpo convencional ou à albumina, a PEGuilação e a construção de dímeros (STEWART *et al.*, 2007; HUTT, *et al.*, 2012).

Diante disso, há uma necessidade de introdução de novos anticorpos e novas terapias no mercado farmacêutico que superem limitações ainda existentes, e os VHHs se mostram como uma ferramenta biotecnológica extremamente versátil, com alta capacidade de reconhecimento antigênico e aplicabilidades diversas (LUIZ, 2018; RICHARD *et al.*, 2013; CORTEZ-RETAMOZO *et al.*, 2002)

1.3 Biblioteca de nanocorpos de camelídeos

Com o objetivo de selecionar anticorpos específicos a determinados antígenos, bibliotecas de anticorpos podem ser construídas a partir de diferentes animais vertebrados, inclusive do ser humano. As bibliotecas de anticorpos podem ser imunes ou *naive*, sendo desenvolvidas de formas distintas, e podem também ter origem semi-sintética na qual a diversidade de fragmentos é gerada com o auxílio de técnicas moleculares (HOOGENBOOM, 2005; MUYLDERMANS, 2021).

A biblioteca imune é construída a partir do material de animais imunizados previamente e visa explorar a especificidade e afinidade desenvolvida naturalmente após a imunização (LUIZ, 2014; MUYLDERMANS 2021). Assim, os clones selecionados apresentam elevada capacidade de reconhecimento, alta afinidade e especificidade para o antígeno utilizado como imunógeno, gerando clones com maior potencial de interação com alvo (RICHARD *et al.*, 2013). No entanto, a construção de bibliotecas a partir de animais imunizados requer bastante tempo e recurso financeiro, além de algumas vezes ser redundante para certos antígenos (SABIR *et al.*, 2014). Outro contraponto é a menor diversidade e baixa heterogeneidade entre os VHHs selecionados por meio desse tipo de biblioteca (HARRISON *et al.*, 2006).

No estudo de Araújo (2009) foi construída uma biblioteca imune de anticorpos a partir de 20 mulheres com carcinoma ductal infiltrante, um tipo de câncer de mama. Posteriormente, a seleção de clones foi realizada por *Phage Display*, onde os anticorpos selecionados apresentaram especificidade a antígenos tumorais relacionados a essa doença. Já no trabalho de Souza e colaboradores (2007) foi realizada a imunização de galinhas com

proteínas das fases larval e adulta do carrapato bovino *Boophilus microplus* para a construção de uma biblioteca de anticorpos anticarrapato. A seleção de anticorpos foi realizada por meio da tecnologia de *Phage Display* e os clones foram utilizados para analisar e caracterizar alvos protéicos relacionados ao carrapato, demonstrando a importância e eficiência da utilização de bibliotecas na seleção de novos alvos moleculares. No trabalho de Pereira e colaboradores (2013), a utilização de uma biblioteca imune produzida a partir de lhamas previamente imunizadas possibilitou a seleção por *Phage Display* de VHHs contra a proteína recombinante do nucleocapsídeo do hantavírus, agente causador da Síndrome Cardiopulmonar causada por Hantavírus (SCPH). Em um trabalho de Prado e colaboradores (2012) foi demonstrado que VHHs selecionados a partir de uma biblioteca imune foram capazes de reconhecer especificamente toxinas de *Bothrops jararacussu*. Outro exemplo de pesquisa nesse âmbito é o estudo de Luiz (2014), que utilizou um camélido da espécie *Lama glama* para a construção de uma biblioteca imune de anticorpos e seleção, por *Phage Display*, de VHHs contra crotoxina, uma neurotoxina da serpente *Crotalus durissus terrificus*. Os testes realizados com os clones selecionados mostraram resultados positivos. Em 2018, Luiz aprofundou os estudos sobre os clones selecionados e indicou VHHs como ferramentas promissoras para diagnóstico e tratamento do envenenamento crotálico.

As bibliotecas *naive* são desenvolvidas a partir de indivíduos não imunizados. Nesse tipo de biblioteca se obtém o repertório gênico de anticorpos do animal, ou seja, os genes naturais, não imunizados e rearranjados, cada um codificando um sítio único de reconhecimento antigênico (HOOGENBOOM, 2005). Essa abordagem se torna mais rápida, sendo possível obter clones variados contra diversos antígenos, mostrando assim, um grande potencial para aplicações biotecnológicas (SABIR *et al.*, 2014). Em um trabalho realizado por Sabir e colaboradores (2014), a construção de uma biblioteca *naive* a partir de 30 camelos não imunizados demonstrou a robustez dessa técnica. Os resultados indicaram eficácia dessa abordagem na obtenção de uma biblioteca ampla, com tamanho estimado de 10^7 células. Além disso, os clones selecionados foram sequenciados e alinhados, mostrando alta diversidade e possibilidade de seleção de VHHs para inúmeros antígenos. Outro estudo desenvolvido por Monegal e colaboradores (2009) demonstrou a versatilidade de uma biblioteca *naive* de lhamas por meio de seleção e isolamento de vários VHHs diferentes para 6 proteínas relacionadas a patologias humanas. O receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos FGFR1 (do inglês, *fibroblast growth factor receptor 1*) foi uma das proteínas estudadas em mais detalhes e os resultados indicaram forte afinidade com o antígeno, atestando a eficiência de clones isolados a partir de bibliotecas *naive*. No entanto, apesar de

ser possível e viável a seleção de anticorpos, ocasionalmente podem existir dificuldades para a obtenção de clones com alta afinidade a um antígeno de interesse (SABIR *et al.*, 2014).

As bibliotecas de VHHs podem ser construídas de ambas as formas e o material utilizado para o desenvolvimento da biblioteca é coletado a partir de camelídeos. A seleção dos VHHs que apresentam alta afinidade de ligação com um antígeno específico tem sido realizada por meio de tecnologias de expressão e seleção *in vitro*, como *Phage Display*, *Ribosome Display* e *Yeast Display* (HARMSSEN *et al.*, 2006). Atualmente, a tecnologia de *Phage Display* é a mais utilizada para seleção de VHHs com alta especificidade e afinidade para com determinado alvo molecular (GHAHROUDI *et al.*, 1997; HARMSSEN *et al.*, 2006; STANLEY, 2014; ALMAGRO *et al.*, 2019;). Nessa tecnologia, proteínas e peptídeos exógenos podem ser expressos e apresentados fusionados às proteínas do capsídeo de bacteriófagos permitindo a busca de um extenso e variado repertório de alvos (PEREIRA, 2014). É importante mencionar que apesar da baixa imunogenicidade do VHH, os anticorpos selecionados geralmente são humanizados quando o objetivo é a aplicação para terapêutica de doenças humanas (ALMAGRO *et al.*, 2019, MUYLDERMANS 2021).

Diante disso, a construção de uma biblioteca *naive* de nanocorpos de camelídeos se mostra uma excelente estratégia para seleção de VHHs contra uma ampla variedade de antígenos e a obtenção e amplificação do repertório gênico contemplam as etapas iniciais para essa construção.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Amplificar o repertório gênico de VHH de um animal da espécie *Lama glama* com vistas a construção de uma biblioteca *naive* de anticorpos de domínio único de camelídeos.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar linfócitos a partir do sangue coletado do animal da espécie *Lama glama*;
- Obter RNA dos linfócitos do animal;
- Sintetizar o cDNA a partir do RNA;
- Amplificar o repertório gênico do VHH;

- Purificar e quantificar os produtos amplificados.

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram realizados de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Para o desenvolvimento de pesquisa experimental com animais, o presente trabalho foi submetido à Comissão de Ética para uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) e aprovado sob o protocolo 08863241/2020. Além disso, o projeto foi encaminhado para a Comissão Interna de Biossegurança (CIBIO) da Fiocruz-Ceará, considerando a necessidade de utilização de Organismo Geneticamente Modificados (OGMs) e de métodos de engenharia genética, sendo deferido pela CTNBio no EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.153/2020, com concessão de CQB 526/2020.

A metodologia utilizada para as etapas seguintes foi baseada nos protocolos estabelecidos anteriormente nos estudos de Pereira e colaboradores (2014), e Luiz e colaboradores (2018) e adaptada.

3.2 Coleta de sangue

A coleta do sangue foi realizada por um médico veterinário capacitado. O animal utilizado no presente estudo é da espécie *Lama glama*, jovem, macho, adulto, e está mantido sob as condições climáticas locais (Ceará), estabelecidos em condições *ad libitum*. O animal reside na Fazenda de Experimentação Agropecuária Dr. Esaú Accioly Vasconcelos, da Universidade Estadual do Ceará (UECE), localizada no município de Guaiúba. Foram coletados cerca de 40 mL de sangue do indivíduo em um tubo de coleta à vácuo contendo EDTA. Logo após a coleta, os tubos foram armazenados em um isopor contendo gelo e transportados para a sede da Fiocruz-Ceará.

3.3 Isolamento de linfócitos

A amostra transportada foi retirada do acondicionamento para que atingisse a

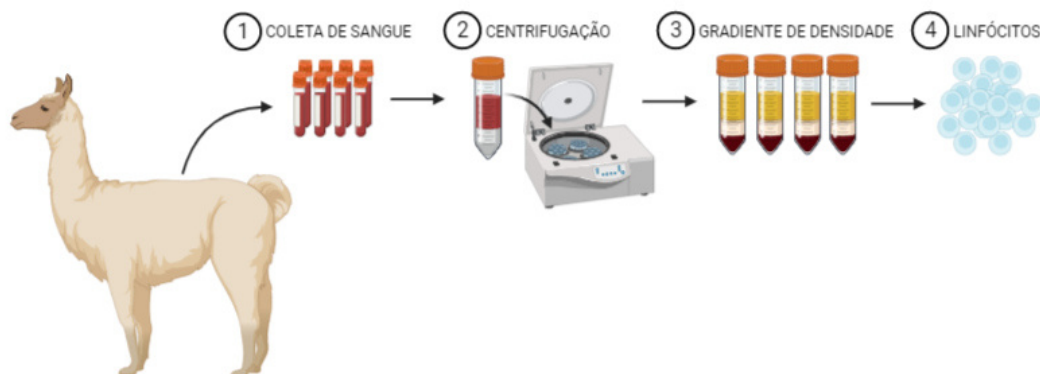
temperatura ambiente. Inicialmente, foi feita a diluição na proporção de 1:1 (v/v) em solução balanceadora (D-Glicose Anidra 0,1%; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $5,0 \times 10^{-5}$ M; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $9,8 \times 10^{-4}$ M; KCl $5,4 \times 10^{-3}$ M; Tris Base 0,145 M e NaCl 0,14 M; pH 7,6) e adicionada cuidadosamente em tubo tipo Falcon contendo *Ficoll-Paque PLUS*® (*Amersham Biosciences*, Reino Unido) na proporção de 3:4 (v/v). Os tubos foram centrifugados a 400 xg por 30 minutos a 20° C para obtenção do gradiente de densidade. Após a centrifugação, observou-se a separação da amostra em diferentes fases e a formação característica de um anel na interface média do gradiente de centrifugação, referente aos linfócitos.

O anel formado foi cuidadosamente recuperado e transferido para um novo tubo do tipo Falcon com solução balanceadora na proporção de 1:3 (v/v), que foi centrifugado a 100 xg por 10 minutos a 20° C. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado pelos linfócitos precipitados foi ressuspenso e solubilizado em 6 mL de solução balanceadora, seguido por uma nova centrifugação nas mesmas condições (100 xg por 10 minutos a 20° C). O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado formado foi ressuspenso e solubilizado em 1 mL de solução balanceadora. Uma alíquota dessa suspensão contendo os linfócitos isolados (Figura 4) foi retirada e diluída na proporção de 1:20 (v/v) em azul de tripan (0,1%) para contagem de células isoladas em microscópio óptico na objetiva de 40x, utilizando câmara de Neubauer, considerando a fórmula para determinação de número de células por mL mostrada a seguir:

$$\frac{\text{Número de células contadas} \times \text{Fator de diluição (20)} \times \text{Fator de correção da câmara (10}^4\text{)}}{\text{Número de quadrantes contados (4)}} = \text{Células / mL}$$

As células foram armazenadas em alíquotas de 250 µL dessa suspensão e 750 µL de TRIzol® (*Invitrogen*, EUA) em geladeira à 4° C para serem utilizadas na extração de RNA em até 24 horas, já as demais alíquotas que não foram utilizadas na etapa de extração de RNA, foram armazenadas a -30° C, podendo ficar armazenadas por até um ano.

Figura 4 - Fluxograma simplificado da metodologia de isolamento de linfócitos.



Fonte: Elaborado pela autora. O sangue do animal foi coletado e centrifugado para obtenção do gradiente de densidade. A partir do gradiente formado, o anel de linfócitos observado foi recuperado e as células foram isoladas.

3.4 Extração de RNA

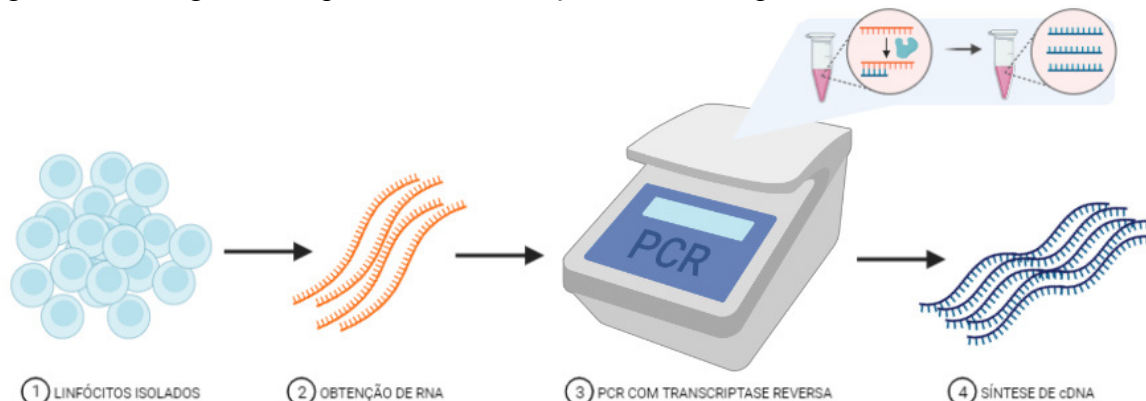
Para a extração do RNA total, a partir do sangue coletado anteriormente, foi realizada a lise celular dos linfócitos em suspensão. Inicialmente, a amostra contendo trizol e linfócitos foi retirada da geladeira à 4° C e, esperou-se cerca de 5 minutos para que a amostra atingisse a temperatura ambiente. Logo após, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e houve homogeneização suave por inversão durante 15 segundos. A amostra foi colocada em uma estante de suporte e esperou-se 3 minutos. Depois disso, o material foi centrifugado a 12.000 xg por 15 minutos à 4° C. A fase aquosa superior formada foi recuperada e cuidadosamente transferida para um novo tubo para o procedimento de precipitação do RNA total. Ao tubo foram adicionados 500 µL de isopropanol, que foi homogeneizado por inversão. O tubo foi colocado em uma estante de suporte e esperou-se 10 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 xg por 10 minutos à 4° C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido a lavagem com 1 mL de etanol a 75%, e subsequente centrifugação a 7500 xg por 5 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram invertidos em um ângulo de 45° para facilitar a evaporação de etanol residual. O precipitado foi solubilizado com 30 µL de água tratada DEPC (*Invitrogen*, EUA), incubado à 55° C por 15 minutos em banho-maria e armazenado em gelo. A concentração do RNA total foi estimada por leitura em espectrofotometria à 260 nm no NanoDrop One® (*ThermoFisher Scientific*) e em seguida o material foi armazenado em alíquotas de 5 µL a -80° C.

3.5 Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Assim, para a reação foi utilizado uma média de 4-5 µg de RNA total do indivíduo. O volume utilizado da amostra do animal foi calculado com base na concentração de RNA da amostra, aferida anteriormente.

Inicialmente, foi preparado um mix em tubos de 0,3 mL estéreis com 1 µL de 10 mM de dNTP mix, 1 µL de *Random Hexamers Primer* (50 ng/µL), q.s.p. 10 µL água tratada com DEPC. Um segundo mix foi preparado contendo 2 µL de *RT buffer* 10x, 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de *RNaseOUT* (40 UI/µL) e 1 µL de *SuperScript III RT* (200 UI/µL). Fora da cabine de PCR, o volume de amostra contendo 4-5 µg de RNA foi adicionado ao primeiro mix, que foi incubado por 5 minutos à 65 °C em termociclador automático *Agilent Technologies (SureCycler 8800)* e por 1 minuto em gelo. Em seguida o segundo mix foi adicionado ao primeiro e incubado por 10 minutos à 25° C, depois 50 minutos à 50° C e, por último, 5 minutos à 85° C, todas as etapas em termociclador automático *Agilent Technologies (SureCycler 8800)*. Logo após foi adicionado 1 µL de *RNase H* (2UI/µL) e a mistura foi incubada por 20 minutos à 37° C para degradação de RNA residual, resultando no cDNA obtido (Figura 5). O cDNA foi quantificado por leitura em espectrofotômetro à 260 nm *NanoDrop One® (ThermoFisher Scientific)*, diluído em água ultrapura para concentração final de estoque de 200 ng/µL e separado em alíquotas de 10 µL para armazenamento em freezer à -30° C. É válido ressaltar que cDNA obtido foi mantido em gelo até o momento do armazenamento para evitar degradação.

Figura 5 - Fluxograma simplificado da obtenção de cDNA a partir dos linfócitos isolados.



Fonte: Elaborado pela autora. Obtenção de RNA a partir dos linfócitos isolados, que foi utilizado para a síntese de cDNA por meio de reação de amplificação utilizando transcriptase reversa.

3.6 Amplificação da região variável do VHH

3.6.1 PCR I

O cDNA sintetizado foi submetido a PCR I (Reação em Cadeia da Polimerase I) na qual foram utilizados os *primers* específicos VH BACK A6 (5' GAT GTG CAG CTG CAG GCC TCT GG(A/G) GGA GG 3') e CH2 FOR TA4 (5' CGC CAT CAA GGT ACC AGT TGA 3'). Na PCR I ocorre a amplificação das regiões que codificam as sequências VH-CH1-CH2 dos anticorpos convencionais IgG₁, resultando em um fragmento de cerca de 900 pb, e VHH-CH2 dos anticorpos de cadeia pesada do camélídeos, IgG₂ e IgG₃, resultando em um amplicon de em média 600 pb. Para essa reação, dentro de uma cabine de fluxo laminar vertical para PCR, foi preparado um mix em tubos de 0,3 mL estéreis com 10 µL de 5x *TransStart FastPfu Fly Buffer*, 4 µL de dNTPs mix (10mM), 1 µL de cada *primer* VH BACK A6 (10mM) e CH2 FOR TA4 (10mM), 1 µL de *TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase* e q.s.p. 50 µL de água ultrapura. Fora da cabine de PCR foi adicionado aproximadamente 100 ng de DNA na reação, para isso, foi efetuada uma diluição a partir do estoque de cDNA para a concentração de 50 ng/µL, e assim, 2 µL foram adicionados ao mix. A reação foi realizada em termociclador automático *Agilent Technologies (SureCycler 8800)* com temperatura *hot start* de 95° C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 95° C por 20 segundos para desnaturação, 56° C por 20 segundos para anelamento e 72° C por 20 segundos para extensão, após os ciclos, a extensão final foi realizada na temperatura de 72° C por 5 minutos.

O produto de PCR I foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,2% preparado com 1,2 g de agarose (LGC Biotecnologia) e 100 mL de tampão TAE 1x (40 mM de Tris, 20 mM de ácido acético e 1 mM de EDTA). A solução foi aquecida por cerca de 80 segundos, com pausas a cada 15 e, quando ficou transparente, esperou-se esfriar um pouco para verter no molde e colocar o pente com os poços. Após solidificar, a cuba de eletroforese foi preenchida com TAE 1x até cobrir todo o gel e o pente foi cuidadosamente removido. Para o preparo da amostra, foi utilizado 10 µL de tampão de amostra 6x com *Diamond (New England Biolabs)* e 50 µL de amostra, sendo dividida em 2 poços, com aplicação de 30 µL em cada. A corrida ocorreu a 60 V e durou cerca de 1 hora 20 minutos. Após isso, o gel de agarose foi analisado com base no marcador de DNA de 1 kb LCG no *iBright™ FL1000 Imaging System (Thermo Fisher Scientific)*, onde foi possível observar a presença de 2 bandas. A banda referente ao fragmento de 600 pb amplificado, segmento de interesse, foi

excisado do gel com uso de um bisturi e purificado utilizando o *Cellco Agarose Gel Extraction Kit*, seguindo instruções do fabricante.

Para iniciar com a purificação, as bandas excisadas do gel foram pesadas e transferidas para tubos de 2 mL. Logo após, foi adicionado 3 volumes de *Extraction Buffer* para cada 1 volume de gel e incubado por 10 minutos à 60 °C no banho seco. Depois disso, foi adicionado 1 volume de isopropanol e foi misturado por inversão. Em seguida, foi montado o sistema contendo uma *Spin Column* dentro de um tubo coletor (ambos fornecidos pelo Kit) que inicialmente foi hidratada com 100 µL de água ultrapura e o sistema centrifugado a 10.000 xg por 30 segundos à 20° C. Após isso, foi adicionado 100 µL de *Activation Buffer* o sistema montado foi submetido a uma nova centrifugação nas mesmas condições. O resíduo líquido presente no tubo coletor foi descartado e foi adicionado 700 µL da amostra preparada anteriormente, seguindo para mais uma centrifugação nas mesmas condições. Novamente houve o descarte do *flow through*, e o restante da amostra foi adicionada à *Spin Column* para mais uma centrifugação sob os mesmos parâmetros. A coluna utilizada foi transferida para um tubo de 2 mL novo para prosseguir com a próxima etapa, onde foi adicionado 700 µL de *Washing Buffer* contendo etanol e em seguida o sistema foi mais uma vez centrifugado nas mesmas condições. Essa etapa foi repetida e uma centrifugação adicional foi realizada, a uma aceleração de 10.000 xg, 20° C e duração de 2 minutos, para remover *Washing Buffer* residual. Para a eluição, as colunas foram transferidas para novos tubos de 2 mL, onde foi adicionado 30 µL de água ultrapura a 60° C seguido por uma incubação de 1 min em temperatura ambiente e posterior centrifugação a 10.000 xg, 20° C e duração de 1 minuto. Por fim, a amostra foi quantificada no *NanoDrop One®* (*Thermofisher Scientific*) em leitura de espectrofotometria à 260 nm e armazenada em freezer à -30° C.

3.6.2 PCR II

O DNA purificado da PCR I foi submetido a PCR II onde foram utilizados os *primers* VH FOR 36_3 (5' GGA CTA GTT GCG GCC GCT GAG GAG ACG GTG ACC TG 3') e VH BACK A4 (5' GGA CTA GTT GCG GCC GCT GAG GAG ACG GTG ACC GTG ACC TG - 3'). Na PCR II ocorre a amplificação apenas da região VHH dos anticorpos de cadeia pesada dos camelídeos e também a inserção das sequências referentes aos sítios das endonucleases de restrição *Sfi-I* e *Not-I* (sublinhados), resultando em um amplicon de um pouco mais de 400 pb. Para essa reação, dentro de uma cabine de fluxo laminar vertical para PCR, foi preparado um mix em tubos de 0,3 mL estéreis com 10 µL de 5x *TransStart FastPfu*

Fly Buffer, 4 μL de dNTPs mix (10 mM), 1 μL de cada *primer* VH FOR 36_3 (10mM) e VH BACK A4 (10mM), 1 μL de *TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase* e q.s.p. 50 μL de água ultrapura. Fora da cabine de PCR foi adicionado aproximadamente 60 ng de DNA na reação, o volume a ser adicionado foi calculado a partir da concentração do produto de PCR I quantificado anteriormente. O tubo foi colocado em termociclador automático *Agilent Technologies (SureCycler 8800)* e a reação foi realizada com temperatura *hot start* de 95° C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 95° C por 20 segundos para desnaturação, 45° C por 20 segundos para anelamento e 72° C por 6 segundos para extensão, além de 72° C por 5 minutos para extensão final.

Os fragmentos amplificados na PCR II foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% preparado com 1,2 g de agarose (LGC Biotecnologia) e 100 mL de tampão TAE 1x (40 mM de Tris, 20 mM de ácido acético e 1 mM de EDTA), preparado de forma idêntica ao gel da PCR I. Para o preparo das amostras, foi adicionado 10 μL de Tampão de amostra 6x com *Diamond (New England Biolabs)* ao tubo de PCR, totalizando 60 μL que foram aplicados em dois poços de 30 μL . A corrida ocorreu à 60 V e durou cerca de 1 hora e meia. Após isso, o gel de agarose foi analisado com base no marcador de DNA de 100 pb (*Sinapse inc.*) no *iBright™ FL1000 Imaging System (Thermo Fisher Scientific)*, onde foi possível observar a presença da banda de pouco mais que 400 pb referente a amplificação do repertório gênico de VHH do camélídeos. A banda de interesse foi excisada do gel com uso de um bisturi e purificada utilizando o *Cellco Agarose Gel Extraction Kit*, seguindo instruções do fabricante, assim como na PCR I. A amostra foi quantificada por espectrofotometria à 260 nm no *NanoDrop One® (ThermoFisher Scientific)* e armazenada em freezer à -30 °C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Processamento de amostra

Inicialmente, foi realizado o isolamento de linfócitos a partir da amostra de sangue referente ao indivíduo utilizando *Ficoll-Paque PLUS®*. Após essa etapa, a suspensão com células do animal foi quantificada utilizando a câmara de Neubauer, apresentando uma concentração de $6,0 \times 10^7$ células/mL, e diluída para de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ células/mL a fim de seguir as próximas etapas. O isolamento de linfócitos periféricos por meio do gradiente de centrifugação utilizando *Ficoll-Paque PLUS®* é observado em vários

outros estudos (LUIZ, 2014; MONEGAL *et al.*, 2009; SABIR *et al.*, 2014). No estudo de Luiz (2014) foram obtidos $1,5 \times 10^7$ linfócitos/mL de um único animal da espécie *Lama glama*, semelhante ao que foi observado neste trabalho. De acordo com Muyldermans (2021), é esperado que a partir de 1 mL de sangue, sejam isolados 10^6 linfócitos. Assim, os resultados de isolamento de linfócitos a partir do sangue do animal se mostraram positivos.

Seguindo a metodologia do estudo, o RNA total obtido a partir dos linfócitos isolados foi quantificado por espectrofotometria à 260 nm no *NanoDrop One*® (*ThermoFisher Scientific*) e os resultados são apresentados abaixo (Tabela 1). Após isso, cerca de 4-5 µg de RNA total foram utilizados para a síntese do cDNA, de acordo com as instruções do fabricante. As quantificações do material também foram estimadas utilizando *NanoDrop One*® (*ThermoFisher Scientific*), e os dados obtidos são apresentados abaixo (Tabela 1). O cDNA sintetizado foi diluído a concentração de 50 ng/µL e submetido a duas PCRs em sequência.

Tabela 1 - Resultados obtidos a partir da quantificação das amostras de RNA e cDNA por espectrofotometria à 260 nm no *NanoDrop One*® (*ThermoFisher Scientific*).

AMOSTRAS	LEITURAS	
	Concentração	260/280 nm
RNA	444,2 ng/µL	2,07
cDNA	808,8 ng/µL	1,83

Fonte: elaborado pela autora.

Segundo Desjardins e Conklin (2010), a razão apresentada entre as leituras de 260/280 nm deve ser em torno de 2.0 para amostras de RNA, indicando um maior grau de pureza da amostra e uma menor presença de contaminantes que absorvam fortemente 280 nm. Para DNA, a razão entre 260/280 nm deve ser mais próxima de 1.8 indicando maior pureza (DESJARDINS e CONKLIN, 2010). Diante disso, o material obtido apresenta grau de pureza satisfatório.

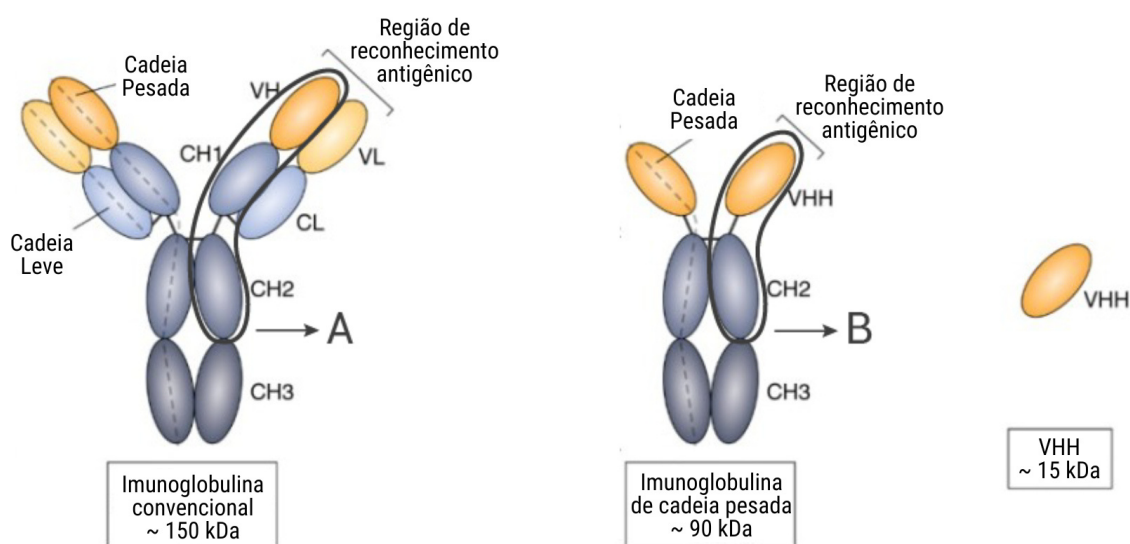
No trabalho de Sabir e colaboradores (2014), a extração de RNA foi realizada através de outra metodologia utilizando o *QIAamp1 RNA blood extraction mini kit* (*Qiagen*, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Já no estudo de Monegal e colaboradores (2009), o RNA foi isolado por meio do *Nucleospin RNA II kit* (*Macherey Nagel*, Alemanha). A quantificação estimada do RNA obtido por meio desses métodos não é

especificada nos trabalhos.

4.2 PCR I

Na PCR I ocorreu a amplificação de dois fragmentos distintos (Figura 6), gerando assim, duas bandas em cada amostra, que foram analisadas com base no marcador de 1 kb (*LGC Ladder*). A primeira banda corresponde a um fragmento de aproximadamente 900 pb, referente a amplificação da região VH-CH1-CH2 do anticorpo convencional (IgG₁). A segunda banda corresponde a um fragmento com cerca de 600 pb referente à região VHH-CH2 de anticorpos de cadeia pesada de camélídeos (IgG₂ e IgG₃).

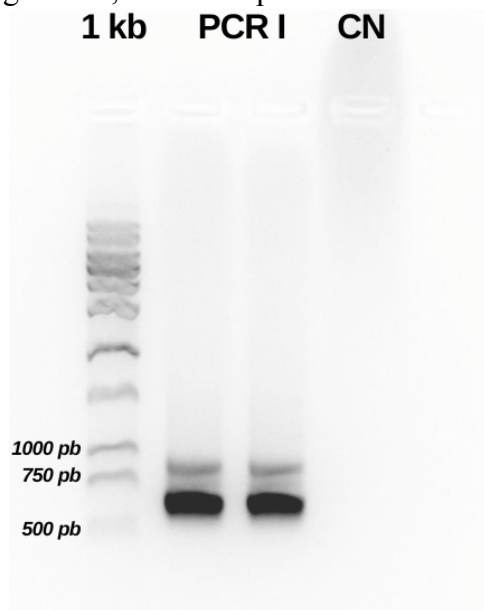
Figura 6 - Representação esquemática das regiões amplificadas na PCR I.



Fonte: adaptado de CHELOHA *et al.* (2020). A: fragmento CH2-CH1-VH de anticorpos convencionais. B: fragmento CH2-VHH dos anticorpos de cadeia pesada.

Os resultados observados por meio da eletroforese em gel de agarose 1,2% do produto da PCR I são apresentados a seguir (Figura 7).

Figura 7 - Gel de eletroforese em agarose 1,2% com o produto da PCR I.



Fonte: Elaborado pela autora. Gel com produto da PCR I onde há amplificação da região VH-CH1-CH2 (900 pb) e VHH-CH2 (600 pb) dos anticorpos de *Lama glama*. CN: controle negativo.

A metodologia de duas PCRs sequenciais é observada em muitos trabalhos (GHAHROUDI *et al.*, 1997; PEREIRA *et al.*, 2013; LUIZ *et al.*, 2018). Isso se dá, por conta da alta similaridade entre as regiões FR, principalmente a FR4, da região VHH dos anticorpos de cadeia pesada (IgG₂ e IgG₃) e da região VH dos anticorpos convencionais (IgG₁) (VU *et al.*, 1997). Assim, uma PCR que amplifica o domínio VHH diretamente do cDNA, apresenta uma alta probabilidade de também amplificar o domínio VH (KASTELIC *et al.*, 2009). Metodologias padronizadas para a amplificação do repertório gênico de VHH foram desenvolvidas a fim de evitar contaminação com VH. Dessa forma, após o isolamento do RNA e a síntese do cDNA, duas PCR sucessivas são realizadas. A primeira possibilita a distinção entre VH e VHH com base nos amplicons formados (aproximadamente 900 pb e 600 pb, respectivamente). Os menores amplicons, que codificam os VHHs, são submetidos a uma segunda PCR, onde os oligonucleotídeos iniciadores se anelam às regiões FR1 e FR4, amplificando apenas a porção VHH (KASTELIC *et al.*, 2009).

Assim, as bandas de 600 pb observadas no gel de eletroforese foram excisadas, purificadas e quantificadas. Os resultados da quantificação estão expostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados obtidos a partir da quantificação do produto de PCR I por espectrofotometria à 260 nm no *NanoDrop One*® (*ThermoFisher Scientific*).

AMOSTRA	LEITURAS	
	Concentração	260/280 nm
PCR I	30,8 ng/μL	1,83

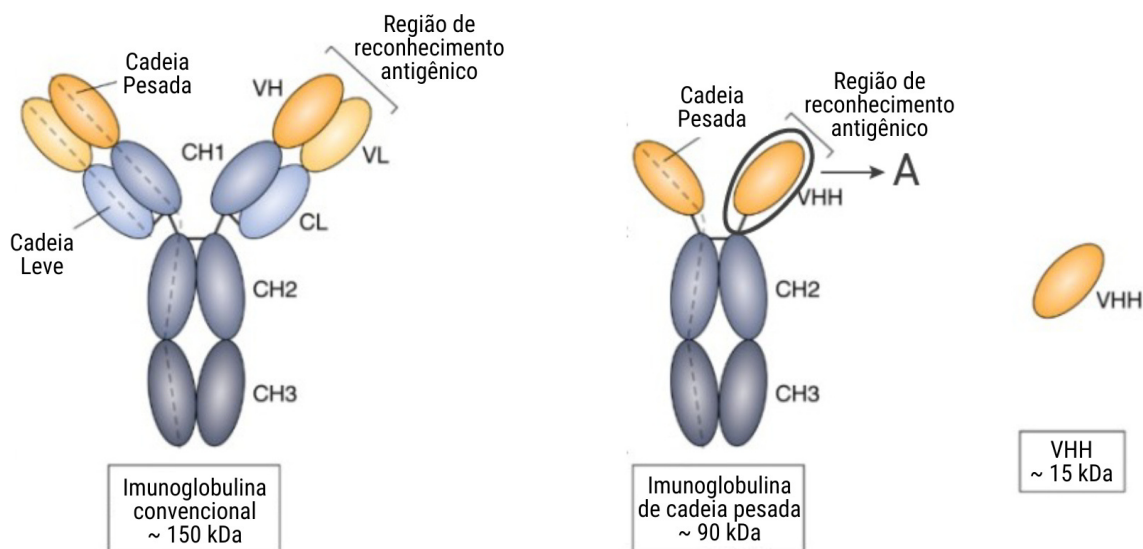
Fonte: elaborado pela autora.

É válido ressaltar que ambos os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos fragmentos referentes a PCR I (VH BACK A6 e CH2 FOR TA4) são vistos em trabalhos que abordam a construção de bibliotecas *naive* (SABIR *et al.*, 2014) e de bibliotecas imunes (GHAHROUDI *et al.*, 1997; LUIZ *et al.*, 2018) de nanocorpos de camelídeos.

4.3 PCR II

Na PCR II ocorreu a amplificação da porção VHH dos anticorpos de cadeia pesada IgG₂ e IgG₃ (Figura 8) e a adição das sequências dos sítios de restrição das endonucleases *Sfi-I* e *Not-I* nas regiões 5' e 3' das sequências de VHH por meio dos oligonucleotídeos iniciadores, totalizando amplicons de aproximadamente 400 pb.

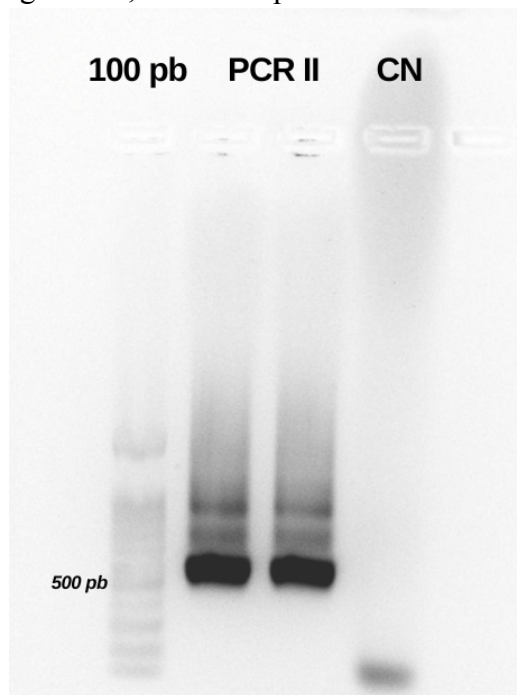
Figura 8 - Representação esquemática da região amplificada na PCR II.



Fonte: adaptado de CHELOHA *et al.* (2020). A: fragmento VHH de anticorpos de cadeia pesada amplificado na PCR II.

Os resultados observados por meio da eletroforese em gel de agarose 1,2% do produto da PCR II são apresentados a seguir (Figura 9).

Figura 9 - Gel de eletroforese em agarose 1,2% com o produto da PCR II.



Fonte: Elaborado pela autora. Gel com produto da PCR II onde há amplificação da região VHH e adição de sítios das endonucleases *Sfi*-I e *Not*-I. CN: controle negativo.

Após a eletroforese, as bandas referentes aos fragmentos de aproximadamente 400 pb foram excisadas do gel, purificadas e quantificadas. A divergência no tamanho do fragmento pode estar relacionada com o uso de *Diamond*, usado em alternativa ao brometo de etídio para permitir a visualização do fragmento de DNA amplificado. O resultado das quantificações é apresentado na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3 - Resultados obtidos a partir da quantificação do produto de PCR II por espectrofotometria à 260 nm no *NanoDrop One*® (*ThermoFisher Scientific*).

AMOSTRA	LEITURAS	
	Concentração	260/280 nm
PCR II	39,1 ng/μL	1,67

Fonte: elaborado pela autora.

Nessa perspectiva, no trabalho de Luiz (2018), são utilizados os *primers* VH BACK A4, assim como o presente estudo, e uma variação do VH FOR 36_3, gerando um padrão de amplificação semelhante. Ademais, tal estudo se utiliza das sequências referentes aos sítios de restrição das enzimas *Sfi-I* e *Not-I* para promover digestão com as endonucleases, ligação em um vetor fagomídeo e posterior construção de uma biblioteca com base na tecnologia de *Phage display*. Isso comprova a possibilidade de utilizar o repertório gênico de VHH de *Lama glama* desenvolvido no presente trabalho para a construção de uma biblioteca *naive* de nanocorpos de camelídeos.

Apesar de bibliotecas imunes de nanocorpos de camelídeos contemplarem a maior parte dos estudos nesse campo, a expressão e a seleção de clones a partir de bibliotecas *naive* vem sendo proposto como uma alternativa (GHAHROUDI *et al.*, 1997; GOLDMAN, 2006; VERHEESEN, 2006). Isso se dá pela possibilidade de identificação de ligantes para inúmeros antígenos distintos devido a alta diversidade característica dessa ferramenta (GHAHROUDI *et al.*, 1997). O estudo de Sabir e colaboradores (2014) apresenta a vasta diversidade observada em uma biblioteca *naive* construída a partir de indivíduos da espécie *Lama glama* não imunizados por meio do sequenciamento e alinhamento de clones selecionados. Já o estudo de Muyldermans e colaboradores (2009) demonstrou que nanocorpos recuperados a partir de uma biblioteca *naive* apresentaram afinidade comparável a de clones recuperados de uma biblioteca de anticorpos monoclonais.

Diante do que foi exposto no presente trabalho, o material resultante da amplificação do repertório gênico certamente será utilizado para a construção de uma biblioteca *naive* de nanocorpos de camelídeos, uma estratégia para prospecção de nanocorpos capazes de reconhecer alvos moleculares de patógenos de relevância para a saúde pública (MONEGAL *et al.*, 2019; KOLKMAN E LAW, 2010;). Segundo o estudo de Sabir e colaboradores (2014), a construção de uma biblioteca *naive* de nanocorpos de camelídeos é possível em menor tempo e com menos recursos financeiros, quando comparada a uma biblioteca imune. Assim, esse trabalho tem como perspectivas desenvolver as etapas de digestão do repertório de VHH e do vetor fagomídeo pHEN-2 com as endonucleases de restrição (*Not-I* e *Sfi-I*), ligação do inserto ao vetor para obtenção do DNA recombinante e transformação do material recombinado em *Escherichia coli* cepa XL-Blue elerocompetente para construção da biblioteca *naive*.

Atualmente, a busca por alternativas que superem ou contornem as limitações ainda presentes no desenvolvimento e na aplicação de anticorpos é crescente (LUIZ, 2014). Assim, os nanocorpos de camelídeos são uma ferramenta com enorme potencial de suprir

necessidades existentes em diversos âmbitos farmacêuticos e biotecnológicos (CORTEZ-RETAMOZO *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2007; HARMSEN; HAARD, 2007).

5 CONCLUSÃO

Por meio da realização do presente trabalho foi possível ampliar o repertório gênico de VHH a partir do cDNA obtido após extração de RNA total de linfócitos periféricos isolados do indivíduo da espécie *Lama glama*. Como perspectiva, o material purificado será usado para a construção de biblioteca *naive*, após digestão com as endonucleases de restrição *Not-I* e *Sfi-I*. A biblioteca *naive* será ferramenta estratégica da Plataforma de Desenvolvimento de Nanocorpos e Insumos relacionados (PlatnAb) da Fiocruz-Ceará para seleção de nanocorpos contra diferentes alvos moleculares importantes em doenças humanas e de interesse agropecuário. Especialmente para alvos cuja obtenção de proteína recombinante para imunização do animal em quantidade e pureza suficientes seja fator limitante, impossibilitando a construção de biblioteca imune. Ademais, a biblioteca *naive* também será essencial na obtenção de VHHs para antígenos tóxicos aos animais, ou antígenos não imunogênicos.

REFERÊNCIAS

- ALMAGRO, Juan C. *et al.* Phage Display Libraries for Antibody Therapeutic Discovery and Development. **Antibodies**, [S.l.], v. 8, n. 3, p. 44, 23 ago. 2019. MDPI AG. DOI: 10.3390/antib8030044.
- ALVARENGA, Larissa *et al.* Engineering Venom's Toxin-Neutralizing Antibody Fragments and Its Therapeutic Potential. **Toxins**, [S.l.], v. 6, n. 8, p. 2541-2567, 21 ago. 2014. MDPI AG. DOI: 10.3390/toxins6082541.
- ARAÚJO, Thaise Gonçalves de. Construção de uma biblioteca de anticorpos recombinantes (FAB) anti-carcinoma mamário e obtenção de fragmentos ligantes de antígenos tumorais por phage display. 2009. 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.
- BANNAS, Peter *et al.* Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. **Frontiers In Immunology**, [S.l.], v. 8, p. 1-13, 22 nov. 2017. Frontiers Media SA. DOI 10.3389/fimmu.2017.01603.
- CHELOHA, Ross W. *et al.* Exploring cellular biochemistry with nanobodies. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 295, n. 45, p. 15307-15327, nov. 2020. Elsevier BV. DOI: 10.1074/jbc.rev120.012960.
- CORTEZ-RETAMOZO, Virna *et al.* Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. **International Journal Of Cancer**, [S.l.], v. 98, n. 3, p. 456-462, 7 mar. 2002. Wiley. DOI: 10.1002/ijc.10212.
- DESJARDINS, Philippe *et al.* NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. **Journal Of Visualized Experiments**, [S.l.], n. -1, p. 1-5, 22 nov. 2010. MyJove Corporation. DOI: 10.3791/2565.
- 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. 2009. Wiley. DOI: 10.1110/ps.34602.
- EWERT, Stefan *et al.* Biophysical Properties of Camelid VHH Domains Compared to Those of Human VH3 Domains. **Biochemistry**, [S.l.], v. 41, n. 11, p. 3628-3636, 19 fev. 2002. American Chemical Society (ACS). DOI: 10.1021/bi011239a.
- FERNANDES, Carla F. C. *et al.* Camelid Single-Domain Antibodies As an Alternative to Overcome Challenges Related to the Prevention, Detection, and Control of Neglected Tropical Diseases. **Frontiers In Immunology**, [S.l.], v. 8, p. 1-8, 9 jun. 2017. Frontiers Media SA. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00653.
- FERNANDES, Carla F.C. *et al.* Engineering of single-domain antibodies for next-generation snakebite antivenoms. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 185, p. 240-250, ago. 2021. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.043.

GENST, Erwin de *et al.* Antibody repertoire development in camelids. **Developmental & Comparative Immunology**, [S.l.], v. 30, n. 1-2, p. 187-198, jan. 2006. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.dci.2005.06.010.

GHAHROUDI, M Arbabi *et al.* Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. **Febs Letters**, [S.l.], v. 414, n. 3, p. 521-526, 15 set. 1997. Wiley. DOI: 10.1016/s0014-5793(97)01062-4.

GOLDMAN, Ellen R. *et al.* Facile Generation of Heat-Stable Antiviral and Antitoxin Single Domain Antibodies from a Semisynthetic Llama Library. **Analytical Chemistry**, [S.l.], v. 78, n. 24, p. 8245-8255, 9 nov. 2006. American Chemical Society (ACS). DOI: 10.1021/ac0610053.

HAARD, Hans J. de *et al.* A Large Non-immunized Human Fab Fragment Phage Library That Permits Rapid Isolation and Kinetic Analysis of High Affinity Antibodies. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 274, n. 26, p. 18218-18230, jun. 1999. Elsevier BV. DOI: 10.1074/jbc.274.26.18218.

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.

HARMSSEN, M. M. *et al.* Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.l.], v. 72, n. 3, p. 544-551, 1 fev. 2006. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1007/s00253-005-0300-7.

HARMSSEN, M. M.; HAARD, H. J. de. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.l.], v. 77, n. 1, p. 13-22, 18 ago. 2007. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1007/s00253-007-1142-2.

HARRISON, R.A. *et al.* Neutralisation of venom-induced haemorrhage by IgG from camels and llamas immunised with viper venom and also by endogenous, non-IgG components in camelid sera. **Toxicon**, [S.l.], v. 47, n. 3, p. 364-368, mar. 2006. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.10.017.

HOLLIFIELD, Alyssa L *et al.* Caplacizumab: an anti-von willebrand factor antibody for the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. **American Journal Of Health-System Pharmacy**, [S.l.], v. 77, n. 15, p. 1201-1207, 26 jun. 2020. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1093/ajhp/zxaa151.

HOOGENBOOM, Hennie R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. **Nature Biotechnology**, [S.l.], v. 23, n. 9, p. 1105-1116, set. 2005. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1038/nbt1126.

HUTT, Meike *et al.* Plasma Half-life Extension of Small Recombinant Antibodies by Fusion to Immunoglobulin-binding Domains. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 287, n. 7, p. 4462-4469, fev. 2012. Elsevier BV. DOI: 10.1074/jbc.m111.311522.

KASTELIC, Damjana *et al.* A single-step procedure of recombinant library construction for the selection of efficiently produced llama VH binders directed against cancer markers. **Journal Of Immunological Methods**, [S.l.], v. 350, n. 1-2, p. 54-62, out. 2009. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.jim.2009.08.016.

KOLKMAN, Joost A.; LAW, Debbie A.. Nanobodies – from llamas to therapeutic proteins. **Drug Discovery Today: Technologies**, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 139-146, jun. 2010. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.ddtec.2010.03.002.

LEE, Hyun Tae *et al.* High-resolution structure of the vWF A1 domain in complex with caplacizumab, the first nanobody-based medicine for treating acquired TTP. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.l.], v. 567, p. 49-55, ago. 2021. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.06.030.

LUIZ, Marcos Barros. Produção e caracterização parcial de nanocorpos ativos contra Crotoxina: uma neurotoxina da serpente *Crotalus durissus terrificus*. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental (PGBIOEXP), Fundação Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Porto Velho, 2014.

LUIZ, Marcos *et al.* Camelid Single-Domain Antibodies (VHHs) against Crotoxin: a basis for developing modular building blocks for the enhancement of treatment or diagnosis of crotalic envenoming. **Toxins**, [S.l.], v. 10, n. 4, p. 142, 29 mar. 2018. MDPI AG. DOI: 10.3390/toxins10040142.

LUIZ, Marcos Barros. Anticorpos de domínio único, do tipo VHH, contra crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terreficus*: ferramentas biotecnológicas para o diagnóstico ou tratamento do envenenamento crotálico. 2018. 132f. Tese (Doutorado em Biologia Experimental) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental (PGBIOEXP), Fundação Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Porto Velho, 2018.

MONEGAL, Ana *et al.* Immunological applications of single-domain llama recombinant antibodies isolated from a naïve library. **Protein Engineering, Design And Selection**, [S.l.], v. 22, n. 4, p. 273-280, 4 fev. 2009. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1093/protein/gzp002.

MUYLDERMANS, S. *et al.* Camelid immunoglobulins and nanobody technology. **Veterinary Immunology And Immunopathology**, [S.l.], v. 128, n. 1-3, p. 178-183, mar. 2009. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.vetimm.2008.10.299.

MUYLDERMANS, S. 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.

MUYLDERMANS, Serge. A guide to: generation and design of nanobodies. **The Febs Journal**, [S.l.], v. 288, n. 7, p. 2084-2102, 28 ago. 2020. Wiley. DOI: 10.1111/febs.15515.

PALANQUES-PASTOR, Tomás *et al.* Effectiveness of Caplacizumab Nanobody in Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Refractory to Conventional Treatment. **Acta**

Haematologica, [S.l.], v. 145, n. 1, p. 72-77, 5 ago. 2021. S. Karger AG. DOI: 10.1159/000517813.

PEREIRA, Soraya dos Santos. Seleção e caracterização de Nanocorpos de Camelídeos contra o antígeno recombinante do segmento-S de Hantavírus, cepa Araucária. 2013. 96f. Tese (Doutorado em Biologia Experimental) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental (PGBIOEXP), Fundação Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Porto Velho, 2013.

PEREIRA, Soraya S. *et al.* Novel Camelid Antibody Fragments Targeting Recombinant Nucleoprotein of Araucaria hantavirus: a prototype for an early diagnosis of hantavirus pulmonary syndrome. **Plos One**, [S.l.], v. 9, n. 9, p. 1-11, 22 set. 2014. Public Library of Science (PLoS). DOI: 10.1371/journal.pone.0108067.

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.

PEYVANDI, Flora *et al.* Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. **New England Journal Of Medicine**, [S.l.], v. 374, n. 6, p. 511-522, 11 fev. 2016. Massachusetts Medical Society. DOI: 10.1056/nejmoa1505533.

PINHEIRO, Ana Catarina Almeida. Revisão sistemática sobre o papel do caplacizumab no tratamento da púrpura trombocitopénica trombótica. 2021. 31 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP), Universidade do Porto, Porto, 2021.

PRADO, Nidiane D. R. *et al.* Inhibition of the Myotoxicity Induced by Bothrops jararacussu Venom and Isolated Phospholipases A2 by Specific Camelid Single-Domain Antibody Fragments. **Plos One**, [S.l.], v. 11, n. 3, p. 1-22, 30 mar. 2016. Public Library of Science (PLoS). DOI: 10.1371/journal.pone.0151363.

RICHARD, Gabrielle *et al.* In Vivo Neutralization of α -Cobratoxin with High-Affinity Llama Single-Domain Antibodies (VHHs) and a VHH-Fc Antibody. **Plos One**, [S.l.], v. 8, n. 7, p. 1-14, 22 jul. 2013. Public Library of Science (PLoS). DOI: 10.1371/journal.pone.0069495.

ROSSOTTI, Martin A. *et al.* Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies. **The Febs Journal**, [S.l.], v. 289, n. 14, p. 4304-4327, 25 mar. 2021. Wiley. DOI: 10.1111/febs.15809.

SABIR, Jamal S.M. *et al.* Construction of naïve camelids VHH repertoire in phage display-based library. **Comptes Rendus Biologies**, [S.l.], v. 337, n. 4, p. 244-249, abr. 2014. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.crvi.2014.02.004.

SAERENS, D; GHASSABEH, G; MUYLDERMANS, S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. **Current Opinion In Pharmacology**, [S.l.], v. 8, n. 5, p. 600-608, out. 2008. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.coph.2008.07.006.

SOUZA, Guilherme Rocha Lino de. Construção de uma biblioteca de anticorpos (scFv) apresentada em fagos para seleção, análise e caracterização de antígenos do carrapato bovino

(*Boophilus microplus*). 2007. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

SOUZA, Marlene Teixeira de; BRÍGIDO, Marcelo de Macedo; MARANHÃO, Andréia Queiroz. **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**. 2. ed. Brasília: Unb, 2016.

STEWART, Christine S. *et al.* Isolation, characterization and pentamerization of α -cobrotoxin specific single-domain antibodies from a naïve phage display library: preliminary findings for antivenom development. **Toxicon**, [S.l.], v. 49, n. 5, p. 699-709, abr. 2007. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.11.023.

VERHEESEN, Peter *et al.* Reliable and controllable antibody fragment selections from Camelid non-immune libraries for target validation. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Proteins And Proteomics**, [S.l.], v. 1764, n. 8, p. 1307-1319, ago. 2006. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.bbapap.2006.05.011.

VINCKE, Cécile *et al.* General Strategy to Humanize a Camelid Single-domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 284, n. 5, p. 3273-3284, jan. 2009. Elsevier BV. DOI: 10.1074/jbc.m806889200.

VINCKE, Cécile; MUYLDERMANS, Serge. Introduction to Heavy Chain Antibodies and Derived Nanobodies. **Single Domain Antibodies**, [S.l.], p. 15-26, 2012. Humana Press. DOI: 10.1007/978-1-61779-968-6_2.

VU, Khoa Bang *et al.* Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. **Molecular Immunology**, [S.l.], v. 34, n. 16-17, p. 1121-1131, nov. 1997. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0161-5890(97)00146-6.

XU, Jianliang *et al.* Nanobodies from camelid mice and llamas neutralize SARS-CoV-2 variants. **Nature**, [S.l.], v. 595, n. 7866, p. 278-282, 7 jun. 2021. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1038/s41586-021-03676-z.