

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTIINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

ANÁLISE DO USO DE *Bacillus subtilis* COMO HOSPEDEIRO PARA EXPRESSÃO
DE VHH ANTI-FOSFOLIPASE DE *Bothrops jararacussu*

CAIO COUTINHO DE SOUZA

MANAUS

2022

CAIO COUTINHO DE SOUZA

**ANÁLISE DO USO DE *Bacillus subtilis* COMO HOSPEDEIRO PARA EXPRESSÃO
DE VHH ANTI-FOSFOLIPASE DE *Bothrops jararacussu***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção de título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Luis André Morais Mariúba, PhD

MANAUS

2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729a Souza, Caio Coutinho de
Análise do uso de Bacillus subtilis como hospedeiro para
expressão de VHH anti-fosfolipase de Bothrops jararacussu / Caio
Coutinho de Souza . 2022
98 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Luis André Morais Mariúba
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Bacillus subtilis KO7. 2. Vetor fagomídeo. 3. VHH-Homodímero
Variável de Cadeia Pesada . 4. Bothrops jararacussu. 5.
Fosfolipase. I. Mariúba, Luis André Morais. II. Universidade Federal
do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda minha família, especialmente a minha mãe, Prof^a Clícia Paula Coutinho, que está obrigatoriamente na frente de todos os meus objetivos e é o maior motivo das minhas lutas diárias. Afinal, se durante a minha vida eu não ajudar e orgulhar aqueles que eu tanto amo, então de nada valerá minha existência neste mundo...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela força diária. Embora minha fé seja medíocre, sei que o senhor estas comigo por onde quer que eu ande.

Ao meu pai, seu Valdoaldo Melo de Souza, um grande carpinteiro do Município de Novo Aripuanã-AM que sempre sonhou com dias melhores, mesmo em meio a tanta dificuldade. Agradeço imensamente a minha mãe, Dona Clícia Paula Coutinho, que nunca deixou de acreditar e apoiar seus filhos e é um poço de amor incondicional. E aos meus irmãos Karem Coutinho e Cássio Coutinho, obrigado pela torcida! Amo todos!

Ao meu orientador, Dr. André Mariúba, obrigado pela atenção, preocupação, paciência e ensinamentos diários. Sou muito honrado e grato por fazer parte do seu grupo de pesquisa e espero um dia ser tão paciente e assertivo quanto o senhor. Obrigado pela incontável ajuda no andamento do nosso projeto, o senhor é a minha maior referência na pesquisa!

Ao meu ex-coorientador de iniciação científica do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, o Dr. Bruno Bezerra Jensen, um grande amigo e primeira inspiração na ciência.

A Maria Edilene Martins, uma grande amiga que o mestrado me proporcionou. Admiro-lhe por ser uma boa mãe e por demonstrar sabedoria nas horas necessárias. Obrigado por compartilhar comigo seus conhecimentos de vida!

As minhas colegas de laboratório, Késsia Caroline, Juliane Corrêa, Daniele Mota, Fernanda Batalha e Adélia. Saibam que todas possuem parcelas no meu aprendizado e crescimento profissional.

A Universidade Federal do Amazonas, responsável pela minha formação como licenciado em Ciências Biológicas. Local onde vivenciei uma das épocas de maior aprendizado de toda minha vida.

Ao programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade de ingresso e conclusão do curso de mestrado.

Ao instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/FIOCRUZ-AM por toda a estrutura, apoio técnico e materiais fornecidos para a concretização deste projeto de pesquisa.

Ao instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/FIOCRUZ-RO pela parceria e fornecimento do plasmídeo pHEN1, dos antígenos e outros suportes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da minha bolsa de estudo.

E a todos que de alguma forma me incentivaram e contribuíram para o meu desenvolvimento como aspirante a pesquisador, desde meus tempos de Iniciação Científica no INPA, até os meus dias atuais na Fiocruz-Amazônia. Obrigado de verdade!

“Podia se ver ao longe um grande resplendor, onde havia desaparecido a figura de um grande guerreiro, seu nome era Vegeta, o príncipe dos Sayajins, que foi extremamente orgulhoso.”

(O sacrifício de Vegeta-Dragon Ball Z).

RESUMO

Os Homodímeros Variáveis de Cadeia Pesada (VHHs), também chamados de nanocorpos de camelídeos, são fragmentos de anticorpos IgG incomuns e exclusivos de animais da família camelidae, que atingem alta afinidade e especificidade de ligação ao antígeno. Atualmente são agentes potenciais para aplicações no tratamento ou diagnóstico em casos de acidentes ofídicos. Diferentes hospedeiros já produziram nanocorpos recombinantes, porém ainda há desafios nesta produção que precisam ser superados. Visando contornar estes problemas, exploramos o uso de *Bacillus subtilis* para a expressão de VHHs. No capítulo I desta dissertação apresentamos um artigo de revisão que inicialmente levantou os principais estudos que justificam a escolha de *B. subtilis* na pesquisa e nas indústrias. Correlacionamos às características deste hospedeiro atreladas às variadas estratégias de engenharia genética para produzir biomoléculas de forma eficiente e econômica. O capítulo II aborda os resultados decorrentes da utilização de *B. subtilis* cepa KO7 como hospedeiro para produzir um VHH anti-fosfolipase. O *B. subtilis* KO7 foi transformado com o plasmídeo pHEN1 e foi feita a posterior indução da expressão da proteína, a confirmação da expressão foi realizada pela técnica de *western-blot* e a funcionalidade da proteína foi avaliada via ensaio de citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que a transformação utilizando o vetor pHEN1 foi eficiente e as induções utilizando o indutor IPTG ou a lactose foram satisfatórias. A proteína VHH foi expressa na porção solúvel do lisado bacteriano apresentando uma massa molecular de aproximadamente 11 KDa. Observou-se um alto reconhecimento do VHH anti-fosfolipase contra as proteínas miotóxicas Bothropstoxina I (BthTX-I) e Bothropstoxina II (BthTX-II) de *Bothrops jararacussu*, constatando que *B. subtilis* KO7 é um potencial hospedeiro para produzir VHHs solúveis e com sua funcionalidade preservada para posterior uso clínico.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis* KO7; vetor fagomídeo; VHH; *Bothrops jararacussu*; fosfolipase; proteínas recombinantes.

ABSTRACT

The Variables Heavy-chain Homodimers (VHHs), also called camelid nanobodies, are unusual and unique IgG antibody fragments from animals of the camelid family, which achieve high antigen-binding affinity and specificity. Currently, they are potential agents for applications in the treatment or diagnosis of snakebites. Different hosts have already produced recombinant nanobodies, but there are still challenges in this production that need to be overcome. In order to overcome these problems, we explored the use of *Bacillus subtilis* for the expression of VHHs. In chapter I of this dissertation we present a review article that initially raised the main studies that justify the choice of *B. subtilis* in research and industries. We correlated the characteristics of this host linked to the various genetic engineering strategies to produce biomolecules efficiently and economically. Chapter II discusses the results resulting from the use of *B. subtilis* strain KO7 as a host to produce an anti-phospholipase VHH. The *B. subtilis* KO7 was transformed with plasmid pHEN1 and subsequent induction of protein expression was carried out, confirmation of expression was performed by the western-blot technique and protein functionality was evaluated via flow cytometry assay. The results showed that the transformation using the pHEN1 vector was efficient and the inductions using the IPTG inducer or lactose were satisfactory. The VHH protein was expressed in the soluble portion of the bacterial lysate with a molecular mass of approximately 11 kDa. There was a high recognition of anti-phospholipase VHH against the myotoxic proteins Bothropstoxin I (BthTX-I) and Bothropstoxin II (BthTX-II) from *Bothrops jararacussu*, confirming that *B. subtilis* KO7 is a potential host to produce soluble VHHs and with its functionality preserved for later clinical use.

Keywords: *Bacillus subtilis* KO7; phagomid vector; VHH; *Bothrops jararacussu*; phospholipase; recombinant proteins.

LISTA DE FIGURAS

Referencial Teórico

Figura 1- Modelo estrutural de um anticorpo convencional..	17
Figura 2- Representação esquemática de anticorpos de ocorrência natural no soro de camelídeos	19
Figura 3- Estrutura de anticorpos e nanocorpos apenas de cadeia pesada de camelídeos e comparação da estrutura de um domínio VHH com um VH convencional.	21
Figura 4- Esquema de produção de nanocorpo usando uma biblioteca de exibição de fago. ...	23
Figura 5- Aplicações de <i>B. subtilis</i>	31

Capítulo I

Figura 1. Etapas para expressão heteróloga em <i>B. subtilis</i>	46
--	----

Capítulo II

Figura 1- Análise por eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da extração do DNA das colônias transformantes de <i>Bacillus subtilis</i> KO7.	72
Figura 2- A: Análise da fração insolúvel por <i>western-blot</i> utilizando anticorpo monoclonal anti-VHH após indução com IPTG (1Mm).	73
Figura 3- SDS-PAGE 15% contendo amostras do extrato bruto proteico após indução com lactose (10 g/L).....	73
Figura 4- Histograma da média de intensidade de fluorescência de Alexa flúor 488 nas partículas de látex acopladas com BthTX-I, BthTX-IIe veneno total	75

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1- Sistemas de expressão utilizando *Bacillus subtilis* entre os anos de 2015 a 2020. ..41

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	- Citotoxicidade celular dependente de anticorpos
Ag	- Antígeno
aTTP	- Púrpura trombocitopênica trombótica adquirida
AVE	- Acidente vascular encefálico
BthTX-I	- Bothropstoxina I
BthTX-II	- Bothropstoxina II
CDC	- Citotoxicidade dependente de complemento
cDNA	- DNA complementar
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
CDR	- Região determinante de complementariedade
CH	- Domínio constante da cadeia pesada de anticorpo
CL	- Domínio constante da cadeia leve de anticorpo
D.O	- Densidade óptica
dsFv	- Fv estabilizado por dissulfeto
EGFR	- Fator de crescimento epidérmico
ELISA	- Ensaio de Imunoabsorção por Ligação Enzimática
CRISPR	- <i>Clusters of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
Fab'2	- Fragmentos de ligação a antígeno ligados por pontes dissulfeto
Fab	- Fragmento de ligação a antígeno
Fc	- Fragmento cristalizável
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FRs	- Regiões <i>frameworks</i>
Fv	- Fragmento variável
GRAS	- <i>Generally recognized as safe</i>
GPIba	- Receptores da glicoproteína Iba
HAMA	- <i>Human anti-mouse antibody</i>
HCAbs	- Anticorpos de cadeia pesada
Ig	- Imunoglobulina
IgA	- Imunoglobulina A
IgD	- Imunoglobulina D
IgE	- Imunoglobulina E

IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
IPTG	- Isopropil- β -D-thiogalactopiranosideo
kDa	- Kilo Dalton
mAbs	- <i>Monoclonal antibodies</i>
mRNA	- RNA mensageiro
MS	- Espectrometria de massa
OMS	- Organização mundial da saúde
pAbs	- <i>Polyclonal antibodies</i>
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
pFv	- Fragmentos Fv permutados
pHEN1	- Vetor fagomídeo
phoA	- Fosfatase alcalina
RF	- Riboflavina
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
scFv	- Fragmentos variável de cadeia única
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio
Sec	- <i>General secretion pathway</i>
SSR	- Sistema de recombinação sítio-específica
STII	- Enterotoxina estável ao calor II
TAT	- <i>Twin-arginine translocation system</i>
TNFα	- Fator de necrose tumoral humano
VH	- Domínio variável da cadeia pesada de anticorpos
vWF	- Fator de von Willebrand
VHH	- <i>Variable Heavy-chain Homodimer</i>
VL	- Domínio variável da cadeia leve

SUMÁRIO

I. Referencial Teórico.....	16
1.1 Anticorpos Convencionais.....	17
1.2 Anticorpos de cadeia pesada de camelídeos (HCAbs).....	18
1.2.1 Os nanocorpos VHH de camelídeos e sua obtenção.....	20
1.2.2 Aplicações gerais dos nanocorpos VHH.....	24
1.2.3 Aplicações dos nanocorpos VHH contra toxinas de serpentes.....	26
1.2.4 Sistemas de expressão de nanocorpos VHH recombinantes.....	27
1.3 <i>Bacillus subtilis</i> e suas aplicações.....	29
1.3.1 Expressão heteróloga em <i>Bacillus subtilis</i>	31
II. Objetivos.....	33
Capítulo I.....	35
Capítulo II.....	65
III. Discussão Geral.....	83
IV. Conclusão.....	86
V. Referências.....	88

INTRODUÇÃO

A Engenharia Genética proporcionou avanços na área médica e na indústria farmacêutica, com a criação da Tecnologia do DNA recombinante (LOPES *et al.*, 2012). O advento desta tecnologia ofereceu novas oportunidades para inovações que visam produzir uma ampla gama de produtos biotecnológicos como proteínas recombinantes necessárias para a indústria, pesquisa e área da saúde, produzidas de forma segura e eficiente (KHAN *et al.*, 2016; FENG, 2020; BAJAJ *et al.*, 2020; AKRAM *et al.*, 2020).

Vários sistemas hospedeiros podem ser usados para produzir proteínas recombinantes e estes incluem bactérias, leveduras, fungos multicelulares, células de mamíferos, plantas e insetos (DEMAIN *et al.*, 2009). O que faz com que a produção recombinante em microrganismos de fácil manipulação e economicamente viáveis se difunda cada vez mais (MUYLDERMANS, 2013; DE MEYER *et al.*, 2014).

Dentre estes hospedeiros, *Bacillus subtilis*, uma bactéria Gram-positiva classificada como um organismo GRAS (*generally recognized as safe*), pela FDA (*Food and Drug Administration*) vem ganhando um progressivo interesse para a produção de proteínas recombinantes (BARÁK *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2019). Esta bactéria cresce bem em fontes de carbono baratas e simples, tem um metabolismo endógeno distinto, arcabouço genômico e fisiológico bem caracterizados (GU *et al.*, 2018). É a espécie mais estudada no gênero *Bacillus* e o seu emprego como uma plataforma tecnológica é inerente a gama de estratégias desenvolvidas no ramo da Engenharia Genética, tornando-se um atraente hospederio para produzir proteínas de interesse terapêutico, como os VHHs de camelídeos (HANIF *et al.*, 2017; KOVÁCS, 2019).

Os VHHs são fragmentos de anticorpos que pertencem a uma classe de proteínas IgG derivadas de animais da família camelidae que tem a capacidade de reconhecimento a antígenos (HAMERS-CASTERMAN *et al.*, 1993). Essa molécula possui uma faixa de tamanho nanométrico (2,5 a 4nm) com uma massa molecular entre 11-15 KDa (HOLLIGER *et al.*, 2005; MITCHELL; COLWELL, 2018; MORADI *et al.*, 2020). Algumas características dos VHHs são a baixa imunogenicidade, melhor estabilidade em termos de resistência térmica, possui resistência proteolítica e apresenta alta solubilidade (KUNS *et al.*, 2018; SIONTOROU, 2013).

Os VHHs surgiram como uma alternativa aos anticorpos convencionais e detém grande potencial nos campos da imunologia, biotecnologia, diagnóstico e medicamentos terapêuticos (BANNAS *et al.*, 2017). Podem ser facilmente expressos em diversos sistemas

de expressão como *Escherichia coli*, o hospedeiro mais predominante para a produção de VHHs, além de hospedeiros eucarióticos como, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* (LIU; HUANG, 2018).

As principais aplicações dos VHHS contemplam ainda pesquisas sobre biologia estrutural, são candidatos para tratar diferentes doenças, como o câncer, terapia de pacientes acometidos por acidente vascular encefálico (AVE) e podem auxiliar na terapia antiveneno no combate aos efeitos ocasionados por picadas de serpentes em acidentes ofídicos (OLIVEIRA *et al.*, 2013; KIJANKA *et al.*, 2015; JANK *et al.*, 2019; SALVADOR *et al.*, 2019).

Os acidentes ofídicos foram classificados pela organização mundial da saúde (OMS) como um problema de saúde pública que acometem principalmente as populações mais vulneráveis (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). Estima-se que ocorram uma média de 5 milhões de casos de acidentes ofídicos a cada ano em todo o mundo, 29 mil casos por ano são notificados no Brasil (BRASIL, 2019). E em relação a 2019, foram registrados 2276 casos somente no Estado do Amazonas (MAIA *et al.*, 2021). O diagnóstico em casos de acidentes ofídicos pode ser convenientemente feito por métodos clínicos e laboratoriais seguido de aplicação de soro antiofídico monovalente ou polivalente (THEAKSTON; LAING, 2014). No entanto, combater ou neutralizar as toxinas dos venenos ainda é um desafio enfrentado para melhorar o diagnóstico e tratamento no apoio às vítimas (KNUDSEN *et al.*, 2021).

Portanto, visando superar os problemas de expressão insolúvel e buscando facilitar o processo de purificação a partir da utilização de um microrganismo GRAS. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o uso da linhagem *B. subtilis* KO7 para a expressão de um VHH anti-fosfolipase capaz de reconhecer proteínas nativas presentes no veneno de *Bothrops jararacussu*.

I. Referencial Teórico

1.1 Anticorpos Convencionais

Os anticorpos convencionais também chamados de imunoglobulinas (Ig) são uma classe de glicoproteínas produzidas pelos linfócitos B presentes no soro de vertebrados e fluidos teciduais, possuem alta afinidade e especificidade a diferentes antígenos e atuam na defesa do organismo frente a patógenos (WESOLOWSKI *et al.*, 2009).

Do ponto de vista estrutural, consistem em quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias leves e duas cadeias pesadas mais longas, cada cadeia leve dobra para formar dois domínios, uma variável (VL) e uma constante (CL), e cada cadeia pesada dobra para formar quatro ou mais domínios, uma variável (VH) e três ou mais domínios constantes (CH1, CH2 e CH3). Os domínios VL e CL1 de uma cadeia leve associam-se aos domínios de uma cadeia pesada para formar um fragmento de ligação ao antígeno (Fab), regiões efetoras de funções de citotoxicidade (GHETIE *et al.*, 1996). Dois Fab's formam os braços da estrutura em forma de Y do anticorpo (Figura 1).

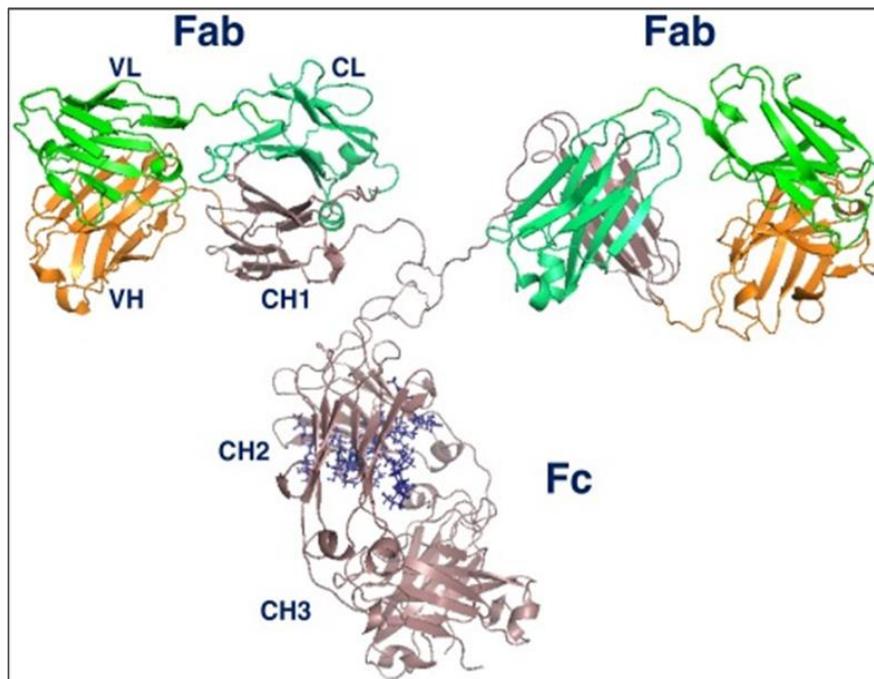


Figura 1- Modelo estrutural de um anticorpo convencional. A região Fab é composta pela interação entre os domínios variável e CH1 das cadeias pesada e leve. A cadeia leve é colorida em verde com a região variável colorida em verde brilhante. A cadeia pesada é de cor marrom com a região variável correspondente colorida de laranja.

Fonte: Chiu e Gilliland (2016).

Os domínios constantes restantes em cada cadeia pesada (CH2 e CH3) se associam para formar a haste em formato de “Y” e são conhecidos coletivamente como o fragmento cristalizável ou constante (Fc) (DUNBAR *et al.*, 2014). Além destas regiões, existem quatro regiões estruturais (FRs) que formam o núcleo do domínio das imunoglobulinas, e três regiões hipervariáveis (CDR1, CDR2 e CDR3), as regiões determinantes da complementaridade (CDR) que participam do reconhecimento de antígenos (MUYLDERMANS *et al.*, 2001).

Em humanos, cinco tipos de anticorpos são distinguidos, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, estas moléculas diferem quanto à função, sequência de aminoácidos na porção C-terminal das cadeias pesadas, cargas elétricas e peso molecular (DE TAEYE *et al.*, 2019). Todos estes isótipos de imunoglobulina têm sua própria biodistribuição, função e muitas vezes são desencadeados por gatilhos específicos (DE TAEYE *et al.*, 2019).

1.2 Anticorpos de cadeia pesada de camelídeos (HCAbs)

Os estudos pioneiros realizados por Ungar-Waroni e colaboradores em 1987 demonstraram a existência de IgGs incomuns verificados após o isolamento de proteínas do soro de dromedários (camelos de uma corcunda), porém estas características só foram detalhadas a partir do trabalho do grupo de Hamers em Bruxelas (SMOLAREK *et al.*, 2012).

Hamers-Casterman *et al.* (1993) observaram que além da Imunoglobulina G convencional (IgG1), o soro da espécie *Camelus dromedarius* apresentava um subconjunto de imunoglobulinas do tipo IgG funcionais (IgG2 e IgG3), desprovidas de cadeias leves e domínios CH1, com um único domínio de ligação ao antígeno que foi denominado VHH (HAMERS-CASTERMAN *et al.*, 1993) (Figura 2).

Além dos camelídeos, alguns peixes cartilagosos (tubarões, raias e ratfish) também produzem um receptor de antígeno desprovido de cadeias leves com estrutura e característica que se assemelham aos anticorpos de cadeia pesada (GREENCERG *et al.*, 1995; FLAJNIK *et al.*, 2011; DIAZ *et al.*, 1998). Todavia, a maioria das pesquisas foi realizada em camelídeos em razão de sua facilidade de manuseio e imunização (MUYLDERMANS, 2013).

Existem hipóteses quanto a real origem e evolução destas moléculas, algumas destas sustentam que os anticorpos de cadeia pesada teriam surgido por convergência evolutiva pelo menos quatro vezes na evolução dos vertebrados (FLAJNIK *et al.*, 2011). Estudos filogenéticos indicam que seriam aparentemente o resultado de alterações adaptativas relativamente recentes que ocorreram no compartimento dos anticorpos convencionais e seu

estabelecimento biológico é uma consequência de várias mutações e deleções na linha germinativa destas espécies (NGUYEN *et al.*, 2001).

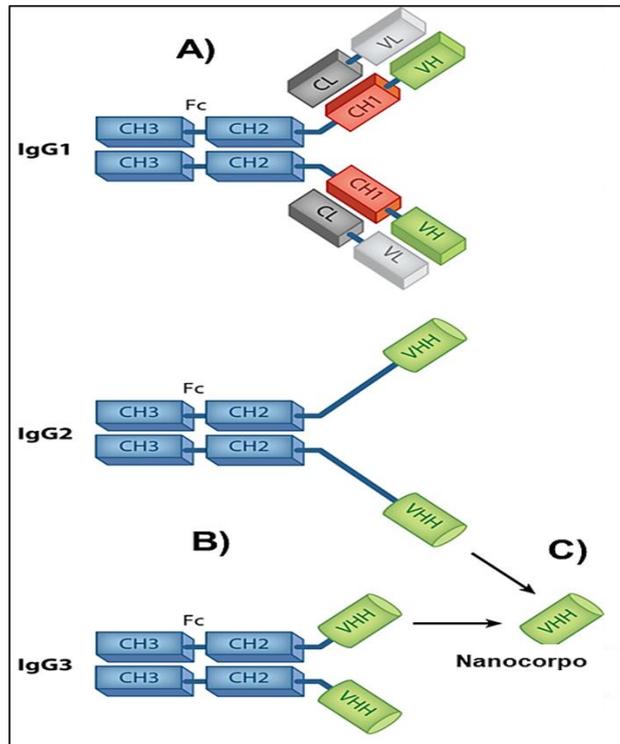


Figura 2-Representação esquemática de anticorpos de ocorrência natural no soro de camelídeos. A): Anticorpos convencionais (IgG1). B): IgG2 e IgG3 que compreendem apenas cadeias H, onde cada cadeia H contém domínios VHH, dobradiça, CH2 e CH3. A dobradiça de IgG2 é mais longa que IgG3. C): O menor fragmento funcional dos HCAs, denominado de VHH ou nanocorpo.

Fonte: Adaptado de Muyldermans (2013).

Flajnik *et al.* (2011) sugerem que a cadeia leve poderia ter sido usada por um vírus como co-receptor para a infecção de linfócitos B e essa foi a causa da sua exclusão, quando o vírus desapareceu, a cadeia leve poderia ser usada novamente, no entanto, não foi restaurado para todos os tipos de IgGs.

Outra teoria para explicação do surgimento de HCAs, se apoia no fato de que as cadeias leves estão associadas à amiloidose (doença caracterizada por acúmulo extracelular de fibrilas de proteínas anormais em vários tecidos e órgãos), desta forma, seu desaparecimento poderia servir como um fator evolutivo positivo (HURLE *et al.*, 1994).

Smolarek *et al.* (2012) argumentam que a resposta mais provável para a existência destes anticorpos únicos diz respeito à necessidade (ou vantagem) do sistema imune humoral adaptativo em desenvolver anticorpos com um domínio V menor, de domínio único e ligação a antígeno. Estes poderiam complementar anticorpos canônicos com seus locais de ligação

planares ou côncavos (SMOLAREK *et al.*, 2012). Visto que fragmentos de ligação de antígeno de tamanho mínimo fornecem acesso a epítomos inacessíveis pelos anticorpos convencionais (KUNZ *et al.*, 2018).

É consenso que a descoberta dos HCABs abriu novas perspectivas no âmbito da engenharia de anticorpos que se iniciaram desde o primeiro anticorpo monoclonal desenvolvido pela tecnologia de hibridoma relatado por Köhler e Milstein (1975). Atualmente, os fragmentos de domínio único (VHH) dos anticorpos de cadeia pesada de camelídeos se tornaram moléculas valorizadas, versáteis e propícias para a pesquisa terapêutica e são consideradas ferramentas de última geração que seguem sob intensa investigação (ROMAO *et al.*, 2016).

1.2.1 Os nanocorpos VHH de camelídeos e sua obtenção

Como visto, a imunidade adaptativa dos camelídeos é ainda mais surpreendente dado a existência de uma classe única de anticorpos funcionais desprovidos de cadeias leves, circulando no seu sangue (HAMERS-CASTERMAN *et al.*, 1993). O reconhecimento de antígenos por estas moléculas ocorrem em virtude de um único domínio, originalmente referido como VHH e mais tarde devidamente designado de “nanocorpo”, referindo-se às suas dimensões em escala nanométrica (MUYLDERMANS *et al.*, 2021). No qual a interface VH-VL hidrofóbica é substituída por uma superfície hidrofílica, devido algumas mutações (DESMYTER *et al.*, 1996; SPINELLI *et al.*, 1996; MUYLDERMANS *et al.*, 2001).

Estas moléculas são capazes de preservar a afinidade de ligação e especificidade do anticorpo completo original e possuem uma engenharia simples, sendo considerados os menores fragmentos de ligação ao antígeno de ocorrência natural já conhecidos (MUYLDERMANS, 2013). Os nanocorpos VHH têm a mesma arquitetura estrutural que os domínios VH das imunoglobulinas humanas, com quatro regiões de sequência conservada (regiões estruturais - FR1/ 2/3/4) que circundam três “*loops*” de ligação ao antígeno hipervariáveis, as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) 1, 2 e 3. (INGRAM *et al.*, 2018; MUYLDERMANS *et al.*, 2009) (Figura 3).

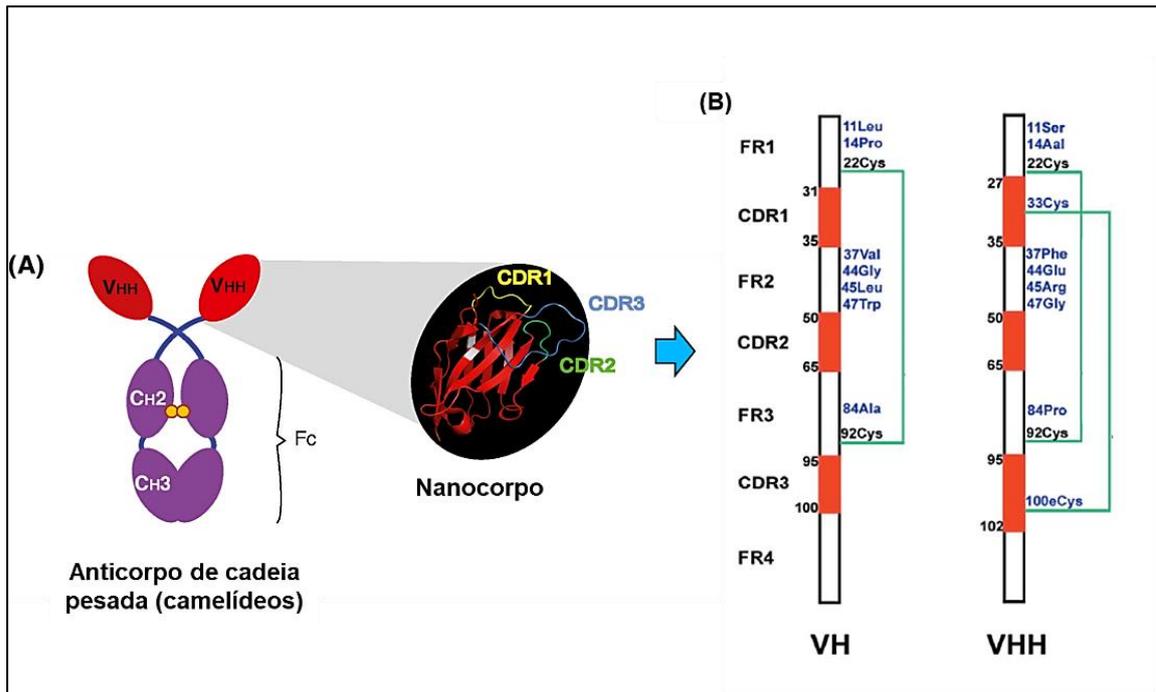


Figura 3- Estrutura de anticorpos e nanocorpos apenas de cadeia pesada de camelídeos e comparação da estrutura de um domínio VHH com um VH convencional. (A): Representação esquemática de um anticorpo apenas de cadeia pesada com a estrutura do domínio VHH (Nc). As regiões determinantes de complementaridade (CDRs) são marcadas em cores diferentes: CDR1 em amarelo, CDR2 em verde, CDR3 em azul e as regiões estruturais (FR) são indicadas em vermelho. (B): As três regiões determinantes da complementaridade (CDRs) são indicadas em vermelho, e os números de resíduos de aminoácidos que os delimitam. A cor azul indica os resíduos de aminoácidos com os quais a cadeia pesada VHH difere de um VH clássico.

Fonte: Adaptado de Salema e Fernández (2017); Smolarek (2012).

O VHH (parátipo) é formado principalmente pelos aminoácidos pertencentes aos CDRs (DE MARCO, 2020). Por conta de o parátipo apresentar um plano convexo e devido ao seu pequeno tamanho, podem se ligar a epítomos ocultos em pequenas cavidades, como sítios ativos de enzimas, epítomos conformacionais e até mesmo epítomos lineares (DE GENST *et al.*, 2006; DESMYTER *et al.*, 1996; VAN DEN ABBEELE *et al.*, 2010; BEGHEIN *et al.*, 2017).

O domínio VHH contém várias substituições de aminoácidos em comparação com anticorpos convencionais, a maioria destas alterações está presente na região envolvida pelas interações hidrofóbicas (KÖNNING *et al.*, 2017). Val-37, Gli-44, Leu-45 e Trp-47 são geralmente substituídos por Fen-37, Glu-44, Arg-45 e Gli-47 (INGRAM *et al.*, 2018). Tais substituições de aminoácidos foram encontradas em todas as sequências conhecidas de aminoácidos de anticorpos de cadeia pesada (NGUYEN *et al.*, 2001).

A natureza de domínio único dos VHHs impõe regras de engajamento que diferem das regras convencionais, além de diferenças nos CDRs e na região-quadro 2 (FR2) (INGRAM *et*

al., 2018). Por exemplo, o comprimento médio do CDR3 em VHHs de dromedários é de 18 aminoácidos em comparação com 14 e 11 resíduos em Vhs humanos e de camundongos, respectivamente (MUYLDERMANS *et al.*, 1994). O longo CDR3 de um VHH aumenta a superfície potencial de interação com o antígeno alvo, compensando, em parte, o domínio VL ausente (WESOLOWSKI *et al.*, 2009; MUYLDERMANS *et al.*, 2013).

Outras diferenças estruturais entre os Vhs e um VHH de camelídeos ocorre ao nível das alças de ligação ao antígeno. CDR1 e CDR2 dos VHHs adotam um número maior de possíveis estruturas de *loop* que se desviam fundamentalmente das estruturas de alça canônica definidas para anticorpos convencionais, o que possibilita uma maior diversidade estrutural e geométrica (DECANNIERE *et al.*, 2000).

Os VHHs são fracamente imunogênicos para humanos porque compartilham genes com homologia de alta sequência com os genes pertencentes às famílias humanas (DESCHACHT *et al.*, 2010; DIAZ *et al.*, 1998). Estes são fáceis de serem clonados e podem ser expressos com altos rendimentos utilizando diferentes sistemas de expressão (HARMSEN; DE HAARD, 2007). Todas estas propriedades bioquímicas e biofísicas dos VHHs supostamente os tornam superiores aos anticorpos convencionais ou demais fragmentos de anticorpos e os classificam como idealmente adequados para aplicações biotecnológicas (BEGHEIN; GETTEMANS, 2017).

A obtenção dos VHHs requer uma imunização ativa de animais (normalmente 2-3 meses), como camelos, dromedários, lhamas ou alpacas (SALVADOR *et al.*, 2019) (Figura 4). Posteriormente, segue-se o processo de triagem que consiste no isolamento do mRNA dos linfócitos periféricos, subsequente amplificação da sequência codificadora do VHH por PCR (reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase). A seguir, após inclusão dos sítios de enzimas de restrição, os diferentes fragmentos são inseridos em um vetor de clonagem fagomídeo onde a biblioteca VHH é produzida infectando o sistema de expressão de fago e, após a seleção do clone mais adequado por meio de ensaios *in vitro* por ELISA (do inglês “*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”), o VHH correspondente é produzido (SALVADOR *et al.*, 2019).

São necessárias algumas rodadas de “*Biopanning*” para identificar os fagos positivos, esta etapa consiste na seleção por afinidade de fagos capazes de interagir com antígenos, por meio de ligantes expressos em seu capsídeo (VERHEESEN; LAEREMANS, 2012). Após esta seleção, a produção dos VHHs correspondentes é realizada *in vitro* por meio de um sistema de expressão adequado (SALVADOR *et al.*, 2019).

Várias bibliotecas de VHHs não imunes ou sintéticas podem ser geradas e não requerem a imunização de camelídeos (MOUTEL *et al.*, 2016; YAN *et al.*, 2014). O uso de bibliotecas não imunes é uma solução viável devido à falta de imunogenicidade do alvo, além disso, este é um método que permite que a produção de VHHs ocorra a partir de compostos menos antigênicos (MUYLDERMANS *et al.*, 2021).

Já as bibliotecas sintéticas apresentam um grau de diversidade que pode ser induzido pela preparação ajustável com base no protocolo executado. Isso se deve à sua capacidade de introduzir diferentes aminoácidos nas regiões CDR selecionadas, portanto, esses tipos de bibliotecas são considerados uma alternativa promissora ao método convencional, incluindo a imunização de animais (SALVADOR *et al.*, 2019).

Como parte de uma eventual caracterização *in vitro*, a capacidade de ligação e a constante de afinidade dos VHHs pós-purificação pode ser determinada por ELISA (PEREIRA *et al.*, 2014). Ensaios de inibição de atividade biológica do alvo também podem ser realizados, e os melhores clones são submetidos a testes *in vivo* que objetivam, por exemplo, avaliar a capacidade protetiva do VHH em modelos experimentais (HMILA *et al.*, 2010).

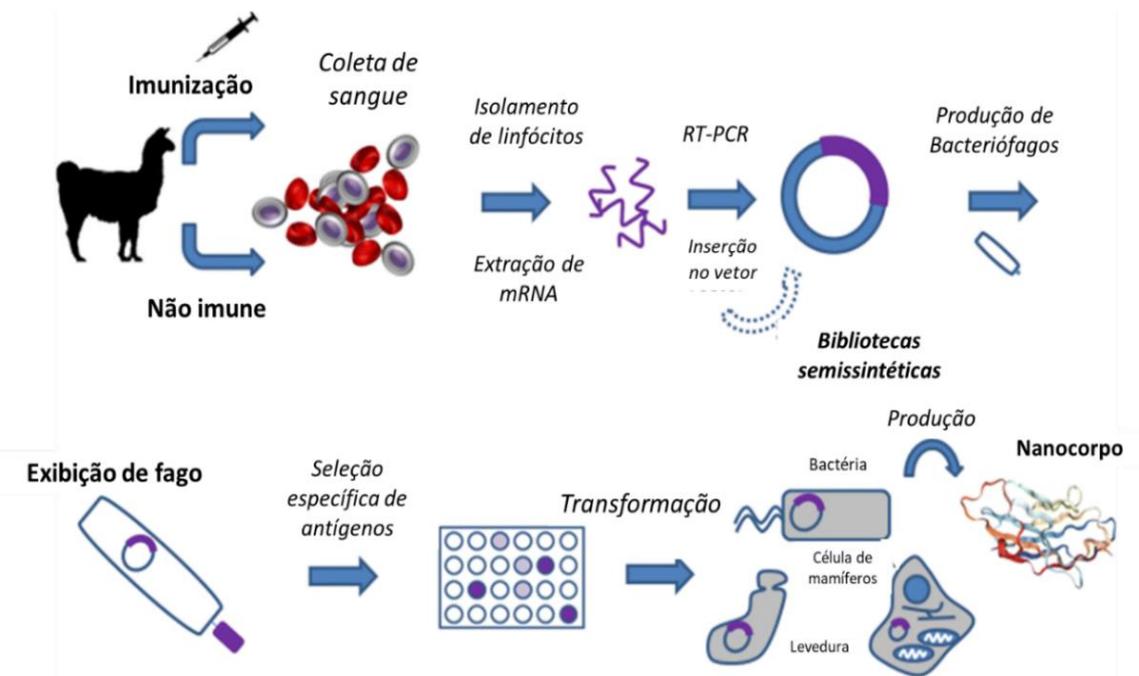


Figura 4-Esquema de produção de nanocorpo usando uma biblioteca de exibição de fago.

Fonte: Adaptado de Salvador *et al.* (2019).

1.2.2 Aplicações gerais dos nanocorpos VHH

A soma de todas as características dos nanocorpos que incluem um tamanho pequeno, alta solubilidade, estabilidade, especificidade, facilidade de clonagem e resistência térmica e química, bem como o fato de os nanocorpos VHHs serem considerados não imunogênicos, tornaram os VHHs candidatos atrativos nas pesquisas em diagnósticos e terapias (MUYLDERMANS, 2013; DE MEYER *et al.*, 2014).

No estudo de Bekesi *et al.* (2018), os autores utilizaram nanocorpos como ferramenta no auxílio da caracterização estrutural e funcional de proteínas de sinalização complexas com múltiplos domínios heterogêneos. Foram utilizados nanocorpos específicos contra a proteína de ligação ao CREB (CBP) e p300 que pudessem atingir especificamente suas diferentes regiões e para serem usados para marcação, rotulagem e estabilização estrutural destes complexos. O que forneceu uma nova abordagem de mecanismos no estudo de proteínas altamente dinâmicas (BEKESI *et al.*, 2018).

Há relatos do uso de VHHs em estudos de co-cristalização visando melhorar significativamente o comportamento da cristalização (SCHUMACHER *et al.*, 2018). Estas práticas são pertinentes, já que a produção de cristais de proteínas de alta qualidade em pesquisas de cristalografia por raios X são tidas como desafiadoras e impulsionam cada vez mais o aprimoramento das técnicas em estudos de nanocorpos utilizados como sondas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para a purificação de proteínas (DE GENST *et al.*, 2013).

VHHs como agentes marcadores também têm sido utilizados em microscopia confocal e de super resolução (VIRANT *et al.*, 2018; BEGHEIN; GETTEMANS, 2017). Em uma abordagem semelhante, Cai *et al.* (2019) desenvolveram uma tecnologia de imunomarcção baseada em nanocorpos VHHs que permitiu obter imagens e quantificar detalhes subcelulares através de ossos, pele e tecidos altamente auto fluorescentes de camundongos, onde foi possível visualizar projeções neuronais em animais adultos.

Um dos novos tratamentos promissores que podem superar as desvantagens das terapias baseadas em anticorpos monoclonais é o emprego de nanocorpos direcionados a tumores (KIJANKA *et al.*, 2015). O estudo imunoterápico realizado por Deken *et al.* (2020) demonstrou o uso do conjugado PDT de nanocorpo-fotossensibilizador (PS), onde apenas em uma única sessão de tratamento através de terapia fotodinâmica, observou-se a indução seletiva da regressão tumoral de forma significativa de tumores com superexpressão de HER2, receptor expresso em pacientes com câncer de mama e que resulta em uma doença

mais agressiva. Esse método se mostrou um potente tratamento alternativo para o câncer de mama HER2 + (DEKEN *et al.*, 2020).

Desde sua descoberta, os nanocorpos VHHs provaram ser de grande interesse na terapêutica contra doenças humanas e patógenos, incluindo vírus (HEMMER *et al.*, 2018). Como exemplos pertinentes, destacam-se pesquisas de HIV, onde no estudo de Jähnichen *et al.* (2010) foi observado que os nanocorpos 238D2 e 238D4 se ligavam ao CXCR4 celular (receptor de quimiocina CXC tipo 4 ou CD184) e neutralizaram as cepas X4 de HIV-1 bloqueando este co-receptor (JÄHNICHEN *et al.*, 2010). Além disso, um nanocorpo anti-p24 foi empregado como um detector do antígeno p24 Gag na concepção de testes diagnósticos miniaturizados de infecção por HIV-1 (TURBÉ *et al.*, 2017).

Nanocorpos VHHs neutralizantes de vírus foram desenvolvidos para várias famílias de vírus animais e humanos, além do HIV-1. Estes incluem o rotavírus (VAN DER VAART *et al.*, 2006), vírus influenza A (HULTBERG *et al.*, 2011; HUFTON *et al.*, 2014), vírus sincicial respiratório (HULTBERG *et al.*, 2011), norovírus (KOROMYSLOVA *et al.*, 2017) e vírus da raiva (HULTBERG *et al.*, 2011). Em modelos murinos, os nanocorpos previnem à doença da influenza H5N1 (IBAÑEZ *et al.*, 2011) e infecção por rotavírus neonatal.

Para obter um nanocorpo eficaz contra o vírus SARS-CoV-2, Hanke *et al.* (2020) usaram a imunização da lhama contra a proteína *spike* conjugada com FC SARS-CoV-2 e isolaram os nanocorpos usando a técnica de exibição de fago. Depois de realizar as duas rodadas de *panning*, o nanocorpo Ty1 demonstrou ter uma ligação potente com a proteína *spike*. O teste de neutralização de vírus mostrou que este nanocorpo neutralizou o SARS-CoV-2 a um IC₅₀ de 0,77 µg/mL (54 nM) (HANKE *et al.*, 2020). Estes resultados vêm demonstrando que os nanocorpos surgem como potenciais ferramentas para derrotar pandemias de doenças infecciosas (CHI *et al.*, 2020).

Diversos estudos vêm investigando a utilidade dos nanocorpos VHHs como agentes de direcionamento para a entrega de drogas terapêuticas (GLASSMAN *et al.*, 2020). Os nanocorpos podem ser usados para abordagens terapêuticas de várias maneiras e uma delas é a conjugação de um nanocorpo com proteínas para aumentar a meia-vida da droga e diminuir sua toxicidade (JOVČEVSKA; MUYLDERMANS, 2020; KIJANKA *et al.*, 2015). Roovers *et al.* (2007) conjugaram dois nanocorpos com a albumina gerando o anti-EGFR contra o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), superexpresso em muitos tumores. Os resultados revelaram que meia-vida da droga foi aumentada de 1 para 44 horas e foi retardado o crescimento do tumor EGFR em modelos animais.

Existem nanocorpos VHHs conjugados utilizados em processos inflamatórios, como o anti-TNF α , no qual a eficácia da droga foi aumentada e a gravidade da doença foi aliviada significativamente. Estes estudos se mostraram valiosos uma vez que o fator de necrose tumoral humano (TNF α) é um mediador substancial da resposta inflamatória e a busca por medicamentos para reduzir inflamações são constantes (KARAMI *et al.*, 2020).

Recentemente, intensificaram os estudos que apontam os nanocorpos VHHs como potenciais novos agentes trombolíticos como alternativas para o tratamento de isquemia cerebral aguda e podem ser empregados como moduladores de processos inflamatórios estéreis pós-AVE (JANK *et al.*, 2019). O Caplacizumab[®] um nanocorpo dirigido contra o Fator de von Willebrand (vWF), foi aprovado para o uso contra púrpura trombocitopênica trombótica adquirida (aTTP) (PEYVAND *et al.*, 2017). O Caplacizumab inibe a interação do vWF com os receptores da glicoproteína Ib α (GPIb α) plaquetária ao se ligar ao domínio A1 do vWF. O tratamento com estes nanocorpos reduzem a adesão das plaquetas aos vasos danificados e o crescimento do trombo sem aumentar o risco de hemorragia intracerebral (DUGGAN, 2014).

1.2.3 Aplicações dos nanocorpos VHH contra toxinas de serpentes

Em casos de envenenamento por serpentes de importância médica, de maneira geral, observa-se uma patologia local e sistêmica grave, no qual exige a administração intravenosa de um antiveneno, preparado a partir de IgG de cavalos ou ovelhas imunizados com o veneno (LALLOO; THEAKSTON, 2003). Embora este seja o tratamento convencional, já existem inúmeras pesquisas focadas para desenvolver tratamentos alternativos eficazes e vantajosos baseados em produtos inovadores de acordo com a especificidade das toxinas presentes no veneno e da espécie da serpente em questão (HARRISON *et al.*, 2006).

Neste sentido, ao longo dos anos foram desenvolvidos múltiplos nanocorpos VHH para neutralizar vários venenos e toxinas (STEWART *et al.*, 2007; HMILA *et al.*, 2010; GOLDMAN *et al.*, 2009; HMILA *et al.*, 2010). No estudo realizado por Prado *et al.* (2016) uma *Lama glama* foi imunizada com 100 μ g de toxinas BthTX I e BthTX II de *B. jararacussu*. Após o ensaio de ELISA foi possível observar uma resposta imune satisfatória para ambas as toxinas e o *western-blotting* revelou que os nanocorpos gerados eram capazes de reconhecer um epítipo em ambas as toxinas (PRADO *et al.*, 2016).

No trabalho de Luiz *et al.* (2018), quatro nanocorpos capazes de interagir com a sequência de CB que compõem a crotocina (CTX) do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

foram selecionados usando *Phage Display*. Após serem expressos em *E. coli* mostraram termoestabilidade, inibiram a atividade de CTX *in vitro*, a citotoxicidade e a miotoxicidade induzida por CTX *in vivo* (LUIZ *et al.*, 2018).

Bailon Calderon *et al.* (2020) desenvolveram um conjunto de nanocorpos contra os componentes hemorrágicos e miotóxicos do veneno de *Bothrops atrox*. Ensaio *in vivo* demonstraram que cinco nanocorpos inibiram a atividade hemorrágica das proteínas, três neutralizaram a atividade hemorrágica, enquanto quatro nanocorpos inibiram a proteína miotóxica. Mostrando o potencial uso de nanocorpos como agentes terapêuticos inovadores contra o envenenamento pelo viperídeo *B. atrox* (BAILON CALDERON *et al.*, 2020).

1.2.4 Sistemas de expressão de nanocorpos VHH recombinantes

Diversos estudos utilizaram *Escherichia coli* como hospedeiro para produzir VHHs (GOPAL, 2013; HAYAT *et al.*, 2018; ROSANO *et al.*, 2019). Ta *et al.* (2015) produziram nanocorpos modificados com uma função alcino em seu C-terminal, capaz de se aderir a molécula VCAM1 que desempenha um papel importante no recrutamento de leucócitos para o endotélio. Neste estudo, foi observado a expressão citoplasmática da proteína, o que levou a um rendimento de (até 22 mg/L de cultura) e capacidade de ligação ao VCAM1.

Li *et al.* (2019) expressaram nanocorpos que se ligavam a microglobulina (β 2MG) identificada como a principal composição das fibrilas que causam amiloidose. Dentre as linhagens de *E. coli* utilizadas, o rendimento final de VHHs solúveis por litro de cultura foi de 47,5 a 52,5 mg (Shuffle T7) e 54,5-57,0 mg (Rosetta-gami B (DE3) pLysS), respectivamente.

A maior parte de sua produção é restrita às células hospedeiras que contêm o periplasma o que exige que as células sejam destruídas para extrair o conteúdo. Uma grande quantidade de nanocorpos ainda é expressa apenas em níveis muito baixos devido à insuficiência de chaperonas no periplasma (LIU; HUANG, 2018). Devido às desvantagens da expressão periplasmática, a expressão citoplasmática parece ser o único modo de expressão para determinados tipos de proteínas (BILLEN *et al.*, 2017). Porém, a maioria dos nanocorpos obtidos a partir da redução da expressão citoplasmática são agregações não funcionais e a sua recuperação a partir desses corpos de inclusão por desnaturação completa e redobramento muitas vezes não é eficiente (LIU; HUANG, 2018).

Além disso, *E. coli* contém endotoxinas, que podem causar múltiplos efeitos indesejáveis em humanos e, portanto, extratos de *E. coli* requerem a remoção completa de

endotoxinas no desenvolvimento de nanocorpos produzidos neste organismo como produtos biológicos terapêuticos (PETSCH; ANSPACH, 2000).

Outros sistemas de expressão utilizaram o hospedeiro *Pichia pastoris* como biofábrica eucariótica e alternativa para a produção de nanocorpos recombinantes (DE MARCO *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2019). Gai *et al.* (2020) expressaram um nanocorpo específico contra SARS-CoV-2 produzido em *Pichia pastoris*, e o rendimento da proteína-alvo no sobrenadante da fermentação chegou a atingir 20 g/L (GAI *et al.*, 2020). No geral, o Nc11-59 foi considerada uma molécula profilática e terapêutica promissora contra COVID-19, especialmente por meio de administração por inalação.

No estudo de Baghban *et al.* (2016) foi expresso e purificado o nanocorpo contra uma neurotoxina botulínica de *Clostridium botulinum* em *P. pastoris*. O rendimento final do nanocorpo expresso foi estimado em 16 mg/L. Além disso, no ensaio *in vivo* após a injeção dos nanocorpos em modelo murinho, o nanocorpo estendeu a sobrevivência dos camundongos para 1,5 vezes em comparação com o controle. Indicando alta qualidade da proteína expressa nesta levedura.

Também há relatos da produção eficiente de nanocorpos contra a atividade de *Helicobacter pylori* em *Pichia pastoris*. Pourasadi *et al.* (2017) verificaram em seu estudo que o rendimento do nanocorpo expresso em *P. pastoris* foi estimado em 5 mg/L em comparação com 2 mg/L expresso por *E. coli*. O nanocorpo foi purificado e a afinidade de ligação ao antígeno foi avaliada usando ELISA. O nanocorpo expresso na levedura detectou especificamente o antígeno UreC e inibiu a atividade com alta eficiência.

Embora a demonstração de viabilidade, esses esforços não tiveram sucesso em convencer a comunidade científica sobre a vantagem de usar tal organismo (DE MARCO, 2020). Os nanocorpos expressos em *P. pastoris* Mut^S apresentaram substituições de resíduos de metionina devido à incorporação errônea de O-metil-L-homoserina, também chamada de metoxina. A metoxina é provavelmente sintetizada pela ação enzimática do O-acetil homoserina sulfidrilase, e foi ainda confirmado que os nanocorpos produzidos nas cepas selvagens não continham variantes de metoxina.

Segundo Schotte *et al.* (2016), a incorporação de metoxina em proteínas recombinantes é provável de ocorrer quando um excesso de metanol está presente durante a fermentação, mas pode ser evitado quando o protocolo de taxa de alimentação de metanol é cuidadosamente projetado. Além do exposto, existem trabalhos recentes em que os VHHs produzidos em *P. pastoris* mostraram menor eficiência de ligação ao antígeno (LIU; HUANG, 2018).

Em se tratando de *Saccharomyces cerevisiae*, este organismo foi a primeira levedura a ser fermentada por humanos e também tem sido utilizada para produzir nanocorpos (GORLANI *et al.*, 2012; THOMASSEN *et al.*, 2005). Diversos estudos obtiveram bons rendimentos na produção destas proteínas em frascos de agitação (THOMASSEN *et al.*, 2002). No entanto, problemas de N-glicosilação ocorreram nestes sistemas (SAGT *et al.*, 2000; VAN DER VAART *et al.*, 2006).

Provavelmente devido ao fato de que a utilização de leveduras para expressão heteróloga resulta na liberação de proteínas N-glicosiladas para o meio de cultura (LIU; HUANG, 2018). No entanto, no caso dos nanocorpos, a maioria não contém locais de N-glicosilação devido à falta do domínio Fc (LIU; HUANG, 2018), sendo assim, os efeitos de uma N-glicosilação ocasional nestes produtos pode diminuir a capacidade de ligação ao antígeno em alguns casos, o que exige detalhadas investigações futuras para reduzir a chance de imunogenicidade indesejada na expressão utilizando este hospedeiro (EZZINE *et al.*, 2012 ; VAN DER VAART *et al.*, 2006).

Recentemente, Yang *et al.* (2020) apresentaram um novo sistema de expressão utilizando a bactéria formadora de esporos *Bacillus subtilis* para secretar nanocorpos VHHs de camelídeos. Neste estudo, os nanocorpos continham um domínio de ligação de celulose para o seu armazenamento de longo prazo e foi usado o fluido sobrenadante das bactérias para realizar a detecção das proteínas nas superfícies das células. Ao final, os rendimentos de nanocorpos foram estimados em 15 a 20 mg por litro de cultura bacteriana (YANG *et al.*, 2020). Este trabalho foi o primeiro estudo que utilizou uma linhagem de *B. subtilis* para produzir nanocorpos de camelídeos até o presente momento.

1.3 *Bacillus subtilis* e suas aplicações

Quanto a sua taxonomia e classificação, a espécie *Bacillus subtilis* pertence ao Reino Bacteria, Filo Firmicutes, Ordem Bacillales, Família Bacillaceae e ao Gênero *Bacillus* (KOVÁCS, 2019). É uma bactéria Gram-positiva aeróbia que pode ser isolada de vários ambientes, do solo aos habitats marinhos, conhecida por ser formadora de esporos e por seu intenso uso em estudos biotecnológicos, consolidado ao longo de várias décadas, principalmente devido a uma série de características apreciáveis do ponto de vista experimental (ERRINGTON, 2003).

Já são conhecidas uma gama de aplicações que utilizam esta bactéria, como por exemplo, estudos no ramo da engenharia genética. Os sistemas de manipulação genética mais comumente usados para *B. subtilis* incluem sistemas de recombinação sítio-específica (SSR) e

o sistema CRISPR-Cas9 (YAN *et al.*, 2008; ALTENCUCHNER *et al.*, 2016). A aplicação industrial de *B. subtilis* desenvolveu-se rapidamente nos últimos anos tornando-o a principal fábrica para muitos produtos industriais incluindo muitas enzimas como amilases, xilanases, liquenase e celulases (VAN DIJL; HECKER, 2013). Já foi constatado que *B. subtilis* pode também ser usado para produzir vitaminas como a riboflavina (RF), amplamente utilizada por seus efeitos antioxidantes (SUWANNASOM *et al.*, 2020).

Na agricultura, estudos têm mostrado que ao adicionar uma quantidade adequada de *B. subtilis* pode-se melhorar significativamente o conteúdo de húmus e carbono do composto, melhorando assim a qualidade do solo e promovendo o crescimento da cultura (DUAN *et al.*, 2020). Devido ao seu status GRAS, as proteases de *B. subtilis* podem ser usadas em várias aplicações alimentares, como preparação de hidrolisado de soja, amaciamento de carne, preparação de hidrolisado de caseína, coagulação do leite e tratamento de resíduos alimentares (PATEL *et al.*, 2019).

Ademais, *B. subtilis* pode formar biofilmes complexos, que podem ser usados como materiais biológicos vivos para a produção de muitos biomateriais funcionais, como fatores de crescimento de superfície, antibióticos, lisozima e peptídeos antimicrobianos para materiais médicos (SU *et al.*, 2020a). Além disso, ainda pode ser usado como uma plataforma para a preparação de vacinas ou um aditivo para rações na agricultura (CHEN *et al.*, 2017). As principais aplicações e uso de *B. subtilis* estão ilustradas na figura 5.

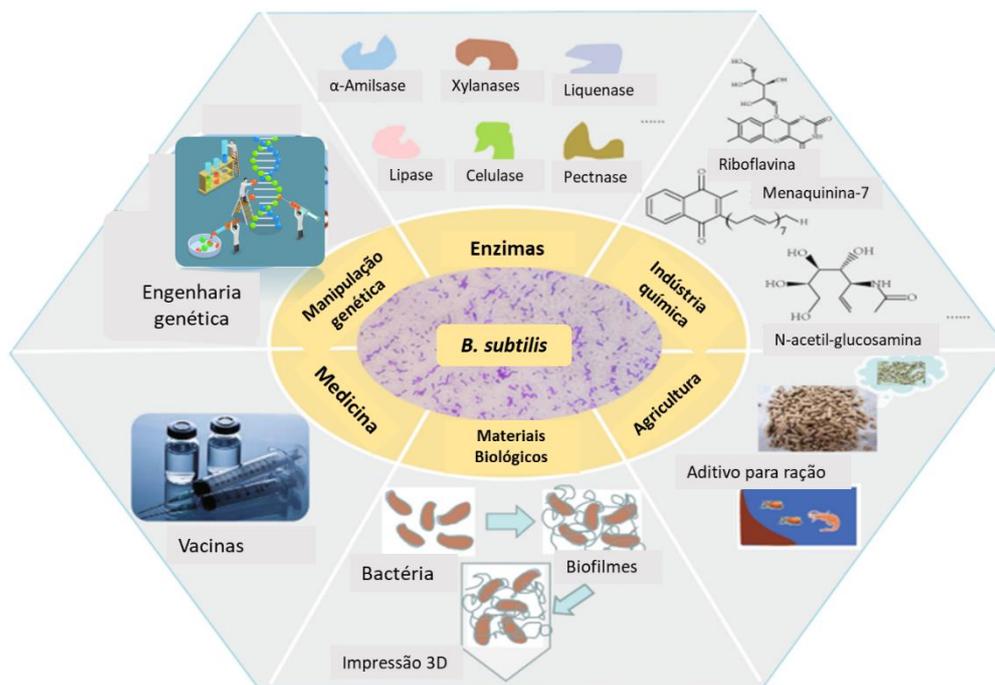


Figura 5- Aplicações de *B. subtilis*. Esta bactéria pode ser amplamente utilizada na engenharia genética para produzir várias enzimas industriais, como α -amilase, xilanase, liquenase, lipase, celulase ou pectinase. Ele também pode ser usado para produzir vários produtos químicos, como riboflavina, menaquinona-7, inositol ou N-acetilglucosamina. Na agricultura, pode ser usado como aditivo alimentar. Biofilmes de *B. subtilis* podem ser usados como biomaterial na impressão 3D. E na medicina, *B. subtilis* pode ser usado para produzir vacinas.
Fonte: Adaptado de Su *et al.* (2020).

1.3.1 Expressão heteróloga em *Bacillus subtilis*

Dentre as espécies do gênero *Bacillus*, *B. subtilis* é o organismo mais bem compreendido em termos bioquímicos, fisiológicos genéticos e metabólicos (ERRINGTON, 2003), graças à disponibilidade inicial da sequência do seu genoma que aumentou nossa compreensão sobre os processos celulares fundamentais e resultou em uma oportunidade de utilizar esta bactéria em ambientes de pesquisas variados (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). O *B. subtilis* isolado 168 é uma das cepas mais utilizadas em estudos, sendo suas linhagens derivadas de microrganismos não-patogênicos, ou seja, livres de exotoxinas e endotoxinas, sendo assim, não oferecem riscos à saúde humana e nem ao meio ambiente (LIU *et al.*, 2014; SCHALLMEY *et al.*, 2004).

É notável que *B. subtilis* tem uma forte capacidade de expressão gênica e secreção de proteínas, o que levou a sua vasta utilização na produção de proteínas heterólogas de alto valor. Este conta com sistemas de expressão munidos com promotores naturais e construídos artificialmente, bem como diversos plasmídeos como, por exemplo, o vetor de expressão pHT43, ao qual apresenta o forte promotor $P_{grac100}$ que é derivado do operon *groE* de *B. subtilis*. Este promotor conta com elementos reguladores aprimorados e o mesmo é fundido ao

operador *lac* permitindo sua indução pelo reagente IPTG (HANIF *et al.*, 2017; MU *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2020). As principais vias de secreção de *B. subtilis* consistem no sistema de transporte dependente de Sec e o sistema de translocação Twin-arginina (TAT). Estes compreendem a maquinaria secretora primária capaz de secretar seletivamente proteínas nativas e heterólogas (CASPER *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2014).

Logo, *B. subtilis* é uma importante alternativa para a expressão de genes heterólogos, sendo considerada uma plataforma notável, por conta de sua capacidade natural e eficiência de secreção, pois a produção de proteínas recombinantes neste organismo é menos onerosa e mais rápida (CAVALCANTE, 2013). Uma revisão detalhada sobre as principais estratégias utilizadas de engenharia genética, bem como as proteínas já expressas neste hospedeiro, podem ser melhor apreciadas no artigo de revisão publicado por este autor, o qual corresponde ao capítulo I desta dissertação.

II. Objetivos

Geral:

- Produzir VHH anti-fosfolipase em *Bacillus subtilis* KO7 e avaliar sua expressão e funcionalidade.

Específicos:

- 1- Realizar um levantamento bibliográfico sobre o uso de *Bacillus subtilis* como plataforma de expressão de proteínas de interesse biotecnológico;
- 2- Transformar *Bacillus subtilis* KO7 utilizando o plasmídeo pHEN1;
- 3- Induzir e avaliar a expressão da proteína utilizando diferentes indutores;
- 4- Avaliar o reconhecimento do fragmento de anticorpo VHH frente às proteínas nativas.

Capítulo I

Neste capítulo apresentamos um artigo publicado pelo nosso grupo de pesquisa no ano de 2021, o mesmo encontra-se traduzido para o português e correspondente ao primeiro objetivo específico desta dissertação. Trata-se de uma revisão detalhada sobre os principais e os mais recentes avanços no que diz respeito ao desenvolvimento de sistemas de expressão e proteínas já expressas utilizando o hospedeiro *Bacillus subtilis*. Buscamos elucidar a importância de todo o conhecimento genético, fisiológico e bioquímico adquirido a cerca desta bactéria e dos mecanismos decisivos para a consolidação e compreensão do seu potencial de uso na indústria e na pesquisa. Posteriormente elencamos as principais características e estratégias de engenharia genética já desenvolvidas para a melhoria da expressão e criação de novos sistemas de expressão. Com base nos trabalhos consultados, demonstramos que *Bacillus subtilis* é um hospedeiro amplamente utilizado com uma gama de moléculas já produzidas, robusto e promissor para a produção segura e eficiente das mais variadas proteínas de interesse biotecnológico.

Informações sobre o artigo

Título em inglês: The multifunctionality of expression systems in *Bacillus subtilis*: Emerging devices for the production of recombinant proteins.

Situação: Publicado segundo as normas da revista

Ano: 2021

Revista: Experimental Biology and Medicine; ISSN: 1535-3699

Fator de impacto: 4.088

DOI: 10.1177/15353702211030189.

Multifuncionalidade dos sistemas de expressão em *Bacillus subtilis*: dispositivos emergentes para a produção de proteínas recombinantes

Título abreviado: Secreção de proteínas recombinantes em *Bacillus subtilis*

Caio Coutinho de Souza¹, Jander Matos Guimarães², Soraya dos Santos Pereira^{3,6}, Luis André Morais Mariúba^{1,4,5,7}

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, AM, 69067-005, Brazil.

²Centro Multiusuário de Análise de Fenômenos Biomédicos (CMABio) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, 69065-00, Brazil.

³Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Unidade de Rondônia, Porto Velho-RO, 76812-245, Brazil.

⁴Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus, AM, 69057-070, Brazil.

⁵Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, IOC, Rio de Janeiro, 21040-360, Brazil.

⁶Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Fundação Universidade Federal de Rondônia-PGBIOEXP/UNIR, Porto Velho-RO, 76801-974, Brazil.

⁷Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69067-00, Brazil.

Resumo

Bacillus subtilis é um hospedeiro de sucesso para a produção de proteínas recombinantes. Seu status GRAS (*Generally Recognized As Safe*) e sua notável capacidade inata de absorver e incorporar DNA exógeno em seu genoma fazem deste organismo uma plataforma ideal para a expressão heteróloga de substâncias bioativas. Os fatores que corroboram seu valor podem ser atribuídos ao conhecimento científico obtido a partir de décadas de estudo sobre sua biologia que tem fomentado o desenvolvimento de diversas estratégias de engenharia genética, como o uso de diferentes plasmídeos, engenharia de promotores constitutivos ou duplos, indutores químicos, sistemas de expressão autoinduzíveis com ou sem um sistema de secreção que utiliza um peptídeo de sinal, e assim por diante. Ferramentas que enriquecem o arsenal tecnológico desta plataforma de expressão melhoram a eficiência e reduzem os custos de produção de proteínas de importância biotecnológica. Portanto, esta revisão visa destacar os

principais avanços envolvendo sistemas de expressão recombinante desenvolvidos em *B. subtilis*, sustentando assim a geração de conhecimento e sua aplicação em pesquisas futuras. Foi verificado que esta bactéria é um modelo em constante demanda e os estudos sobre a expressão de proteínas recombinantes em larga escala estão aumentando em número. Como tal, representa um poderoso hospedeiro bacteriano para pesquisas acadêmicas e fins industriais.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, promotores, proteínas recombinantes, sistemas de expressão, indução, autoindução

Declaração de impacto

O uso do *Bacillus subtilis* para produzir proteínas recombinantes com valor médico, biotecnológico e industrial é uma atividade crescente que apresenta um enorme potencial de exploração. Este hospedeiro vem se destacando e ganhando notoriedade porque oferece segurança laboratorial e excelentes rendimentos. Tais elementos estimulam cada vez mais o desenvolvimento de sistemas de expressão que utilizam estratégias particulares e não convencionais de engenharia genética. Revisamos a ampla disponibilidade e seleção de vários promotores eficientes, além do uso de indutores químicos economicamente viáveis e sistemas de expressão autoinduzíveis, que são cada vez mais procurados hoje em dia por sua praticidade. Esperamos que este artigo clarifique os sistemas recentes que compõem o arsenal tecnológico disponível para esta plataforma de expressão e que podem ser úteis para vários grupos de pesquisa como alternativas confiáveis para a necessidade mundial de bioativos produzidos por uma fonte escalável de produção.

Introdução

Bacillus subtilis é um hospedeiro bacteriano Gram-positivo qualificado pela *Food and Drug Administration* (FDA) como sendo um microorganismo geralmente seguro (GRAS), livre de exotoxinas e endotoxinas.¹ A leitura de seus códons é notavelmente diversificada e contribui para a expressão de genes heterólogos que não dependem de etapas adicionais.² As aplicações do *Bacillus subtilis* incluem fermentação de alimentos, estudos de divisão celular, desenvolvimento de biofilmes, produção de metabólitos secundários e também é um hospedeiro potencial para a produção de vacinas e um veículo de entrega.^{3,4,5,6,7}

Além disso, se estabeleceu como um robusto hospedeiro de células e uma plataforma tecnológica eficiente para a expressão e produção de proteínas bioativas de alto rendimento, com o potencial escalonamento em biorreator. O principal desafio na produção de proteínas recombinantes em *B. subtilis* é o de como escolher um sistema de expressão relevante.⁸ Diferentes sistemas de expressão já foram desenvolvidos e proteínas de organismos procarióticos ou eucarióticos foram sintetizadas e purificadas.⁹ A melhor estratégia depende da proteína a ser expressa, embora sempre com o objetivo de redução de custos e eficiência na produção.¹⁰ Novas estratégias incluem o uso de promotores constitutivos, promotores duplos, sintéticos funcionais capazes de dirigir a transcrição, peptídeos sinais eficientes e sistemas de expressão induzíveis e autoinduzíveis.^{11,12}

Estas características melhoradas, juntamente com a crescente demanda por produtos biotecnológicos, contribuem para o aumento do uso desta bactéria, endossando assim sua aplicação no campo da engenharia genética e metabólica.^{13,14} Desde o primeiro relatório de superprodução heteróloga de proteínas recombinantes nesta cepa, a produção em massa de uma infinidade de moléculas valiosas tem sido realizada em uma escala relativamente grande.¹⁵

Reconhecendo a importância da engenharia metabólica, da biologia sistemática, da biologia sintética e da engenharia baseada na evolução em *B. subtilis*, esta revisão primeiro resume a importância do conhecimento técnico e da construção de cepas melhoradas adequadas para a produção industrial. Em seguida, apresentamos uma visão geral dos sistemas de secreção de *B. subtilis* e seu papel crucial na produção de proteínas heterólogas. Finalmente, revisamos a versatilidade da aplicação de promotores e outros mediadores de expressão como estratégias que visam à eficiência da produção e também avanços recentes na construção de vetores de expressão sem indutores.

Portanto, esta revisão abrange os mais recentes e principais sistemas de expressão desenvolvidos em *B. subtilis* e as estratégias inerentes à multivalência desta plataforma de expressão e confirma sua ampla capacidade e seu reconhecimento como um importante hospedeiro na moderna indústria biotecnológica. O levantamento bibliográfico das publicações indexadas foi realizado utilizando as bases de dados PUBMED, Google Scholar, e "Periódico Capes". Somente publicações em língua inglesa de 2015 a 2020 foram incluídas. As palavras-chave utilizadas para a pesquisa foram "*Bacillus subtilis*", "Expression Systems", "Promoters", "Induction", "Self-induction" e "Recombinant proteins".

A plataforma de expressão *B. subtilis*

B. subtilis é constantemente referido como um sistema de referência e uma coleção de conhecimentos bioquímicos, genéticos e fisiológicos de bactérias gram-positivas.¹⁶ Seu sequenciamento foi realizado por Kunst e colaboradores em 1997 utilizando a cepa 168 e envolveu mais de 30 laboratórios em todo o mundo.¹⁷ Posteriormente, outros grupos de pesquisa realizaram um sequenciamento completo do genoma que incluiu critérios que garantiram a caracterização de seus genes e produtos.¹⁸

Centros de preservação bacteriana em todo o mundo conservaram numerosas cepas de *B. subtilis*, incluindo as cepas auxotróficas 23, 122, 160, 166 e 168, que foram derivadas originalmente de *B. subtilis* Marburg.¹⁹ A cepa 168 tem sido amplamente utilizada em pesquisa acadêmica e produção industrial.²⁰ Dada a disponibilidade de um número crescente de vetores de clonagem e linhagens hospedeiras mutantes que são fornecidas pelo Bacillus Genetic Stock Center (BGSC)²¹, muitas cepas podem ser transformadas utilizando engenharia metabólica sistemática para obter cepas mutantes que atendam aos requisitos de produção.²² Por exemplo, *B. subtilis* WB600 e *B. subtilis* WB800 foram construídas a partir de *B. subtilis* 168, eliminando seis e oito genes de protease, respectivamente.^{20,23} Embora algumas proteases possam ser de interesse para a indústria, sua atividade geralmente limita a eficiência geral da produção de proteínas heterólogas.²³ No entanto, o uso dessas cepas torna-se atraente, pois resolve parcialmente o problema da proteólise das proteínas alvo secretadas.²⁴

O surgimento de poderosas ferramentas genéticas culminaram no aumento da popularidade de *B. subtilis*, principalmente no segmento industrial.²⁵ É um dos hospedeiros bacterianos mais frequentemente utilizados para produzir proteínas recombinantes de alto valor.²⁶ Além disso, houve um aumento sem precedentes no número de moléculas produzidas neste modelo, o que lhe conferiu um papel proeminente na produção industrial de proteínas em todo o mundo e transformou *B. subtilis* na espécie mais estudada do gênero *Bacillus*.²³ Vários exemplos são mostrados na Tabela 1.

A produção de algumas classes de proteínas pode ser difícil, por exemplo, quando se trata de proteínas com múltiplas subunidades ou com um alto peso molecular que enfrenta problemas relacionados ao transporte através da membrana celular. Isto requer o uso de rotas de transporte alternativas cujos mecanismos determinantes relacionados a estes tipos de rotas não-clássicas ainda são limitantes e pouco claros.^{65,66}

Tabela 1- Sistemas de expressão utilizando *Bacillus subtilis* entre os anos de 2015 a 2020.

Promotor	Tipo	Plasmídeo	Indutor	Hospedeiro	Proteína recombinante	Concentração obtida	Referências
P ₄₃	Constitutivo	pHT01	Não	<i>B. subtilis</i> WB800N	Trealose sintetase (TreS)	23080.6 ± 1119.4 U/L	Liu <i>et al.</i> [2019] ²⁷
P ₄₃	Constitutivo	pWB980-mt2938	Não	<i>B. subtilis</i> SCK6	Tripsina (GM2938)	1622.2 U/mL	Wang <i>et al.</i> [2019] ²⁸
P ₄₃	Constitutivo	pUC980-2	Não	<i>B. subtilis</i> WB600	Protease alcalina (spro1)	504 U/mL	Zhao <i>et al.</i> [2020] ²⁹
P ₄₃	Constitutivo	pP43NMK	Não	<i>B. subtilis</i> WB600	l- asparaginase	374.9 U/ml	Feng <i>et al.</i> [2019] ³⁰
P ₄₃	Constitutivo	Pma0911	Não	<i>B. subtilis</i> WB600	Pullulanase	24.5 ± 0.3 U/mL	Songet <i>et al.</i> [2016] ³¹
P _{HpaII}	Constitutivo	pHT43	Não	<i>B. subtilis</i> 168 (ATCC 33,712)	Transglutaminase microbiana	63.0 ± 0.6 mg/L	Mu <i>et al.</i> [2018] ³²
P _{ylb}	Constitutivo	pubc19	Não	<i>B. subtilis</i> WB600	Pullulanase Organophosphorus	N/A N/A	Yu <i>et al.</i> [2015] ³³
P _{srfA}	Autoinduzível	pBSG03	Glicose	<i>B. subtilis</i> 168	Aminopectidase	87.89 U/mL	Guan <i>et al.</i> [2015] ³⁴
P _{aprE}	Constitutivo	pMA5	Não	<i>B. subtilis</i> 1A751	α-Amilase	1,089 U/mL	Chen <i>et al.</i> [2015] ³⁵
P _{HpaII} -P ₄₃	Dual promoter constitutive	Pub110	Não	<i>B. subtilis</i> 1A751	d-Psicose 3-epimerase	N/A	He <i>et al.</i> [2016] ³⁶
P _{HpaII} -P _{amyQ}	Dual promoter	pCGTd4	Não	<i>B. subtilis</i> CCTCC M 2,016,536	β-ciclodextrina glicosiltransferase	571.2 U/mL	Zhang <i>et al.</i> [2017] ³⁷
P _{grac100}	Induzível	pHT100	IPTG	<i>B. subtilis</i> 1012	β-Galactosidase	37,840 MillerUnits	Phan <i>et al.</i> [2015] ³⁸
P _{sacB}	Induzível	pMA0911	Sacarose	<i>B. subtilis</i> WB800	Pullulanase	26.5 U/mL	Deng <i>et al.</i> [2018] ³⁹

P_{Hpall}	Constitutivo	pMA5	IPTG	<i>B. subtilis</i> 1A751P7	DSM13 mannan endo-1,4-mannosidase	2207 U/mL	Song <i>et al.</i> [2017] ⁴⁰
P_{AE}	Constitutivo	pHP13L	Não	<i>B. subtilis</i> BNA	lipase LipA	287.8 U ml ⁻¹	Ma <i>et al.</i> [2018] ⁴¹
P_{Hpall}	Constitutivo	pMA5	Xilose	<i>B. subtilis</i> 1A237	AmyL; AmyS	1,352 and 2,300 U/mL	Chen <i>et al.</i> [2015] ⁴²
P_{T7}	Constitutivo	pDMT1	Não	<i>B. subtilis</i> PT5	Fator de crescimento epidérmico humano (hEGF)	360 ± 9.41 mg/L	Su <i>et al.</i> [2020] ⁴³
P_{veg}	Constitutivo	pJOE-8739	Glicose	<i>B. subtilis</i> 168	Ácido poli- γ -glutâmico	0.131 C-mol C-mol ⁻¹	Halmschlag <i>et al.</i> [2020] ⁴⁴
P_{luxR} and P_{luxI}	Autoinduzível	pBS3Clux	Não	<i>B. subtilis</i> K07	Riboflavina	OD ₆₀₀ = 0.5	Correa <i>et al.</i> [2020] ⁴⁵
$P_{amyE-cdd}$	Promotor duplo	pBShdd2-20	Não	<i>B. subtilis</i> WB800 w	Amidase (Bm-Ami)	10.72 U mg ⁻¹	Kang <i>et al.</i> [2020] ⁴⁶
P_{glv}	Induzível	pUC57-T9W	Maltose	<i>B. subtilis</i> WB800 N	T9W	256 μ M	Zhang <i>et al.</i> [2019] ⁴⁷
P_{vl}	Constitutivo	pBSG03	Não	<i>B. subtilis</i> 168	Aspartase (aspA)	13.11 U/mL	Han <i>et al.</i> [2017] ⁴⁸
P_{gsiB} - P_{Hpall}	Promoto duplo	pBSG24-YncM	Não	<i>B. subtilis</i> WB600	Aminopectidase (AP)	205 U/mL	Guan <i>et al.</i> [2016] ⁴⁹
P_{tetR}	Induzível	pKAM218	Anidotetraciclina	<i>B. subtilis</i> 3NA	Neopullulanase	45 U/mg	Heravi <i>et al.</i> [2015] ⁸
$P_{43'}$ - $riboEI$	Induzível	pUC57A. pUC57B	Teofilina	<i>B. subtilis</i> 168	β -glucuronidase	7.5 U/mL	Cui <i>et al.</i> [2016] ⁵⁰
P_{grac}	Constitutivo	pHT43	IPTG	<i>B. subtilis</i> SCK6 and WB600	rhBMP2	200 ng/ml	Hanif <i>et al.</i> [2017] ¹⁰
P_{grac}	Constitutivo	pHT01	IPTG	<i>B. subtilis</i> WB800	StrepII-SUMO-PhoA	10 mg	Heinrich <i>et al.</i> [2019] ⁵¹

P_{groE}	Constitutivo	pHT43	IPTG	<i>B. subtilis</i> WB800N	Nanocorpos	15 to20 mg	Yang <i>et al.</i> [2020] ⁵²
P_{groES}	Constitutivo	p18	IPTG	<i>B. subtilis</i> K07	MAK33-VL	2 mg L ⁻¹	Scheidler <i>et al.</i> [2020] ⁵³
P_{glv}	Induzível	pGJ148	Maltose	<i>B. subtilis</i> WB800N	Cecropin AD	26.4 mg/L	Zhang <i>et al.</i> [2020] ⁵⁴
P_{glv}	Induzível	pGJ148	Maltose	<i>B. subtilis</i> WB800N	PR-FO	7 mg	Zhang <i>et al.</i> [2020] ⁵⁵
P_{vyvD}	Constitutivo	pWB980	Não	<i>B. subtilis</i> WB600	Transglutaminase (TG)	2.6 U/mg	Fu <i>et al.</i> [2020] ⁵⁶
P_{srfA}	Autoinduzível	pMA09	Não	<i>B. subtilis</i> 168	8BMP	3.16 g/L	Sun <i>et al.</i> [2020] ⁵⁷
P_{T7}	Constitutivo	pP 43	Não	<i>B. subtilis</i> WB800	Pullulanase	2.74 mg mL ⁻¹	Pang <i>et al.</i> [2020] ⁵⁸
P_{opuAA}	Induzível	pSaltExSePR 5	Sal	<i>B. subtilis</i> WB800	GFP	9.1 U/ml	Promchai <i>et al.</i> [2016] ⁵⁹
P_{hpaII}	Constitutivo	pMD18-T	Não	<i>B. subtilis</i> 168	L- teanina	53 g l ⁻¹	Yang <i>et al.</i> [2019] ²⁴
P_{aprE}	Constitutivo	pBE-S	Não	<i>B. subtilis</i> pBE-AgaA7	AgaA7	1.27 µg	Ramos <i>et al.</i> [2016] ⁶⁰
$P_{grac 212}$	Induzível	pHT399	IPTG	<i>B. subtilis</i> 1012	HRV3C	8065 U/mg	Le <i>et al.</i> [2019] ⁶¹
P_{glv}	Induzível	pMA5	Maltose	<i>B. subtilis</i> 1A751	Creatinase	141.9 U/mL	Tao <i>et al.</i> [2020] ⁶²
P_{BH4}	Constitutivo	pBBH4-GusA and pBBH4-NK	Não	<i>B. subtilis</i> 3NA	β-glucuronidase (GusA) e Nattokinase (NK)	8.9 ± 0.1 U/mL and 437.2 ± 15.8 FU/mL	Han <i>et al.</i> [2019] ⁶³
P_{Bsamy} - P_{Baamy}	Promotor duplo	pWBPRO1	Não	<i>B. subtilis</i> WB600	Serina protease alcalina (BcaPRO)	27.860 U/mL	Liu <i>et al.</i> [2019] ⁶⁴

As sequências de genes sintéticos também precisam ser otimizadas para alcançar a melhor expressão possível⁶⁷, uma vez que, da mesma forma que ocorre em outras espécies, alguns códons são raramente utilizados, e a seleção de códons sinônimos é restrita pela eficiência da tradução. Os genes altamente expressos são quase sempre mais dependentes do conteúdo de tRNA e tendem a ter uma forte preferência para o uso de códons.^{68,69} Do ponto de vista estrutural, ao contrário de outros hospedeiros bacterianos, *B. subtilis* não possui uma membrana externa ou espaço periplasmático, o que lhe confere uma maior capacidade de secreção de proteínas diretamente em seu ambiente circundante.²⁰ E com base em estudos de análise proteômica, *B. subtilis* já demonstrou o potencial de exportar aproximadamente 300 proteínas.⁷⁰

O sistema de secreção em *B. subtilis*

As etapas para produzir proteínas recombinantes em *Bacillus subtilis* são relativamente simples (Figura 1A). Para garantir que as proteínas sejam corretamente direcionadas para as vias e assim iniciar o processo de translocação, um peptídeo sinal específico está presente no terminal N de cada proteína e deve ser clivado por uma peptidase para posterior liberação da proteína madura a ser exportada para o meio, podendo ser retida na parede celular ou retida na interface da membrana celular.^{71,70} *B. subtilis* contém um rigoroso sistema de controle de qualidade para proteínas dependentes de sua maquinaria e realizado por chaperonas intracelulares e extracelulares, proteases de parede celular e proteases extracelulares.^{72,20} Vários sistemas diferentes de exportação de proteínas foram identificados nesta bactéria até agora.⁷³

O sistema de transporte dependente da via de secreção geral (Sec) e o sistema de translocação "*Twin-arginine*" (Tat) são geralmente estudados e utilizados para a secreção de proteínas recombinantes no meio extracelular em *B. subtilis*.^{20,25} A via de secreção geral (Sec) (Figura 1B) inclui componentes que convertem energia na forma de ATP e usa prótons transmembrana como força motriz para direcionar proteínas através de canais incorporados na membrana.⁷⁴ O sistema de secreção geral (SeC) é considerado a via principal para a secreção de proteínas no meio de crescimento e tem a característica de transportar proteínas através da membrana citoplasmática em uma conformação desdobrada ou fracamente dobrada.^{75,76}

No modo de exportação co-tradução, a proteína é sintetizada ribossomicamente como uma proteína precursora contendo um peptídeo sinal na região N-terminal, sendo auxiliada a manter seu estado competente de translocação por chaperonas citoplasmáticas, com o

subsequente reconhecimento do peptídeo sinal pela partícula de reconhecimento de sinal (SRP), bem como o direcionamento pelas translocases de membrana.⁷⁷ O direcionamento da pré-proteína por este complexo SRP também envolve a presença da proteína FtsY, uma GTPase altamente conservada que também atua no direcionamento pelos canais transmembranares de SecYEG.⁷⁸ Desta forma, a lipoproteína PrsA é necessária para a posterior dobra da proteína madura, e na assistência para proporcionar estabilidade e evitar interações não produtivas com a parede celular.⁷⁹ Em outra estratégia no modo de exportação pós-tradução, SecA transfere as proteínas precursoras para o canal de translocação da membrana, depois a proteína motora SecA transloca as pré-proteínas através de SecYEG utilizando a energia metabólica da hidrólise de ATP.⁸⁰

Em Tat, (Figura 1C) antes da translocação da proteína recombinante através da membrana citoplasmática, elas se dobras completamente no citoplasma com a ajuda de chaperonas intracelulares, em uma estratégia capaz de reduzir a degradação proteolítica.²¹ Por outro lado, na via dependente do Tat, as proteínas secretadas geralmente contêm um peptídeo sinal típico altamente conservado que afeta diretamente a secreção.⁸¹

A proteína precursora fortemente dobrada por acompanhantes intracelulares é transportada por um canal formado pelo complexo translocase.⁸² Em *B. subtilis*, dois sistemas separados de translocação trabalham em paralelo: TatAdCd e TatAyCy. TatAdCd é expresso como uma translocase, enquanto TatAyCy é expresso constitutivamente.^{71,20} TatAd e TatCd combinam-se para formar o complexo TatAdCd enquanto TatAy e TatCy formam o complexo TatAyCy.

Como mostrado na Figura 1D, as proteínas também podem ser exportadas para o meio através dos transportadores de cassetes de ligação ATP (ABC).⁸³ Em contraste, (Figura 1E) pequenos números de proteínas são exportados pela rota de exportação da pseudopilina (Com).⁷³

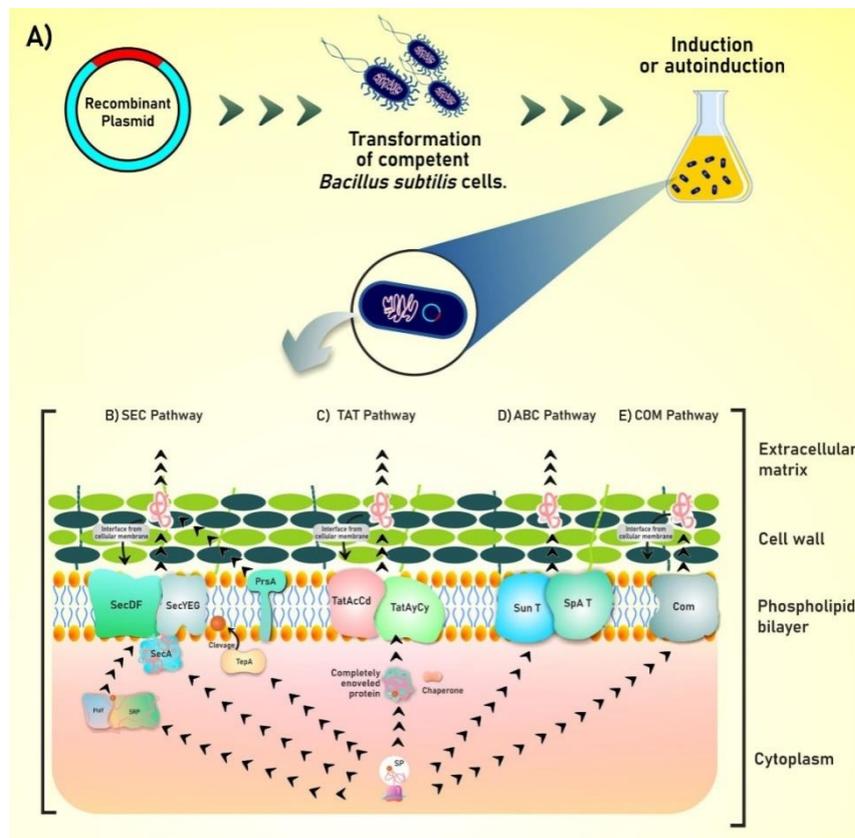


Figura 1. Etapas para expressão heteróloga em *B. subtilis* e as quatro vias de exportação de proteínas através da membrana citoplasmática. A): Ligação do gene de interesse a um vetor de expressão, transformação de células competentes e subsequente indução ou autoindução da expressão. B): Na via Sec, a proteína precursora contendo um peptídeo sinal é reconhecida pela partícula de reconhecimento de sinal (SRP) e interage com a proteína FtsY, direcionando a proteína para as translocases de membrana (SecA, SecDF e SecYEG). A TepA cliva o peptídeo sinal e a lipoproteína PrsA auxilia no enovelamento da proteína. Outra forma de transporte é por meio de um SecA solúvel que orienta a proteína até os canais de translocação, com posterior retirada do peptídeo sinal. C): Na via Tat, a proteína se dobra inteiramente no citoplasma com o auxílio de acompanhantes, sendo conduzida a dois sistemas de translocação diferentes (TatAcCd e TatAyCy). D): Na via ABC, as proteínas podem utilizar os sistemas de exportação Sun T e SpaA T para facilitar sua secreção. Essas duas classes de translocadores têm uma função dupla: atividade proteolítica além da atividade de transporte. E): Na via de exportação da pseudopilina (Com), as proteínas são exportadas de forma específica e podem ser retidas na interface da parede da membrana celular.

Os promotores constitutivos em *B. subtilis*

Notavelmente, muitos esforços têm sido feitos para identificar promotores fortes para o controle da transcrição. Neste sentido, o P_{43} é um promotor que atende a estes requisitos e é amplamente utilizado. O P_{43} foi descrito pela primeira vez nos estudos de Wang e Doi em 1984 e melhor caracterizado por Song e Neuhard em 1989.^{84,85} Já foi usado para produzir metil paration hidrolase (MPH), onde uma alta expressão e secreção de MPH maduro foi alcançada.^{86,87}

Em um estudo recente, o promotor P₄₃ foi fundido com sucesso com outros promotores para construir uma série de plasmídeos para estender a triagem de peptídeos sinais (SPs) e para obter promotores adequados para a secreção de BcaPRO (serina protease alcalina) de *B. clausii*. O peptídeo sinal "DacB" e o promotor duplo "P_{Bsamy}-P_{Baamy}" demonstraram o melhor desempenho, com um alto nível de expressão de BcaPRO (27.860 U/mL).⁶⁴ Liu et al.²⁷ regularam a atividade extracelular da enzima TreS (trealose sintase) usando o promotor P₄₃ para produzir trealose, um dissacarídeo estável não redutor. Neste estudo, um mutante TreS foi expresso e secretado com sucesso em *B. subtilis* WB800N.²⁷ Atualmente, o P₄₃ é usado regularmente em estudos comparativos para medir a força de diferentes promotores em *B. subtilis*, mostrando que, embora novos promotores mais fortes possam ser identificados, ele é um parâmetro importante para estudos envolvendo a triagem de promotores para a melhoria das condições de fermentação e níveis de expressão.^{28,29}

Vários outros promotores foram caracterizados para aumentar a expressão heteróloga em *B. subtilis*. Estas caracterizações surgem do acúmulo de informações genéticas, bioquímicas e estruturais sobre o mecanismo molecular subjacente ao estímulo do promotor.⁸⁸ É importante enfatizar que promotores fortes são necessários uma vez que suas características levam a uma transcrição mais eficiente dos genes que codificam a proteína de interesse. Seo e Schmidt-Dannert em 2019 utilizaram o forte promotor P_{veg} em combinação com elementos reguladores de *Pseudomonas putida* para investigar e controlar a expressão da proteína fluorescente verde (GFP) em *B. subtilis*.⁸⁹ Este novo sistema provou ser promissor e útil para estudos de engenharia metabólica, biologia sintética e produção de proteínas de interesse industrial.⁸⁹

Como resultado de numerosos estudos, o repertório de técnicas se expandiu, e a melhoria da eficiência dos promotores via integração cromossômica se tornou uma opção. Por exemplo, Zhou et al.⁹⁰ melhoraram a atividade do promotor P_{ylb}, e otimizaram a região central - 35, - 10, e a sequência a montante (UP), substituindo ambas as sequências por sequências de consenso.⁹⁰ O promotor final exibiu quase 26 vezes a atividade da β-galactosidase (BgaB) e 195 vezes a intensidade da proteína fluorescente verde superdobrada (sfGFP).

Os promotores duplos em *B. subtilis*

Outra abordagem promissora para aumentar a produtividade que recebeu ampla atenção devido a sua alta eficiência e continuidade é o uso de promotores duplos.⁹¹ No estudo de Guan et al.⁴⁹, foram alcançados resultados satisfatórios com o promotor duplo P_{gsiB}-P_{HpaII},

que mostrou melhor desempenho e aumentou a produção de aminopeptidase (AP) após 45 horas de fermentação. Outro sistema com promotor duplo que apresentou notável aplicabilidade foi o P_{HpalI} - P_{amyQ} , que produziu β -cyclodextrina glicosiltransferase (β -CGTase), e mediou a expressão de pululanase extracelular substancial e a expressão de α -cyclodextrina glicosiltransferase (α -CGTase).³⁷

Estas enzimas também foram produzidas usando o promotor triplo $P_{sodA-fusA-amyE}$.^{92,93} Kang et al.⁴⁶ usaram um sistema contendo um promotor duplo $P_{amyE-cdd}$ e um peptídeo sinal (Pac) para aumentar a expressão de uma amidase recombinante (Bm-Ami). A atividade extracelular de Bm-Ami contendo o plasmídeo pBSHdd2-20 atingiu 10,72 U/mg-1 DCW após 52 horas em uma fermentação em escala que, de acordo com os autores, foi a maior secreção obtida de Bm-Ami até hoje.⁴⁶

Os promotores sintéticos funcionais em *B. subtilis*

Uma técnica que tem se mostrado útil é o desenvolvimento de promotores sintéticos funcionais. Os promotores sintéticos são mais resistentes a condições de crescimento imperfeitas, como processos biotecnológicos que causam estresse celular ou carga metabólica e geram uma forte transcrição dos genes alvo.⁹⁴ Isto os torna uma alternativa importante, uma vez que os promotores naturais muitas vezes não são universalmente caracterizados devido a seu fraco desempenho.⁹⁵

Han et al.⁶³ desenvolveram uma nova estratégia chamada evolução gradual para a triagem de promotores bacterianos robustos em *B. subtilis*. O promotor mutante P_{BH4} foi identificado e verificado como um promotor sintético excepcionalmente forte. Neste mesmo estudo, esta técnica foi utilizada com sucesso para aumentar a força do promotor constitutivo P_{yIbPE} do promotor indutivo por xilose P_{xylA} e provou ser um novo método para a fabricação e triagem de promotores.⁶³

Os promotores dependentes de indutor em *B. subtilis*

O primeiro sistema de expressão induzível relatado em *B. subtilis* foi descrito após os estudos pioneiros de Yansura e Henner em 1984, nos quais o promotor *spac* foi induzido por isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG).⁹⁶ Este sistema é uma combinação de um promotor de fago de *B. subtilis* SPO-1 e o operador *lac* de *E. coli* que desativa o repressor *lac* produzido constitutivamente.⁸

Yang et al.⁵² transformaram a cepa modificada WB800N com o vetor pHT43, que continha um promotor forte derivado do operon *groE* de *B. subtilis* convertido em um promotor indutível por IPTG.⁵² Este estudo relatou pela primeira vez a secreção de fragmentos de anticorpos somente de cadeia pesada ou nanocorpos de camelídeos. Os rendimentos de nanocorpos foram estimados em 15 a 20 mg de um litro de cultura bacteriana, que é comparável aos rendimentos em sistemas de produção de nanocorpos em *E. coli* (15 a 20 mg).⁹⁷

Scheidler et al.⁵³ foram os pioneiros no desenvolvimento de um sistema eficiente de supressão de âmbar em *B. subtilis* usando IPTG como indutor. Este sistema permite a expressão, secreção e purificação direta de uma proteína alvo contendo aminoácidos não canônicos (ncAAs). Os autores expressaram o domínio variável da cadeia leve de um fragmento de anticorpo monoclonal murino (MAK33-VL) e obtiveram 2 mg L⁻¹ de cultura. O sistema de expressão relatado cria a possibilidade de produzir proteínas terapêuticamente e biotecnologicamente significativas contendo grupos bio-ortogonais sujeitos a decoração química.⁵³

Le et al.⁶¹ usaram o promotor robusto P_{grac212}, induzível por IPTG, para superexpressar a protease 3C de rinovírus humano (HRV3C) no citoplasma de células de *B. subtilis*. No estudo, as proteases His-HRV3C e His-GST-HRV3C foram superexpressas no citoplasma em 11% e 16% do total de proteínas celulares, respectivamente. As maiores atividades de protease específica foram 8065 U/mg para His-HRV3C.⁶¹, o que indica que é um método eficaz para a produção de proteínas recombinantes no citoplasma de *B. subtilis*.

Embora o indutor IPTG tenha sido amplamente utilizado, modelos com outros indutores químicos, como os carboidratos sacarose, manose, xilose, maltose e amido, foram desenvolvidos e são considerados eficientes e baratos. O indutor IPTG não é consumido por bactérias e esta é uma vantagem sobre outros promotores induzíveis por carboidratos, como P_{malA}, P_{manP} e P_{mtlA}.^{98,99,100} No entanto, em alguns casos onde as cepas construídas, podem usar apenas glicose em detrimento de outras fontes de carbono, este carboidrato é atraente no contexto da regulação metabólica e engenharia.⁴⁴

No caso do promotor P_{glv} induzível por maltose, que foi usado para secretar T9W, uma variante do antimicrobiano mieloide de porco 36 (PMAP 36) com alta atividade antimicrobiana, este sistema provou ser uma abordagem econômica e ambientalmente correta para a produção biotecnológica.⁴⁷ Além disso, a maltose foi igualmente utilizada como indutor

em um método seguro para produzir Cecropin AD (CAD), um peptídeo híbrido com atividade biológica.⁵⁴

Outros sistemas de indução importantes são aqueles em que a indução é baseada no peptídeo sinal, como o sistema LIKE (“*Lla-Kontrollierte Expression*”) que é baseado no promotor *lial*, e o sistema SURE (gene regulado por subtilina). Ambos os sistemas são estritamente controlados pela adição de bacitracina e subtilina lantibiótica após a fase exponencial de crescimento celular, evitando assim o vazamento da transcrição em condições não indutivas.

Estudos envolvendo o peptídeo sinal têm se tornado cada vez mais viáveis, uma vez que esse mecanismo pode guiar a secreção da proteína heteróloga para uma área específica com mais precisão e, assim, aumentar efetivamente a solubilidade da proteína.⁵⁵ Estudos anteriores mostraram que os peptídeos sinal SP *sacB*, SP *amy*, SP *aprs* e SP *aprl* guiaram simultaneamente a expressão de pululanase.¹⁰² Su et al.⁴³ descreveram seis SPs para guiar a secreção do fator de crescimento epidérmico humano (hEGF). O maior nível de produção foi obtido quando o gene hEGF foi fundido com SP *xynD* ($360 \pm 9,41$ mg / L), o que revelou um excelente sistema para a expressão de proteínas de interesse cosmético e farmacêutico.⁴³

Heinrich et al.⁵¹ identificaram uma região codificadora do peptídeo sinal com alta capacidade de expressão e secreção de proteínas. Com base no plasmídeo pHT01, um vetor de expressão foi construído para codificar uma proteína de fusão. O cassete construído neste estudo demonstrou grande eficiência na codificação do peptídeo sinal YoaW-StrepII-SUMO em *B. subtilis* e deu origem a um sistema capaz de maximizar o rendimento, bem como melhorar a translocação, dobramento e estabilidade de proteínas heterólogas.

Os sistemas de expressão induzíveis controlados por riboswitches em *B. subtilis*

Como indutores conhecidos, há uma variedade de riboswitches sintéticos que foram desenvolvidos para controlar a expressão heteróloga e que representam alvos de engenharia relevantes para a produção biotecnológica de compostos.^{103,104} Nessa perspectiva, um sistema com grande compatibilidade e robustez foi obtido nos estudos de Cui et al.⁵⁰, em que um novo elemento genético composto pelo promotor P₄₃ e uma teofilina-riboswitch foi desenvolvido e caracterizado em *B. subtilis* a partir da união das características constitutivas do P₄₃ para um padrão dose-dependente induzido por teofilina.⁵⁰ Os autores observaram que o sistema superexpressou β-glucuronidase com um nível de expressão induzida superior a três outros promotores constitutivos fortes, incluindo P_{srfA}, P_{aprE} e o P₄₃ nativo.

Os promotores de ativação condicional em *B. subtilis*

Um dos sistemas de indução mais simples já descritos são os controlados por mudança de temperatura. Li et al.¹⁰⁵ caracterizaram dois promotores sensíveis à temperatura, P₂ e P₇, isolados de *B. subtilis*. A produção de β-galactosidase conduzida por esses promotores foi maior a 45 °C do que a 37 °C. Em um estudo posterior, com o objetivo de melhorar a superprodução de proteínas “difíceis de expressar”, Welsch et al.¹⁰⁶ desenvolveram um sistema de expressão de baixa temperatura em *B. subtilis* que foi baseado no promotor induzível pelo frio do gene *des*. O sistema de expressão melhorado foi validado pela superprodução de xilanase, bem como de uma α-glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae*, confirmando a adequação desse organismo hospedeiro para a superprodução de substâncias críticas.

Recentemente, os sistemas de expressão autoinduzíveis têm atraído mais atenção devido à praticidade de seus serviços.^{94,107} Promotores autoinduzíveis, como P_{pst} e P_{cry3Aa} podem expressar o gene alvo desde a fase log tardia até a fase estacionária sem a necessidade de um indutor, o que facilita a produção eficiente de proteínas e peptídeos de baixo custo.^{57,108} Um sistema de autoindução independente de indutor foi desenvolvido por Wenzel et al.¹⁰⁹ usando a cepa mutante TQ356 para melhorar ainda mais a eficiência de custo e o rendimento do produto. Nesse sistema, a glicose evitou a indução por meio da repressão pelo catabolismo de carbono, criando condições ideais para a autoindução. Esta técnica levou a um aumento de quase três vezes na produção e atingiu um rendimento de 14,6% de proteína recombinante (eGFP).¹⁰⁹

Guan et al.³⁴ construíram um sistema de expressão autoindutor e autoregulador simplesmente adicionando glicose, usando o promotor relacionado à detecção de quorum (P_{srfA}). Nesse caso, a sequência central de -10 e -35 foi substituída por sequências de consenso. No final, o sistema provou sua eficiência pela produção bem-sucedida de aminopeptidase. Em estudos posteriores, Guan et al.¹¹⁰ demonstraram que é possível integrar os genes correspondentes a jusante do promotor no plasmídeo ou cromossomo na cepa BSG1682 de *B. subtilis*. Os resultados revelaram que o promotor P₂₃, derivado do promotor P_{srfA}, apresentou o melhor desempenho, sendo quase duas vezes mais forte que o P_{srfA}. Duas proteínas heterólogas, aminopeptidase (AP) e nattoquinase (NK) foram superproduzidas neste estudo.¹¹⁰

Além disso, Correa et al.⁴⁵ desenvolveram um método de regulação dinâmica por meio da detecção de quorum em *B. subtilis*, que era capaz de se automonitorar e induzir a expressão

sem supervisão humana. A resposta do promotor foi 2,5 e 3,2 vezes mais forte do que os promotores bem caracterizados P_{srfA} e P_{veg} , respectivamente. Os pesquisadores até aplicaram o dispositivo de autoindução mais forte para produzir vitamina B2 e a autoindução provou ser modular e ajustável.⁴⁵ Além disso, Correa et al.¹¹¹ apresentaram um conjunto de dados para analisar diferentes parâmetros de crescimento de OD600, medição de fluorescência de GFP, luminescência e produção de riboflavina. O objetivo desta validação foi apoiar a eficiência deste dispositivo autoindutor para a expressão e controle de genes em *B. subtilis*.¹¹¹

Os vetores de expressão livres de indutor com base em P_{grac}

O estudo de vetores de expressão sem indutor ainda é um desafio devido a uma série de gargalos na produção industrial, mas já existem alguns estudos promissores investigativos.¹¹² A esse respeito, Tran et al.¹¹³ geraram vetores de expressão livres de indutor usando promotores induzíveis por IPTG na ausência do repressor *LacI* e contendo o promotor forte $P_{grac100}$. Os níveis de expressão de β -galactosidase (gene *bgaB*) foram pelo menos 37 vezes maiores quando comparados às construções induzíveis na ausência de IPTG. Esses plasmídeos também podem ser convenientes para estudar a expressão gênica em diferentes escalas para a produção de proteínas recombinantes.¹¹³

Tran et al.¹¹⁴ demonstraram o grande potencial do uso de promotores fortes da família P_{grac} na superprodução de proteínas recombinantes por meio da construção de vetores livres de indutores, capazes de se integrar ao genoma de *B. subtilis* tanto no locus *lacA* quanto no locus *amyE*. Neste estudo, os promotores $P_{grac 100-bgaB}$ e $P_{grac 212-bgaB}$ renderam 20,9% e 42% de proteínas intracelulares, respectivamente. Assim, após a incorporação de $P_{grac 212-bgaB}$ nos locus *amyE* e *lacA*, a expressão de β -galactosidase (BgaB) foi observada em até 53,4% das proteínas intracelulares.¹¹⁴

Em outra estratégia que visa apoiar pesquisas fundamentais em *B. subtilis*, Chu et al.¹¹⁵ construíram plasmídeos de expressão livres de indutor contendo o promotor híbrido P_{spac} , induzível por IPTG, adequado para expressar de forma controlada e em níveis mais baixos proteínas com funções específicas na célula hospedeira e genes repórter. Como esperado, os genes alvo *BgaB* e *GFP* + foram expressos em níveis baixos em comparação com plasmídeos livres de indutor com os promotores fortes P_{grac01} e $P_{grac100}$, cerca de 16,2 a 20,3 vezes para *BgaB* e 24,7 a 34,3 vezes para *GFP* +, respectivamente. Os autores concluíram que o uso desses vetores livres de indutor contendo o promotor P_{spac} possibilitou a

expressão constitutiva de proteínas recombinantes heterólogas em baixos níveis desejados em *B. subtilis*.¹¹⁵

Conclusões

Em resumo, a literatura consultada amplia o conhecimento sobre os sistemas de expressão funcional comercialmente disponíveis e desenvolvidos a partir de diferentes linhagens de *Bacillus subtilis*. Constatamos a existência de um grande arsenal de precursores e estudos recentes que credenciam esta bactéria como uma das principais plataformas para a expressão de proteínas heterólogas, promovendo assim o progresso na bioprodução. Além disso, sua ampla utilização se justifica devido às suas características genéticas e metabólicas que permitem um planejamento adequado e proporcionam segurança experimental. O sucesso desse modelo na expressão de biocompósitos se deve ao desenvolvimento de estratégias massivas que visam criar e garantir constantemente a eficiência de seus promotores, plasmídeos, uso de indutores variados de baixo custo e elementos autoreguladores transcricionais, entre outros. Com isso, o alto status tecnológico alcançado incentiva cada vez mais o aprimoramento das técnicas de engenharia genética existentes, bem como a busca pelo desenvolvimento de novas abordagens eficientes, o que torna a bactéria gram-positiva *B. subtilis* um hospedeiro robusto e promissor com excelência biotecnológica para a expressão ótima de diferentes proteínas recombinantes com aplicações valiosas. Embora os avanços nos estudos ônicos sejam claros e decisivos para a afirmação deste hospedeiro biotecnológico robusto, e muitas estratégias tenham culminado na expressão de várias proteínas recombinantes, estudos futuros precisam se concentrar em superar muitas limitações em relação ao entendimento e exploração das vias de secreção. Devem ser desenvolvidas novas estratégias para superar os gargalos atuais, por exemplo, expressão de proteínas de subunidades múltiplas de importância médica e industrial.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Todos os autores participaram da concepção e revisão do manuscrito. CCS, LAMM e SDSP realizaram a revisão da literatura, CCS escreveu o manuscrito e JMG forneceu as imagens.

RECONHECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), ao Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ AMAZÔNIA) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

O (s) autor (es) não declararam (em) nenhum potencial conflito de interesse com relação à pesquisa, autoria e / ou publicação deste artigo.

FINANCIAMENTO

Esta pesquisa não recebeu financiamento específico de nenhuma agência de fomento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

REFERÊNCIAS

1. Liu Y, Liu L, Li J, Du G, Chen J. Synthetic biology toolbox and chassis development in *Bacillus subtilis*. *Trends Biotechnol* 2019; 37: 548-562.
2. Shumann W. Productions of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Adv Appl Microbiol* 2007; 62: 137-189.
3. Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc Natl AcadSci U S A* 2013; 110: E1621-E1630.
4. Fukushima T, Szurmant H, Kim EJ, Perego M, Hoch JA. A sensor histidine kinase coordinates cell wall architecture with cell division in *Bacillus subtilis*. *Molmicrobiol* 2008; 69: 621-632.
5. Vlamakis H, Chai Y, Beauregard P, Losick R, Kolter R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Revmicrobiol* 2013; 11: 157-168.
6. Harwood CR, Mouillon JM, Pohl S, Arnau J. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS microbial Ver* 2018; 42: 721-738.
7. Rosales-Mendoza S, Angulo C. *Bacillus subtilis* comes of age as a vaccine production host and delivery vehicle. *Expert Rev Vaccines* 2015; 14: 1135-1148.
8. Heravi KM, Watzlawick H, Altenbuchner J. Development of an anhydrotetracycline-inducible expression system for expression of a neopullulanase in *B. subtilis*. *Plasmid* 2015; 82: 35-42.
9. Phan T, Huynh P, Truong T, Nguyen H. A Generic Protocol for Intracellular Expression of Recombinant Proteins in *Bacillus subtilis*. *Methods molbiol* 2017; 1586: 325-334.
10. Hanif MU, Gul R, Hanif M, Hashmi AA. Heterologous Secretory Expression and Characterization of Dimerized Bone Morphogenetic Protein 2 in *Bacillus subtilis*. *BioMed Res Int* 2017. doi.org/10.1155/2017/9350537

11. Radeck J, Kraft K, Bartels J, Cikovic T, Dürr F, Emenegger J, Kelterborn S, Sauer C, Fritz G, Gebhard S, Mascher T. The *Bacillus* BioBrick Box: generation and evaluation of essential genetic building blocks for standardized work with *Bacillus subtilis*. *J Biol Eng* 2013; 7: 1-17.
12. Popp PF, Dotzler M, Radeck J, Bartels J, Mascher T. The *Bacillus* BioBrick Box 2.0: expanding the genetic toolbox for the standardized work with *Bacillus subtilis*. *Sci Rep* 2017; 7: 1-3.
13. Karpov DS, Domashin AI, Kotlov MI, Osipova PG, Kiseleva SV, Seregina TA, Goncharenko AV, Mironov AS, Karpov VL, Poddubko SV. Biotechnological Potential of the *Bacillus subtilis* 20 Strain. *Mol Biol* 2020; 54: 119-127.
14. Chen J, Zhao L, Fu G, Zhou W, Sun Y, Zheng P, Sun J, Zhang D. A novel strategy for protein production using non-classical secretion pathway in *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact* 2016; 15: 1-16.
15. Cui W, Han L, Suo F, Liu Z, Zhou L, Zhou Z. Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond. *World J Microbiol Biotechnol* 2018; 34: 1-19.
16. Harwood C. R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends biotechnol* 1992; 10: 247-256.
17. Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni GO, Azevedo V, Borriss R. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 1997; 390: 249-256.
18. Barbe V, Cruveiller S, Kunst F, Lenoble P, Meurice G, Sekowska A, Vallenet D, Wang T, Moszer I, Médigue C, Danchin. From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiol* 2009; 155: 1758-1775.
19. Burkholder, P. R, Giles NH. Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. *Am J Bot* 1947; 34: 345-348.
20. Zhang K, Su L, Wu J. Recent Advances in Recombinant Protein Production by *Bacillus subtilis*. *Annu Ver Food Sci Technol* 2020; 11: 295-318.
21. Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 72: 211-222.
22. Xiang M, Kang Q, Zhang D. Advances on systems metabolic engineering of *Bacillus subtilis* as a chassis cell. *Synth Syst Biotechnol* 2020; 5: 245-251.

23. Calero P, Nikel PI. Chasing bacterial chassis for metabolic engineering: a perspective review from classical to non-traditional microorganisms. *Microb Biotechnol* 2019; 12: 98-124.
24. Yang T, Irene K, Liu H, Liu S, Zhang X, Xu M, Rao Z. Enhanced extracellular gamma glutamyl transpeptidase production by overexpressing of P_{rsa} lipoproteins and improving its mRNA stability in *Bacillus subtilis* and application in biosynthesis of L-theanine. *J biotechnol* 2019; 302: 85-91.
25. Schallmeyer M, Singh A, Ward OP. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* 2004; 50: 1-17.
26. Hirooka K, Tamano A. *Bacillus subtilis* highly efficient protein expression systems that are chromosomally integrated and controllable by glucose and rhamnose. *Biosciotechnol biochem* 2018; 82: 1942-1954.
27. Liu H, Wang S, Song L, Yuan H, Liu K, Meng W, Wang T. Trehalose Production Using Recombinant Trehalose Synthase in *Bacillus subtilis* by Integrating Fermentation and Biocatalysis. *J Agric Food Chem* 2019; 67: 9314-9324.
28. Wang Z, Li X, Tian J, Chu Y, Tian Y. Cloning, heterologous expression and characterization of a novel streptomyces trypsin in *Bacillus subtilis* SCK6. *Int J Biolmacromol* 2019; 147: 890-897.
29. Zhao X, Xu J, Tan M., Zhen J, Ma Y, Zheng HC, Song H. High copy number and highly stable *Escherichia coli*-*Bacillus subtilis* shuttle plasmids based on pWB980. *Microb Cell Fact* 2020. doi.org/10.1186/s12934-020-1296-5
30. Feng Y, Liu S, Jiao Y, Wang Y, Wang M, Du G. Gene cloning and expression of the l-asparaginase from *Bacillus cereus* BDRD-ST26 in *Bacillus subtilis* WB600. *JBiosciBioeng* 2019; 127: 418-424.
31. Song W, Nie Y, Mu XQ, Xu Y. Enhancement of extracellular expression of *Bacillus naganoensis* pullulanase from recombinant *Bacillus subtilis*: effects of promoter and host. *Protein Expr Purif* 2016; 124: 23-31.
32. Mu D, Lu J, Qiao M, Kuipers OP, Zhua J, Li X, Yang P, Zhao Y, Luo S, Wu X, Jiang S, Zheng Z. Heterologous signal peptides-directing secretion of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase by *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018; 102: 5533-5543.
33. Yu X, Xu J, Liu X, Chu X, Wang P, Tian J, Wu N, Fan Y. Identification of a highly efficient stationary phase promoter in *Bacillus subtilis*. *Sci Rep* 2015; 5: 1-9.

34. Guan C, Cui W, Cheng J, Zhou L, Guo J, Hu X, Xial G, Zhou Z. Construction and development of an auto-regulatory gene expression system in *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact* 2015; 14: 1-15.
35. Chen J, Gai Y, Fu G, Zhou W, Zhang D, Wen J. Enhanced extracellular production of alpha-amylase in *Bacillus subtilis* by optimization of regulatory elements and over-expression of P_{rsa} lipoprotein. *Biotechnol Lett* 2015; 37: 899-906.
36. He W, Mu W, Jiang B, Yan X, Zhang T. Construction of a food grade recombinant *Bacillus subtilis* based on replicative plasmids with an auxotrophic marker for biotransformation of d-fructose to d-allulose. *J Agric Food Chem* 2016; 64: 3243-3250.
37. Zhang K, Su L, Duan X, Liu L, Wu J. High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system. *Microb Cell Fact* 2017; 16: 1-15.
38. Phan TT, Tran LT, Schumann W, Nguyen HD. Development of P_{grac100}-based expression vectors allowing high protein production levels in *Bacillus subtilis* and relatively low basal expression in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 2015; 14: 1-9.
39. Deng Y, Nie Y, Zhang Y, Wang Y, Xu Y. Improved inducible expression of *Bacillus naganoensis* pullulanase from recombinant *Bacillus subtilis* by enhancer regulation. *Protein Expr Purif* 2018; 148: 9-15.
40. Song Y, Fu G, Dong H, Li J, Du Y, Zhang D. High-efficiency secretion of β -mannanase in *Bacillus subtilis* through protein synthesis and secretion optimization. *J Agric Food Chem* 2017; 65: 2540-2548.
41. Ma RJ, Wang YH, Liu L, Bai LL, Ban R. Production enhancement of the extracellular lipase LipA in *Bacillus subtilis*: effects of expression system and Sec pathway components. *Protein Expr Purif* 2018; 142: 81-87.
42. Chen J, Fu G, Gai Y, Zheng P, Zhang D, Wen J. Combinatorial Sec pathway analysis for improved heterologous protein secretion in *Bacillus subtilis*: identification of bottlenecks by systematic gene overexpression. *Microb Cell Fact* 2015; 14: 1-15.
43. Su HH, Chen JC, Chen PT. Production of recombinant human epidermal growth factor in *Bacillus subtilis*. *J Taiwan Inst Chem Em* 2020; 106: 86-91.
44. Halmschlag B, Putri SP, Fukusaki E, Blank LM. Poly- γ -glutamic acid production by *Bacillus subtilis* 168 using glucose as the sole carbon source: A metabolomic analysis. *J Bioscibioeng* 2020; 130: 272-282.

45. Correa GG, Lins MRDCR, Silva BF, Paiva GB, Zocca VFB, Ribeiro NV, Picheli FP, Mack M, Pedrolli DB. A modular autoinduction device for control of gene expression in *Bacillus subtilis*. *Metab Eng* 2020; 61: 326-334.
46. Kang XM, Cai X, Huang ZH, Liu ZQ, Zheng YG. Construction of a highly active secretory expression system in *Bacillus subtilis* of a recombinant amidase by promoter and signal peptide engineering. *Int J Biolmacromol* 2020; 143: 833-841.
47. Zhang L, Li G, Zhan N, Sun T, Cheng B, Li Y, Shan A. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa*-targeted antimicrobial peptide T9W in *Bacillus subtilis* using a maltose-inducible vector. *Process Biochem* 2019; 81: 22-27.
48. Han L, Suo F, Jiang C, Gu J, Li N, Zhang N, Zhou Z. Fabrication and characterization of a robust and strong bacterial promoter from a semi-rationally engineered promoter library in *Bacillus subtilis*. *Process Biochem* 2017; 61: 56-62.
49. Guan C, Cui W, Cheng J, Liu R, Liu Z, Zhou L, Zhou Z. Construction of a highly active secretory expression system via an engineered dual promoter and a highly efficient signal peptide in *Bacillus subtilis*. *New Biotechnol* 2016; 33: 372-379.
50. Cui W, Han L, Cheng J, Liu Z, Zhou L, Guo J, Zhou Z. Engineering an inducible gene expression system for *Bacillus subtilis* from a strong constitutive promoter and a theophylline-activated synthetic riboswitch. *Microb Cell Fact* 2016; 15: 1-13.
51. Heinrich J, Drewniok C, Neugebauer E, Kellner H, Wiegert T. The YoaW signal peptide directs efficient secretion of different heterologous proteins fused to a StrepII-SUMO tag in *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact* 2019; 18: 2-14.
52. Yang M, Zhu G, Korza G, Sun X, Setlow P, Li J. Engineering *Bacillus subtilis* as a Versatile and Stable Platform for Production of Nanobodies. *Appl Environ Microbiol* 2020; 86: 1-15.
53. Scheidler CM, Vrabel M, Schneider S. Genetic Code Expansion, Protein Expression, and Protein Functionalization in *Bacillus subtilis*. *ACS Synth Biol* 2020; 9: 486-493.
54. Zhang L, Li X, Zhan N, Sun T, Li J, Shan A. Maltose Induced Expression of Cecropin AD by SUMO Technology in *Bacillus subtilis* WB800N. *Protein J* 2020; 39: 383-391.
55. Zhang L, Wei D, Zhan N, Sun T, Shan B, Shan A. Heterologous expression of the novel α -helical hybrid peptide PR-FO in *Bacillus subtilis*. *Bioprocess Biosyst Eng* 2020; 43: 1619-1627.

56. Fu L, Wang Y, Ju J, Cheng L, Xu Y, Yu B, Wang L. Extracellular production of active-form *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2020; 104: 623-631.
57. Sun W, Wu Y, Ding W, Wang L, Wu L, Lin L, Che Z, Zhu L, Liu Y, Chen X. An auto-inducible expression and high cell density fermentation of Beefy Meaty Peptide with *Bacillus subtilis*. *Bioprocess Biosyst Eng* 2020; 43: 701-710.
58. Pang B, Zhou L, Cui W, Liu Z, Zhou Z. Production of a Thermostable Pullulanase in *Bacillus subtilis* by Optimization of the Expression Elements. *Starch Stärk* 2020. doi.org/10.1002/star.202000018
59. Promchai R, Promdonkoy B, Tanapongpipat S, Visessanguan W, Eurwilaichitr L, Luxananil, P. A novel salt-inducible vector for efficient expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *J. Biotechnol* 2016; 222: 86-93.
60. Ramos KRM, Valdehuesa KNG, Cabulong RB, Moron LS, Nisola GM, Hong SK, Chung WJ. Overexpression and secretion of AgaA7 from *Pseudoalteromonas hodoensis* sp. nov in *Bacillus subtilis* for the depolymerization of agarose. *Enzyme Microbtechnol* 2016; 90: 19-25.
61. Le V D, Phan TTP, Nguyen TM, Brunsveld L, Schumann W, Nguyen HD. Using the IPTG-inducible $P_{grac212}$ promoter for overexpression of human rhinovirus 3C protease fusions in the cytoplasm of *Bacillus subtilis* cells. *Currmicrobiol* 2019; 76:1477-1486.
62. Tao Z, Fu G, Wang S, Jin Z, Wen J, Zhang D. Hyper-secretion mechanism exploration of a heterologous creatinase in *Bacillus subtilis*. *Biochem Eng* 2019. doi.org/10.1016/j.bej.2019.107419
63. Han L, Cui W, Suo F, Miao S, Hao H, Chen Q, Guo J, Liu Z, Zhou L, Zhou Z. Development of a novel strategy for robust synthetic bacterial promoters based on a stepwise evolution targeting the spacer region of the core promoter in *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact* 2019; 18: 2-14.
64. Liu Y, Shi C, Li D, Chen X, Li J, Zhang Y. Engineering a Highly Efficient Expression System to Produce BcaPRO Protease in *Bacillus Subtilis* by an Optimized Promoter and Signal Peptide. *Int J Biol Macromol* 2019; 138: 903-911.
65. Zhao L, Chen J, Sun J, Zhang D. Multimer recognition and secretion by the non-classical secretion pathway in *Bacillus subtilis*. *Sci Rep* 2017; 7: 1-18.
66. Wang M, Wu J, Wu D. Cloning and expression of the sucrose phosphorylase gene in *Bacillus subtilis* and synthesis of kojibiose using the recombinant enzyme. *Microb Cell Fact* 2018; 17: 1-9.

67. Xi X, Ni K, Hao H, Shang Y, Zhao B, Qian Z. Secretory expression in *Bacillus subtilis* and biochemical characterization of a highly thermostable polyethylene terephthalate hydrolase from bacterium HR29. *Enzyme Microbial Technol* 2021. doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109715
68. Kanaya S, Yamada Y, Kudo Y, Ikemura T. Studies of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis* tRNAs: gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis. *Gene* 1999; 238: 143-155.
69. Moszer I, Rocha EP, Danchin A. Codon usage and lateral gene transfer in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 524-528.
70. Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JD, Braun PG, Darmon E, Dorenbos R, Dubois JY, Westers H, Zanen G, Quax WJ, Kuipers OP, Bron S, Hecker M, Van Dijl JM. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the “secrets” of the secretome. *Microbiol Mol Biol* 2004; 68: 207–33.
71. Frain KM, Robinson C, Van Dijl JM. Transport of folded proteins by the Tat system. *Protein J* 2019; 38: 377-388.
72. Molière N, Turgay K. Chaperone-protease systems in regulation and protein quality control in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* 2009; 160: 637-644.
73. Jongbloed JD, Antelmann H, Hecker M, Nijland R, Bron S, Airaksinen U, Braun PG. Selective contribution of the twin-arginine translocation pathway to protein secretion in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 2002; 277: 44068-44078.
74. Neef J, Bongiorno C, Schmidt B, Goosens VJ, Van Dijl JM. Relative contributions of non-essential Sec pathway components and cell envelope-associated proteases to high-level enzyme secretion by *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact* 2020; 19: 1-13.
75. Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed J.D.H, Bron S, Van Dijl JM. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol* 2000; 64: 515-547.
76. Hirose I, Sano K, Shioda I, Kumano M, Nakamura K, Yamane K. Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study The SWISS-PROT accession numbers for the N-terminal amino acid sequences reported in this paper are: P00691 for AmyE; P54507 for CotN; O07921 for Csn; P09124 for Gap; P26901 for KatA; P39116 for Pel; P39824 for PenP; P54375 for SodA; P29141 for Vpr; Q07833 for WapA; P54423 for WprA; P54327 for XkdG; Q45071 for

- XynD; P94421 for YclQ; O31803 for YcnM; O05512 for YdhT; O34952 for YflE; O06487 for YfnI; O31737 for YlqB; P96740 for YwtD; P42110 for YxaK; P94356 for YxkC. *Microbiology* 2000; 146: 65-75.
77. Fu LL, Xu ZR, Li WF, Shuai JB, Lu P, Hu CX. Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: implication for optimization of heterologous protein secretion. *Biotechnol Adv*2007; 25: 1-12.
78. Oguro A, Kakeshita H, Honda K, Takamatsu H, Nakamura K, Yamane K. Srb: a *Bacillus subtilis* gene encoding a homologue of the alpha-subunit of the mammalian signal recognition particle receptor. *DNA Res* 1995; 2: 95-100.
79. Wahlström E, Vitikainen M, Kontinen VP, Sarvas M. The extracytoplasmic folding factor PrsA is required for protein secretion only in the presence of the cell wall in *Bacillus subtilis*. *Microbiol* 2003; 149: 569-57.
80. Schiebel E, Driessen A J, Hartl FU, Wickner W. Delta mu H⁺ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* 1991; 64: 927-939.
81. DeLisa MP, Tullman D, Georgiou G. Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 6115-6120.
82. Pop O, Martin U, Abel C, Muller JP. The twin-arginine signal peptide of PhoD and the TatAd/Cd proteins of *Bacillus subtilis* form an autonomous Tat translocation system. *J Biol Chem* 2002; 277: 3268-3273.
83. Lin FL, Rong XZ, Fen LW, Bing SJ, Ping L, Xia HC. Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: implication for optimization of heterologous protein secretion. *Biotechnol Adv* 2007; 25: 1-12.
84. Wang PZ, Doi RH. Overlapping promoters transcribed by *Bacillus subtilis* sigma 55 and sigma 37 RNA polymerase holoenzymes during growth and stationary phases. *J Biolchem* 1984; 259: 8619-8625.
85. Song BH, Neuhard J. Chromosomal location, cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* cdd gene encoding cytidine/deoxycytidine deaminase. *Mol Gen Genet MGG* 1989; 216: 462-468.
86. Zhang XZ, Cui ZL, Hong Q, Li SP. High-level expression and secretion of methyl parathion hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 4101-4103.

87. Xia Y, Chen W, Zhao J, Tian F, Zhang H, Ding X. Construction of a new food-grade expression system for *Bacillus subtilis* based on theta replication plasmids and auxotrophic complementation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 76: 643-650.
88. Meijer WJ, Salas M. Relevance of UP elements for three strong *Bacillus subtilis* phage ϕ 29 promoters. *Nucleic Acids Research* 2004; 32:1166-1176.
89. Seo SO, Schmidt-Dannert C. Development of a synthetic cumate-inducible gene expression system for *Bacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2019; 103: 303-313.
90. Zhou C, Ye B, Cheng S, Zhao L, Liu Y, Jian J, Yan X. Promoter engineering enables overproduction of foreign proteins from a single copy expression cassette in *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact* 2019; 18: 1-11.
91. Rao Y, Cai D, Wang H, Xu Y, Xiong S, Gao L, Ma X. Construction and application of a dual promoter system for efficient protein production and metabolic pathway enhancement in *Bacillus licheniformis*. *J Biotechnol* 2020; 312: 1-10.
92. Liu X, Wang H, Wang B, Pan L. Efficient production of extracellular pullulanase in *Bacillus subtilis* ATCC6051 using the host strain construction and promoter optimization expression system. *Microb Cell Fact* 2018; 17: 1-12.
93. Meng F, Zhu X, Nie T, Lu F, Bie X, Lu Y, Lu Z. Enhanced expression of pullulanase in *Bacillus subtilis* by new strong promoters mined from transcriptome data, both alone and in combination. *Front Microbiol* 2018. doi.org/10.3389/fmicb.2018.02635
94. Rajkumar AS, Liu G, Bergenholm D, Arsovska D, Kristensen M, Nielsen J, Jensen MK, Keasling JD. Engineering of synthetic, stress-responsive yeast promoters. *Nucleic Acids Res* 2016. doi.org/10.1093/nar/gkw553
95. Wang Y, Liu Q, Weng H, Shi Y, Chen J, Du G, Kang Z. Construction of synthetic promoters by assembling the sigma factor binding -35 and -10 boxes. *Biotechnol J* 2019. doi.org/10.1002/biot.201800298
96. Yansura DG, Henner DJ. Use of the *Escherichia coli lac* repressor and operator to control gene expression in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci* 1984; 81: 439-443.
97. Salema V, Fernandez LA. High yield purification of nanobodies from the periplasm of *E. coli* as fusions with the maltose binding protein. *Protein Expr Purif* 2013; 92: 42-48.
98. Ming YM, Wei ZW, Lin C Y, Sheng, GY. Development of a *Bacillus subtilis* expression system using the improved P_{glv} promoter. *Microb Cell Factories* 2010; 9: 1-8.
99. Sun T, Altenbuchner J. Characterization of a mannose utilization system in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 2010; 192: 2128-2139.

100. Heravi K M, Wenzel M, Altenbuchner J. Regulation of *mtl* operon promoter of *Bacillus subtilis*: requirements of its use in expression vectors. *Microb Cell Factories* 2011; 10: 1-19.
101. Toymentseva AA, Schrecke K, Sharipova MR, Mascher T. The LIKE system, a novel protein expression toolbox for *Bacillus subtilis* based on the *liaI* promoter. *Microb Cell Fact* 2012; 11: 1-13.
102. Wang Y, Liu Y, Wang Z, Lu F. Influence of promoter and signal peptide on the expression of pullulanase in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Lett* 2014; 36: 1783-1789.
103. Desai SK, Gallivan JP. Genetic screens and selections for small molecules based on a synthetic riboswitch that activates protein translation. *J Am Chem Soc* 2004; 126: 13247-54.
104. Suess B, Fink B, Berens C, Stentz R, Hillen W. A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 1610-1614.
105. Li W, Li HX, Ji SY, Li S, Gong YS, Yang MM, Chen YL. Characterization of two temperature-inducible promoters recently isolated from *B. subtilis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 1148-1153.
106. Welsch N, Homuth G, Schweder T. Stepwise optimization of a low-temperature *Bacillus subtilis* expression system for "difficult to express" proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; 99: 6363-6376.
107. Dahl RH, Zhang F, Alonso-Gutierrez J, Baidoo E, Batth TS, Redding-Johanson AM, Petzold, Mukhopadhyay CJ, Lee TS, Adams PD, Keasling JD. Engineering dynamic pathway regulation using stress-response promoters. *Nat Biotechnol* 2013; 31: 1039-1046.
108. Lee SJ, Pan JG, Park SH, Choi SK. Development of a stationary phase-specific autoinducible expression system in *Bacillus subtilis*. *J Biotechnol* 2010; 149: 16-20.
109. Wenzel M, Müller A, Siemann-Herzberg M, Altenbuchner J. Self-inducible *Bacillus subtilis* expression system for reliable and inexpensive protein production by high-cell-density fermentation. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 6419-6425.
110. Guan C, Cui W, Cheng J, Zhou L, Liu Z, Zhou Z. Development of an efficient autoinducible expression system by promoter engineering in *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact* 2016; 15: 1-12.
111. Correa GG, Lins MRDCR Silva BF, Paiva GB, Zocca VFB, Ribeiro NV, Picheli FP, Mack M, Pedrolli DB. Dataset for supporting a modular autoinduction device for control of gene expression in *Bacillus subtilis*. *Data Brief* 2020. doi.org/10.1016/j.dib.2020.105736

112. Liu H, Wang X, Yang S, Wang R, Wang T. Saturation mutagenesis and self-inducible expression of trehalose synthase in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Prog* 2019. doi.org/10.1002/btpr.2826
113. Tran DTM, Phan TTP, Huynh TK, Dang NTK, Huynh PTK, Nguyen TM, Truong TTT, Tran TL, Schumann S, Nguyen HD. Development of inducer-free expression plasmids based on IPTG-inducible promoters for *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact* 2017; 16: 1-10.
114. Tran, DTM, Phan TTP, Doan TTN, Tran TL, Schumann W. Nguyen HD. Integrative expression vectors with P_{grac} promoters for inducer-free overproduction of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Rep* 2020. doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00540.
115. Chu PTB, Phan HTT, Nguyen HD, Phan TTP. Development of inducer-free expression plasmids using IPTG-inducible P_{spac} promoter for *Bacillus subtilis*. *VJSTE* 2021; 63: 64-70.

Capítulo II

No capítulo II, apresentamos um artigo original a ser submetido com os resultados referentes aos objetivos 2, 3 e 4 deste trabalho. Aqui reportamos a transformação de *Bacillus subtilis* KO7 utilizando o vetor fagomídeo pHEN1, análise da expressão bacteriana por *western-blot* após indução com IPTG e lactose, além da avaliação do reconhecimento específico da molécula VHH frente aos antígenos Bothropstoxina I e II (BthTX-I e BthTX-II) purificados e ao veneno total da serpente de interesse médico *Bothrops jararacussu* pela técnica de citometria de fluxo. Os dados aqui apresentados reforçam e sugerem a utilização de *Bacillus subtilis* KO7 para uma produção de VHHs solúveis e potencialmente candidatos a agentes terapêuticos.

Informações sobre o artigo

Título do artigo: Avaliação da expressão em *Bacillus subtilis* KO7 de fragmentos de anticorpos VHH-antifosfolipase de *Bothrops jararacussu* em vetor fagomídeo

Situação: A ser submetido à Canadian Journal of Microbiology

Avaliação da expressão em *Bacillus subtilis* KO7 de fragmentos de anticorpos VHH-antifosfolipase de *Bothrops jararacussu* em vetor fagomídeo

Caio Coutinho de Souza¹, Maria Edilene Almeida², Juliane Corrêa Glória², Késsia Caroline Souza Alves², Yury Oliveira Chaves², Soraya dos Santos Pereira⁴, Luis André Moraes Mariúba^{1,2,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, AM, 69067-005, Brasil.

²Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus, AM, 69057-070, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69067-00, Brasil.

⁴Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Unidade de Rondônia, Porto Velho-RO, 76812-245, Brazil.

RESUMO

Os nanocorpos ou VHHs de camelídeos configuram entre as principais classes de moléculas estudadas em biotecnologia, possui particularidades únicas e facilidade de expressão em diferentes hospedeiros. Estes possuem grande potencial para a criação de ferramentas terapêuticas para o tratamento em casos de acidentes ofídicos, exigindo a busca por métodos mais eficientes e vantajosos para sua produção. O objetivo deste estudo foi utilizar a linhagem *Bacillus subtilis* KO7 para expressar um VHH anti-fosfolipase de *Bothrops jararacussu*, espécie causadora de muitos acidentes ofídicos no Brasil. Após a transformação do *B. subtilis* KO7 com vetor pHEN1 contendo o gene codificante do nanocorpo, a produção deste foi induzida e observada a expressão do VHH na sua forma solúvel em ensaios de *western-blot*. A citometria de fluxo demonstrou que os VHHs expressos foram capazes de reconhecer as fosfolipases BthTX-I e BthTX-II, além de outras proteínas do veneno total de *Bothrops jararacussu*, comprovando assim a sua especificidade e viabilidade da utilização de *B. subtilis* KO7 para produzir VHHs funcionais em vetor fagomídeo.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*; VHH; vetor fagomídeo; nanocorpos; proteína recombinante.

INTRODUÇÃO

A descoberta dos fragmentos de anticorpos de camelídeos chamados de nanocorpos ou VHHs abriu um leque de investigações para as áreas de diagnóstico e tratamento de doenças (HAMERS-CASTERMAN *et al.*, 1993). Estas moléculas vêm sendo constantemente exploradas e já figuram como importantes alvos biotecnológicos (POLLITHY *et al.*, 2011; VANEYCKEN *et al.*, 2011; KONWARH, 2020; MARTINEZ-DELGADO, 2020; XIANG *et al.*, 2020).

A bactéria *Escherichia coli* ainda é o principal hospedeiro na produção de VHHs (KAZEMI-LOMEDASHT *et al.*, 2016; SALEMA; FERNÁNDEZ, 2017; RUANO-GALLEGO *et al.*, 2019; ASADA *et al.*, 2021). Porém, alguns problemas de insolubilidade, necessidade de etapas posteriores e demoradas para processar a proteína visando o dobramento correto e remoção de endotoxinas são comumente relatadas (LIU; HUANG, 2018). Estes gargalos exigem à busca por novos hospedeiros e abordagens alternativas para uma produção mais prática, rápida e segura dos VHHs.

Um hospedeiro promissor é a bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis*, pois apresenta uma extensa anotação documentada e é um organismo GRAS (*Generally recognized as safe*) segundo a FDA (*Food and Drug Administration*) (PEDREIRA *et al.*, 2022). Possui uma grande capacidade de crescimento em substratos de baixo custo e é um excelente sistema de expressão para a produção de proteínas (SU *et al.*, 2020). Apesar dos avanços atuais nas pesquisas sobre *B. subtilis*, seu uso para a produção de VHHs candidatos à terapia antiveneno para a melhoria do diagnóstico e tratamento dos acidentes ofídicos foi pouco explorado.

Em estudos anteriores, foram desenvolvido VHHs contra fosfolipases de *B. jararacussu* e sua expressão e validação foram avaliadas. Após a expressão em *E. coli*, estes foram capazes de reconhecer e neutralizar os efeitos miotóxicos das BthTX-I, BthTX-II presentes no veneno desta serpente (Prado *et al.*, 2016). A fim de averiguar novos hospedeiros para o aumento da produção e facilitar o método ajusante de purificação deste nanocorpo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o uso de *B. subtilis* KO7 para expressão de VHH. Os resultados demonstram à viabilidade do uso deste hospedeiro para obtenção de nanocorpos solúveis e funcionais, facilitando o processo posterior de purificação destas moléculas para aplicação clínica dada a ausência de lipopolissacarídeos em *B. subtilis*.

METODOLOGIA

Linhagens bacterianas e vetor

Para a realização deste estudo, foram utilizadas as linhagens *Escherichia coli* cepa TOP 10 e *Bacillus subtilis* cepa KO7. O vetor utilizado foi o plasmídeo pHEN1 contendo o gene VHH anti-fosfolipase de *Bothrops jararacussu*, desenvolvido em trabalhos anteriores por Prado *et al.* (2016) e gentilmente cedido pelo Laboratório de Engenharia de Anticorpos, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Rondônia).

Transformação em *Bacillus subtilis* KO7

B. subtilis KO7 foi obtido junto ao *Bacillus Genetic Stock Center*. As células competentes foram preparadas seguindo o protocolo de Harwood *et al.* (1990). Para a realização da transformação, 100 µL de célula competente foi adicionada em um microtubo de 1,5mL junto ao DNA plasmidial na concentração final de 5mg. O microtubo foi colocado para incubar em termobloco por 2 horas a 37°C. As bactérias transformadas foram semeadas em placas de Petri com meio LB-ágar contendo 50 µg/mL de ampicilina. Logo, as placas foram incubadas a 37°C por um período de 12 horas. E a análise das colônias transformantes para confirmação da presença do gene de interesse foi realizada por PCR.

Indução da expressão gênica por IPTG e Lactose em *Bacillus subtilis*

As colônias foram cultivadas em 3 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de ampicilina por 16 horas a 37 °C sob agitação constante. Após o crescimento das colônias, estas foram inoculadas em um volume de 100 mL ou 1L de LB líquido até atingir um OD₆₀₀ de 0,7 - 0,8. Após o alcance da D.O desejada, a esse crescimento foi adicionado 100 µL do reagente indutor IPTG (1 mM final) ou 10 g/L do indutor lactose. Após 3 horas de indução *overnight* os induzidos foram centrifugados a 4.000 rpm por 15 minutos e os *pellets* e os sobrenadantes foram armazenados. Os *pellets* foram submetidos ao processo de lise celular utilizando o sonicador de ponteira ultrassônico (Eco-sonics) e o produto da sonicação foi centrifugado por 15 min a 14000 rpm e o sobrenadante recuperado. Amostras dos sobrenadantes foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA 40%), onde 12 mL de sobrenadante foi misturado a 3 mL de TCA e incubou-se no gelo por 10 minutos. Esta amostra foi dividida em

microtubos que foram centrifugadas 2x a 12.000g e ressuspensos em 2 mL de acetona para posterior evaporação em temperatura ambiente.

Confirmação da produção do VHH por análise em Gel SDS-PAGE 15%

O gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 15 % foi preparado conforme recomendações de Maniatis *et al.* (1989). As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra 1x (50 mM Tris pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2%, 100 mM de dithiothereitol (DTT), azul de bromofenol 0,1%) incubadas a 95 °C por 10 minutos e aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada numa voltagem constante de 140V por 1 hora. Foi utilizado como marcador de massa molecular *BLUeye prestained protein ladder* (Sigma-Aldrich). Após a corrida, o gel foi corado por 18 horas com a solução de Azul Brilhante de Coomassie G250. E o gel foi descorado com solução descorante (100 mL ácido acético; 450 mL de água; 450 mL de etanol 100%) para as análises.

Confirmação da expressão do VHH por *Western-blot*

A confirmação da expressão do VHH foi realizada por meio de *western-blot*, no qual amostras do *pellet* das colônias 1 e 7 e amostras do sobrenadante e *pellet* do lisado bacteriano da colônia 1 foram submetidas à corrida eletroforética por SDS-PAGE 15%. Houve a transferência para uma membrana de nitrocelulose, embebida em tampão contendo 25 mM Tris, 192 mM de glicina, pH 8,5 e metanol 20% final e utilizou-se uma cuba específica (Semi-dry system, Bio-rad, Hercules, USA). A voltagem constante foi de 10 V durante 1 hora e 5 minutos. Após a transferência a membrana foi bloqueada por 30 minutos utilizando solução de PBS 1X com BSA 3%. Posteriormente foi adicionado o anticorpo primário anti-VHH cedido gentilmente pelo Laboratório de Engenharia de Anticorpos, Fundação Oswaldo Cruz, diluído na concentração de 1:500 durante 30min. A membrana foi então lavada 3 vezes, durante 5 minutos cada, com solução PBS 1X adicionado Tween 20 a 0,05%. Foi adicionado o anticorpo secundário anti-rabbit (invitrogen™), diluído 1:500 e incubado durante 30 min. Após as lavagens com PBS Tween 20 a 0,05% e água, a membrana foi revelada com o revelador Diaminobenzidina (DAB) (10 mg/mL).

Citometria de fluxo

Para averiguar a capacidade da proteína expressa em reconhecer a proteína nativa, uma citometria de fluxo foi realizada utilizando amostras da porção solúvel do lisado bacteriano e *beads* de látex contendo individualmente os antígenos BthTX-I (F1), BthTX-II (F2) e veneno bruto (VT) de *B. jararacussu* (cedidas gentilmente pelo Laboratório de Engenharia de Anticorpos, FIOCRUZ-RO). Inicialmente houve o acoplamento destas moléculas de forma covalente à microesferas de látex. Em cada microtubo, as microesferas de látex foram ativadas adicionando 57 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de EDAC e NHS (0,5 mM final) a cada 1 μL de microesferas de látex diluídas em PBS 1X filtrado, deixados incubando a 22 °C sob, 950 rpm por 3 horas. Após o período de incubação os antígenos BthTX-I, BthTX-II e proteínas do veneno total foram adicionados para o contato com as microesferas em seus respectivos microtubos na concentração de 4 μg para cada 1 μL de microesferas de látex. Estas amostras foram incubadas *overnight* sob as mesmas condições descritas anteriormente. No dia seguinte as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm a 15 °C por 5 minutos, descartou-se os sobrenadantes e as microesferas de látex foram lavadas por duas vezes com PBS 1x filtrado por meio de ciclos de centrifugação, ressuspensas em tampão de bloqueio (PBS 1x filtrado + BSA 5%) e incubadas por 2 horas. Após o bloqueio, foram feitas duas lavagens com PBS 1X filtrado e as amostras dos sobrenadantes contendo a proteína VHH, e do sobrenadante bacteriano do controle negativo foram adicionadas a cada microtubo de microesferas acopladas aos antígenos BthTX-I, BthTX-II e veneno total. Os microtubos foram submetidos a agitação de 950 rpm a 6 °C por 1 hora. Realizou-se 3 lavagens com PBS 1x filtrado para a posterior ligação com os anticorpos de captura anti-VHH diluído a 1:500 e incubado durante 30 minutos. Seguiu-se 3 lavagens com PBS 1x filtrado para a posterior ligação com o anticorpo anti-rabbit diluído 1:2000. As amostras foram lavadas por 3 vezes, ressuspensas em PBS 1x filtrado e analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto II™ (BD Biosciences™). Nas análises, para evitar a análise de possíveis aglutinações por essas partículas, foi realizada a análise de células únicas (*single cells*). Ao final da determinação morfométrica, as partículas de látex funcionalizadas foram analisadas por meio da análise de fluorescência emitida pela fluoróforo Alexa fluor 488 através dos parâmetros métricos de porcentagem e média de intensidade de fluorescência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após transformação do plasmídeo pHEN1 em *Bacillus subtilis* foram obtidas 7 colônias transformantes, havendo a confirmação da presença do fragmento de aproximadamente 400pb correspondente ao gene VHH anti-fosfolipase em três colônias (Figura 1). Este vetor já foi anteriormente utilizado para a produção de outros fragmentos de anticorpos como, por exemplo, o scFv, expresso em *E. coli* (AN *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2013; GODAKOVA *et al.*, 2019). No entanto, não há relatos de seu uso em *Bacillus subtilis* KO7.

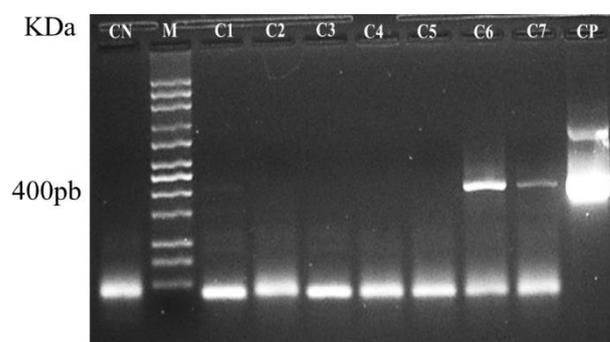


Figura 1- Análise por eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da extração do DNA das colônias transformantes de *Bacillus subtilis* KO7. CN: controle negativo; M: marcador (100pb a 3kb) Mid Range DNA Ladder (cellco); canaletas de 1-7: contém amostras das colônias; nas canaletas C1, C6 e C7: pode-se verificar amplificação do gene VHH com 400 pb; CP: controle positivo (1 uL do plasmídeo pHEN1).

Dentre estas, somente duas colônias (colônia 1 e 7) positivas para a presença do gene de VHH anti-fosfolipase foram utilizadas para o teste indução da proteína recombinante. A análise de “western blot” dos extratos bacterianos após 18 horas de indução revelaram bandas de reconhecimento do anticorpo anti-VHH com uma massa molecular estimada em 11 KDa (Figura 2A). Luiz (2014) também observou a expressão de VHHs em *E. coli* usando IPTG após 18 horas de indução. Yang *et al.* (2020) reportou a expressão de VHHs em *Bacillus subtilis* WB800N após 6 horas de indução com IPTG.

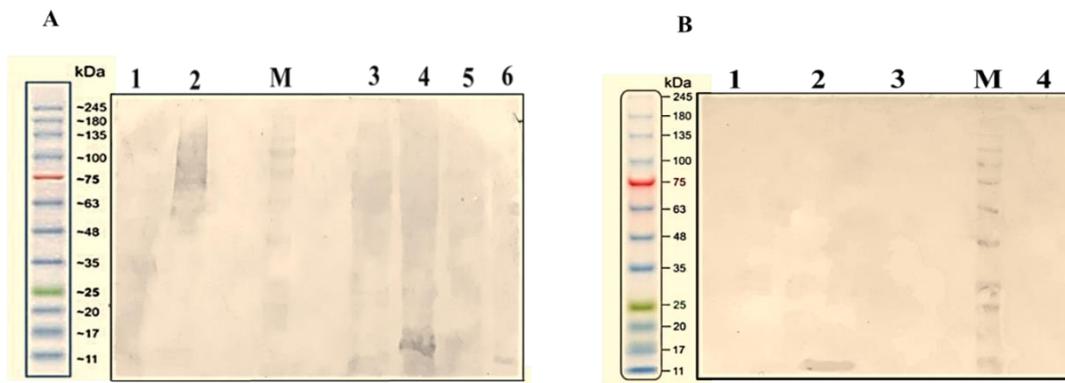


Figura 2- **A:** Análise da fração insolúvel por *western-blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-VHH após indução com IPTG (1 mM). Canaleta 1: controle negativo, indução por 3 horas; canaleta 2: controle negativo, indução *overnight*; M: marcador de peso molecular 245 kDa (Thermo Scientific); canaleta 3: colônia 1, indução por 3 horas; canaleta 4: colônia 1, indução *overnight*; canaleta 5: colônia 7, indução por 3 horas; canaleta 6: colônia 7: indução *overnight*. **B:** Análise da expressão na porção solúvel e insolúvel do lisado e do sobrenadante precipitado com TCA das amostras induzidas *overnight* utilizando anticorpo monoclonal anti-VHH. Canaleta 1: colônia 1, *pellet* do lisado; canaleta 2: colônia 1, sobrenadante do lisado; canaleta 3: colônia 1, sobrenadante precipitado com TCA; M: marcador de peso molecular 245 kDa (Thermo Scientific); canaleta 4: controle negativo, sobrenadante precipitado com TCA.

A proteína recombinante estava presente integralmente na porção solúvel do lisado bacteriano (Figura 2B), não havendo presença na porção insolúvel ou escape para o sobrenadante de cultura. Kumada *et al.* (2015) relatou problemas de insolubilidade na expressão de VHH anti-gonadotrofina coriônica humana (hCG) em hospedeiro *E. coli*, exigindo longos processos de triagens utilizando uréia e reoxidação para redobrar a molécula. Da mesma forma, Chen *et al.* (2021) observaram a formação de corpos de inclusão na expressão de VHH anti-IL-6R utilizando o plasmídeo pET28a+ e a cepa de *E. coli* BL21(DE3) decorrente da expressão citoplasmática do VHH neste hospedeiro.

A expressão *overnight* do VHH anti-fosfolipase utilizando o indutor lactose apresentou uma detecção da proteína com maior intensidade após análise por SDS-PAGE do lisado bacteriano (Figura 3).

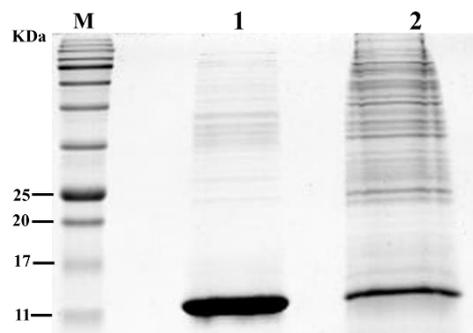


Figura 3- SDS-PAGE 15% contendo amostras do extrato bruto proteico após indução com lactose (10 g/L). M: marcador de peso molecular 245 kDa (Thermo Scientific); canaleta 1: sobrenadante do lisado da colônia 1; canaleta 2: *pellet* do lisado da colônia 1.

Estes resultados da indução em *B. subtilis* KO7 indicam que a lactose pode ser uma alternativa ao IPTG, principalmente visto sua maior viabilidade econômica, tornando este hospedeiro uma nova opção aos hospedeiros bacterianos tradicionais visando à expressão de VHHs de forma barata. Além disso, os resultados aqui apresentados demonstraram à viabilidade do uso do vetor pHEN1 para expressão de proteínas recombinantes em *B. subtilis* KO7, indicando que a maquinaria bacteriana foi capaz de reconhecer a sequência âmbar presente no vetor pHEN1 como um códon de terminação, não traduzindo os aminoácidos subsequentes que correspondem a proteína III do fago, o que permitiu a expressão do VHH anti-fosfolipase na sua forma solúvel (PRADO, 2013).

As análises realizadas por citometria de fluxo demonstraram um alto reconhecimento de todos os antígenos alvos avaliados acoplados às microesferas quando expostos à amostra do sobrenadante do lisado contendo a proteína VHH anti-fosfolipase induzida e expressa com lactose em *B. subtilis* KO7. Trabalhos anteriores já utilizaram outras metodologias como o *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) na avaliação da funcionalidade de VHHs produzidos. Prado *et al.* (2016) selecionaram VHHs a partir de uma biblioteca de fagos e os VHHs expressos reconheceram as proteínas BthTX-I e BthTX-II por ELISA. Os VHHs também foram capazes de reconhecer BthTX-I por *Western-blot* e inibiram a atividade da fosfolipase BthTX-II, neutralizando os seus efeitos miotóxicos.

A quantificação das microesferas na amostra de sobrenadante contendo VHH (F1+, gráfico A) apresentou um maior pico no histograma em comparação a F2+ (gráfico B) e VT+ (gráfico C), nas mesmas condições. O deslocamento de fluorescência de F2+ foi mais significativo, sendo maior que F1+ e VT+ respectivamente. Os valores da média de intensidade de fluorescência (MIF) para cada amostra foram de 4399 para F1+, e de 2189 para F1-. A MIF de F2+ foi de 4044 e a MIF de F2- foi de 1275. Por fim, a média de intensidade de VT+ foi de 4516 em detrimento de 1397 de VT- (figura 4). Logo, os resultados observados nos ensaios de citometria de fluxo indicam que a proteína VHH anti-fosfolipase foi expressa em sua conformação tridimensional correta.

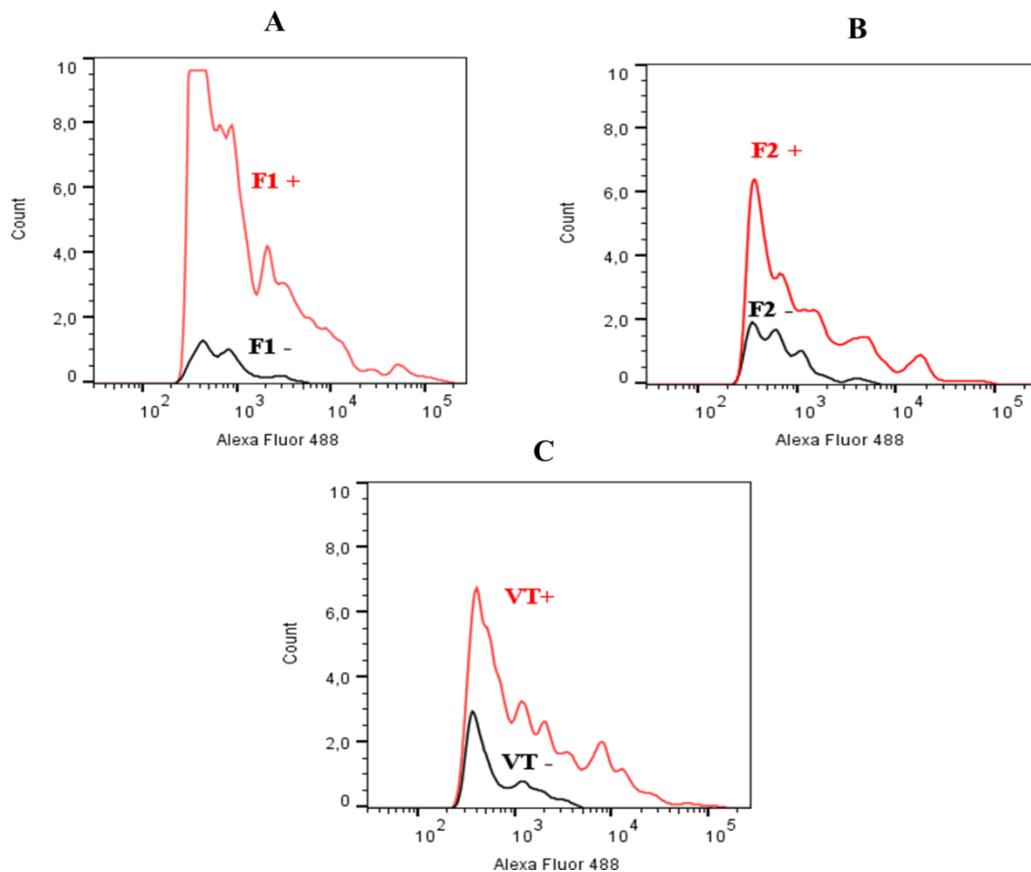


Figura 4- Histograma da média de intensidade de fluorescência de Alexa flúor 488 nas partículas de látex acopladas com BthTX-I (F1, gráfico A), BthTX-II (F2, gráfico B) e veneno total (VT, gráfico C). "+": sobrenadante de lisado de *Bacillus subtilis* KO7 após expressão do VHH anti-fosfolipase utilizado como anticorpo primário; "-": controle negativo utilizado na etapa do anticorpo primário correspondendo a um sobrenadante de lisado de *B. subtilis* KO7 induzido sem o plasmídeo pHEN1 contendo o gene para síntese de VHH.

Portanto, o método de expressão de VHHs funcionais em *Bacillus subtilis* se mostrou seguro e prático, apresentando uma abordagem promissora considerando os desafios da epidemiologia do envenenamento por serpentes no Brasil. Cabe ressaltar que a linhagem de *B. subtilis* KO7 além da deleção de genes de proteases, não possui em seus componentes estruturais os lipopolissacarídeos (LPS's) que são endotoxinas encontradas na superfície externa de bactérias gram-negativas (HARPER *et al.*, 2011). Logo, a ausência de LPS facilitará o processo de purificação destes ativos para uso clínico, tornando-se assim mais um ponto positivo para utilização de *Bacillus subtilis* para a produção de fragmentos de anticorpos VHH.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, obtivemos com sucesso a expressão de anticorpos VHH anti-fosfolipase utilizando hospedeiro bacteriano *Bacillus subtilis* KO7 e plasmídeo pHEN1. O uso deste vetor para expressão nesta bactéria não foi reportado anteriormente na literatura. A proteína recombinante expressa estava presente no sobrenadante do lisado bacteriano, sendo capaz de reconhecer especificamente fosfolipases BthTX-I e BthTX-II pela técnica de citometria de fluxo. Trabalhos futuros avaliarão a capacidade produtiva da proteína VHH neste sistema, podendo ser aplicado ainda para expressão de outros fragmentos de anticorpos similares como os scFv. O uso de *Bacillus subtilis* para expressão de VHH poderá facilitar a purificação desta molécula para uso clínico, dado seu estado GRAS e a não necessidade de remoção de LPS, como ocorre em expressões utilizando *Escherichia coli*.

REFERÊNCIAS

- AN, G. *et al.* Expression and characterization of the ScFv fragment of antiplatelet GPIIIa monoclonal antibody SZ-21. **Thrombosis research**, v. 105, n. 4, p. 331-337, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Acidentes de trabalho por animais peçonhentos entre trabalhadores do campo, floresta e águas, Brasil 2007 a 2017. **Boletim Epidemiológico**, 50 (11), 1-14, 2019.
- ASADA, T. *et al.* Secretory production of a camelid single-domain antibody (VHH, nanobody) by the *Serratia marcescens* Lip system in *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 549, p. 105-112, 2021.
- CHEN, X. *et al.* A dual target-directed single domain-based fusion protein against interleukin-6 receptor decelerate experimental arthritis progression via modulating JNK expression. **Inflammation**, v. 44, n. 4, p. 1620-1628, 2021.
- GODAKOVA, S. A. *et al.* Camelid VHHs fused to human Fc fragments provide long term protection against botulinum neurotoxin A in mice. **Toxins**, v. 11, n. 8, p. 464, 2019.
- HAMERS-CASTERMAN, C.; ATARHOUCHE, T.; MUYLDERMANS, S. A.; ROBINSON, G. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. **Nature**, 363, n. 6428, p. 446-448, 1993.
- HARPER, M. S. *et al.* *E. coli* lipopolysaccharide: acute oral toxicity study in mice. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 8, p. 1770-1772, 2011.

KAZEMI-LOMEDASHT, F. *et al.* Production and characterization of novel camel single domain antibody targeting mouse vascular endothelial growth factor. **Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy**, v. 35, n. 3, p. 167-171, 2016.

KONWARH, R. Nanobodies: prospects of expanding the gamut of neutralizing antibodies against the novel coronavirus, SARS-CoV-2. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1531, 2020.

KUMADA, Y.; KANG, B.; YAMAKAWA, K.; KISHIMOTO, M.; HORIUCHI, J. I. Efficient preparation and site-directed immobilization of VHH antibodies by genetic fusion of poly (methylmethacrylate) binding peptide (PMMAT ag). **Biotechnology Progress**, 31(6), 1563-1570, 2015.

LIU, Y.; HUANG, H. Expression of single-domain antibody in different systems. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 2, p. 539-551, 2018.

PEREIRA, M. B. Produção e caracterização parcial de nanocorpos ativos contra Crotoxina: uma neurotoxina da serpente *Crotalus durissus terrificus*. 2014.

MAIA, G. J. G. *et al.* Epidemiologia dos acidentes ofídicos no Estado do Amazonas entre os anos de 2018 e 2019 Epidemiology of snake accidents in the State of the Amazon in 2018 and 2019. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 12, p. 116805-116818, 2021.

MARTINEZ-DELGADO, G. Inhaled nanobodies against COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 10, p. 593-593, 2020.

PEDREIRA, T.; ELFMANN, C.; STÜLKE, J. The current state of Subti Wiki, the database for the model organism *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D875-D882, 2022.

POLLITHY, A. *et al.* Magnetosome expression of functional camelid antibody fragments (nanobodies) in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 17, p. 6165-6171, 2011.

PRADO, N. 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**, v. 11, n. 3, p. e0151363, 2016.

PRADO, N. D. R. Produção e caracterização parcial de fragmentos de anticorpos do tipo vhh, selecionados por *phage display* a partir de *Lama glama*, ativos contra toxinas Bthtx-I e Bthtx-II purificadas do veneno de *Bothrops jararacussu*, 2013.

RUANO-GALLEGO, David. *et al.* Screening and purification of nanobodies from *E. coli* culture supernatants using the hemolysin secretion system. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1-13, 2019.

SALEMA, V.; FERNÁNDEZ, L. Á. *Escherichia coli* surface display for the selection of nanobodies. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1468-1484, 2017.

SU, H. H.; CHEN, J. C.; CHEN, P. T. Production of recombinant human epidermal growth factor in *Bacillus subtilis*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 106, p. 86-91, 2020.

VANEYCKEN, I. *et al.* Immuno-imaging using nanobodies. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 877-881, 2011.

WOHLK, B. L. P. *et al.* Expressão heteróloga, purificação e caracterização da proteína hipoxantina guanina fosforribosiltransferase de *Plasmodium falciparum*. 2012.

XIANG, Y. *et al.* Versatile and multivalent nanobodies efficiently neutralize SARS-CoV-2. **Science**, v. 370, n. 6523, p. 1479-1484, 2020.

XU, L. *et al.* Establishment of scFv antibody library screening technology based on flow cytometry. **Xi bao yu fen zi Mian yi xue za zhi= Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology**, v. 29, n. 1, p. 65-68, 2013.

YANG, M. *et al.* Engineering *Bacillus subtilis* as a versatile and stable platform for production of nanobodies. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n. 8, p. e02938-19, 2020.

DADOS COMPLEMENTARES

Análise do plasmídeo pHEN1 quanto à presença do fragmento VHH

A sequência do gene VHH foi amplificada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se a enzima Taq DNA Polimerase (Cellco). 391ng/ µL de DNA plasmidial, tampão da enzima Taq 1X; 0,25 mM de uma mistura de dNTPs, 1 mM de MgCl₂. Os *primers*: 5' GGATCCcatcaccatcaccatcacATGGCCGACGTGCAGCTGCAGGCGTCT 3' e 5' TCTAGATGAGGAGACGGTGACGGTGACCTG 3' e água deionizada esterilizada que completasse o volume de 12,5 µL em termociclador Mastercycler® personal (Eppendorf).

O programa para amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C/7 minutos; seguidos de 35 ciclos a 95 °C/30 segundos, desnaturação a 94°C/1minuto, anelamento a 50°C/40 segundos, extensão a 72°C/1 minuto e um ciclo de extensão final a 72°C/5 minutos. Após a reação, o amplicon foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM pH 8,5, EDTA 1 mM) corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). A corrida foi realizada numa voltagem de 100V por 45 minutos e o gel foi visualizado sob luz ultravioleta em equipamento de fotodocumentação.

Resultados da amplificação do gene VHH e transformação em *E. coli* TOP 10.

A estratégia inicial escolhida para a expressão dos VHHs consistiu na amplificação do gene de interesse clonado anteriormente no vetor pHEN1. Os resultados da PCR revelaram a amplificação da sequência de DNA nas canaletas 4 e 5 (figura 1A), tais bandas são correspondentes ao fragmento do gene VHH gerando um produto de aproximadamente 400pb. Em decorrência da confirmação da presença do gene VHH no vetor pHEN1 realizamos uma transformação em *E. coli* TOP 10 com o objetivo de obter mais amostras do plasmídeo para os subseqüentes ensaios. O resultado ilustrado na figura 1B confirmou o êxito na transformação. E a extração do DNA plasmidial das colônias transformantes demonstrou um rendimento de 9,115 ng/ μ L.

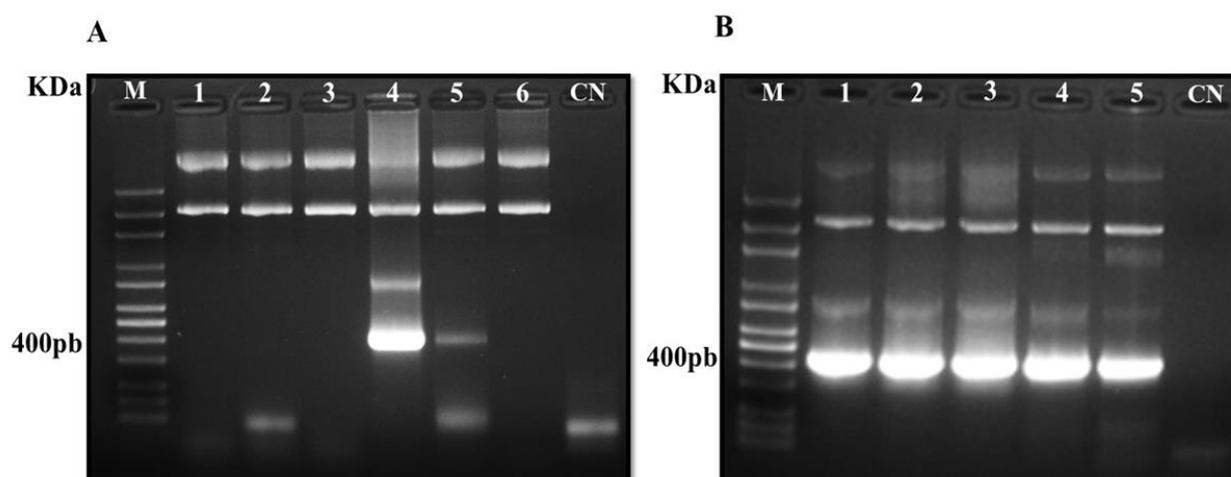


Figura 1- **A:** Análise por eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação por PCR. M: marcador (100pb a 3kb) Mid Range DNA Ladder (cellco); canaletas de 1-6: correspondem às amostras com diferentes volumes de reagentes; CN: controle negativo. **B:** Análise por eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da extração do DNA plasmidial de *E. coli* TOP 10 após transformação com pHEN1. M: marcador (100pb a 3kb) Mid Range DNA Ladder (cellco); canaletas de 1-5: contém amostras das colônias e observa-se a amplificação do gene VHH com 400pb; CN: controle negativo (sem colônia).

Citometria de fluxo

A seguir seguem os dados da análise fenotípica por porcentagem de fluorescência e da média de intensidade de fluorescência de Alexa flúor 488 dos antígenos acoplados com as *beads* frente ao sobrenadante do lisado contendo o VHH anti-fosfolipase utilizado como

anticorpo primário, e ao sobrenadante de lisado de *B. subtilis* KO7, induzido sem o plasmídeo pHEN1 contendo o gene para síntese de VHH.

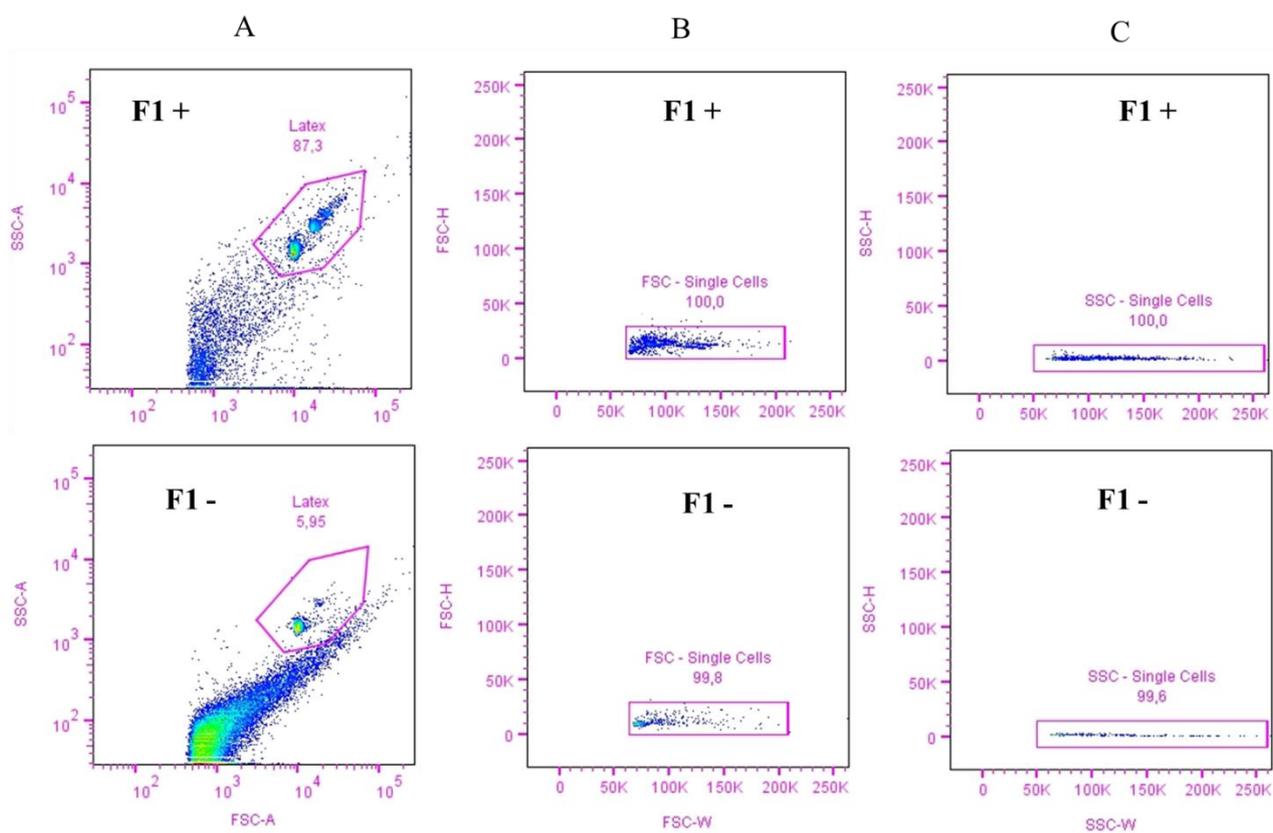


Figura 2- Avaliação da capacidade funcional de partículas de látex acopladas com BthTX-I (F1). **A:** Análise morfológica por tamanho (FSC-A) e complexidade (SSC-A) em F1+ e F1-. **B:** Análise de uniformidade (single cells) por tamanho em F1+ e F1-. **C:** Análise de uniformidade (single cells) por complexidade em F1+ e F1-. Nota: "+": sobrenadante de lisado de *Bacillus subtilis* KO7 após expressão do VHH anti-fosfolipase utilizado como anticorpo primário; "-": controle negativo utilizado na etapa do anticorpo primário correspondendo a um sobrenadante de lisado de *B. subtilis* KO7 induzido sem o plasmídeo pHEN1 contendo o gene para síntese de VHH.

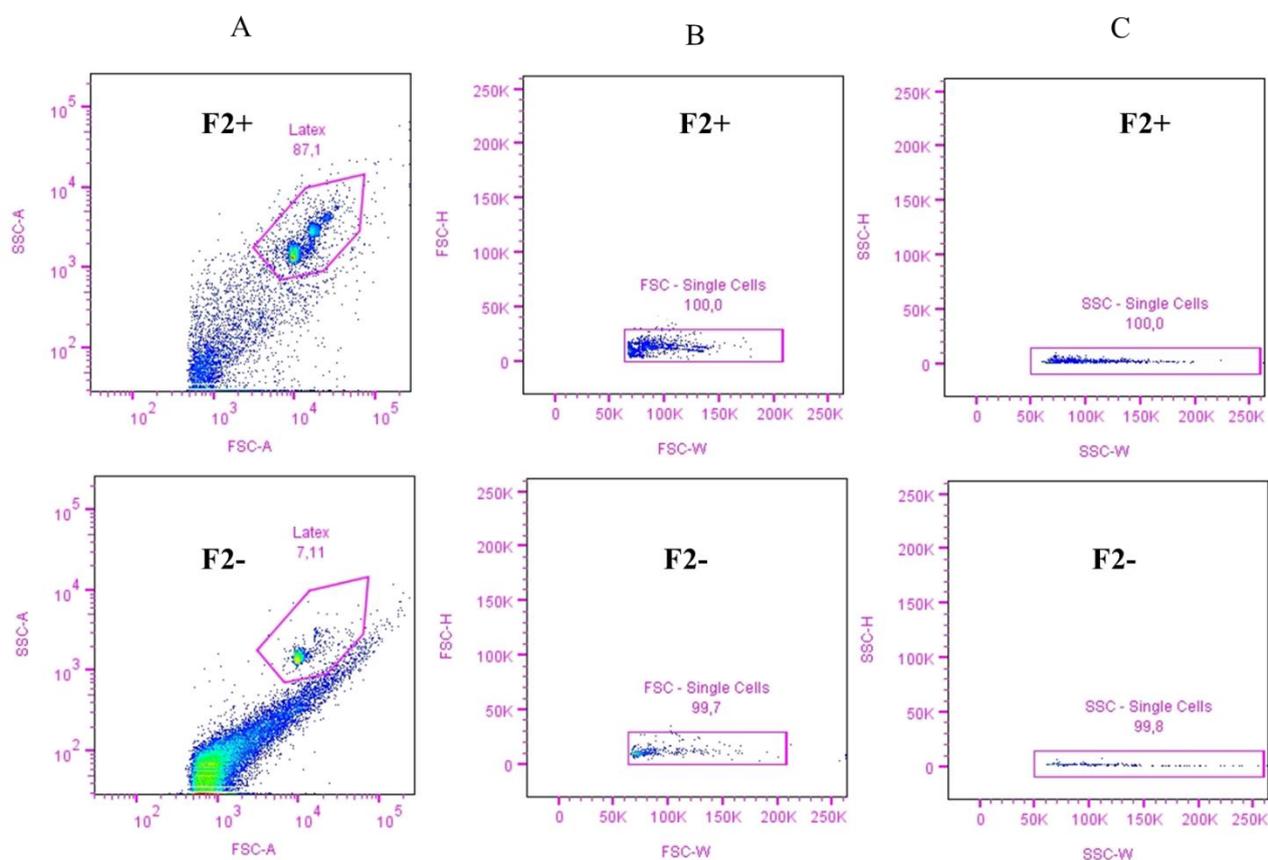


Figura 3- Avaliação da capacidade funcional de partículas de látex acopladas com BthTX-II (F2). **A:** Análise morfológica por tamanho (FSC-A) e complexidade (SSC-A) em F2+ e F2-. **B:** Análise de uniformidade (single cells) por tamanho em F2+ e F2-. **C:** Análise de uniformidade (*single cells*) por complexidade em F2+ e F2-. Nota: "+": sobrenadante de lisado de *Bacillus subtilis* KO7 após expressão do VHH anti-fosfolipase utilizado como anticorpo primário; "-": controle negativo utilizado na etapa do anticorpo primário correspondendo a um sobrenadante de lisado de *B. subtilis* KO7 induzido sem o plasmídeo pHEN1 contendo o gene para síntese de VHH.

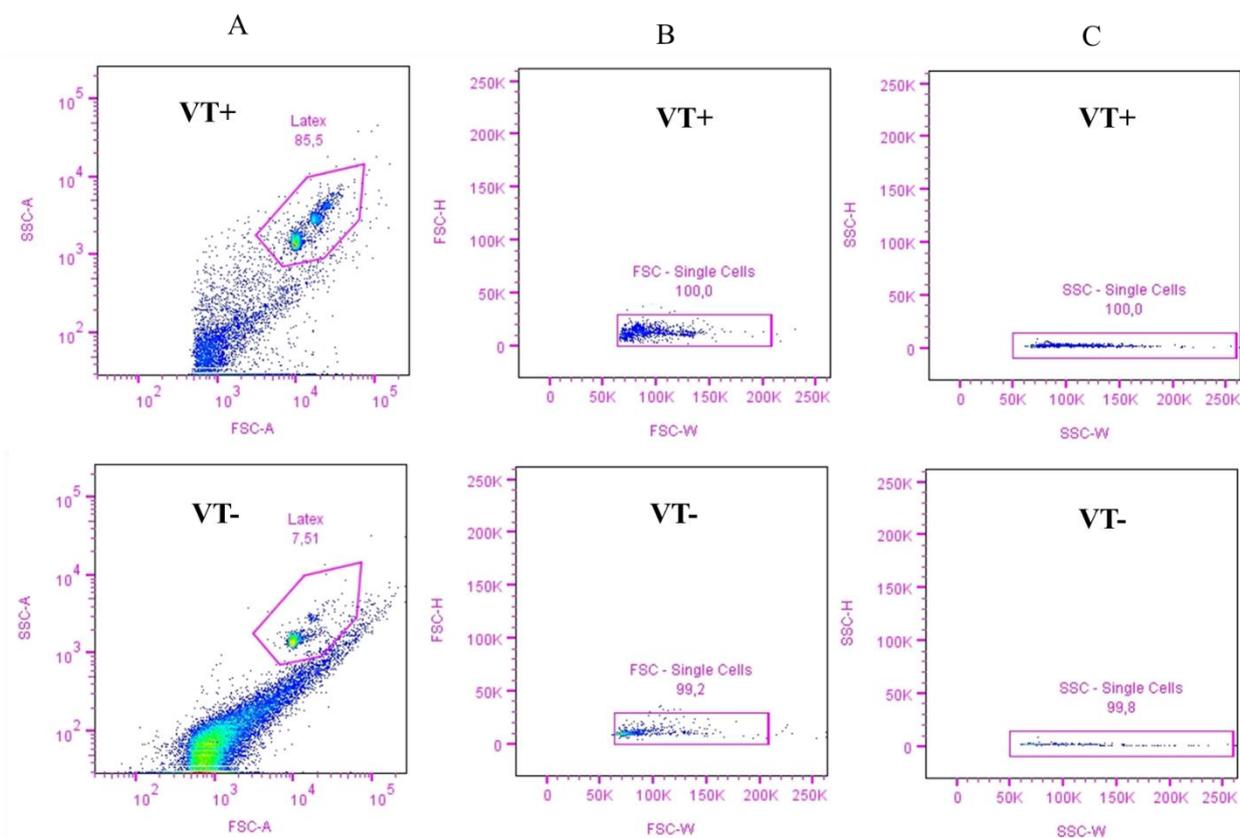


Figura 4- Avaliação da capacidade funcional de partículas de látex acopladas com veneno total (VT). **A:** Análise morfológica por tamanho (FSC-A) e complexidade (SSC-A) em VT+ e VT-. **B:** Análise de uniformidade (single cells) por tamanho em VT+ e VT-. **C:** Análise de uniformidade (single cells) por complexidade em VT+ e VT-. Nota: "+": sobrenadante de lisado de *Bacillus subtilis* KO7 após expressão do VHH anti-fosfolipase utilizado como anticorpo primário; "-": controle negativo utilizado na etapa do anticorpo primário correspondendo a um sobrenadante de lisado de *B. subtilis* KO7 'induzido sem o plasmídeo pHEN1 contendo o gene para síntese de VHH.

III. Discussão Geral

As características físico-químicas e a versatilidade dos VHHs contribuíram para que estes fragmentos de anticorpos se tornassem objetos de investigação de pesquisas que almejam sucesso em aplicações biotecnológicas (WEISS; WERRIPS, 2019). Muitos estudos vêm se concentrando na melhoria da sua produção visando à redução de custos e etapas dispendiosas, sem a perda da funcionalidade da proteína. Projetar ou identificar sistemas de expressão bem-sucedidos como é o caso de *Bacillus subtilis* é, portanto, de importância proeminente para o progresso biotecnológico (LAMBERTZ *et al.*, 2014).

O capítulo I desta dissertação destaca exatamente a relevância alcançada ao longo de décadas de conhecimento adquirido sobre as características metabólicas, genéticas e bioquímicas deste hospedeiro. Estes dados encontram-se compilados na forma de um artigo de revisão publicado por nosso grupo de pesquisa em 2021 na revista *Experimental Biology and Medicine*. O levantamento das publicações clarificou o estado da arte no que diz respeito ao emprego de *Bacillus subtilis* como hospedeiro bacteriano. Foram encontrados 41 artigos publicados entre os anos de 2015 a 2020, os quais atendiam aos critérios de inclusão e palavras-chave utilizadas para a pesquisa.

Estes trabalhos descrevem estratégias clássicas e as mais recentes adotadas para a produção de inúmeras proteínas. A exemplo, Han *et al.* (2017) obtiveram uma superprodução de uma aspartase de *E. coli* em *Bacillus subtilis* 168 recombinante sob o controle de promotores derivados de P_{sfA}. Halmschlaget *al.* (2020) produziram ácido poli- γ -glutâmico também em *Bacillus subtilis* usando glicose como única fonte de carbono substituindo o promotor nativo do *operon* PGA pelo forte promotor constitutivo P_{veg}. Pang *et al.* (2020) produziram a pululanase, uma enzima desramificadora comumente usada na indústria de processamento de amido em *Bacillus subtilis* otimizando elementos da expressão. Além de vitaminas e hormônios já produzidos (SU *et al.*, 2020; CORREA *et al.*, 2020). Dentre outras moléculas alvos da área da saúde, indústria e academia.

Destacamos também os sistemas de expressão existentes e disponíveis dando ênfase na maquinaria celular da bactéria, suas principais vias de transporte para proteínas heterólogas, além de apresentar os tipos de promotores, plasmídeos, indutores, linhagens celulares, proteínas expressas e os rendimentos obtidos por estudo. Constatamos ao final deste artigo de revisão que *Bacillus subtilis* possui muitos atributos que corroboram sua escolha em comparação a outros hospedeiros, sendo um modelo consolidado e com potencial para produzir proteínas variadas.

Embora muitos estudos de engenharia genética demonstrem a aplicação para produzir uma tríade de moléculas, seu uso é escasso para produzir fragmentos de anticorpos, salvo alguns poucos trabalhos voltados a expressar fragmentos como o scFv (WU *et al.*, 2002; LAKOWITZ *et al.*, 2017). Já para a produção de VHHs, há documentado na literatura apenas um estudo realizado por Yang *et al.* (2020), no qual os autores produziram quatro nanocorpos VHHs diferentes direcionados a antígenos específicos em *Bacillus subtilis* cepaWB800N.

No capítulo II, encontram-se os resultados referentes a um artigo original a ser publicado. Demonstramos o uso da linhagem deficiente em protease *Bacillus subtilis* KO7 para expressar VHHs solúveis e funcionais. A estratégia consistiu em transformar *B. subtilis* KO7 utilizando o vetor pHEN1 e da utilização de diferentes tipos de indutores: IPTG e lactose. Adotamos o uso da lactose como alternativa ao IPTG, já que a lactose é um indutor mais acessível financeiramente, natural e biodegradável (BRIAND *et al.*, 2016; VÉLEZ *et al.*, 2014). Identificamos que a expressão de VHHs ocorreu na porção solúvel do lisado bacteriano, diferente dos problemas de insolubilidade que vem sendo observados em *E. coli* (KUMADA *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2021).

Os resultados da citometria de fluxo, método este escolhido devido sua alta capacidade de detecção e sensibilidade, demonstraram que os VHHs reconheceram as duas fosfolipases isoladas, bem como outras proteínas do veneno de *B. jararacussu*, resultado semelhante ao trabalho de Prado *et al.* (2016) que selecionou VHHs ativos capazes de reconhecer as mesmas fosfolipases BthTX-I e BthTX-II, inibindo e neutralizando seus efeitos miotóxicos.

Morais (2016) ao utilizar o mesmo clone do presente estudo (KF498607) também observou afinidade a BthTX-I e BthTX-II inibindo a atividade fosfolipásica. O ensaio *in vivo* com camundongos indicou a diminuição da atividade miotóxica e redução do edema formado durante o tratamento com o clone KF498607. Os resultados positivos da capacidade de reconhecimento à proteína nativa pelo VHH anti-fosfolipase expresso em *Bacillus subtilis* KO7 sugerem que há possibilidade destes apresentarem capacidade de inibição igual ou similar em testes *in vivo*. Para tanto, como perspectivas de trabalhos futuros, será buscada a melhoria do processo de purificação, como por exemplo, a inserção de caudas que facilitem a purificação da molécula.

Com base no exposto, foi possível utilizar o *Bacillus subtilis* KO7 para expressar VHHs solúveis capazes de reconhecer seus alvos. Este trabalho situa-se como o primeiro trabalho reportando sucesso na transformação de *Bacillus subtilis* KO7 com o vetor fagomídeo pHEN1 e expressão de VHHs solúveis e funcionais anti-fosfolipase.

IV. Conclusão

- A transformação de *Bacillus subtilis* KO7 utilizando o vetor fagomídeo pHEN1 foi bem-sucedida e a expressão de VHH anti-fosfolipase de *B. jararacussu* em *Bacillus subtilis* KO7 ocorreu após indução *overnight* tanto com o IPTG como a lactose;
- Os VHHs foram expressos na forma solúvel, fator determinante para a utilização em estudos futuros visando à recuperação e purificação da proteína para uso clínico;
- A avaliação dos VHHs anti-fosfolipase frente às toxinas isoladas e veneno total de *B. jararacussu* mostrou um alto reconhecimento principalmente contra BthTX-I e BthTX-II, o que indica que a proteína foi expressa sem comprometimento de sua estrutura e função biológica;
- O método apresentado utilizando *Bacillus subtilis* KO7 como hospedeiro sugere como uma nova alternativa para a produção de fragmentos de anticorpos VHHs solúveis e funcionais.

V. Referências

AKRAM, M. *et al.* Genetic Engineering of Novel Products of Health Significance: Recombinant DNA Technology. In: **Functional Foods and Nutraceuticals**. Springer, Cham, 2020. p. 595-611.

ALTENBUCHNER, J. Editing of the *Bacillus subtilis* genome by the CRISPR-Cas9 system. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 17, p. 5421-5427, 2016.

BAGHBAN, R.; GARGARI, S. L. M.; RAJABIBAZL, M.; NAZARIAN, S.; BAKHERAD, H. Camelid-derived heavy-chain nanobody against Clostridium botulinum neurotoxin E in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 63, n. 2, p. 200-205, 2016.

BAILON CALDERON, H. *et al.* Development of nanobodies against hemorrhagic and myotoxic components of bothrops atrox snake venom. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 655, 2020.

BAJAJ, S. *et al.* Targeting telomerase for its advent in cancer therapeutics. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, n. 5, p. 1871-1919, 2020.

BANNAS, P.; HAMBACH, J.; KOCH-NOLTE, F. Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics. **Frontiers in immunology**, 8, p. 1603, 2017.

BARÁK, I.; MUCHOVÁ, K.; LABAJOVÁ, N. Asymmetric cell division during *Bacillus subtilis* sporulation. **Future microbiology**, 14, n. 4, p. 353-363, 2019.

BEGHEIN, E.; GETTEMANS, J. Nanobody technology: a versatile toolkit for microscopic imaging, protein–protein interaction analysis, and protein function exploration. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 771, 2017.

BEKESI, A.; ABDELLAOUI, S.; HOLROYD, N.; VAN DELM, W. *et al.* Challenges in the Structural–Functional Characterization of Multidomain, Partially Disordered Proteins CBP and p300: Preparing Native Proteins and Developing Nanobody Tools. **Methods in enzymology**, 611, p. 607-675, 2018.

BRIAND, L. *et al.* A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

CAI, R. *et al.* Panoptic imaging of transparent mice reveals whole-body neuronal projections and skull–meninges connections. **Nature neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 317-327, 2019.

CASPERS, M. *et al.* Improvement of Sec-dependent secretion of a heterologous model protein in *Bacillus subtilis* by saturation mutagenesis of the N-domain of the AmyE signal peptide. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1877–1885, 1 maio 2010.

CAVALCANTE, R. C. M. **Desenvolvimento de sistemas de expressão heteróloga para *Bacillus subtilis***. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2013.

CHEN, J. *et al.* Combinatorial Sec pathway analysis for improved heterologous protein secretion in *Bacillus subtilis*: identification of bottlenecks by systematic gene overexpression. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 92, 26 jun. 2015.

CHEN, Q. *et al.* An efficient constitutive expression system for Anti-CEACAM5 nanobody production in the yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 155, p. 43–47, 1 mar. 2019.

CHEN, X. *et al.* A dual target-directed single domain-based fusion protein against interleukin-6 receptor decelerate experimental arthritis progression via modulating JNK expression. **Inflammation**, v. 44, n. 4, p. 1620-1628, 2021.

CHI, X. *et al.* Humanized single domain antibodies neutralize SARS-CoV-2 by targeting the spike receptor binding domain. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2020.

CHILDS, C. E.; CALDER, P. C.; MILES, E. A. **Diet and immune function**. 2019.

CHIU, M. L.; GILLILAND, G. L. Engineering antibody therapeutics. **Current Opinion in Structural Biology**, New constructs and expression of proteins • Sequences and topology. v. 38, p. 163–173, 1 jun. 2016.

CORREA, G. G.; LINS, M. R. D. C. R.; SILVA, B. F.; PAIVA, G. B.; ZOCCA, V. F. B.; RIBEIRO, N. V.; PICHELI, F. P.; MACK, M.; PEDROLI, D. B. A modular autoinduction device for control of gene expression in *Bacillus subtilis*. **Metab Eng**, v. 61, p. 326-334, 2020.

DE GENST, E. *et al.* Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 12, p. 4586-4591, 2006.

DE GENST, E.; CHAN, P.-H.; PARDON, E.; HSU, S.-T. D. *et al.* A nanobody binding to non-amyloidogenic regions of the protein human lysozyme enhances partial unfolding but inhibits amyloid fibril formation. **The Journal of Physical Chemistry B**, 117, n. 42, p. 13245-13258, 2013.

DE MARCO, A. Recombinant antibody production evolves into multiple options aimed at yielding reagents suitable for application-specific needs. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 1-17, 2015.

DE MARCO, A. Recombinant expression of nanobodies and nanobody-derived immunoreagents. **Protein expression and purification**, p. 105645, 2020.

DE MEYER, T.; MUYLDERMANS, S.; DEPICKER, Ann. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. **Trends in biotechnology**, v. 32, n. 5, p. 263-270, 2014.

DE TAEYE, S. W.; RISPENS, T.; VIDARSSON, G. The ligands for human IgG and their effector functions. **Antibodies**, v. 8, n. 2, p. 30, 2019.

DECANNIERE, K.; MUYLDERMANS, S.; WYNS, L. Canonical antigen-binding loop structures in immunoglobulins: more structures, more canonical classes? **Journal of molecular biology**, 300, n. 1, p. 83-91, 2000.

DEKEN, M. M.; KIJANKA, M. M.; HERNÁNDEZ, I. B.; SLOOTER, M. D. *et al.* Nanobody-targeted photodynamic therapy induces significant tumor regression of

- trastuzumab-resistant HER2-positive breast cancer, after a single treatment session. **Journal of Controlled Release**, 323, p. 269-281, 2020.
- DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297–306, 1 maio 2009.
- DESCHACHT, N. *et al.* A Novel Promiscuous Class of Camelid Single-Domain Antibody Contributes to the Antigen-Binding Repertoire. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5696–5704, 15 maio 2010.
- DESMYTER, A. *et al.* Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. **Nature structural biology**, v. 3, n. 9, p. 803-811, 1996.
- DIAZ, M.; GREENBERG, A. S.; FLAJNIK, M. F. Somatic hypermutation of the new antigen receptor gene (NAR) in the nurse shark does not generate the repertoire: possible role in antigen-driven reactions in the absence of germinal centers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 95, n. 24, p. 14343-14348, 1998.
- DUAN, M. *et al.* Effects of *Bacillus subtilis* on carbon components and microbial functional metabolism during cow manure–straw composting. **Bioresource Technology**, v. 303, p. 122868, 1 maio 2020.
- DUGGAN, S. Caplacizumab: first global approval. **Drugs**, v. 78, n. 15, p. 1639-1642, 2018.
- DUNBAR, J. *et al.* SAbDab: the structural antibody database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D1140–D1146, 1 jan. 2014.
- DUNBAR, J. *et al.* SAbDab: the structural antibody database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D1140–D1146, 1 jan. 2014.
- EZZINE, A. *et al.* Efficient expression of the anti-AahI'scorpion toxin nanobody under a new functional form in a *Pichia pastoris* system. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 15-21, 2012.
- FENG, X. H. A special issue on the 10-year anniversary of Life Sciences Institute, Zhejiang University. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 52, n. 7, p. 701-701, 2020.
- FLAJNIK, M. F.; DESCHACHT, N.; MUYLDERMANS, S. A case of convergence: why did a simple alternative to canonical antibodies arise in sharks and camels? **PLoS Biol**, 9, n. 8, p. e1001120, 2011.
- GAI, J. *et al.* A potent neutralizing nanobody against SARS-CoV-2 with inhaled delivery potential. **MedComm**, v. 2, n. 1, p. 101-113, 2020.
- GHETIE, V.; HUBBARD, J. G.; KIM, J. K.; TSEN, M. F. *et al.* Abnormally short serum half-lives of IgG in β 2-microglobulin-deficient mice. **European journal of immunology**, 26, n. 3, p. 690-696, 1996.
- GLASSMAN, P. M. *et al.* Molecularly engineered nanobodies for tunable pharmacokinetics and drug delivery. **Bioconjugate chemistry**, v. 31, n. 4, p. 1144-1155, 2020.

GOLDMAN, E. R. *et al.* Ricin Detection Using Phage Displayed Single Domain Antibodies. **Sensors**, v. 9, n. 1, p. 542–555, jan. 2009.

GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. **The protein journal**, v. 32, n. 6, p. 419-425, 2013.

GORLANI, A.; DE HAARD, H.; VERRIPS, T. Expression of VHHs in *Saccharomyces cerevisiae*. In: **Single Domain Antibodies**. Humana Press, Totowa, NJ, 2012. p. 277-286.

GREENBERG, A. S.; AVILA, D.; HUGHES, M.; HUGHES, A. *et al.* A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. **nature**, 374, n. 6518, p. 168-173, 1995.

GU, Y.; XU, X.; WU, Y.; NIU, T. *et al.* Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: from rational design to industrial applications. **Metabolic engineering**, 50, p. 109-121, 2018.

GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J.; HABIB, A. G.; Harrison, R. A.; WILLIAMS, D. J.; WARRELL, D. A. Snakebite envenoming. **Nature reviews Disease primers**, v. 3, n. 1, p. 1-21, 2017.

HALMSCHLAG, B. *et al.* Poly- γ -glutamic acid production by *Bacillus subtilis* 168 using glucose as the sole carbon source: a metabolomic analysis. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 130, n. 3, p. 272-282, 2020.

HAMERS-CASTERMAN, C.; ATARHOUCHE, T.; MUYLDERMANS, S. A.; ROBINSON, G. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. **Nature**, 363, n. 6428, p. 446-448, 1993.

HAN, L. *et al.* Fabrication and characterization of a robust and strong bacterial promoter from a semi-rationally engineered promoter library in *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 56-62, 2017.

HANIF, M. *et al.* Heterologous secretory expression and characterization of dimerized bone morphogenetic protein 2 in *Bacillus subtilis*. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

HANKE, L. *et al.* An alpaca nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by blocking receptor interaction. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2020.

HARMSSEN, M. M.; DE HAARD, H. J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 77, n. 1, p. 13-22, 2007.

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**, v. 47, n. 3, p. 364-368, 2006.

HAYAT, S. M. G. *et al.* Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 6, p. 718-725, 2018.

HEMMER, C. *et al.* Nanobody-mediated resistance to Grapevine fanleaf virus in plants. **Plant biotechnology journal**, v. 16, n. 2, p. 660-671, 2018.

HMILA, I. *et al.* A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. **The FASEB Journal**, 24, n. 9, p. 3479-3489, 2010.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nature biotechnology**, 23, n. 9, p. 1126-1136, 2005.

HUFTON, S. E. *et al.* The Breadth of Cross Sub-Type Neutralisation Activity of a Single Domain Antibody to Influenza Hemagglutinin Can Be Increased by Antibody Valency. **PLOS ONE**, v. 9, n. 8, p. e103294, 1 ago. 2014.

HULTBERG, A. *et al.* Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e17665, 2011.

HURLE, M. R.; HELMS, L. R.; LI, L.; CHAN, W. *et al.* A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 91, n. 12, p. 5446-5450, 1994.

IBANEZ, L. I. *et al.* Nanobodies with in vitro neutralizing activity protect mice against H5N1 influenza virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 8, p. 1063-1072, 2011.

INGRAM, J. R.; SCHMIDT, F. I.; PLOEGH, H. L. Exploiting nanobodies' singular traits. **Annual review of immunology**, 36, p. 695-715, 2018.

JÄHNICHEN, S. *et al.* CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 47, p. 20565-20570, 2010.

JANK, L. *et al.* Current Approaches and Future Perspectives for Nanobodies in Stroke Diagnostic and Therapy. **Antibodies**, v. 8, n. 1, p. 5, mar. 2019.

JOVČEVSKA, I.; MUYLDERMANS, S. The therapeutic potential of nanobodies. **BioDrugs**, v. 34, n. 1, p. 11-26, 2020.

KARAMI, E.; BEHDANI, M.; KAZEMI-LOMEDASHT, F. Albumin nanoparticles as nanocarriers for drug delivery: Focusing on antibody and nanobody delivery and albumin-based drugs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, p. 101471, 1 fev. 2020.

KHAN, S. *et al.* Role of recombinant DNA technology to improve life. **International journal of genomics**, v. 2016, 2016.

KIJANKA, M. *et al.* Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. **Nanomedicine**, v. 10, n. 1, p. 161-174, 2015.

KNUDSEN, C. *et al.* Snakebite envenoming diagnosis and diagnostics. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 661457, 2021.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **nature**, 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.

KÖNNING, D.; ZIELONKA, S.; GRZESCHIK, J.; EMPTING, M. *et al.* Camelid and shark single domain antibodies: structural features and therapeutic potential. **Current opinion in structural biology**, 45, p. 10-16, 2017.

KOROMYSLOVA, A. D.; HANSMAN, G. S. Nanobodies targeting norovirus capsid reveal functional epitopes and potential mechanisms of neutralization. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 11, p. e1006636, 2 nov. 2017.

KOVÁCS, Á. T. *Bacillus subtilis*. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 724-725, 2019.
KRITTANAI, S. *et al.* Expression of actively soluble antigen-binding fragment (Fab) antibody and GFP fused Fab in the cytoplasm of the engineered *Escherichia coli*. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 6, p. 4519–4529, jun. 2020.

KUMADA, Y.; KANG, B.; YAMAKAWA, K.; KISHIMOTO, M.; HORIUCHI, J. I. Efficient preparation and site-directed immobilization of VHH antibodies by genetic fusion of poly (methylmethacrylate)-binding peptide (PMMA-T ag). **Biotechnology Progress**, 31(6), 1563-1570, 2015.

KUNZ, P. *et al.* The structural basis of nanobody unfolding reversibility and thermoresistance. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

KUNZ, P. *et al.* The structural basis of nanobody unfolding reversibility and thermoresistance. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

LAKOWITZ, A.; KRULL, R.; BIEDENDIECK, R. Recombinant production of the antibody fragment D1. 3 scFv with different *Bacillus* strains. **Microbial cell factories**, v. 16, n. 1, p. 1-18, 2017.

LALLOO*, D. G.; THEAKSTON, R. D. G. Snake antivenoms: antivenoms. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 277-290, 2003.

LAMBERTZ, C. *et al.* Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2014.

LI, Da. *et al.* High expression achievement of active and robust anti- β 2 microglobulin nanobodies via *E. coli* hosts selection. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 2860, 2019.

LIU, H. *et al.* Saturation mutagenesis and self-inducible expression of trehalose synthase in *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 4, p. e2826, 2019.

LIU, R. *et al.* Twin-arginine signal peptide of *Bacillus subtilis* YwbN can direct Tat-dependent secretion of methyl parathion hydrolase. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 13, p. 2913-2918, 2014.

LIU, Y.; HUANG, H. Expression of single-domain antibody in different systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 2, p. 539–551, 1 jan. 2018.

- LOPES, D. S. A.; PESSOA, M. H. N.; DA SILVA SANTOS, R.; BARBOSA, M. S. A. produção de insulina artificial através da tecnologia do DNA recombinante para o tratamento de diabetes mellitus. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, 10, n. 1, p. 234-245, 2012
- LUIZ, M. B. 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.
- MITCHELL, L. S.; COLWELL, L. J. Comparative analysis of nanobody sequence and structure data. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, 86, n. 7, p. 697-706, 2018.
- MORADI, A.; POURSEIF, M. M.; JAFARI, B.; PARVIZPOUR, S. *et al.* Nanobody-based therapeutics against colorectal cancer: Precision therapies based on the personal mutanome profile and tumor neoantigens. **Pharmacological research**, p. 104790, 2020.
- MORAIS, S. S. M. Caracterização de nanocorpos de camelídeos ativos contra a proteína N de hantavírus (Dissertação de mestrado), 2016.
- MOUTEL, S. *et al.* NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies. **Elife**, v. 5, p. e16228, 2016.
- MU, D. *et al.* Heterologous signal peptides-directing secretion of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase by *Bacillus subtilis*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 13, p. 5533-5543, 2018.
- MUYLDERMANS, S. Applications of Nanobodies. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 9, n. 1, p. 401–421, 2021.
- MUYLDERMANS, S. *et al.* Camelid immunoglobulins and nanobody technology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Special Issue: The 8th International Veterinary Immunology Symposium (8th IVIS). v. 128, n. 1, p. 178–183, 15 mar. 2009.
- MUYLDERMANS, S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. **Annual review of biochemistry**, 82, p. 775-797, 2013.
- MUYLDERMANS, S. Single domain camel antibodies: current status. **Reviews in molecular Biotechnology**, 74, n. 4, p. 277-302, 2001.
- MUYLDERMANS, S.; ATARHOUCHE, T.; SALDANHA, J.; BARBOSA, J. *et al.* Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. **Protein Engineering, Design and Selection**, 7, n. 9, p. 1129-1135, 1994.
- NGUYEN, V. K.; DESMYTER, A.; MUYLDERMANS, S. Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. 2001.

- OLIVEIRA, S.; HEUKERS, R.; SORNKOM, J.; KOK, R. J. *et al.* Targeting tumors with nanobodies for cancer imaging and therapy. **Journal of Controlled Release**, 172, n. 3, p. 607-617, 2013.
- PANG B.; ZHOU, L.; CUI, W.; LIU, Z.; ZHOU, Z. Production of a Thermostable Pullulanase in *Bacillus subtilis* by Optimization of the Expression Elements. **Starch Stärk**, 2020.
- PATEL, A. R. *et al.* Production optimisation and characterisation of extracellular protease secreted by newly isolated *Bacillus subtilis* AU-2 strain obtained from *Tribolium castaneum* gut. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, p. 101122, 1 maio 2019.
- PEREIRA, S. 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**, v. 9, n. 9, p. e108067, 2014.
- PETSCH, D.; ANSPACH, F. B. Endotoxin removal from protein solutions. **Journal of Biotechnology**, v. 76, n. 2, p. 97–119, 21 jan. 2000.
- PEYVANDI, F. *et al.* Caplacizumab reduces the frequency of major thromboembolic events, exacerbations and death in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. **Journal of thrombosis and haemostasis**, v. 15, n. 7, p. 1448-1452, 2017.
- POURASADI, S. *et al.* Efficient production of nanobodies against urease activity of *Helicobacter pylori* in *Pichia pastoris*. **Turkish journal of medical sciences**, v. 47, n. 2, p. 695-701, 2017.
- PRADO, N. 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**, v. 11, n. 3, p. e0151363, 2016.
- ROMAO, E.; MORALES-YANEZ, F.; HU, Y.; CRAUWELS, M. *et al.* Identification of useful nanobodies by phage display of immune single domain libraries derived from camelid heavy chain antibodies. **Current pharmaceutical design**, 22, n. 43, p. 6500-6518, 2016.
- ROOVERS, R. C. *et al.* Efficient inhibition of EGFR signalling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 56, n. 3, p. 303–317, mar. 2007.
- ROSANO, G. L.; MORALES, E. S.; CECCARELLI, E. A. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. **Protein Science**, v. 28, n. 8, p. 1412-1422, 2019.
- SAGT, C. M. J. *et al.* Introduction of an N-Glycosylation Site Increases Secretion of Heterologous Proteins in Yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4940–4944, 1 nov. 2000.
- SALEMA, V.; FERNÁNDEZ, L. Á. *Escherichia coli* surface display for the selection of nanobodies. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1468-1484, 2017.
- SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian journal of microbiology**, v. 50, n. 1, p. 1-17, 2004.

SCHOTTE, P. *et al.* *Pichia pastoris* MutS strains are prone to misincorporation of O-methyl-l-homoserine at methionine residues when methanol is used as the sole carbon source. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 98, 7 jun. 2016.

SCHUMACHER, D.; HELMA, J.; SCHNEIDER, A. F.; LEONHARDT, H. *et al.* Nanobodies: chemical functionalization strategies and intracellular applications. **Angewandte Chemie International Edition**, 57, n. 9, p. 2314-2333, 2018.

SIONTOROU, C. G. Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4215-4227, 2013.

SMOLAREK, D.; BERTRAND, O.; CZERWINSKI, M. Variable fragments of heavy chain antibodies (VHHs): a new magic bullet molecule of medicine? **Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej**, 66, 2012.

SPINELLI, S. *et al.* The crystal structure of a llama heavy chain variable domain. **Nature structural biology**, v. 3, n. 9, p. 752-757, 1996.

STEWART, C. S.; MACKENZIE, C. R.; HALL, J. Christopher. Isolation, characterization and pentamerization of α -cobrotoxin specific single-domain antibodies from a naïve phage display library: Preliminary findings for antivenom development. **Toxicon**, v. 49, n. 5, p. 699-709, 2007.

SU, Y. *et al.* *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2020.

SUWANNASOM, N. *et al.* Riboflavin: The Health Benefits of a Forgotten Natural Vitamin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 950, jan. 2020.

TA, Duy Tien. *et al.* An efficient protocol towards site-specifically clickable nanobodies in high yield: cytoplasmic expression in *Escherichia coli* combined with intein-mediated protein ligation. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 28, n. 10, p. 351-363, 2015.

THEAKSTON, R. D. G.; LAING, G. D. Diagnosis of snakebite and the importance of immunological tests in venom research. **Toxins**, v. 6, n. 5, p. 1667-1695, 2014.

TURBÉ, V. *et al.* Towards an ultra-rapid smartphone-connected test for infectious diseases. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

UNGAR-WARON, H.; ELIAS, E.; GLUCKMAN, A.; TRAININ, Z. Dromedary IgG: purification, characterization, and quantification in sera of dams and newborns. **Isr. J. Vet. Med**, 43, p. 198-203, 1987.

VAN DEN ABEELE, A. *et al.* A llama-derived gelsolin single-domain antibody blocks gelsolin-G-actin interaction. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 9, p. 1519-1535, 1 maio 2010.

VAN DER VAART, J. M. *et al.* Reduction in morbidity of rotavirus induced diarrhoea in mice by yeast produced monovalent llama-derived antibody fragments. **Vaccine**, v. 24, n. 19, p. 4130-4137, 8 maio 2006.

VAN DIJL, J.; HECKER, M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. 2013.

VÉLEZ, A. M. *et al.* High-throughput strategies for penicillin G acylase production in *E. coli* fed-batch cultivations. **BMC Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 6, 2014.

VERHEESEN, P.; LAEREMANS, T. Selection by Phage Display of Single Domain Antibodies Specific to Antigens in Their Native Conformation. In: SAERENS, D.; MUYLDERMANS, S. (Eds.). **Single Domain Antibodies: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. p. 81–104.

VIRANT, D. *et al.* A peptide tag-specific nanobody enables high-quality labeling for dSTORM imaging. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2018.

WEISS, R. A.; VERRIPS, C. Theo. Nanobodies that neutralize HIV. **Vaccines**, v. 7, n. 3, p. 77, 2019.

WESOLOWSKI, J.; ALZOGARAY, V.; REYELT, J.; UNGER, M. *et al.* Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. **Medical microbiology and immunology**, 198, n. 3, p. 157-174, 2009.

WU, S. C. *et al.* Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3261-3269, 2002.

YAN, J. *et al.* Construction of a synthetic phage-displayed Nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications. **Journal of translational medicine**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2014.

YAN, X. *et al.* Cre/lox System and PCR-Based Genome Engineering in *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5556–5562, 1 set. 2008.

YANG, M. *et al.* Engineering *Bacillus subtilis* as a versatile and stable platform for production of nanobodies. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n. 8, p. e02938-19, 2020.