

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

MARIA JOSÉ CHIABAI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DE
ANTICORPOS RECOMBINANTES, PRODUZIDOS POR MEIO DE UM
SISTEMA DE ENTREGA DE DNA TENDO A BACTÉRIA *Lactococcus*
lactis COMO VEÍCULO, NO TRATAMENTO DA COLITE
EXPERIMENTAL**

Brasília, DF

2019

MARIA JOSÉ CHIABAI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DE
ANTICORPOS RECOMBINANTES, PRODUZIDOS POR MEIO DE UM
SISTEMA DE ENTREGA DE DNA TRANSPORTADO POR
Lactococcus lactis, NO TRATAMENTO DA COLITE EXPERIMENTAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor (a) em Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Coorientador: Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Brasília, DF

2019

Ficha de Catalogação

Parecer/ Aprovação

Aos meus pais Gilberto e Luniana,
ao meu irmão João Paulo e ao meu marido
Fernando. Dedico a vós minha eterna
gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Sua benção e por ter me segurado em Suas mãos nos momentos em que eu mais precisei.

Aos professores Andrea Maranhão e Marcelo Brigido, meus orientadores, pela competência científica e por todos os ensinamentos. Obrigada pelo compromisso, paciência, incentivo, confiança, assim como pelas críticas, correções e sugestões feitas durante o doutorado. Também agradeço muito pela amizade e o carinho de vocês. Muito, muito obrigada!

À professora Anamélia Bocca, por abrir as portas de seu laboratório para a concretização deste trabalho e por me acolher.

Ao professor Anderson Miyoshi da UFMG, por me receber de forma tão generosa. Obrigada por dividir seus conhecimentos, pela disponibilidade, dedicação e atenção.

À professora Leonora Vianna, pela competência e participação “patológica” neste trabalho. A sua contribuição foi fundamental.

À Juliana Almeida, pela grande amizade concretizada e pelos cafés que me fizeram mais feliz!

À Azadeh Mehdad, que já não está mais aqui conosco e que tive a grande sorte de conhecer.

Às minhas queridas estagiárias Gabriele, Mariana e Suelen, que me deram muito trabalho, mas que, mais tarde, renderam excelentes frutos e me dão muito orgulho!

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada, Ana Paula, Isabel, Juan, Nestor, Renato e Ronny, que estiveram ao meu lado durante todo este período, comemorando os experimentos que deram certo e reclamando dos que deram errado.

Às meninas da UFMG, que me auxiliaram: Vanessa Bastos, Meri Txell e Camila Prósperi.

Aos colegas de experimentos que me deram uma “mãozinha” em alguma análise ou experimento, ou me emprestaram algum material: Angelina Basso, Karina Simon, Raffael Araújo, Fabiana Brandão, Márcio Jerônimo, Waldeyr Mendes, Jivago e Chris Hoffmann.

Aos professores do IB, obrigada pelas dicas, ensinamentos e auxílios prestados.

Aos funcionários do IB, em especial Ana, dona Fátima, Ivone e Márcia, pela atenção e disponibilidade sempre que precisei.

Aos meus muito mais que amigos, Beto, Flávia e Rogério! Sem o apoio de vocês, eu não conseguiria.

Aos membros da banca examinadora Dra. Ana Faria, Dr. Aldo Tavares e Dra. Kelly Magalhães pela disponibilidade e cuidadosa avaliação deste trabalho.

À CAPES, CNPq e FAP-DF pelo apoio financeiro.

À minha família, por ser o meu porto seguro!

Tudo isso foi fundamental para o término deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

Doença inflamatória intestinal (IBD), incluindo doença de Crohn (CD) e colite ulcerativa (UC), é caracterizada por uma inflamação crônica do trato gastrointestinal (GIT) e tem origem pouco conhecida. Assim, entender os mecanismos moleculares da patologia e desenvolver novos medicamentos é fundamental para o tratamento destas doenças. Nesse contexto, a citocina TNF α desempenha papel crucial na patogênese de IBD e é atualmente considerada o melhor alvo terapêutico. Entretanto, a via de administração intravenosa de imunoterapias convencionais causa imunogenicidade e efeitos colaterais sistêmicos. Para contornar estas limitações, a entrega local destes medicamentos poderia beneficiar os pacientes, restringindo a terapia no sítio inflamatório. Portanto, o desenvolvimento de linhagens de *Lactococcus lactis* capazes de entregar um vetor de expressão eucariótica que codifique um fragmento variável de cadeia única (*scFv*) de anticorpo representa uma nova estratégia para a elaboração de uma terapia alternativa mais efetiva para expressão diretamente no intestino, contra UC. Logo, dois vetores derivados de pValac que codificam dois *scFv* foram construídos para produção de anti-TNF α e de anti-IL1 β e foram testados no modelo de colite induzida por DSS, em camundongos. Após mostrar que os dois vetores eram capazes de induzir a síntese dos anticorpos por cultura de células animais HEK-293, os plasmídeos foram introduzidos em *L. lactis* MG1363 FnBPA+ para serem testados no modelo *in vivo* com camundongos C57BL/6. Após 4 dias de tratamento, a administração oral de *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::anti-TNF α), mas não de *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::anti-IL1 β), se mostrou capaz de melhorar os parâmetros macroscópicos e histológicos da colite. Além disso, os animais tratados apresentaram níveis dos transcritos de mRNA de IL-6, IL17A, IL1 β , IL10 e Foxp3 semelhantes aos animais saudáveis. Portanto, marcadores moleculares e morfológicos sugerem melhora da colite induzida experimentalmente. Assim, este estudo fornece evidências para o uso deste sistema alternativo de entrega de biofarmacêuticos *in loco* para o tratamento de IBD, pavimentando o caminho para uma nova rota biotecnológica de baixo custo e direcionada ao sítio de inflamação para o tratamento de doenças inflamatórias.

Palavras-chave: *Lactococcus lactis*, entrega de mucosa, anti-TNF α , *scFv*, colite, DSS.

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD), which includes Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), is characterized by chronic inflammation of the gastrointestinal tract (GIT) and a cryptogenic origin. Thus, understanding the molecular mechanisms of pathology and developing new drugs is pivotal to the treatment of these diseases. In this context, tumor necrosis factor- α (TNF α) plays a crucial role in the pathogenesis of IBD and it is currently the most considered target for immunotherapy. However, the intravenous administration route of conventional immunotherapy causes immunogenic and systemic side effects. To circumvent these limitations, the local delivery of this pharmaceutical would benefit patients, restricting therapy towards the inflamed tissue. Therefore, the development of *Lactococcus lactis* strains capable of delivering a eukaryotic expression vector encoding a single-chain fragment variable (*scFv*) represents a new strategy for the elaboration of a more effective alternative therapy for expression in the GIT lining, against UC. Thus, two *scFv* coding pValac derived vectors were constructed for producing anti-TNF α and anti-IL1 β production, and they were evaluated in a DSS-induced colitis model in mice. After showing that both *scFv* expression vectors are able to induce antibody protein synthesis the cultured animal cells HEK-293, the plasmids were introduced in *L. lactis* MG1363 FnBPA+ to be tested *in vivo* in C57BL/6 mice. After four days of treatment, oral administration of *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::anti-TNF α), but not *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::anti-IL1 β), was able to improvement the histological and macroscopic score of colitis. Moreover, treated animals display IL-6, IL17A, IL1 β , IL10 e Foxp3 mRNA levels similar to health control mice. Therefore, morphological and molecular markers suggest amelioration of the experimentally induced colitis. Hence, this study provides evidences for the use of this alternative system for delivering therapeutic biopharmaceuticals *in loco* for treating inflammatory bowel disease, paving the way for a novel low-cost and site-specific biotechnological route for the treatment of inflammatory disorders.

Keywords: *Lactococcus lactis*, mucosal delivery, anti-TNF α , *scFv*, colitis, DSS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|------------------------|--|
| Amp | Ampicilina |
| AP | <i>Alkaline Phosphatase</i> |
| ASC | <i>Apoptosis-Associated Speck-Like Protein</i> |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| BGH | Hormônio de Crescimento Bovino |
| BL | Bactéria Láctica |
| BLG | Beta-lactoglobulina |
| Caco-2 | <i>Human Colon Cancer 2 Cell</i> |
| CD | <i>Crohn's Disease</i> (Doença de Crohn) |
| cDNA | DNA Complementar |
| CHO-K1 | <i>Chinese Hamster Ovary K1 Cell</i> |
| <i>Cm^r</i> | Gene de Resistência ao Cloranfenicol |
| DAI | <i>Disease Activity Index</i> |
| DAMP | <i>Damage-Associated Molecular Pattern</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DO | Densidade Óptica |
| DSS | <i>Dextran Sulphate Sodium</i> (Dextrana sulfato de sódio) |
| ELISA | Imunoensaio Enzimático |
| <i>Ery^r</i> | Gene de Resistência a Eritromicina |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FnBPA | <i>Fibronectin Binding Protein A</i> (Proteína A de ligação à fibronectina) |
| GALT | <i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i> (Tecido linfoide associado ao intestino) |
| gDNA | DNA Genômico |
| GFP | <i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína Verde Fluorescente) |
| GRAS | <i>Generally Recognized As Safe</i> (Geralmente reconhecidos como seguros) |
| HACA | <i>Human Anti-Chimeric Antibodies</i> |
| HAMA | <i>Human Anti-Murine Antibodies</i> |
| HEK-293 | <i>Human Embryonic Kidney 293 Cell</i> |
| IBD | <i>Inflammatory Bowel Disease</i> (Doença Inflamatória Intestinal) |
| IgA | Imunoglobulina A |
| IgG | Imunoglobulina G |
| ILC | Células Linfoides Inatas |
| LB | Luria-Bertani |
| LITAF | <i>Lipopolysaccharide Induced TNFα Factor</i> |
| mAbs | <i>Monoclonal Antibodies</i> (Anticorpos Monoclonais) |
| mRNA | RNA Mensageiro |
| NF κ B | Fator Nuclear kappa B |
| ORF | <i>Open Reading Frame</i> (Fase de Leitura Aberta) |
| PAMP | <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| pCMV | Promotor do Citomegalovirus |

| | |
|------------------------|--|
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| poliA | Sinal de Poliadenilação |
| pValac | Plasmídeo - <i>Vaccination Using Lactic Acid Bacteria</i> |
| qPCR | <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> |
| RepA | Origem de Replicação em <i>L. lactis</i> |
| RepC | Origem de Replicação em <i>E. coli</i> |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| RPS9 | Proteína Ribossomal S9 |
| scFv | Fragmento Variável de Cadeia Única |
| SDS-PAGE | <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| slgA | Imunoglobulina A Secretória |
| TCA | Ácido Tricloroacético |
| <i>Tet^r</i> | Gene de Resistência a Tetraciclina |
| TGI | Trato Gastrointestinal |
| TLRs | Receptores do tipo <i>Toll</i> |
| tmTNF | TNF transmembrana |
| UC | <i>Ulcerative Colitis</i> (Colite Ulcerativa) |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |
| % | Porcentagem |
| °C | Graus Celsius |
| cm | Centímetro |
| kb | Quilobase |
| kDa | Quilodalton |
| kV | Quilovolt |
| L | Litro |
| M | Molar |
| mA | Miliampère |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| mm | Milímetro |
| m/v | Massa/volume |
| ng | Nanograma |
| nm | Nanômetro |
| p/v | Peso/volume |
| pb | Pares de base |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| qsp | Quantidade suficiente para |
| rpm | Rotações por minuto |
| U | Unidade de atividade enzimática |
| V | Volt |
| v/v | Volume/volume |
| x g | Força gravitacional |
| Ω | Ohm |
| μF | Microfarad |
| μg | Micrograma |
| μm | Micrômetro |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Anticorpos terapêuticos aprovados em 2018 nos Estados Unidos e/ ou na Europa*. | 23 |
| Tabela 2. Anticorpos terapêuticos em estudos clínicos de fase tardia para condições que não o câncer*. | 24 |
| Tabela 3. Moléculas-alvo potenciais para terapias biológicas em pacientes com IBDs. | 33 |
| Tabela 4. mAbs anti-TNF aprovados pelo FDA para tratamento de IBDs. | 35 |
| Tabela 5. Linhagens bacterianas utilizadas neste estudo. | 50 |
| Tabela 6. Plasmídeos utilizados neste estudo. | 50 |
| Tabela 7. Plasmídeos e respectivas endonucleases. | 63 |
| Tabela 8. Massa molecular das proteínas dos fragmentos de anticorpos scFv anti-TNFα e scFv anti-IL1β. | 69 |
| Tabela 9. Sequência de iniciadores para PCR. | 73 |
| Tabela 10. Esquema de tratamento do experimento animal 1. | 77 |
| Tabela 11. Esquema de tratamento do experimento animal 2A. | 78 |
| Tabela 12. Esquema de tratamento do experimento animal 2B. | 79 |
| Tabela 13. Esquema de tratamento do experimento animal 3. | 80 |
| Tabela 14. Disease activity index (DAI). | 81 |
| Tabela 15. Índice de danos histológicos. | 83 |
| Tabela 16. Iniciadores usados para qPCR. | 85 |
| Tabela 17. Condições de ciclagem para qPCR. | 86 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência de CD e UC dos anos de 1990 a 2016. Mapa do mundo representando a incidência de (A) CD e de (B) UC. Adaptado (Ng et al., 2018). 28

Figura 2. O inflamassoma NLRP3. O inflamassoma NLRP3 é composto por 3 proteínas: NLRP3, ASC e pró-caspase-1. O NLRP3 tem 3 domínios: LRR, NACHT e PYD. A proteína ASC pareia-se com NLRP3 via domínio PYD e com pró-caspase-1 via domínio CARD. A ativação de LRR pelo DAMP desencadeia a transcrição de NLRP3 e pró-IL-1 β . Assim, o inflamassoma inteiramente montado ativa caspase-1, levando a ativação de IL1 β e IL-18. Abreviações: ASC, apoptosis associated speck-like protein; LRR, leucine-rich repeats; PYD, N-terminal pyrin domain. Adaptado (Butts et al., 2015). 38

Figura 3. Representação esquemática da transferência de DNA mediada por bactéria para células eucariotas. 1) Célula eucariótica e bactéria carregando a ORF de interesse; 2) Entrada da bactéria nas células-alvo; 3) Formação do fagolisossomo; 4) Lise bacteriana; 5 e 6) Escape dos plasmídeos do fagolisossomo e liberação dos plasmídeos no citoplasma, sendo transferido para o núcleo da célula hospedeira; 7) Expressão da ORF de interesse no núcleo; 8) Tradução e síntese proteica pela maquinaria da célula hospedeira para liberação da proteína de interesse para o lúmen intestinal. Adaptado (Pontes et al., 2011). 43

Figura 4. Estrutura do vetor de expressão eucariótica pValac. A unidade transcricional é responsável pela expressão da proteína de interesse nas células eucarióticas, contendo o promotor, o transgene de interesse e a sequência Kozak, o stop códon e a sequência de poliadenilação (poly A). A região procariótica é a responsável pela proliferação e manutenção do plasmídeo na bactéria. Contém o gene de resistência como marcador de seleção bacteriana e a origem de replicação procariótica. Adaptado (Pereira et al., 2014b). 44

Figura 5. Sequência nucleotídica da ORF scFv anti-TNF α de *M. musculus*. A ORF scFv anti-TNF α possui 838 pb. A sequência destacada de rosa claro representa o peptídeo sinal de albumina humana e a destacada de verde representa a sequência do peptídeo derivado de HA. 52

Figura 6. Sequência nucleotídica da ORF scFv anti-IL1 β de *M. musculus*. A ORF scFv anti-IL1 β possui 835 pb. A sequência destacada de rosa claro representa o peptídeo sinal de albumina humana e a destacada de verde representa a sequência do peptídeo derivado de HA. 53

Figura 7. Representação esquemática das ampliações da região codificante das ORFs scFv anti-TNF α e scFv anti-IL1 β , que ilustra os dois fragmentos gerados com tamanhos distintos. A estratégia consistiu em amplificar um fragmento do pValac que compreende o inserto, clonados em *L. lactis*. 72

Figura 8. Linha do tempo do experimento animal 1. O experimento 1 foi composto por 42 animais, dos quais os do grupo CN ingeriram somente salina e água filtrada durante todo o experimento. Os grupos DSS, LL-F, LL-FT, LL-FI e LL-FTI ingeriram DSS 2% adicionado à água filtrada durante todo o experimento. Dos dias 8 ao 14, os

grupos LL-F, LL-FT, LL-FI e LL-FTI receberam *L. lactis* recombinantes. Os animais foram sacrificados no dia 15 (seta)..... 77

Figura 9. Linha do tempo do experimento animal 2A. O experimento 2A foi composto por 21 animais, dos quais os do grupo CN ingeriram somente salina e água filtrada durante todo o experimento. Os grupos DSS, LL-F, LL-FT e LL-FI ingeriram DSS 2% adicionado à água filtrada durante todo o experimento. Dos dias 5 ao 8, os grupos LL-F, LL-FT e LL-FI receberam *L. lactis* recombinantes. Os animais foram sacrificados no dia 9 (seta)..... 79

Figura 10. Linha do tempo do experimento animal 2B. O experimento 2B foi composto por 21 animais, dos quais os do grupo CN ingeriram somente salina e água filtrada durante todo o experimento. O grupo DSS ingeriu a substância química durante todo o experimento. Os grupos LL-F, LL-FT e LL-FI ingeriram DSS 2% dos dias 1 ao 8, e dos dias 5 ao 12 estes grupos receberam *L. lactis* recombinantes. Os animais foram sacrificados no dia 13 (seta). 80

Figura 11. Linha do tempo do experimento animal 3. O experimento 3 foi composto por 41 animais, dos quais os do grupo CN ingeriram somente salina e água filtrada durante todo o experimento. Os grupos DSS, LL-M, LL-F, LL-FT, LL-FI e LL-FTI ingeriram DSS 2% adicionado à água filtrada durante todo o experimento. Dos dias 5 ao 8, os grupos LL-M, LL-F, LL-FT, LL-FI e LL-FTI receberam *L. lactis*. Os animais foram sacrificados no dia 9 (seta)..... 81

Figura 12. Visualização do DNA plasmidial em média escala dos plasmídeos pBluescriptIIISK(-)::*anti-IL1 β* e pBluescriptIIISK(-)::*anti-TNF α* . Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. L: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1: pBluescriptIIISK(-)::*anti-IL1 β* , 2: High DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 3: pBluescriptIIISK(-)::*anti-TNF α* 89

Figura 13. Produto da digestão enzimática dos plasmídeos pBluescriptIIISK(-)::*anti-IL1 β* e pBluescriptIIISK(-)::*anti-TNF α* com as enzimas Nhe I e EcoR I. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. L: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1: vetor pBluescriptIIISK(-) e ORF *scFv anti-IL1 β* e 2: vetor pBluescriptIIISK(-) e ORF *scFv anti-TNF α* 90

Figura 14. Purificação das ORFs *scFv anti-IL1 β* e *scFv anti-TNF α* a partir de um gel preparatório de agarose. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. L: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1: ORF *scFv anti-IL1 β* e 2: ORF *scFv anti-TNF α* 91

Figura 15. Produto da digestão enzimática do plasmídeo pValac::*gfp* com as enzimas Nhe I e EcoR I. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. L: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 a 4: vetor pValac. 91

Figura 16. Purificação do vetor pValac sem a ORF *gfp* a partir de um gel preparatório de agarose. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. L: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 e 2: vetor pValac. 92

Figura 17. Produtos da digestão enzimática dos plasmídeos pValac::*anti-IL1 β* e pValac::*anti-TNF α* com as enzimas Nco I e Xba I, respectivamente. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. L: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 1 e 3: pValac::*anti-IL1 β* intacto; 2 e 4: pValac::*anti-*

IL1 β digerido por *Nco*I; 5 e 7: pValac::*anti-TNF α* intacto; 6 e 8: pValac::*anti-TNF α* digerido por *Xba*I. 93

Figura 18. Imunodetecc o dos scFvs de anti-TNF α e anti-IL1 β no sobrenadante de cultivo de células após a transfec o. 1: controle positivo de uma proteína scFv; 2: anti-IL1 β detectado em sobrenadante de Caco-2; 3: anti-TNF α detectado em sobrenadante de HEK-293; 4: anti-IL1 β detectado em sobrenadante de HEK-293; L: BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). 94

Figura 19. Produtos de amplificac o do PCR confirmando a presença dos plasmídeos em *L. lactis*. L: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 1: produto da amplificac o de pValac::*anti-IL1 β* ; 2: produto de amplificac o de pValac::*anti-TNF α* 95

Figura 20. Curvas de crescimento das diferentes linhagens de *L. lactis*, de acordo com a rela o DO₆₀₀ versus tempo. LL-M, *L. lactis* MG1363; LL-F, *L. lactis* MG1363 FnBPA+; LL-FT, *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*), e LL-FI, *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-IL1 β*). 96

Figura 21. A. Peso (g) e B. Comprimento do cólon (cm) do experimento 1. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*); LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*IL1 β*); e LL-FI: grupo que recebeu concomitantemente LL-FT e LL-FI. As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney para o gráfico e ANOVA *two-way* para as curvas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ 97

Figura 22. Score histológico do experimento 1. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*); LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*IL1 β*); e LL-FI: grupo que recebeu concomitantemente LL-FT e LL-FI. 98

Figura 23. A. Peso (g) e B. Comprimento do cólon (cm) do experimento 2A. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*); e LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*IL1 β*). As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney para o gráfico e ANOVA *two-way* para as curvas. * $p < 0,05$ 99

Figura 24. DAI do experimento 2A. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*); e LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*IL1 β*). As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$ 100

Figura 25. Peso (g) e comprimento do cólon (cm) do experimento 2B. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*); e LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*IL1 β*). As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney para o gráfico e ANOVA *two-way* para as curvas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ 101

Figura 26. DAI do experimento 2B. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*); e LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*IL1 β*). As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$102

Figura 27. A. Peso (g) e B. Comprimento do cólon (cm) do experimento 3. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*); LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*IL1 β*); e LL-FTI, grupo que recebeu concomitantemente LL-FT e LL-FI. As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney para o gráfico e ANOVA *two-way* para as curvas * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$103

Figura 28. A. DAI e B. Score histológico do experimento 3. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*); LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*IL1 β*); e LL-FTI, grupo que recebeu concomitantemente LL-FT e LL-FI. As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$104

Figura 29. Análise histopatológica. Lâminas representativas do tecido colônico distal de cada grupo de animais do experimento 3. **(A)** grupo CN, parede intestinal de aspecto normal; **(B)** grupo DSS, extensa úlcera e exsudato fibrino-puruleto na superfície e infiltrado inflamatório estendido até a submucosa; **(C)** grupo LL-F, intenso infiltrado inflamatório comprometendo todas as camadas da parede intestinal; **(D)** grupo LL-FT, parede intestinal com mucosa íntegra e discreto infiltrado inflamatório que se estende até a submucosa, e muscular própria de aspecto normal; **(E)** grupo LL-FI, área de ulceração na mucosa (seta preta); **(F)** grupo LL-FTI, infiltrado inflamatório intenso comprometendo todas as camadas da parede intestinal.106

Figura 30. Níveis de expressão de mRNA no tecido colônico após tratamento com *L. lactis*. Os níveis de mRNA foram normalizados com o gene endógeno RPS9. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*); LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*IL1 β*); e LL-FTI, grupo que recebeu concomitantemente LL-FT e LL-FI. As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$109

Figura 31. Concentração de proteína-c reativa sérica. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*); LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*IL1 β*); e LL-FTI, grupo que recebeu concomitantemente LL-FT e LL-FI. As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$110

Figura 32. Quantificação de IgA fecal. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*); LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*IL1 β*); e LL-FTI, grupo que recebeu concomitantemente LL-FT e LL-FI. As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$111

lactis FnBPA+ (pValac::*IL1β*); e LL-FTI, grupo que recebeu concomitantemente LL-FT e LL-FI. As barras representam as médias ± EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney.111

Figura 33. Quantificação Sérica de IL-6, TNF e IL-10. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ e LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNFα*). As barras representam as médias ± EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$112

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 22 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 28 |
| 2.1 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS | 28 |
| 2.2 TRATAMENTO PARA IBDs | 32 |
| 2.2.1 Terapias com anti-TNF α | 33 |
| 2.2.2 Terapias com anti-IL1 β | 36 |
| 2.3 BACTÉRIAS LÁCTICAS (BLs) E O TRATAMENTO DE IBD | 39 |
| 2.3.1 O papel de anti-TNF α e anti-IL1 β em IBD | 45 |
| 3. OBJETIVOS | 47 |
| 3.1 OBJETIVO PRINCIPAL | 47 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 47 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 49 |
| 4.1 LINHAGENS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO | 49 |
| 4.1.1 <i>Escherichia coli</i> | 49 |
| 4.1.2 <i>Lactococcus lactis</i> | 49 |
| 4.2 PLASMÍDEOS | 50 |
| 4.3 DESENHO DAS ORFs DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS | 51 |
| 4.4 SÍNTESE DAS ORFs DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS | 53 |
| 4.5 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS pValac::<i>anti-TNFα</i> E pValac::<i>anti-IL1β</i> | 54 |
| 4.5.1 Preparação da ORF <i>scFv anti-TNFα</i> e da ORF <i>scFv anti-IL1β</i> | 54 |
| 4.5.1.1 Preparação de Células Competentes e Transformação de <i>E. coli</i> XL1-Blue | 54 |
| 4.5.1.1.1 Por Choque Térmico (Cloreto de Cálcio - CaCl ₂) | 54 |
| 4.5.1.1.2 Por Eletroporação | 55 |

| | |
|--|----|
| 4.5.1.2 Extração de DNA Plasmidial de <i>E. coli</i> XL1-Blue em Média Escala | 56 |
| 4.5.1.3 Confirmação da Clonagem | 56 |
| 4.5.1.3.1 Gel de Agarose e Resolução Eletroforética | 57 |
| 4.5.1.3.2 Digestão Enzimática | 57 |
| 4.5.2 Preparação do Vetor pValac | 58 |
| 4.5.2.1 Digestão Enzimática | 58 |
| 4.5.2.2 Purificação do Fragmento de DNA do Vetor pValac sem a ORF <i>gfp</i> | 59 |
| 4.5.3 Ligação das ORFs <i>scFv anti-TNFα</i> e <i>scFv anti-IL1β</i> no Vetor pValac | 59 |
| 4.5.4 Confirmação da Ligação pValac:: <i>anti-TNFα</i> e pValac:: <i>anti-IL1β</i> | 60 |
| 4.5.4.1 Transformação em <i>E. coli</i> TG1 por Eletroporação | 61 |
| 4.5.4.2 Extração de DNA Plasmidial de <i>E. coli</i> TG1 em Pequena Escala | 61 |
| 4.5.4.3 Confirmação da Clonagem | 62 |
| 4.5.4.3.1 Digestão Enzimática | 62 |
| 4.5.4.3.2 Sequenciamento de Sanger | 63 |
| 4.6 ENSAIOS DE TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS | 63 |
| 4.6.1 Linhagens de Células Eucarióticas e Condições e Cultivo | 64 |
| 4.6.1.1 HEK-293 | 64 |
| 4.6.1.2 CHO-K1 | 64 |
| 4.6.1.3 Caco-2 | 64 |
| 4.6.2 Congelamento e Descongelamento das Células | 64 |
| 4.6.3 Transfecção de Células HEK-293, CHO-K1 e Caco-2 com os Plasmídeos pValac:: <i>anti-TNFα</i> e pValac:: <i>anti-IL1β</i> | 65 |
| 4.6.4 SDS-PAGE | 66 |
| 4.6.4.1 Montagem do Aparato de Eletroforese e Confeção do Gel de Poliacrilamida | 66 |
| 4.6.4.2 Preparo das Amostras | 67 |
| 4.6.4.3 Corrida e Condições de Migração | 67 |

| | |
|---|-----------|
| 4.6.4.4 Coloração do Gel de Poliacrilamida..... | 68 |
| 4.6.5 Imunodeteccção por <i>Western Blot</i> | 68 |
| 4.7 CONSTRUÇÃO DAS LINHAGENS <i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA+ (pValac::<i>anti-TNFα</i>) E <i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA+ (pValac::<i>anti-IL1β</i>)..... | 70 |
| 4.7.1 Confeccção de Células Eletrocompetentes e Transformação de <i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA+..... | 70 |
| 4.7.2 Extração de DNA Plasmidial de <i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA+ em Pequena Escala..... | 71 |
| 4.7.3 Confirmação da Clonagem..... | 72 |
| 4.7.4 Curvas de Crescimento das Linhagens de <i>L. lactis</i> | 73 |
| 4.8 ENSAIOS COM AS LINHAGENS RECOMBINANTES DE <i>L. lactis</i> EM MODELO ANIMAL DE COLITE..... | 74 |
| 4.8.1 Indução da Colite Experimental..... | 75 |
| 4.8.2 Preparo das Doses e Administração da Bactéria..... | 75 |
| 4.8.3 Padronização do Protocolo de Indução de Colite Experimental com DSS em Camundongo..... | 76 |
| 4.8.3.1 Experimento Animal 1..... | 76 |
| 4.8.3.2 Experimento Animal 2..... | 78 |
| 4.8.3.3 Experimento Animal 3..... | 80 |
| 4.8.4 <i>Disease Activity Index (DAI)</i> | 81 |
| 4.8.5 Índice de Danos Histológicos da Inflamação Intestinal..... | 82 |
| 4.8.6 Isolamento de RNA Colônico e Análise por qPCR..... | 83 |
| 4.8.6.1 Obtenção de RNA do Tecido Intestinal..... | 84 |
| 4.8.6.2 Quantificação e Qualificação do RNA Extraído..... | 84 |
| 4.8.6.3 Tratamento do RNA com DNase..... | 84 |
| 4.8.6.4 Síntese de cDNA..... | 85 |
| 4.8.6.5 Ensaio de qPCR..... | 85 |
| 4.8.7 Avaliação de Parâmetros Bioquímicos..... | 86 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 4.8.7.1 | Quantificação Sérica de Proteína-C Reativa | 87 |
| 4.8.7.2 | Quantificação de IgA Fecal | 87 |
| 4.8.7.3 | Quantificação Sérica de Citocinas | 87 |
| 4.9 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 88 |
| 5. | RESULTADOS | 89 |
| 5.1 | ETAPAS DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS pValac:: <i>anti-TNFα</i> E pValac:: <i>anti-IL1β</i> | 89 |
| 5.2 | ENSAIOS DE TRANSFECCÃO EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS | 93 |
| 5.3 | CONSTRUÇÃO DAS LINHAGENS <i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA+ (pValac:: <i>anti-TNFα</i>) E <i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA+ (pValac:: <i>anti-IL1β</i>) | 94 |
| 5.4 | CURVAS DE CRESCIMENTO BACTERIANO | 95 |
| 5.5 | ENSAIOS COM AS LINHAGENS RECOMBINANTES DE <i>L. lactis</i> EM MODELO ANIMAL DE COLITE | 96 |
| 5.5.1 | Experimento Animal 1 | 96 |
| 5.5.2 | Experimento Animal 2 | 98 |
| 5.5.3 | Experimento Animal 3 | 102 |
| 5.6 | ENSAIOS DE qPCR | 106 |
| 5.7 | DOSAGEM SÉRICA DE PROTEÍNA-C REATIVA | 110 |
| 5.8 | DOSAGEM DE IGA FECAL | 110 |
| 5.9 | QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DE CITOCINAS | 111 |
| 6. | DISCUSSÃO | 113 |
| 7. | CONCLUSÃO | 125 |
| 8. | REFERÊNCIAS | 128 |

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

Na última década, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais (*Monoclonal Antibodies*, mAbs) tem ganhado destaque como um dos pilares de opções terapêuticas para doenças autoimunes e inflamatórias. Grandes avanços no entendimento de mecanismos moleculares dessas doenças resultaram em enorme benefícios para pacientes que dependem de anticorpos terapêuticos e serviram como base para o expansão de futuros mAbs terapêuticos (Chan and Carter, 2010).

Quando a tecnologia do hibridoma foi criada (Köhler and Milstein, 1975), mAbs de camundongos foram desenvolvidos, em 1975, porém estes agentes terapêuticos apresentavam limitações como imunogenicidade, tempo de meia-vida curto e falta de funções efetoras. Assim, houve o advento de anticorpos quiméricos e, em meados de 1980, surgiram tecnologias para humanização de anticorpos (Chan and Carter, 2010).

Ao contrário dos anticorpos policlonais que são muito variáveis na composição, os mAbs são produtos homogêneos e monoespecíficos. Com isso, é possível a obtenção de uma preparação de anticorpos homogênea, específica e facilmente padronizável. Devido a estas características, na clínica, eles foram recebidos como uma nova geração de fármacos, com grande especificidade e poder terapêutico. Porém, como os mAbs que já são comercializados ainda não podem ser administrados pela via oral, seu uso requer formulações terapêuticas de uso sistêmico implicando um alto custo para a indústria farmacêutica, doses geralmente elevadas e limitações de penetração na barreira hematoencefálica, já que possuem tamanhos grandes, como o formato IgG, com 150 kDa (Chan and Carter, 2010; Kelley, 2009).

De 2010 até o momento, os estudos clínicos com mAbs aumentaram de 26 para mais de 60. O ritmo de desenvolvimento de mAbs acelerou muito, principalmente nos últimos 2 anos. Pela primeira vez, em 2017, o número de mAbs aprovados nos Estados Unidos e na Europa chegou ao total de 10. Em 2018, um total de 12 mAbs novos foram aprovados (Tabela 1) (Kaplon and Reichert, 2018a, 2018b).

Tabela 1. Anticorpos terapêuticos aprovados em 2018 nos Estados Unidos e/ ou na Europa*.

| Nome Internacional | Nome Comercial | Alvo; Formato | Indicação na 1ª Aprovação | Data da 1ª Aprovação na EU | Data da 1ª Aprovação nos EUA |
|-----------------------|------------------|--|---|----------------------------|------------------------------|
| Erenumab | Aimovig | Receptor CGRP; IgG2 Humano | Prevenção de enxaqueca | 26/07/2018 | 17/05/2018 |
| Fremanezumab | Ajovy | Receptor CGRP; IgG2 Humanizado | Prevenção de enxaqueca | Em revisão | 14/09/2018 |
| Galcanezumab | Emgality | Receptor CGRP; IgG4 Humanizado | Prevenção de enxaqueca | 14/11/2018 | 27/09/2018 |
| Burosumab | Crysvita | FGF23; IgG1 Humano | Hipofosfatemia ligada ao cromossomo X | 19/02/2018 | 17/04/2018 |
| Lanadelumab | Takhzyro | Calicreína; IgG1 Humano | Ataques de angioedema hereditário | 22/11/2018 | 23/08/2018 |
| Caplacizumab | Cablivi | Fator de von Willebrand; nanobody Humanizado | Púrpura trombocitopênica trombótica adquirida | 31/08/2018 | Em revisão |
| Mogamulizumab | Poteligeo | CCR4; IgG1 Humanizado | Micose fungóide e síndrome de Sézary | 22/11/2018 | 08/08/2018 |
| Moxetumomab pasudodox | Lumoxiti | CD22; imunotoxina dsFv de IgG1 murino | Leucemia de células pilosas | NA | 13/09/2018 |
| Cemiplimab | Libtayo | PD-1; mAb Humano | Carcinoma de células escamosas | Em revisão | 28/09/2018 |
| Ibalizumab | Trogarzo | CD4; IgG4 Humanizado | Infecção por HIV | Em revisão | 06/03/2018 |
| Tildrakizumab | Ilumetri, Ilumya | IL-23 p19; IgG1 Humanizado | Psoríase em placa | 17/09/2018 | 20/03/2018 |
| Emapalumab | Gamifant | IFN γ ; IgG1 Humano | Linfo-histiocitose hemofagocítica primária | Em revisão | 20/11/2018 |

*Dados obtidos em 30 de novembro de 2018. CGRP, *calcitonin gene-related peptide*; dsFv, *disulfide-stabilized variable fragment*; EU, *European Union*; FGF23, *fibroblast growth factor 23*; IgG, *immunoglobulin G*; NA, *not applicable*; PD-1, *programmed cell death 1*; EUA, *United States*. Adaptado (Kaplon and Reichert, 2018b).

Dados atuais mostram que 29 mAbs estão sob investigação com estudos clínicos em andamento e testes em pacientes com doenças cardiovasculares, doenças autoimunes, doenças infecciosas, desordens neurológicas e condições oftálmicas (Tabela 2).

Tabela 2. Anticorpos terapêuticos em estudos clínicos de fase tardia para condições que não o câncer*.

| Companhia Farmacêutica | Nome Internacional | Formato | Alvo | Fase Mais Avançada | Indicações de Estudo em Fase Tardia |
|------------------------------|----------------------|-----------------------|--|--------------------|---|
| Novartis | Crizanlizumab | IgG2 Humanizado | CD62 (aka P-selectina) | 3 | Doença falciforme |
| Novartis | Ligelizumab | IgG1 Humano | IgE | 3 | Urticária espontânea crônica |
| Bioverativ | Sutimlimab, BIVV009 | mAb Humanizado | C1s | 3 | Doença por aglutininas a frio |
| Omeros Corporation | OMS721 | mAb Humano | MASP-2 | 3 | Síndrome hemolítica urêmica atípica |
| Regeneron Pharmaceuticals | Evinacumab | mAb Humano | Angiopietina tipo 3 | 3 | Hipercolesterolemia familiar homozigótica |
| AstraZeneca/MedImmune LLC | Tezepelumab | IgG2 Humano | Linfopoetina estromal tímica | 3 | Asma não controlada grave |
| AstraZeneca/MedImmune LLC | Tralokinumab | IgG4 Humano | IL-13 | 3 | Dermatite atópica |
| UCB | Bimekizumab | IgG1 Humanizado | IL-17A, F | 3 | Espondilite anquilosante e psoríase |
| Biocad | BCD-085 | mAb Humanizado | IL-17 | 3 | Espondilite anquilosante e psoríase |
| AstraZeneca/MedImmune LLC | Anifrolumab | IgG1 Humano | Receptor 1 de $INF_{\alpha,\beta,\omega}$ | 3 | Lúpus eritematoso sistêmico |
| Boehringer Ingelheim | BI655130 | IgG1 Humano | IL-36R | 2/3 | UC |
| Genentech | Etrolizumab | IgG1 Humanizado | Receptor de integrina $\alpha4\text{-}\beta7/\alpha E\text{-}\beta7$ | 3 | UC e CD |
| Shire | SHP-647 | IgG2 Humano | Molécula de adesão celular da adressina da mucosa | 3 | UC e CD |
| Eli Lilly & Co. | Mirikizumab | IgG4 Humanizado | IL-23p19 | 3 | UC e psoríase |
| R-Pharm | Olokizumab | IgG4 Humanizado | IL-6 | 3 | Artrite reumatoide |
| Novartis | Ianalumab (VAY736) | IgG1 Humano | Receptor BLYS/BAFF/TACI/BCMA | 2/3 | Hepatite autoimune |
| GC Pharma | Lenvovimab (GC1102) | IgG1 Humanizado | Antígeno de superfície do vírus B | 2/3 | Vírus da hepatite B associado a transplante |
| Hoffmann-La Roche | Faricimab | CrossMab Biespecífico | VEGF-A, Ang2 | 3 | Edema macular diabético |
| Viela Bio | Inebilizumab | IgG1 Humanizado | CD19 | 2/3 | Neuromielite óptica e espectro de neuromielite óptica |
| Chugai Pharmaceuticals/Roche | Satralizumab | IgG2 Humanizado | IL-6R | 3 | Neuromielite óptica e espectro de neuromielite óptica |
| CytoDyn | Leronlimab (PRO-140) | IgG4 Humanizado | CCR5 | 2/3 | HIV |
| Biogen | Aducanumab | IgG1 Humano | β -Amiloide | 3 | Alzheimer |

| | | | | | |
|-----------------------------------|--------------|--------------------|-------------------|---|--|
| Genentech | Crenezumab | IgG4 Humanizado | β -Amiloide | 3 | Alzheimer |
| Hoffmann-La Roche | Gantenerumab | IgG1 Humano | β -Amiloide | 3 | Alzheimer |
| Alder Biopharmaceuticals | Eptinezumab | IgG1 Humanizado | CGRP | 3 | Prevenção de enxaqueca |
| Regeneron Pharmaceuticals | Fasimumab | IgG4 Humano | NGF | 3 | Dor devido a osteoartrite do joelho ou do quadril, dor lombar crônica |
| Pfizer; Eli Lilly & Company | Tanezumab | IgG2 Humanizado | NGF | 3 | Dor devido a osteoartrite do joelho ou do quadril, dor lombar crônica |
| Horizon Pharma USA | Teprotumumab | IgG1 Humano | IGF-1R | 3 | Doença dos olhos causada pela tireoide |
| Novartis Pharmaceuticals Corp. | Brolucizumab | scFv Humanizado | VEGF-A | 3 | Degeneração macular relacionada à idade |

*Dados obtidos em 30 de novembro de 2018. BAFF, *B-cell activating factor*; BCMA, *B-cell maturation antigen*; BLYS, *B lymphocyte stimulator*; CD, *Chron's disease*; CGRP, *calcitonin gene-related peptide*; IGF-1R, *insulin-like growth factor-1 receptor*; MASP-2, *mannose-binding protein-associated serine protease 2*; NGF, *nerve growth factor*; scFv, *single chain fragment variable*; TACI, *transmembrane activator and CAML interactor*; UC, *ulcerative colitis*; VEGF, *vascular endothelial growth factor*. Adaptado (Kaplon and Reichert, 2018b).

Destes mAbs sob investigação, apenas 4 deles são para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais (*Inflammatory Bowel Diseases*, IBD): o BI655130, cujo alvo é o receptor de IL-36; o etrolizumab, cujo alvo é o receptor de integrina $\alpha 4$ - $\beta 7$ / αE - $\beta 7$; o SHP-647, cujo alvo é a molécula de adesão celular da adressina da mucosa; e o mirikizumab, cujo alvo é IL-23p19.

Apesar do enorme progresso no desenvolvimento dessa classe de biofármacos, até agora há grandes limitações existentes na utilização de mAbs terapêuticos. Portanto, pesquisas são amplamente realizadas no sentido de aumentar a eficácia, a afinidade, a especificidade, a biodisponibilidade, a segurança e a tolerância desses fármacos (Chan and Carter, 2010; Martin et al., 2013; Nelson and Reichert, 2009; Reichert, 2011). Ainda, a busca de tecnologias que permitam que a administração dos mAbs seja realizada pela via oral facilitaria o uso dessa classe de biofármacos pelos pacientes, uma vez que pode diminuir significativamente o custo de produção e, principalmente, reduzir os efeitos colaterais graves provenientes da utilização de mAbs por outras vias, como a via intravenosa, por exemplo, que pode causar a síndrome de liberação de citocinas (Bugelski et al., 2009), a resposta *human anti-*

murine antibodies (HAMA) (Mukherjee et al., 2018) ou até mesmo reações anafiláticas decorrentes da infusão (Baert et al., 2003).

Destarte, o uso potencial de bactérias lácticas geneticamente modificadas, como *Lactococcus lactis*, com o papel de transportar anticorpos e outras moléculas biologicamente ativas até a mucosa intestinal, tem mostrado resultados eficientes no tratamento de doenças inflamatórias (Aubry et al., 2015; Gomes-Santos et al., 2017; Pereira et al., 2017; Souza et al., 2016). Este sistema de entrega *in loco*, poderia contornar o uso de grande quantidade de proteína bruta administrada oralmente, que seria decomposta pelas enzimas digestivas uma vez que *L. lactis* é resistente a variações de pH do trato gastrointestinal (TGI) enquanto transporta uma ou mais proteínas bioativas. Ainda, esta estratégia eliminaria a variação de quanto da proteína bruta seria digerida durante o trânsito pelo TGI até alcançar o alvo. Como a exposição sistêmica à molécula biologicamente ativa seria insignificante, a chance de o paciente desenvolver efeitos colaterais também seria significativamente menor (Cook et al., 2018). Outra grande vantagem, seria que a entrega da molécula bioativa no intestino permitiria o tratamento tópico da área inflamada. Tendo em vista as vantagens que foram expostas, somando ao baixo investimento necessário para a produção de bactérias lácticas, seu uso é uma excelente alternativa terapêutica para o tratamento de IBDs e outras doenças inflamatórias.

REVISÃO DE LITERATURA



2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

As IBDs, como a colite ulcerativa (*ulcerative colitis*, UC) e a doença de Crohn (*Crohn's disease*, CD), são doenças de origem idiopática que causam inflamações crônicas no TGI e afetam cerca de 1,5 milhões de pessoas na América do Norte e 2 milhões de pessoas na Europa. Embora a incidência de UC e CD esteja aumentando a cada ano nos países ocidentais, poucos dados estão disponíveis sobre outras partes do mundo (Figura 1) (Hanauer, 2006; Ng et al., 2018).

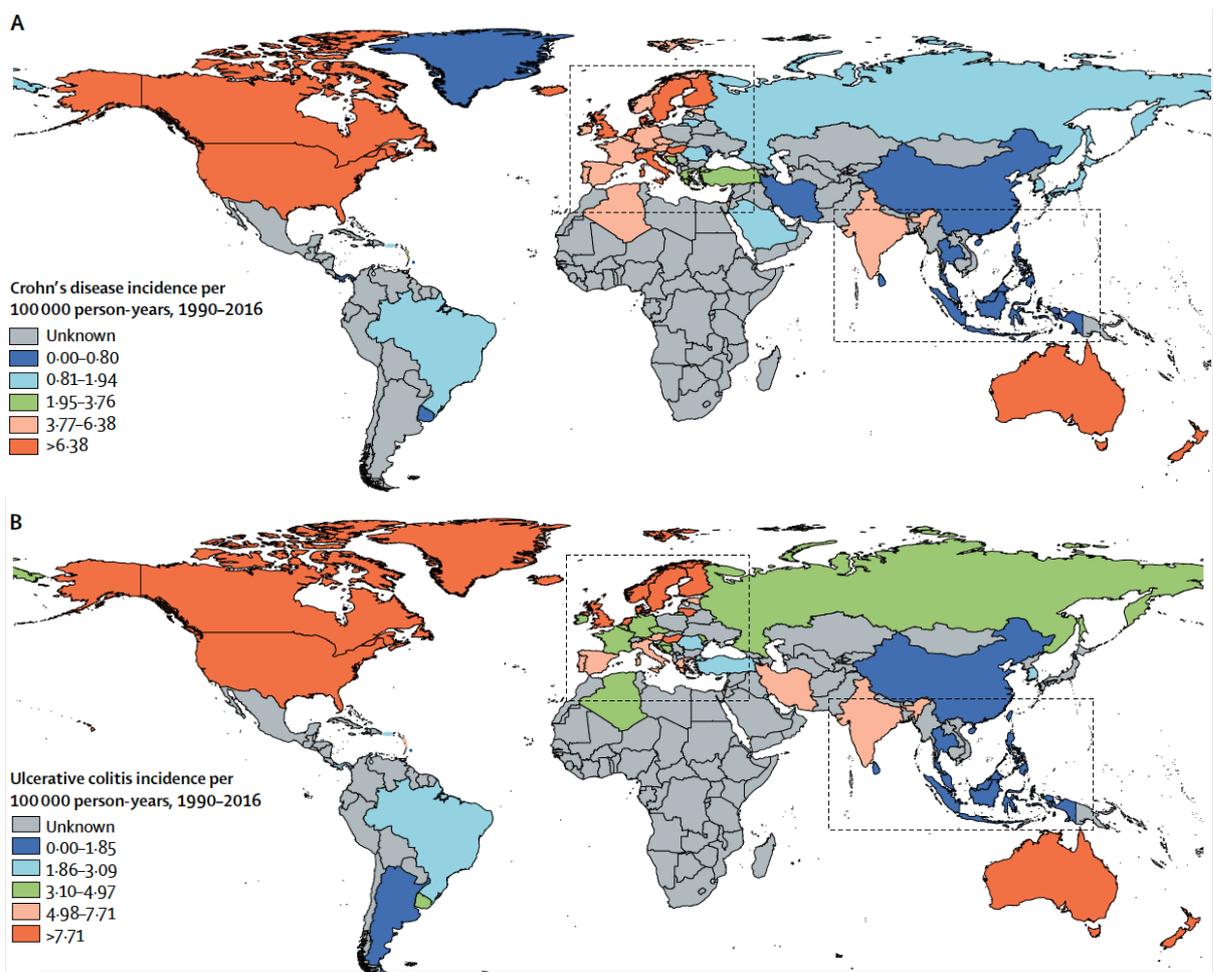


Figura 1. Incidência de CD e UC dos anos de 1990 a 2016. Mapa do mundo representando a incidência de (A) CD e de (B) UC. Adaptado (Ng et al., 2018).

A etiologia da doença é complexa e não está bem elucidada. No entanto sabe-se que é uma doença multifatorial que envolve a associação de fatores genéticos do paciente com disbiose e a resposta imune alterada, além de envolver condições ambientais, podendo incluir infecções intestinais, dieta, estresse, uso de antibióticos e desenvolvimento socioeconômico. Ainda, o estilo de vida de países em desenvolvimento pode prejudicar os padrões de colonização da microbiota intestinal. A interação de microrganismos com compartimentos imunes da mucosa do intestino exerce um papel essencial na formação e na regulação da imunidade (Berlec et al., 2017; Gubernatorova and Tumanov, 2016; Manichanh et al., 2012; Ng et al., 2018; Ni et al., 2017; Wallace et al., 2014).

No âmbito de impacto global, as IBDs estão associadas com morbidade, mortalidade e alto custo para o sistema de saúde. Ademais, quando relacionado ao paciente, esse grupo de doenças implica na redução da qualidade de vida, estigmas sociais e diminuição da força de trabalho, demandando a necessidade que as políticas públicas de saúde implantem infraestruturas e disponibilizem recursos financeiros que atendam adequadamente os pacientes (Ng et al., 2018; Zisman and Cohen, 2007).

É cada vez mais necessário delimitar os fatores que determinam a doença, já que a incidência de IBD aumenta a cada ano. Assim, uma maior compreensão de farmacogenômica, biomarcadores e características clínicas que identificam subpopulações de pacientes que responderão melhor a medicações específicas serão necessárias para adaptar a terapia individualmente. Outras direções futuras de pesquisas incluem a combinação de terapias biológicas e testes diretos para determinar as melhores terapias e como escolher o melhor medicamento (Ungaro et al., 2017).

Apesar da CD e da UC apresentarem algumas características em comum, elas têm padrões clínicos e patofisiológicos de apresentação claramente distintos e são definidas como IBDs. A CD pode envolver todo o TGI e se caracteriza por áreas de inflamação transmural circundadas por áreas normais da mucosa intestinal enquanto que a UC atinge restritamente o cólon intestinal e é caracterizada por inflamação difusa da mucosa (Geremia et al., 2014; Neurath, 2014; Ni et al., 2017; Wallace et al., 2014).

Pacientes com IBDs sofrem de diarreia sanguinolenta, cólicas abdominais, febre e perda de peso. Também podem apresentar inflamações na pele e dores articulares (Gubernatorova and Tumanov, 2016; Neurath, 2014). Quadros mais graves podem surgir, como fístulas, estenose e abscessos na CD e megacólon na UC (Kuhbacher and Fölsch, 2007). Ainda, em um estudo populacional, Bernstein et al. relataram que os pacientes com IBD têm a probabilidade maior de serem acometidos por artrite, asma, bronquite, psoríase e pericardite (Bernstein et al., 2005).

As lesões de mucosa são geradas por uma resposta imune exacerbada ou disbiose contra microrganismos comensais, devido à disbiose e pela diminuição da complexidade do ecossistema intestinal. Ambas as doenças têm baixa taxa de remissão espontânea das lesões intestinais e estão em constante chance de recidivas após tratamento médico ou cirúrgico, características bem comuns em pacientes com DC ou UC (Manichanh et al., 2012).

De forma geral, um comprometimento da barreira mucosa pode resultar na penetração de microrganismos comensais como vírus ou bactérias no tecido levando a ativação da resposta imune (Katsanos and Papadakis, 2017; Molodecky et al., 2012). Nessa fase, a susceptibilidade genética de desenvolver reações inadequadas a fatores ambientais pode levar a uma inflamação descontrolada da mucosa intestinal, levando a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e expressão ou repressão de fatores de transcrição (Geremia et al., 2014; Gubernatorova and Tumanov, 2016; Neurath, 2014).

Estudos mostram que a microbiota é uma peça chave na condução da inflamação em IBD. Em pacientes com CD, o desvio do fluxo fecal leva à remissão da inflamação e cicatrização da mucosa no segmento intestinal removido, ao passo que a infusão de conteúdo fecal reativa a doença (Haens et al., 1998). Pacientes com UC ativa que ingerem antibióticos de amplo-espectro tem a redução do metabolismo da microbiota e redução da inflamação (Casellas et al., 1998). Ainda, sabe-se que em condições fisiológicas, a exposição constante da mucosa intestinal a antígenos desencadeia atividades imunológicas sistêmicas e locais, tais como produção de IgA secretória (sIgA) e indução de tolerância oral (Faria and Weiner, 2005; Santos Rocha et al., 2014).

Muito progresso vem ocorrendo usando modelos murinos para caracterizar as populações de células do sistema imune e mediadores inflamatórios presentes em pacientes com IBDs. De acordo com dados publicados, já se sabe que a desregulação de células T está envolvida nesta patologia. A deleção ou a apoptose de células autorreativas é afetada pelo desbalanço entre células T regulatórias/ Th1, Th2 e Th17 em um estado ativo, uma vez que a falta de células T regulatórias ou a produção excessiva de células T efectoras que reagem à microbiota resultam no desenvolvimento e exacerbação de IBDs (Chaves et al., 2011; Luerce et al., 2014; Santos Rocha et al., 2014). Em consenso, pesquisadores padronizaram que linfócitos CD4+ com fenótipo Th1 são dominantes na mucosa de pacientes com CD, enquanto que linfócitos CD4+ com fenótipo Th2 são dominantes na mucosa de pacientes com UC (Geremia et al., 2014; Podolsky, 2002).

Como nas IBDs ocorre a perda de tolerância imune mediada pelo desbalanço de citocinas na microbiota intestinal (Sanchez-Muñoz et al., 2008), o uso de bactérias como veículo para entrega de moléculas terapêuticas no intestino, como citocinas por exemplo, significa um grande avanço para o tratamento da doença e até prevenção de recidivas (del Carmen et al., 2014; Zurita-Turk et al., 2014). As citocinas têm papel fundamental na ruptura do estado normal de inflamação controlada, também conhecida como inflamação fisiológica intestinal. Dentre as citocinas principais, tanto na UC quanto na CD, destacam-se TNF α e IL-1 β . A expressão e liberação destas duas citocinas caracterizam um aumento do infiltrado inflamatório de modo que células endoteliais e leucócitos (como macrófagos e linfócitos) possuem receptores para essas citocinas. Assim, TNF α e IL-1 β estimulam as células do endotélio e os leucócitos a aumentarem a expressão de selectinas e seus ligantes, e de integrinas e seus ligantes, e estimulam também o aumento da produção de quimiocinas e, conseqüentemente, diapedese, que caracteriza o infiltrado inflamatório (Luerce et al., 2014; de Moreno de LeBlanc et al., 2011; Sanchez-Muñoz et al., 2008).

O diagnóstico das IBDs se dá por meio da colonoscopia e/ou biópsia e da retossigmoidoscopia. Além destes exames, se utilizam exames complementares de biomarcadores séricos de IBDs por serem não-invasivos ao paciente, mais baratos e mais objetivos, que possibilitam a diferenciação de CD, UC e outras doenças intestinais que não IBDs. Estes biomarcadores podem ser detectados em fluidos

biológicos, nas fezes e em partes do corpo, como no caso de pacientes com IBD que possuem altas concentrações de TNF na mucosa, no soro e até nas fezes (Gubernatorova and Tumanov, 2016; Li et al., 2008).

As tecnologias captadoras de imagens também têm papel importante nas IBDs, como a ultrassonografia, ressonância magnética de imagem, raio-x, tomografia computadorizada, tomografia por emissão de prótons e tomografia computadorizada por emissão de fóton único (Li et al., 2008).

2.2 TRATAMENTO PARA IBDs

Como não existe cura para as IBDs, o tratamento médico atual tem por objetivo manter os sintomas controlados por meio de combinações de fármacos anti-inflamatórios, imunossupressores e antibióticos (del Carmen et al., 2014; Kuhbacher and Fölsch, 2007; Zurita-Turk et al., 2014). Entretanto, nenhuma estratégia de tratamento tem potencial curativo ou é livre de efeitos colaterais (Geremia et al., 2014).

Os tratamentos atuais, mesmo os mais baratos, como os corticoides por exemplo, apesar de serem eficientes e induzirem a remissão, quando utilizados a longo prazo geram complicações como catarata, osteoporose, intolerância a glicose e dificuldade de cicatrização de feridas, implicando custos com medicamentos de manutenção. Apesar das limitações existentes, o tratamento destes pacientes é fundamental para melhora física e emocional, implicando na melhora na qualidade de vida e na diminuição das faltas no trabalho e do desemprego (Zisman and Cohen, 2007).

Dentre os tratamentos mais utilizados para IBDs estão os anticorpos anti-TNF, uma vez que seus níveis estão persistentemente elevados na doença (Steeland et al., 2018). Outros alvos como interleucinas inflamatórias, NF κ B e agentes antitumorais como os anti-CD20 também são muito utilizados (Katsanos and Papadakis, 2017; Steeland et al., 2018). Ainda, muitas outras moléculas do sistema imune podem ser alvos potenciais para terapias em pacientes com IBD, como descrito na tabela 3.

Tabela 3. Moléculas-alvo potenciais para terapias biológicas em pacientes com IBDs.

| Mecanismos Desregulados em IBDs | Moléculas-alvo |
|--|--|
| <u>Disfunção da barreira epitelial intestinal</u> | |
| Apoptose | Moléculas apoptóticas (p. ex. caspase-8) |
| Translocação de antígenos / microrganismos | Receptores do tipo <i>Toll</i> (p. ex. TLR-4) |
| Células apresentadoras de antígenos | Macrófagos, células dendríticas |
| Células de Paneth | Defensinas |
| <u>Inflamação aguda</u> | |
| Falha de células regulatórias | Células T regulatórias |
| Ativação de mediadores pró-inflamatórios | Células T efetoras (Th1, Th2, Th17) Células B Células dendríticas Macrófagos (TGF β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-9, IL-12, IL-23) |
| Vias de sinalização | Smad7 Inibidores de JAK (p. ex. tofacitinib) |
| Vias de tráfego | Moléculas de adesão (p. ex. MAdCAM-1) Anti-integrinas (p. ex. anti- α 4 β 7) |
| <u>Perpetuação da inflamação crônica</u> | |
| Mecanismos de imunidade intestinal inata | Genes envolvidos na defesa de mucosa inata e apresentação de antígenos (NOD2, MDR1, PPAR- γ) |
| Mecanismos de imunidade intestinal adaptativa | Células T regulatórias Células T efetoras (Th) Células B |
| Balanco do estresse oxidativo | Vias de sinalização sensíveis ao redox e moléculas de transcrição pró-inflamatórias |
| <u>Cicatrização da mucosa, destruição tecidual</u> | |
| | Células dendríticas, adipócitos Fibroblastos, miofibroblastos |

Th, *T helper*; JAK, *Janus-activated kinase*; MAdCAM-1, *mucosal addressin cellular adhesion molecule 1*. Adaptado (Katsanos and Papadakis, 2017).

2.2.1 Terapias com anti-TNF

O TNF é expresso como proteína transmembrana (tmTNF) com massa molecular de 26 kDa que, quando liberada para a forma homotrimérica solúvel, passa a ter 17 kDa (Idriss and Naismith, 2000). É uma citocina produzida principalmente por linfócitos e macrófagos, e menor quantidade por células dendríticas, neutrófilos e mastócitos,

além de células não imunes como células neuronais, fibroblastos e queratinócitos (Peake et al., 2013; Steeland et al., 2018).

Citocinas da superfamília do TNF desempenham um papel fundamental na homeostase da mucosa intestinal uma vez que estão relacionadas com as vias de transdução de sinais na proliferação, diferenciação e sobrevivência das células, além de participarem na defesa contra infecções e na regulação da inflamação, o que possibilita seu uso e de seus inibidores em terapias contra o câncer e contra doenças autoimunes e inflamatórias, incluindo a colite ulcerativa (Coskun and Nielsen, 2013; Croft et al., 2013; Gubernatorova and Tumanov, 2016).

TNF é a principal citocina pró-inflamatória que desempenha papel crucial na patogênese de IBDs. De fato, os anticorpos monoclonais que neutralizam TNF são mais eficazes para o tratamento dos doentes. Entretanto, a via intravenosa de administração dessa classe de terapêuticos causa imunogenicidade e efeitos colaterais sistêmicos (Nielsen and Munck, 2007; Scott Crowe et al., 2018).

A molécula de TNF foi descoberta em meados de 1980 (Aggarwal et al., 2012), porém o primeiro mAb neutralizante desta citocina para o tratamento de doenças inflamatórias foi o infliximabe (Remicade®), em 1998, para CD. O infliximabe é um mAb quimérico do tipo IgG1 composto por domínios constantes humano e domínios variáveis de origem murina, e se liga tanto ao tmTNF quanto ao TNF solúvel (Targan et al., 1997).

Inicialmente, antagonistas de TNF começaram a ser usados como segunda linha de tratamento para IBDs. Porém, esses bloqueadores de TNF se mostraram tão eficientes que se tornaram o tratamento de primeira escolha e são aprovados atualmente pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de UC e CD (Gubernatorova and Tumanov, 2016) (Tabela 4).

Tabela 4. mAbs anti-TNF aprovados pelo FDA para tratamento de IBDs.

| Anticorpo | Aplicação | Formato | Estrutura | Esquema | Meia-vida (dias) |
|---|--------------------------|---|--|---|------------------|
| Infliximabe – IFX, Remicade | UC e CD. Intravenoso | Quimérico (25% murino, 75% humano) mAb | Domínios variáveis de origem murina e o restante, humana. Liga 2 moléculas de TNF |  | 7-12 |
| Adalimumabe – ADA, Humira | UC e CD. Intradérmico | mAb Humano | Sequência única de aminoácidos. Liga 2 moléculas de TNF |  | 10-20 |
| Golimumabe – GLM, Simponi | UC. Intradérmico | mAb Humano | Sequência de aminoácidos é idêntica à do infliximabe. Liga 2 moléculas de TNF |  | 7-20 |
| Certolizumabe pegol – CZP, Cimzia | CD. Intradérmico | Composto Monovalente Humanizado | Fabs ligam covalentemente ao polietilenoglicol. Fc é ausente. Liga 1 molécula de TNF |  | 14 |

UC, *ulcerative colitis*; CD, *Crohn's disease*. Adaptado (Gubernatorova and Tumanov, 2016).

Os antagonistas de TNF passaram ao longo dos anos por evoluções tecnológicas que iniciaram com anticorpo quimérico (infliximabe - Remicade[®] e biosimilares Remsima[®], Inflectra[®], Flixabi[®] and Ixifi[®]) e com imunoadesina (etanercept - Enbrel[®] e biosimilares Erelzi[®] e Benepali[®]), e progrediram para protocolos com mAbs humanos [adalimumabe (Humira[®] e Cyltezo[®], Imraldi[®], Amgevita[®] e Solymbic[®]) e golimumabe (Simponi[®])] e Fab' humanizados peguilados (certolizumabe pegol - Cimzia[®]), para aumentar o tempo de meia-vida dos fragmentos de anticorpos (Chan and Carter, 2010; Gubernatorova and Tumanov, 2016; Steeland et al., 2018). Entretanto, todos os mAbs anti-TNF foram projetados para inibir a sinalização via TNF, mas com distinções na eficiência, no mecanismo de ação e nas contraindicações (Gubernatorova and Tumanov, 2016; Slevin and Egan, 2015; Thorlund et al., 2015). Além do infliximabe, estes mAbs listados também são anti-TNF do tipo IgG, e são formados pelo fragmento Fab (que se liga ao antígeno) e pelo domínio Fc (ausente no caso no certolizumabe pegol) conectado ao fragmento Fab por uma dobradiça (Gubernatorova and Tumanov, 2016).

Esses *blockbusters* fazem parte da lista dos 10 medicamentos mais vendidos do mundo, estando o adalimumabe como primeiro mAb terapêutico resultante da técnica

de *phage display* a ser comercializado, no topo da lista, arrecadando cerca de 10 bilhões de dólares por ano e, a venda total dos vários anti-TNF arrecadando mais de 25 bilhões de dólares anuais (Kaplon and Reichert, 2018b; Monaco et al., 2015).

Entretanto, um terço dos pacientes não respondem à administração inicial dos inibidores de TNF (não-respondedores primários) e até cerca de 50% dos pacientes que fazem uso de mAbs param em algum momento de responder ao tratamento (não-respondedores secundários) (Gubernatorova and Tumanov, 2016). Ainda, alguns pacientes em uso de infliximabe desenvolvem a resposta *human anti-chimeric antibodies* (HACA), que faz com que estes anticorpos anti-quiméricos se liguem ao anticorpo terapêutico, encurtando seu tempo de meia-vida e, conseqüentemente, limitando a resposta ao tratamento (Afif et al., 2010; Chan and Carter, 2010; Dreesen et al., 2018).

Uma das complicações graves de terapias com anti-TNF é a ativação de tuberculose latente. Outra preocupação é o risco aumentado de contrair doenças bacterianas, virais e fúngicas (Targownik and Bernstein, 2013; Zhou et al., 2018). Outro problema que deve ser levado em conta é que a terapia com anti-TNF é relativamente nova e pouco se sabe sobre seu uso a longo prazo (Gubernatorova and Tumanov, 2016).

Diante de tal panorama, os pesquisadores tentam desenvolver medicamentos que induzam efeitos colaterais mínimos ou, até mesmo, ausentes. Uma estratégia seria a criação de moléculas com maior especificidade no formato ou no receptor de TNF, ou que neutralizem o TNF em células específicas, ou ainda moléculas biológicas sem a estrutura convencional de anticorpos (Steeland et al., 2018). E, apesar de todas as limitações encontradas, os antagonistas de TNF revolucionaram a terapia para IBD e continuam sendo primeira linha de escolha por serem um dos tratamentos mais eficazes da atualidade.

2.2.2 Terapias com anti-IL1 β

IL-1 foi uma das primeiras citocinas a serem descritas. Possui papel fundamental no sistema imune durante uma infecção, diferenciação e morte celular e inflamação e é secretada principalmente por macrófagos e células dendríticas (Dinarello, 1996).

O subtipo IL-1 β está relacionado à iniciação e amplificação da resposta inflamatória causando lesão intestinal, por isso a citocina tem papel importante na patogênese da inflamação do intestino em IBD e em modelos animais de inflamação do intestino. Pacientes com IBD possuem níveis elevados de IL-1 β tecidual, que se correlacionam com altos níveis de inflamação intestinal (Ligumsky et al., 1990). Além disso, Al-Sadi *et al.* demonstraram que IL-1 β aumenta a permeabilidade intestinal nas *tight junctions* (Al-Sadi and Ma, 2007). Como a integridade da barreira epitelial é de grande relevância para bloquear a entrada de microrganismos e toxinas, provavelmente IL-1 β seja imprescindível na fase inicial da cascata inflamatória que leva à inflamação do cólon.

De acordo com Ki *et al.*, níveis elevados de IL1 β na mucosa do cólon e em macrófagos peritoneais foram encontrados na colite induzida por DSS, o que pode representar um gatilho inicial da inflamação intestinal (Ki et al., 2005). Ainda, outro grupo de pesquisa já havia investigado a presença de IL-1 β , juntamente com TNF, em culturas de órgãos da mucosa inflamada de pacientes com IBD. Foram identificados níveis aumentados destas citocinas quando comparados com a mucosa normal. Além disso, foram correlacionados níveis séricos de TNF com sinais clínicos e atividade da doença intestinal (Reimund et al., 1996).

Toll-like receptors (TLRs) são fundamentais no processo de ativação de IL-1 β . Estes receptores reconhecem moléculas de padrões moleculares associados ao dano (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) e moléculas de padrões moleculares associados ao patógeno (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), que quando são ativados levam a produção de IL-1 β . A via de sinalização até a secreção de IL-1 β maduro é complexa. Resumidamente, a ativação da via do fator nuclear kappa B (NF κ B) aumenta a transcrição do gene *IL1B* que codifica a pró-citocina pró-IL-1 β , aumentando seus níveis intracelulares. Então, a pró-citocina é processada pelo inflamassoma NLRP3 (formado pelos domínios NACHT, LRR e PYD). Esse inflamassoma é composto por uma plataforma de 3 proteínas: NLRP3, ASC e pró-caspase-1, tendo a última a função de clivar pró-IL-1 β em proteína madura, IL-1 β (Figura 2). Ou seja, a ativação de NLRP3 leva a oligomerização e recrutamento de ASC. ASC recruta a pró-caspase-1, que se transforma na caspase-1 ativa, cujo

papel é o de clivar pró-IL-1 β e pró-IL-18. IL-1 β ativa pode exercer efeitos citotóxicos diretos ou recrutar outras células inflamatórias (Butts et al., 2015; Chen and Nez, 2011; Grishman et al., 2012). Outras vias como a do receptor de adenosina trifosfato (P2X7) e a de outros inflamassomas como a de NLRP1 também podem levar a liberação de IL-1 β (Grishman et al., 2012). Ademais, enquanto pró-IL-1 β tem massa molecular de 35 kDa, a citocina madura IL-1 β tem 17 kDa (Herzyk et al., 1992).

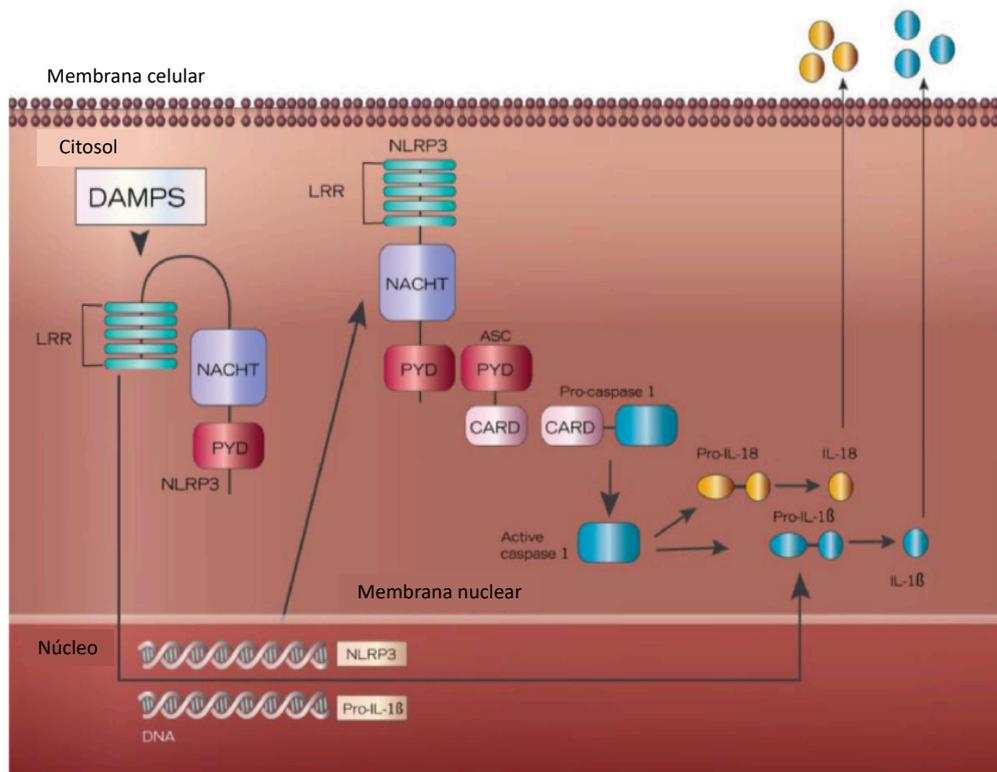


Figura 2. O inflamassoma NLRP3. O inflamassoma NLRP3 é composto por 3 proteínas: NLRP3, ASC e pró-caspase-1. O NLRP3 tem 3 domínios: LRR, NACHT e PYD. A proteína ASC pareia-se com NLRP3 via domínio PYD e com pró-caspase-1 via domínio CARD. A ativação de LRR pelo DAMP desencadeia a transcrição de NLRP3 e pró-IL-1 β . Assim, o inflamassoma inteiramente montado ativa caspase-1, levando a ativação de IL1 β e IL-18. Abreviações: ASC, *apoptosis associated speck-like protein*; LRR, *leucine-rich repeats*; PYD, *N-terminal pyrin domain*. Adaptado (Butts et al., 2015).

XOMA-052 é um mAb humanizado do tipo IgG2, também conhecido como gevokizumabe, e se mostrou ativo para neutralizar IL-1 β (Geiler and McDermott, 2010; Owyang et al., 2011). Em um estudo publicado em 2013, foi proposto que gevokizumabe diminuía a taxa de associação de IL-1 β ao seu receptor ao alterar o potencial de superfície eletrostática da citocina e, ainda foi descrito, que este mAb era o único inibidor da sinalização de IL-1 β que poderia ser usado em doenças inflamatórias associadas à esta citocina (Issafras et al., 2013). Até 2015,

gevokizumabe estava em fase III de testes clínicos para tratamento da doença de Behcet e de pioderma gangrenoso (Reichert, 2015). Segundo um levantamento no banco de dados ClinicalTrials.gov, XOMA-052 estava sendo testado para diabetes mellitus tipo 1 e 2, esclerite ativa e osteoartrite, entre outros, mas não foi aprovado pelo FDA até o momento para comercialização (<https://www.drugs.com/history/gevokizumab.html>, acessado em 16 de jan de 2019, às 22:39h).

Portanto, Canakinumabe (Ilaris®) é o único anticorpo específico para IL-1 β atualmente comercializado, porém é aprovado para tratamento da síndrome periódica associada à criopirina (CAPS), não sendo utilizado no tratamento de IBDs (Chan and Carter, 2010; Dhimolea, 2010).

2.3 BACTÉRIAS LÁCTICAS (BLs) E O TRATAMENTO DE IBD

As BLs formam um grupo heterogêneo de microrganismos gram-positivos amplamente utilizados na indústria alimentícia para a produção e conservação de produtos fermentados. Este grupo inclui cocos e bacilos, representados principalmente pelos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Bifidobacterium* (Wyszyńska et al., 2015). A maioria das espécies de BL é classificada pelo FDA como organismos geralmente reconhecidos como seguros (*Generally Recognized As Safe*, GRAS) devido à sua falta de patogenicidade (FAO/WHO, 2001; van de Guchte et al., 1992; Martín et al., 2013a; Pontes et al., 2011).

Além da importância na indústria de alimentos, muitas espécies de BL possuem propriedades terapêuticas que evitam o desenvolvimento de algumas doenças e que promovem efeitos benéficos para homens e animais, por isso são classificadas como probióticos (FAO/WHO, 2001; van de Guchte et al., 1992; Martín et al., 2013a; Pontes et al., 2011). Probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (AAVV, 2001). Para que um microrganismo seja considerado probiótico é necessário seguir rigorosamente os seguintes critérios: i) ele deve ter um efeito

benéfico claro no hospedeiro; ii) ele deve ser não patogênico, iii) ele deve ser capaz de sobreviver ao trajeto pelo TGI e iv) um grande número deste microrganismo deve ser capaz de sobreviver por períodos prolongados (Marteau, 2006; Martín et al., 2013b).

Embora os mecanismos exatos e as vias moleculares pelas quais os probióticos reduzem os sintomas em IBD experimental ainda permaneçam desconhecidos, alguns deles já foram parcialmente caracterizados. Estes incluem: i) melhoras na função da barreira intestinal; ii) secreção de componentes antimicrobianos e iii) modulação da resposta imune celular do epitélio intestinal e da mucosa (Chaves et al., 2011; de Moreno de LeBlanc et al., 2011; Santos Rocha et al., 2014).

A maioria dos probióticos são BLs e além destes, novas espécies estão sendo estudadas. Porém, nem todos os microrganismos são benéficos e com propriedades imunomodulatórias. Por isso é importante a escolha correta de protocolos e de espécies a serem utilizadas em humanos (Martín et al., 2013b).

As BLs, além de eventualmente possuírem propriedades probióticas, têm potencial para a produção heteróloga de moléculas como citocinas, enzimas e antígenos em produtos fermentados ou diretamente no TGI (Nouaille et al., 2003). Porém, outra grande importância das BLs se dá em utilizá-las como veículos vivos para entrega de proteínas terapêuticas na mucosa gastrointestinal, de forma a alterar tanto a resposta imune da própria mucosa quanto a resposta imune sistêmica (Le Loir et al., 2001; de Moreno de LeBlanc et al., 2011).

Os veículos de entrega são, em sua maioria, patógenos intracelulares atenuados como *Listeria*, *Salmonella* e *Shigella*, que possuem a capacidade de invadir células eucariotas e já são usados há muitos anos para entregar DNA a células de mamíferos (Schoen et al., 2004). A primeira observação da transferência *in vitro* de genes de bactérias para células de mamíferos foi no ano de 1980, quando cópias do genoma do vírus SV40 carregadas por linhagens de *E. coli* foram transferidas para essas células em co-cultura (Schaffner, 1980). Quinze anos mais tarde, em 1995, foi desenvolvido um sistema de transferência de DNA plasmidial com linhagens invasivas de *Shigella*, as quais obtiveram acesso ao citosol de células infectadas (Courvalin et al., 1995). Entretanto, uma vez que esses microrganismos são patogênicos, mesmo que em sua

forma atenuada, existe o risco de reversão para um fenótipo virulento desses patógenos, principalmente em crianças e pacientes imunossuprimidos (Innocentin et al., 2009; de Moreno de LeBlanc et al., 2011; Pereira et al., 2014b).

Como as BLs normalmente não são virulentas e possuem o *status* GRAS de segurança, elas representam a alternativa ideal de veículo para entregar DNA. Além disso, BLs têm pouca atividade imunogênica, não apresentam lipopolissacarídeos (LPS) na parede celular e podem ser facilmente engenheiradas (Pontes et al., 2011).

Dentre as BLs, *L. lactis* se destaca por ser uma bactéria produtora de ácido láctico, anaeróbica facultativa, transitória, não invasiva e não colonizadora do TGI (Chatel et al., 2008; Song et al., 2017; Wells and Mercenier, 2008). Embora *L. lactis* seja utilizada na fabricação de queijos e iogurtes (Carr et al., 2002), essa espécie é considerada uma estratégia potencial para tratar IBDs, uma vez que é uma bactéria de fácil manipulação e resistente ao pH ácido do TGI, possibilitando que se replique e que entregue moléculas terapêuticas no intestino (Vesa et al., 2000). Ainda, *L. lactis* é uma das espécies que está em contato direto com o TGI porque é ingerida principalmente do queijo, e pode ser considerada como a BL modelo, uma vez que vem sendo utilizada para produção e entrega de antígenos e citocinas e possui o genoma completamente sequenciado (Azevedo and Miyoshi, 2004; Bahey-El-Din and Gahan, 2010; Linares et al., 2010; Luerce et al., 2014; Pereira et al., 2014a; Wells and Mercenier, 2008).

O TGI é composto por trilhões de bactérias residentes que desempenham processos fisiológicos e metabólicos muito importantes e possui papel fundamental no desenvolvimento do sistema imune (Kamada and Núñez, 2014). Este microecossistema, que é consequência direta do mutualismo entre o hospedeiro e sua microbiota, é fundamental para manter a homeostase do indivíduo saudável (Martín et al., 2013b; Sekirov et al., 2010). A mucosa intestinal é especialmente interessante por ser o maior órgão imunológico do corpo devido ao tecido linfoide associado ao intestino (*gut associated lymphoid tissue*, GALT). Sua microbiota está em contato íntimo com o sistema linfático e está relacionada com a tolerância de mucosa, por isso é alvo no tratamento de doenças inflamatórias autoimunes (Chaves et al., 2011; Da Cunha and Weiner, 2012). Segundo Manichanh *et al.*, foi encontrado um desbalanço entre bactérias comensais e bactérias patogênicas em pacientes com IBD. Além da

disbiose observada, ainda foi ressaltada uma baixa diversidade de espécies na comunidade microbiana intestinal mas uma alta densidade de colonização na superfície mucosa e invasão epitelial em áreas com a doença ativa (Manichanh et al., 2012).

Resultados positivos obtidos em modelos animais e em ensaios clínicos vêm aumentando o interesse no uso de BL para modular a microbiota de pacientes com IBDs (del Carmen et al., 2014; Martín et al., 2013b). A primeira evidência que mostra o potencial de *L. lactis* recombinante de ser utilizado como veículo terapêutico foi publicada em 2000, quando foi descrito que a bactéria administrada pela via intragástrica foi capaz de secretar IL-10 biologicamente ativa e prevenir o início da colite em camundongos IL-10^{-/-} levando a uma redução de 50% da inflamação na doença crônica induzida por dextrana sulfato de sódio (*dextran sulphate sodium*, DSS) (Schotte et al., 2000; Steidler et al., 2000).

Entretanto, como *L. lactis* deve produzir proteínas e liberá-las no intestino, seu uso clínico é ainda dificultado pois citocinas são extremamente sensíveis ao TGI, razões pelas quais novos meios de administração e novas formulações mais eficazes de *L. lactis* devem ser desenvolvidos para aumentar o seu potencial terapêutico (Del Carmen et al., 2013).

Novos estudos estão sendo realizados no sentido de usar BL como um sistema vivo de entrega *in loco* que seja eficientemente capaz de alcançar a mucosa e entregar moléculas de DNA, como apresentado na figura 3.

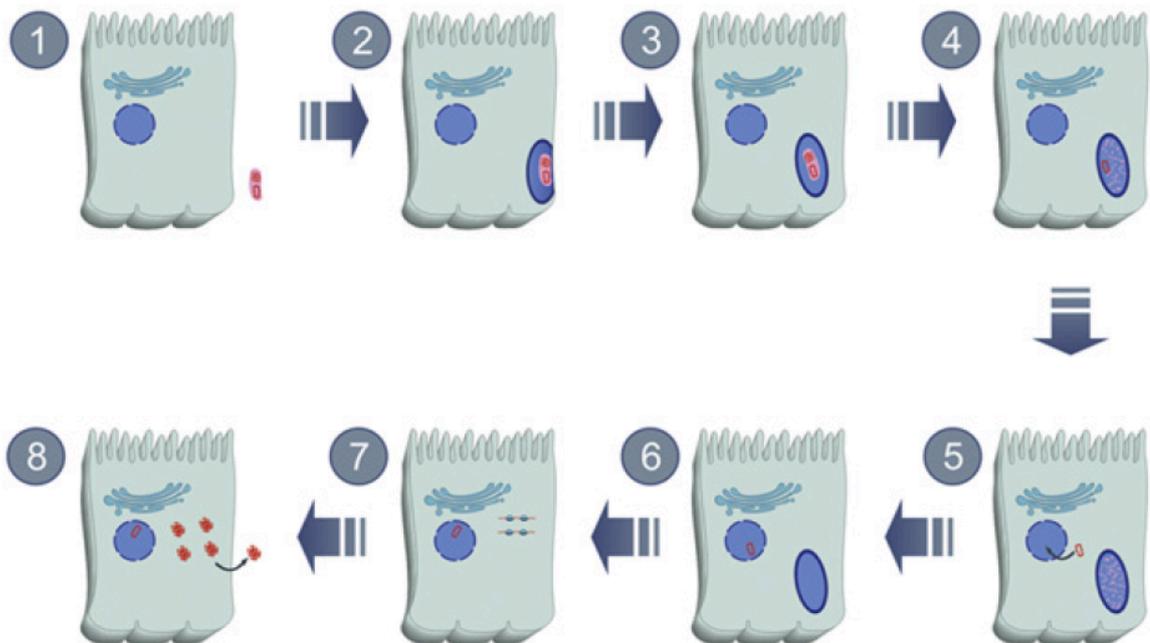


Figura 3. Representação esquemática da transferência de DNA mediada por bactéria para células eucariotas. 1) Célula eucariótica e bactéria carregando a ORF de interesse; 2) Entrada da bactéria nas células-alvo; 3) Formação do fagolisossomo; 4) Lise bacteriana; 5 e 6) Escape dos plasmídeos do fagolisossomo e liberação dos plasmídeos no citoplasma, sendo transferido para o núcleo da célula hospedeira; 7) Expressão da ORF de interesse no núcleo; 8) Tradução e síntese proteica pela maquinaria da célula hospedeira para liberação da proteína de interesse para o lúmen intestinal. Adaptado (Pontes et al., 2011).

Na tentativa de aprimorar a entrega, um vetor para endereçamento de DNA na mucosa intestinal utilizando como veículo o *L. lactis*, chamado de pValac (*Vaccination Using Lactic Acid Bacteria*), foi construído em 2009. Este vetor permite a clonagem da sequência em uma fase de leitura aberta (*open reading frame*, ORF) de uma molécula de interesse e sua expressão por células eucarióticas. Ele possui uma região eucariótica contendo o promotor de citomegalovírus (pCMV) que permite a expressão do antígeno em células eucarióticas, o transgene de interesse e o sinal de poliadenilação (polyA) do hormônio crescimento de crescimento bovino (BGH) para estabilizar o transcrito de RNA mensageiro, necessários para a expressão gênica por células eucarióticas. Além disso, contém uma região que contém as origens de replicação RepA e RepC tanto para *E. coli* quanto para *L. lactis* e, ainda, o gene de resistência a cloranfenicol (Cm) para seleção das linhagens recombinantes (Figura 4) (Guimarães et al., 2009). Este plasmídeo tem o tamanho pequeno e por isso permite a clonagem de fragmentos gênicos grandes (Méndez-Vilas and Pereira, 2013).

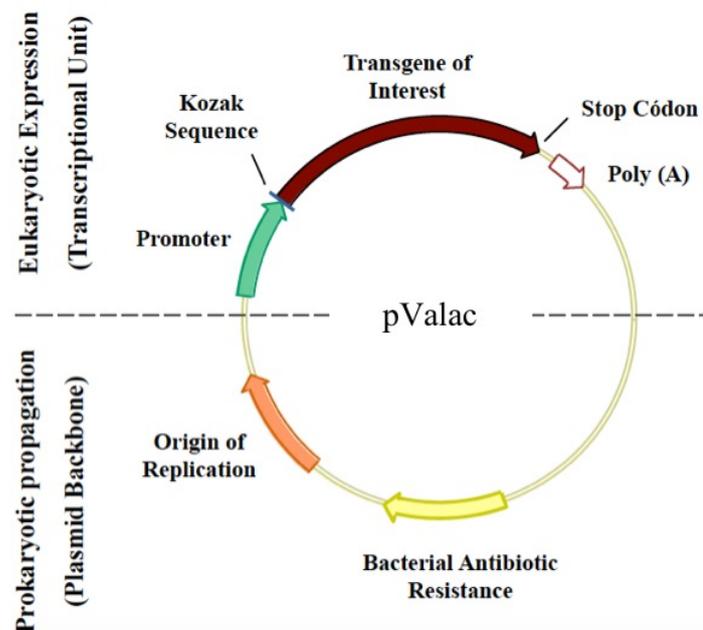


Figura 4. Estrutura do vetor de expressão eucariótica pValac. A unidade transcricional é responsável pela expressão da proteína de interesse nas células eucarióticas, contendo o promotor, o transgene de interesse e a sequência Kozak, o stop códon e a sequência de poliadenilação (poly A). A região procariótica é a responsável pela proliferação e manutenção do plasmídeo na bactéria. Contém o gene de resistência como marcador de seleção bacteriana e a origem de replicação procariótica. Adaptado (Pereira et al., 2014b).

Para otimizar a entrega do DNA à célula, ainda em 2009, Innocentin *et al.* testaram a linhagem selvagem *L. lactis* MG1363 para se tornar invasiva por meio da expressão da proteína A de ligação à fibronectina (*Fibronectin Binding Protein A*, FnBPA+) de *Staphylococcus aureus*. Esta invasina bacteriana está envolvida no processo de invasão celular, que faz com que a bactéria consiga invadir células fagocíticas e não fagocíticas. Com isso, a linhagem se torna capaz de se internalizar de forma eficiente e entregar o plasmídeo pValac para células epiteliais intestinais eucarióticas, desencadeando, assim, a expressão de DNA por estas células uma vez que a internalização da bactéria carreadora é fundamental para entrega eficiente do DNA (Innocentin et al., 2009; Pereira et al., 2014a; Que et al., 2001).

O potencial deste sistema de entregar o DNA e desencadear a expressão da molécula por células epiteliais foi demonstrado *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, a linhagem de *L. lactis* FnBPA+ mostrou habilidade de internalização e potencial para ser utilizada como veículo de entrega de DNA. Ainda, mostrou-se invasiva e capaz de transferir o

plasmídeo pValac::*gfp* para células Caco-2, as quais expressaram mais proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP) do que a linhagem selvagem de lactococos (Innocentin et al., 2009). Estudos em animais identificaram que a administração oral de *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*gfp*) levou à expressão de GFP em células epiteliais do intestino delgado e grosso, confirmando a capacidade de entregar o vetor de DNA *in vivo*. Ainda, Pontes et al. confirmaram que o uso da linhagem invasiva *L. lactis* FnBPA+ (pValac::BLG) aumentou o número de camundongos produzindo beta-lactoglobulina (BLG) quando comparado com *L. lactis* sem expressar FnBPA+ (Del Carmen et al., 2013; Pereira et al., 2014a; Pontes et al., 2012).

2.3.1 O papel de anti-TNF e anti-IL1 β em IBD

Uma vez que TNF e IL-1 β atuam de forma sistêmica, ambas podem, ao atingirem a circulação sanguínea, estimular a medula óssea a produzir mais neutrófilos (em conjunto com outros fatores estimulatórios), o que contribui para a circulação e posterior presença dessas células no infiltrado celular. Então, com a linhagem invasiva de *L. lactis* FnBPA+, cassetes específicos de DNA de anticorpos neutralizantes de TNF e IL-1 β podem ser entregues localmente no intestino e, assim que estes anticorpos forem expressos por células intestinais, possivelmente regularão a ação de ambas as citocinas pró-inflamatórias modulando o aspecto inflamatório local e a evolução de IBDs.

Portanto, diante do exposto, uma nova estratégia biotecnológica para tratamento de IBD, utilizando a linhagem invasiva geneticamente modificada *L. lactis* MG1363 FnBPA+ como veículo capaz de entregar um plasmídeo carreador das ORFs de fragmentos de anticorpos anti-TNF e anti-IL1 β , forneceria uma terapia mais eficiente uma vez que as moléculas de anticorpos seriam produzidas diretamente no sítio da inflamação. Além disso, esta seria uma opção terapêutica de baixo custo para IBDs, com menos toxicidade e sem efeitos colaterais sistêmicos e, ainda, que poderia impedir a remissão da doença a longo prazo, devido ao mecanismo de entrega *in loco*.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar os efeitos anti-inflamatórios de fragmentos de anticorpos recombinantes, utilizando *Lactococcus lactis* que entregam plasmídeos carreadores dos transgene de scFv de anti-TNF e de anti-IL1 β , no tratamento da colite experimental.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenhar as ORFs scFv anti-TNF e scFv anti-IL1 β .
- b) Construir o vetor pValac com a ORF scFv anti-TNF e pValac com a ORF scFv anti-IL1 β .
- c) Construir a linhagem de *L. lactis* MG1363 FnBPA+ contendo o plasmídeo pValac::anti-TNF e de *L. lactis* MG1363 FnBPA+ contendo o plasmídeo pValac::anti-IL1 β .
- d) Analisar os efeitos anti-inflamatórios das duas linhagens de *L. lactis* testadas no modelo de doença inflamatória intestinal induzida quimicamente em camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS



4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

4.1.1 *Escherichia coli*

As linhagens de *E. coli* foram cultivadas em caldo Luria-Bertani (LB) (peptona de caseína 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,0) e, quando necessário, foi suplementado com 10-50 µg/mL de tetraciclina (Tet) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100-200 µg/mL de ampicilina (Amp) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e/ou 10 µg/mL de cloranfenicol (Cm) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Seu crescimento se fez em *shaker*, sob agitação de 180-300 rpm a 37°C *overnight*. Para sementeiras em meio sólido, foi utilizado o caldo LB com 1,5% (m/v) de ágar bacteriológico e as placas de cultura foram incubadas em estufa a 37°C por 18-24 horas.

4.1.2 *Lactococcus lactis*

O meio de cultura utilizado para o crescimento das linhagens de *L. lactis* foi o M17 (Difco, Detroit, MI, USA) enriquecido com glicose 0,5% (v/v) e suplementado, caso necessário, com 5 µg/mL de eritromicina (Ery) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e/ou 10 µg/mL de cloranfenicol (Cm) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Seu crescimento foi realizado em estufa a 30°C sem agitação. Para inóculos em meio sólido, 1,5% (m/v) de ágar bacteriológico foi acrescentado e as placas de cultura foram incubadas a 30°C por 24-48 horas.

Na tabela 5 estão listadas as linhagens de bactérias utilizadas neste estudo, bem como suas respectivas características genéticas e referências.

Tabela 5. Linhagens bacterianas utilizadas neste estudo.

| Linhagem Bacteriana | Característica | Referência |
|--|---|-----------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue | <i>E. coli</i> ; F'[Tn10 <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ(<i>lacZ</i>)M15] <i>hsdR17</i> (<i>rK</i> ⁻ <i>mK</i> ⁺) Tet ^r | Stratagene® |
| <i>Escherichia coli</i> TG1 | <i>E. coli</i> , K-12-derived strain; F' [<i>traD36 proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> ΔM15] <i>supE thi-1</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) Δ(<i>mcrB-hsdSM</i>)5, (<i>rK</i> ⁻ <i>mK</i> ⁻) | Lucigen, Middleton, MI, USA |
| <i>Lactococcus lactis</i> MG1363 | <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 | (Gasson, 1983) |
| <i>Lactococcus lactis</i> MG1363 FnBPA+ | <i>L. lactis</i> MG1363 expressando FnBPA de <i>S. aureus</i> (Ery ^r) | (Que et al., 2001) |
| <i>Lactococcus lactis</i> MG1363 FnBPA+ (pValac:: <i>anti-TNF</i>) | <i>L. lactis</i> MG1363 expressando FnBPA de <i>S. aureus</i> carregando o plasmídeo pValac:: <i>anti-TNF</i> α(<i>anti-TNF</i> / Cm ^r / Ery ^r) | Presente trabalho. |
| <i>Lactococcus lactis</i> MG1363 FnBPA+ (pValac:: <i>anti-IL1</i> β) | <i>L. lactis</i> MG1363 expressando FnBPA de <i>S. aureus</i> carregando o plasmídeo pValac:: <i>anti-IL1</i> β (<i>anti-IL1</i> β/ Cm ^r / Ery ^r) | Presente trabalho. |

Tet^r gene de resistência a tetraciclina; Ery^r gene de resistência a eritromicina; Cm^r gene de resistência a cloranfenicol.

4.2 PLASMÍDEOS

O plasmídeo pValac, do tamanho de 3742 pb, foi utilizado neste trabalho para expressão dos fragmentos de anticorpos. A tabela 6 descreve as características dos plasmídeos utilizados.

Tabela 6. Plasmídeos utilizados neste estudo.

| Plasmídeo | Característica | Referência |
|----------------------------|--|--------------------------|
| pBluescript II SK(-) | Vetor de clonagem do tipo Fagomídeo (pUC ori/ Amp ^r) | GenScript® |
| pValac | Vetor de expressão eucariótica (pCMV/ Cm ^r / RepA/ RepC) | (Guimarães et al., 2009) |
| pValac:: <i>anti-TNF</i> | pValac contendo ORF <i>scFv anti-TNF</i> (pCMV/ Cm ^r / RepA/ RepC/ <i>anti-TNF</i>) | Presente trabalho. |
| pValac:: <i>anti-IL1</i> β | pValac contendo ORF <i>scFv anti-IL1</i> β (pCMV/ Cm ^r / RepA/ RepC/ <i>anti-IL1</i> β) | Presente trabalho. |

pUC ori origem de replicação pUC; Amp^r gene de resistência a ampicilina; pValac vaccination using lactic acid bacteria; pCMV promotor do citomegalovirus; Cm^r gene de resistência a cloranfenicol; RepA e RepC origens de replicação procariótica; *scFv anti-TNF* ORF do gene codificador da proteína *scFv anti-TNF*; *scFv anti-IL1*β ORF do gene codificador da proteína *scFv anti-IL1*β.

4.3 DESENHO DAS ORFs DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS

Para a construção do fragmento de anticorpo no formato de fragmento variável de cadeia única (*scFv*) de anti-TNF, foi utilizada como molde a porção variável da sequência do anticorpo comercial Remicade® (Infliximabe, anticorpo anti-TNF) (*Accession number*: 471270577 e 471270576).

Para a construção do formato *scFv* de anti-IL1 β , foi utilizada como molde a porção variável da sequência do anticorpo comercial XOMA-052 (Gevokizumabe, anticorpo anti-IL1 β) (*Accession number*: 430800940 e 430800941).

As sequências dos dois fragmentos de anticorpos foram construídas considerando uma adaptação de códons para expressão eucariótica em camundongos (*Mus musculus*). Os sítios de restrição inseridos nas sequências das ORFs foram GCTAGC (clivado pela enzima Nhe I) e GAATTC (clivado pela enzima EcoR I). No início da sequência das duas ORFs sintetizadas para expressão em *M. musculus* foi inserida a sequência Kozak (ACCATGG) e um peptídeo sinal de albumina humana. Como *stop codon* foi utilizada a sequência TAG. Uma sequência codificadora de um peptídeo derivado da hemoaglutinina (HA) do *Influenza virus* (YPYDVPDYAS) foi também inserida *downstream* a sequência do *scFv* e funciona como etiqueta em ensaios de imunodeteção das proteínas recombinantes (Figuras 5 e 6) (Field et al., 1988). As ferramentas utilizadas para construção das sequências foram *Bioedit 7.0.9.0* e *Backtranseq* (emboss.bioinformatics.nl).

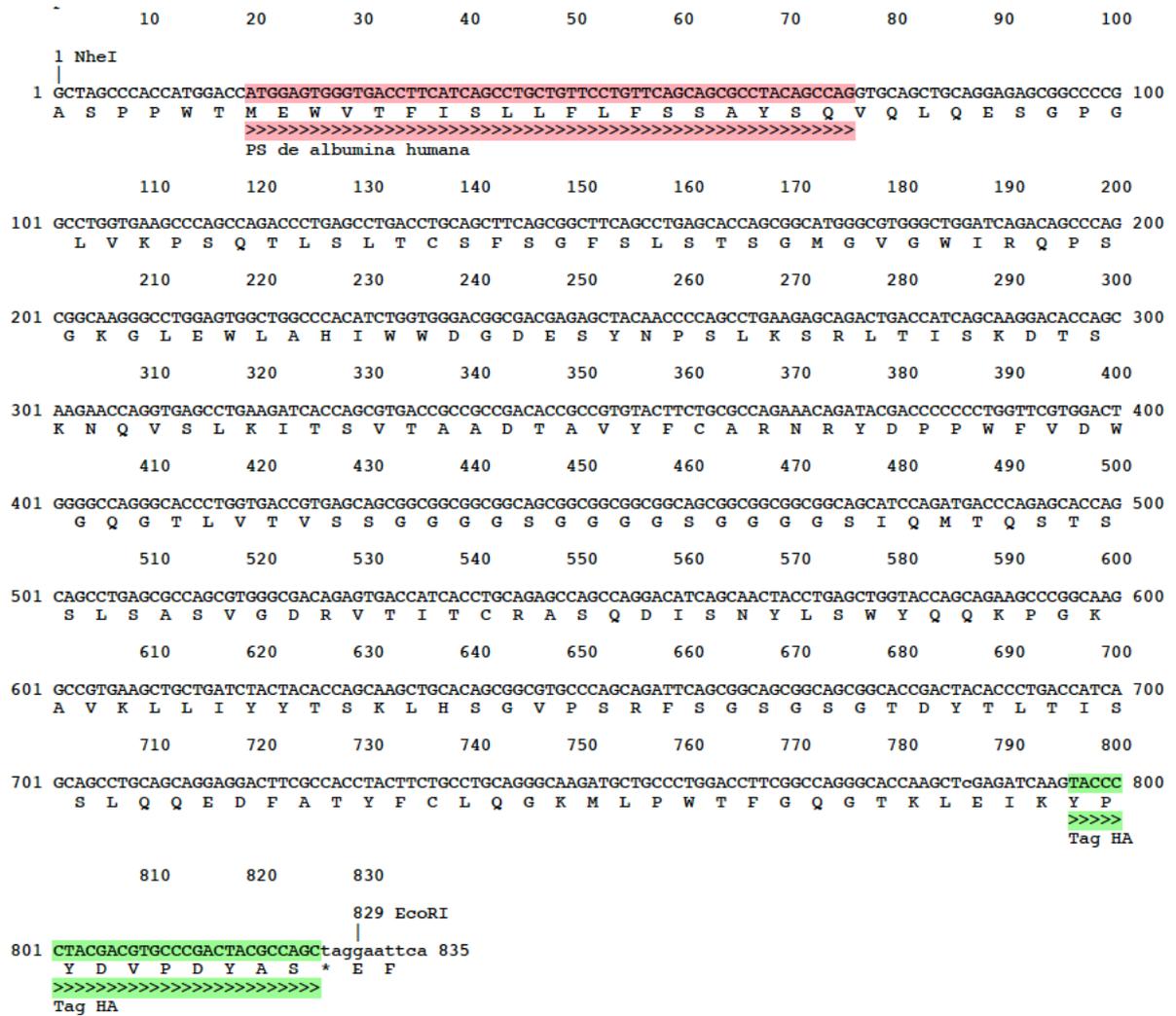


Figura 6. Sequência nucleotídica da ORF *scFv anti-IL1β* de *M. musculus*. A ORF *scFv anti-IL1β* possui 835 pb. A sequência destacada de rosa claro representa o peptídeo sinal de albumina humana e a destacada de verde representa a sequência do peptídeo derivado de HA.

4.4 SÍNTESE DAS ORFs DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS

Após o desenho das duas ORFs, as sequências foram enviadas para a síntese pela empresa GenScript®, produzidas quimicamente e clonadas no vetor pBluescript II SK (-). Deste modo, o plasmídeo contendo a ORF *scFv anti-TNF* e o plasmídeo contendo a ORF *scFv anti-IL1β* foram replicados por meio de transformação bacteriana de *E. coli* XL1-Blue eletrocompetentes para a sua propagação. Os procedimentos de transformação e preparação do DNA plasmidial descritos nas sessões 4.5.1.1 e 4.5.1.2, respectivamente.

4.5 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS pValac::*anti-TNF* E pValac::*anti-IL1 β*

4.5.1 Preparação da ORF *scFv anti-TNF* e da ORF *scFv anti-IL1 β*

4.5.1.1 Preparação de Células Competentes e Transformação de *E. coli* XL1-Blue

4.5.1.1.1 Por Choque Térmico (Cloreto de Cálcio - CaCl₂)

Inicialmente, 1 a 2 colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de caldo LB e crescidas a 37°C com agitação de 180-300 rpm *overnight* (pré-inóculo). Um volume de 500 μ L de pré-inóculo foi adicionado a 50 mL de caldo LB e incubado em *shaker* (180-300 rpm) a 37°C até a cultura atingir uma densidade óptica (DO) de 600 nm na ordem de 0,1 a 0,3 (início da fase exponencial). Após atingir a DO adequada, o frasco foi resfriado em banho de gelo-água (0-4°C) antes de prosseguir para a centrifugação e foi tomado o cuidado de resfriar as soluções, ponteiras, pipetas, demais vidrarias e recipientes utilizados para evitar perda de eficiência. Então, o inóculo foi centrifugado a 3000 x g a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em 10 mL de CaCl₂ (50 mM) gelado por meio de agitação suave (a partir desse momento, a suspensão de células foi mantida em banho de gelo-água). A amostra ressuscitada foi centrifugada mais uma vez a 3000 x g a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuscitado em 1 mL de CaCl₂ gelado e incubado em banho de gelo-água por pelo menos 1 hora (desta etapa em diante as células já foram consideradas competentes, com uma validade de 24 horas).

A seguir, 100-200 μ L dessas células foram incubados com 100-500 ng do plasmídeo de interesse em banho de gelo-água por 30 minutos. O choque térmico foi realizado ao se incubar o sistema de transformação a 42°C por 3 minutos ou, alternativamente, a 37°C por 5 minutos. Imediatamente após, 1 mL de caldo LB foi adicionado aos tubos submetidos ao choque térmico e eles foram incubados em 37°C por 1 hora. Por fim,

50-100 μL de células transformadas foram semeadas em placas de *petri* contendo o meio LB ágar com ampicilina (100-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubadas em estufa a 37°C *overnight* (De-Souza et al., 2016).

4.5.1.1.2 Por Eletroporação

Foi inoculada 1 colônia isolada da bactéria em 10 mL de meio SB (peptona de caseína 3%, extrato de levedura 2%, MOPS 1%, pH 7,0) e incubada em *shaker* a 250 rpm e 37°C *overnight*. A seguir, 0,5 mL dessa cultura foram diluídos em 500 mL de meio SB contendo 2,5 mL de solução de glicose 2 M e 2,5 mL de solução de Magnésio 2 M e o inóculo foi incubado em *shaker* a 250 rpm a 37°C por 2-3 horas até atingir uma DO_{600} de 0,7-0,9 (relativo ao meio da fase exponencial). Após atingir a DO adequada, o erlenmeyer foi resfriado em banho de gelo-água antes de prosseguir para a centrifugação e foi tomado o cuidado de resfriar as soluções, ponteiras, pipetas, demais vidrarias e recipientes utilizados para evitar perda de eficiência. Então, o inóculo foi centrifugado a 3000 x *g* a 4°C por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 25 mL de glicerol 10% gelado seguido de mais 75 mL da mesma solução gelada. A amostra ressuspensa foi centrifugada novamente a 3000 x *g* a 4°C por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e este procedimento foi repetido. O sedimento foi ressuspensa em 25 mL de glicerol 10% gelado e transferido para tubos de 50 mL, sendo centrifugados a 3000 x *g* a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento final foi ressuspensa em 1-2 mL de glicerol 10% para que alcançasse uma DO_{600} de 200-250. A partir deste momento, considerando que as células já estavam competentes, foram separadas alíquotas de 80-200 μL em *ependorfs* e congeladas em banho de gelo seco com etanol, sendo armazenadas imediatamente em freezer de -80°C.

Para transformação, a amostra de DNA plasmidial foi adicionada em tubo previamente resfriado contendo as células competentes por meio de movimentos circulares com a ponteira da pipeta utilizada para transferência. Rapidamente, a mistura foi transferida para cubeta de eletroporação (2 mm) (BioAgency®), já resfriada. Assim, a eletroporação seguiu os seguintes parâmetros elétricos: pulso de 2,5 kV, capacitância de 25 μF e resistência de 200 Ω , no eletroporador GenePulser XCellTM

Electroporation System Quick Guide (Bio-RAD). O tempo de pulso esperado nessas condições foi de 4 a 5 milissegundos. Imediatamente após o pulso, a cubeta foi lavada com 3 mL de meio SOC [solução estoque de Mg 2 M 1%, solução estoque de glicose 2 M 1%, meio SOB (20 g de bactotripton, 5 g de extrato de levedura, 0,584 g de NaCl, 0,186 g de KCl, água destilada qsp 1 L, pH 7,0)] sendo este volume transferido para um tubo Falcon de 50 mL e incubada em *shaker* a 250 rpm a 37°C por 1 hora. Diluições dessa cultura foram semeadas em placas de LB ágar suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas em estufa a 37°C *overnight*. Após essa etapa, essas placas foram avaliadas quanto a presença ou ausência de colônias de *E. coli* de coloração branca, que são resistentes ao antibiótico em questão (De-Souza et al., 2016).

A etapa a seguir constou na seleção dos clones contidos nessas placas para que fosse possível proceder com a extração dos plasmídeos construídos e, assim, a possível confirmação da presença das ORFs *scFv anti-TNF* e *scFv anti-IL1β*.

4.5.1.2 Extração de DNA Plasmidial de *E. coli* XL1-Blue em Média Escala

As colônias de *E. coli* crescidas na placa de cultura da etapa de transformação continham o plasmídeo pBluescriptII SK(-)::*anti-TNF* em uma placa e o pBluescriptII SK(-)::*anti-IL1β* em outra placa (é importante destacar que em todos os experimentos os plasmídeos foram manipulados separadamente). Assim, cada colônia selecionada foi inoculada em 3 mL de caldo LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e incubada em *shaker* a 250 rpm a 37°C *overnight*. Depois, foi utilizado Plasmid Midi Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) para cada inóculo para a extração do DNA plasmidial, seguindo as recomendações do fabricante.

4.5.1.3 Confirmação da Clonagem

A confirmação do evento da clonagem dos insertos de *scFv anti-TNF* e de *scFv anti-IL1β* no vetor pBluescript II SK (-) foi feita por digestão enzimática analisada em gel de agarose para resolução eletroforética, procedimentos detalhados a seguir.

4.5.1.3.1 Gel de Agarose e Resolução Eletroforética

Uma alíquota do DNA plasmidial foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8 % suplementado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). As corridas foram realizadas em tampão TBE 0,5 X (Tris 45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1 mM, água destilada qsp 1 L, pH 8,0-8,5), em corrente de 50-80 V. As imagens foram capturadas e armazenadas usando o E-Gel Imager System (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram, então, estimados por meio da comparação com o marcador de massa molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Além disso, quando necessária, foi feita uma estimativa da concentração de cada DNA ao comparar a intensidade das bandas com o marcador High DNA Mass Ladder (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA).

Para todas as eletroforeses de DNA em gel de agarose durante todo o trabalho, os mesmos parâmetros foram seguidos.

4.5.1.3.2 Digestão Enzimática

A confirmação por digestão enzimática foi essencial para confirmar a clonagem dos insertos de anti-TNF e de anti-IL1β no vetor pBluescript II SK (-), uma vez que por meio dela foi possível detectar os tamanhos dos insertos ligados ao vetor.

Para cada inserto foram realizadas 2 digestões como descrito a seguir: a primeira reação foi composta por 2 µL de 10 X Buffer M (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 µL da enzima Nhe I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 17 µL do DNA plasmidial extraído, totalizando uma reação 20 µL, a qual foi incubada em banho-maria a 37°C por 3 horas. Após esta etapa a reação foi submetida a diálise, com objetivo de remover os sais presentes no tampão, com membrana Millipore de poro de 0,025 µm colocada em placa com água deionizada durante 30 minutos.

A segunda digestão continha 2 µL de 10 X Buffer H (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 µL da enzima EcoR I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 17 µL do produto da primeira

digestão com Nhe I, completando 20 μ L de reação, que foi incubada em banho-maria a 37°C por 3 horas.

Então, uma alíquota do produto submetido às 2 reações de digestão foi aplicada em gel de agarose e resolução eletroforética (sessão 4.5.1.3.1) para verificação da qualidade dos fragmentos e da massa molecular dos insertos liberados do vetor pBluescript II SK (-), mostrando-se a digestão uma técnica adequada para predição de que a clonagem foi bem-sucedida.

4.5.1.4 Purificação dos Fragmentos de DNA Referentes às ORFs *scFv anti-TNF* e *scFv anti-IL1 β*

Para subclonar as ORFs *scFv anti-TNF* e *scFv anti-IL1 β* , os produtos das digestões foram submetidos a gel de agarose para eluição dos insertos, com corrente de 30 V por 6 horas. Em seguida, as bandas de interesse foram purificadas utilizando QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), a partir da excisão do fragmento de DNA do gel de agarose.

4.5.2 Preparação do Vetor pValac

Uma vez que parte deste trabalho foi feita em colaboração com o professor Anderson Miyoshi do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), o vetor pValac foi cedido com inserto da proteína GFP e extraído de *E. coli* TG1, pronto para ser submetido à digestão enzimática seguida da purificação e da reação de ligação vetor::inserto.

4.5.2.1 Digestão Enzimática

Para separação do vetor pValac da ORF *gfp* e posterior ligação das ORFs dos fragmentos de anticorpos, foram realizadas 2 digestões seguidas como descrito: a primeira reação foi composta por 2 μ L de 10 X Buffer M (Invitrogen, Carlsbad, CA,

USA), 1 μL da enzima Nhe I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 μL do DNA plasmidial e 15 μL de água milliQ estéril, totalizando uma reação 20 μL , a qual foi incubada em banho-maria a 37°C por 3 horas. Após esta etapa a reação foi submetida a diálise, com objetivo de remover os sais presentes no tampão, com membrana Millipore de poro de 0,025 μm colocada em placa com água deionizada durante 30 minutos.

A segunda digestão continha 2 μL de 10 X Buffer H (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 μL da enzima EcoR I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 17 μL do produto da primeira digestão com Nhe I, completando 20 μL de reação, que foi incubada em banho-maria a 37°C por 3 horas.

Então 2 μL do produto submetido às 2 reações de digestão foram aplicados em gel de agarose sujeitas à resolução eletroforética (sessão 4.5.1.3.1) para certificação de que a digestão enzimática obteve sucesso.

4.5.2.2 Purificação do Fragmento de DNA do Vetor pValac sem a ORF *gfp*

Para subclonar a ORF do vetor pValac, o produto das digestões com as endonucleases de restrição Nhe I e EcoR I foi submetido a gel de agarose para eluição dos fragmentos de DNA, com corrente de 30 V por 6 horas. Em seguida, a banda correspondente ao pValac sem a ORF *gfp* foi recortada do gel e purificada utilizando QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

4.5.3 Ligação das ORFs *scFv anti-TNF* e *scFv anti-IL1 β* no Vetor pValac

Nesta etapa do experimento é importante que fique claro que foi ligado ao vetor pValac ou a ORF *scFv anti-TNF*, ou a ORF *scFv anti-IL1 β* , nunca as duas ORFs inseridas em um mesmo vetor, construindo dois plasmídeos distintos, pValac::*anti-TNF* e pValac::*anti-IL1 β* .

Para tanto, as ORFs dos fragmentos dos anticorpos previamente digeridas com Nhe I e EcoR I foram ligadas ao vetor pValac, digerido previamente também com as mesmas enzimas, por meio de uma reação de ligação que teve como fórmula:

$$\frac{\text{Vetor (ng)} \times \text{tamanho do inserto (kb)} \times \text{razão molar inserto:vetor} = \text{inserto (ng)}}{\text{Tamanho do vetor (kb)}}$$

em que se deve adicionar uma quantidade maior de inserto do que de vetor para favorecer a ligação. A razão molar inserto::vetor deve ser 3:1 a 5:1 (De-Souza et al., 2016).

A reação de ligação pValac::*anti-TNF* continha 2 µL de *5 X Ligation Buffer* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 2 µL do vetor pValac (50 ng/µL); 5 µL da ORF *scFv anti-TNF* (70 ng/µL) e 1 µL da enzima *T4 DNA Ligase* (1 U/µL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), totalizando um volume final de 10 µL.

A reação de ligação pValac::*anti-IL1β* continha 2 µL de *5 X Ligation Buffer* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 2 µL do vetor pValac (50 ng/µL); 5 µL da ORF *scFv anti-IL1β* (40 ng/µL) e 1 µL da enzima *T4 DNA Ligase* (1 U/µL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), totalizando um volume final de 10 µL.

Ambas as reações de ligação foram incubadas a 4°C por 18-24 horas e foram submetidas à diálise com membrana Millipore de poro de 0,025 µm colocada em placa com água deionizada durante 30 minutos.

4.5.4 Confirmação da Ligação pValac::*anti-TNF* e pValac::*anti-IL1β*

4.5.4.1 Transformação em *E. coli* TG1 por Eletroporação

A produção de *E. coli* TG1 eletrocompetente seguida da transformação com os plasmídeos pValac::*anti-TNF* e pValac::*anti-IL1 β* , foi realizada conforme os procedimentos descritos na sessão 4.5.1.1.2.

4.5.4.2 Extração de DNA Plasmidial de *E. coli* TG1 em Pequena Escala

Terminada a etapa de transformação dos plasmídeos em *E. coli* TG1, as placas foram examinadas e alguns dos clones que cresceram foram selecionados para a procedência com a extração do DNA plasmidial e confirmação da etapa de clonagem do pValac::*anti-TNF* e pValac::*anti-IL1 β* na linhagem de *E. coli* em questão. O protocolo utilizado foi adaptado (Sambrook and W Russell, 2001), como descrito adiante.

Para tal, cada colônia selecionada foi inoculada em 5 mL de caldo LB acrescido de cloranfenicol (10 μ g/mL) e colocada em *shaker* sob agitação de 180-300 rpm a 37°C *overnight*. A seguir, 2 alíquotas de 1,5 mL de cada cultura foram centrifugadas a 3000 x *g* por 5 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Os sedimentos foram ressuspensos em 200 μ L de solução I (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM e glicose 50 mM) e incubados em banho de gelo-água por 5 minutos. Então, foi adicionado 400 μ L da solução II (NaOH 0,2 M e SDS 1% (p/v) - que deve ser preparada na hora), e as amostras foram bem homogeneizadas com inversão leve do tubo por várias vezes e colocadas em banho de gelo-água por 5 minutos. Passado o tempo necessário, 300 μ L da solução III (60 mL de acetato de potássio 5 M; 11,5 mL de ácido acético glacial e água destilada qsp 100 mL) foi adicionado, homogeneizado e incubado em banho de gelo-água por 10 minutos. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x *g* por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante de cada amostra foi, então, transferido para um novo tubo *ependorf* contendo 10 μ L de RNase A (10 mg/mL) e ficou incubado por 30 minutos a 37°C. Adiante, 300 μ L de solução fenol/clorofórmio (1 volume de fenol equilibrado e 1 volume de clorofórmio) foi adicionado a cada amostra com agitação intensa (agitador vórtex) durante 1 minuto para extração das proteínas seguindo para centrifugação a 5.000 x *g* por 5 minutos

em temperatura ambiente. A fase aquosa foi coletada para um novo tubo *ependorf* por meio de pipetagem, desprezando a fase fenólica e a interfase. Seguindo adiante, foi adicionado 300 μL de solução clorofórmio/ álcool isoamílico (24 volumes de clorofórmio e 1 volume de álcool isoamílico, devendo esta solução ser equilibrada com 1/5 volume de Tris-HCl 100 mM pH 7,6) a cada amostra com agitação em vórtex por mais 1 minuto para extração proteica, seguindo para centrifugação a 5.000 x *g* por mais 5 minutos em temperatura ambiente. Novamente, a fase aquosa foi coletada para um novo tubo *ependorf* por meio de pipetagem, desprezando a fase fenólica e a interfase. Então, 2 volumes de etanol absoluto gelado foram adicionados a cada amostra e colocado em -20°C *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x *g* por 30 minutos a 4°C . O sedimento foi lavado com 300 μL de etanol 70% gelado, sem ressuspender, a 12.000 x *g* por 15 minutos a 4°C . Por fim, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de cada amostra foi colocado em temperatura ambiente para secagem. Uma vez seco, o precipitado, que continha o DNA plasmidial extraído, foi ressuspensionado em 30 μL de água milliQ estéril e armazenado a -20°C .

Para estimativa da qualidade da extração, uma alíquota do produto ressuspensionado foi submetida a gel de agarose e à resolução em eletroforese (sessão 4.5.1.3.1).

4.5.4.3 Confirmação da Clonagem

A confirmação do evento da clonagem dos insertos de anti-IL1 β e de anti-TNF no vetor pValac foi feita por gel de agarose seguida de resolução eletroforética (sessão 4.5.1.3.1), digestão enzimática e sequenciamento de Sanger, descritos a seguir.

4.5.4.3.1 Digestão Enzimática

Com o objetivo de confirmar o sucesso da clonagem, os plasmídeos pValac::*anti-TNF* e pValac::*anti-IL1 β* foram submetidos a digestão com endonucleases de restrição. Para cada plasmídeo foram utilizadas enzimas distintas. A reação geral de digestão foi composta por 3 μL do plasmídeo, 1 μL da enzima de restrição, 1,5 μL de tampão

10 X e 9,5 μL de água milliQ, totalizando 15 μL que foram incubados por 4 horas em 37°C. A tabela a seguir mostra a enzima usada para cada plasmídeo, bem como a marca e o tampão correspondentes.

Tabela 7. Plasmídeos e respectivas endonucleases.

| Plasmídeo | Endonuclease (Marca) | Tampão |
|--|----------------------------------|---------------|
| pValac:: <i>anti-TNF</i> | Xba I (Fermentas Life Sciences) | Buffer Tango™ |
| pValac:: <i>anti-IL1β</i> | Nco I (New England BioLabs Inc.) | NEBuffer™ 3.1 |

O produto de cada digestão foi dialisado e aplicado em gel de agarose para verificação da massa molecular de cada um dos fragmentos liberados e da qualidade do produto.

4.5.4.3.2 Sequenciamento de Sanger

Para total certeza de que os produtos das clonagens estavam coerentes, aquelas amostras que apresentaram digestões mais confiáveis visualizadas no gel de agarose com bandas claras, dos tamanhos de pares de bases esperados e que não evidenciaram bandas extras foram selecionadas e enviadas para a empresa Helixxa para confirmação das sequências nucleotídicas dos insertos pelo método de sequenciamento de Sanger (Sanger et al., 1977).

4.6 ENSAIOS DE TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Com o objetivo de garantir a funcionalidade dos plasmídeos pValac::*anti-TNF* e pValac::*anti-IL1 β* em células mamíferas com consequente produção dos dois fragmentos de anticorpos recombinantes, os plasmídeos foram testados *in vitro* em cultivo de células eucarióticas e testes imunoenzimáticos foram realizados para detecção das proteínas produzidas, como será detalhado a seguir.

4.6.1 Linhagens de Células Eucarióticas e Condições e Cultivo

4.6.1.1 HEK-293

A linhagem *Human Embryonic Kidney 293* (HEK-293) (ATCC® CRL-1573™) foi cultivada em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM-Gibco®) enriquecido com soro fetal bovino (SFB-Gibco®) na concentração de 2,5%, 5% ou 10% e suplementado com Anti-Anti 100 X (Gibco®). Sua incubação se deu em estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

4.6.1.2 CHO-K1

As células *Chinese Hamster Ovary K1* (CHO-K1) (ATCC® CCL-61™) foram crescidas em meio nutriente Ham's F-12 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) enriquecido com SFB (Gibco®) na concentração de 2,5%, 5% ou 10% e suplementado com Anti-Anti 100 X (Gibco®). Seu crescimento se deu em estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

4.6.1.3 Caco-2

A linhagem de células *Human Colon Cancer 2* (Caco-2) (ATCC® HTB-37™) foram cultivadas em DMEM (Gibco®) enriquecido com SFB (Gibco®) na concentração de 2,5%, 5% ou 10% e suplementado com Anti-Anti 100 X (Gibco®). Seu crescimento se deu em estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

4.6.2 Congelamento e Descongelamento das Células

Para congelamento, as suspensões celulares foram centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em solução de congelamento composta por DMEM, 20% de SFB (Gibco®) e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO-Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Alíquotas de 1 mL foram distribuídas em tubos criogênicos (TPP®) previamente

resfriados, e transferidos para -80°C por um dia e, após, para tanques de nitrogênio líquido.

Para o descongelamento das células, criotubos contendo as linhagens foram transferidos do nitrogênio líquido para o banho-maria a 37°C , até que o conteúdo estivesse parcialmente descongelado. Então a suspensão de células foi transferida para tubo Falcon de 50 mL contendo 20 mL do meio de cultura apropriado e em temperatura ambiente. Após isso, as células foram centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos e ressuspendidas em 10 mL de meio de cultura acrescido de 10% de SFB. A viabilidade celular foi determinada com o corante vital azul de tripan pela contagem em câmara de Neubauer.

4.6.3 Transfecção de Células HEK-293, CHO-K1 e Caco-2 com os Plasmídeos pValac::*anti-TNF* e pValac::*anti-IL1 β*

As células foram transfectadas com os plasmídeos com Lipofectamine[®] LTX with Plus[™] Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), como a seguir.

Tanto para HEK-293 quanto para células CHO-K1, o protocolo foi exatamente o mesmo: no dia anterior ao da transfecção, $0,25 - 1 \times 10^6$ células foram plaqueadas em cada poço em placas cultura de 6 poços (TPP[®]) e volume final de 2 mL. Foram diluídos 2 μg de DNA plasmidial em 490 μL de meio de cultura apropriado e 2,5 μL de PLUS[™] Reagent, misturando-se gentilmente e incubado por 5 min em temperatura ambiente. A seguir, 6,25 μL de Lipofectamine[®] LTX Reagent foi adicionado, misturado gentilmente e o sistema foi incubado por 30 minutos - 6 horas em temperatura ambiente. Passado o tempo de incubação, o sistema formado (complexo lipídico-DNA plasmidial) foi adicionado às células plaqueadas previamente e novamente incubado de 18-72 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37°C . Por fim, o sobrenadante foi coletado e armazenado em -20°C .

Para a linhagem de células Caco-2, as etapas seguidas foram iguais às descritas acima, porém, após adicionado o complexo lipídico-DNA plasmidial, as células foram

incubadas de 18 até no máximo 24 horas seguindo para a coleta do sobrenadante e armazenamento adequado.

4.6.4 SDS-PAGE

Os sobrenadantes das culturas de células também foram resolvidos em gel desnaturante de poliacrilamida - SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), para detecção da expressão dos fragmentos de anticorpos *in vitro*.

4.6.4.1 Montagem do Aparato de Eletroforese e Confecção do Gel de Poliacrilamida

Para isto, foram montadas duas placas de vidro com espaçadores laterais e inferior da mesma espessura (1 mm) e o conjunto foi ajustado à cuba. Então foi preparado o gel separador a 12% [4 mL de acrilamida/ bisacrilamida (29:1); 2,5 µL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 100 µL de SDS 10%; 4 µL de TEMED; 100 µL de APS 10% e água deionizada qsp 10 mL] e vertido imediatamente após a adição dos catalisadores (APS e TEMED), sendo coberta sua superfície delicadamente com uma camada delgada de butanol saturado com água. As placas de vidro com o gel foram mantidas na posição vertical por 30 minutos para que o gel polimerizasse. Passado este tempo, o butanol foi removido da superfície do gel com água destilada e a superfície interna das duas placas de vidro foram secas com um pedaço de papel de filtro. O gel concentrador 5% [0,83 mL de acrilamida/ bisacrilamida (29:1); 0,63 mL de Tris-HCl 1,0 M pH 8,8; 50 µL de SDS 10%; 5 µL de TEMED; 50 µL de APS 10% e água deionizada qsp 5 mL] pode então ser preparado, vertido sobre o gel separador e imediatamente foi introduzido o pente deixando o gel polimerizar para a formação dos poços, por cerca de 10 minutos. O pente foi removido e os poços foram lavados com água destilada para remoção de possíveis resíduos de monômeros não polimerizados.

4.6.4.2 Preparo das Amostras

Uma alíquota de 1 mL de cada amostra de sobrenadante do cultivo de células foi submetida ao protocolo de precipitação de proteínas com ácido tricloroacético (TCA). Para tal, foi adicionado, para cada amostra, 100 μ L de TCA em 1 mL de sobrenadante e incubado em banho de gelo-água por 10 minutos. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x *g* por 5 minutos e seu sobrenadante foi descartado. Acetona foi adicionada ao precipitado no volume de 500 μ L, e a mistura foi incubada novamente em banho de gelo - água por 10 minutos seguida por centrifugação a 10.000 x *g* por 5 minutos. Essa lavagem com acetona foi repetida mais uma vez. O precipitado final de cada amostra foi ressuscitado em 5 μ L de água milliQ e 5 μ L de tampão de amostra 2 X Tris-HCl 200 mM pH 6,8 [SDS 4% (v/v); β -mercaptoetanol 4% (v/v); glicerol 20% (v/v); azul de bromofenol 0,1% (p/v)]. A partir da adição do tampão de corrida, as amostras foram colocadas em banho de água fervente por 5 minutos para a desnaturação completa das proteínas e foram aplicadas em seguida. Como marcador de massa molecular, foi utilizado BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ou Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA).

4.6.4.3 Corrida e Condições de Migração

Após a aplicação das amostras no gel e adaptação à cuba de eletroforese, o tampão estoque de corrida 5 X [Tris 125 mM; glicina 0,96 M; SDS 0,5% (p/v); pH 8,3 - 8,4] foi diluído para a concentração final 1 X e adicionado ao sistema de eletroforese. A corrente para migração foi fixada em 20 mA observando para que a diferença de potencial foi ultrapassasse 300 V. O azul de bromofenol presente no tampão de amostra permitiu o acompanhamento da corrida, uma vez que, quando o corante saiu do gel, foi indicativo que houve separação efetiva das proteínas com massa molecular de 12 a 43 kDa.

A próxima etapa foi a retirada do gel, que seguiu ou para coloração ou para a técnica de *western blot*, descrita nos próximos dois tópicos.

4.6.4.4 Coloração do Gel de Poliacrilamida

Para a coloração, o gel concentrador foi descartado e o gel separador foi imergido em solução corante [Azul brilhante de Comassie R-250 0,25% (p/v); metanol 30% (v/v); ácido acético glacial 7% (v/v)] sob agitação branda por 4 horas. Passado esse tempo, a solução corante foi substituída pela solução descorante [Metanol 30% (v/v); ácido acético glacial 7% (v/v)], solução esta que foi trocada várias vezes a cada 1 hora até a obtenção do contraste apropriado, que foi obtido somente no dia seguinte, quando as bandas das proteínas ficaram visíveis.

4.6.5 Imunodeteção por *Western Blot*

A fim de identificar as proteínas anti-TNF e anti-IL1 β no sobrenadante do cultivo de células pós transfecção com os plasmídeos construídos no presente trabalho, a técnica de *western blot* foi realizada conforme descrita em Técnicas Básicas em Biologia Molecular (De-Souza et al., 2016).

Após a eletroforese, as proteínas do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram transferidas, por adsorção, para uma membrana de nitrocelulose eletrocromatograficamente. Para isso, 12 pedaços de filtro *Whatmann*[®] 3 MM do tamanho do gel (8 cm x 7 cm) e um pedaço da membrana de nitrocelulose 0,45 μ m nas mesmas medidas foram recortados. Os pedaços recortados foram então mergulhados no tampão de transferência (Tris-base 5,8 g; glicina-HCl 2,9 g; SDS 0,37 g; metanol 200 mL e água deionizada qsp 1000 mL pH 8,3) e sobre o eletrodo de grafite da cuba de transferência foi montado um sanduíche de transferência na seguinte ordem: eletrodo positivo, 6 pedaços de filtro *Whatmann*[®], nitrocelulose, gel, 6 pedaços de filtro *Whatmann*[®], eletrodo negativo, tomando cuidado para remoção de eventuais bolhas na nitrocelulose. Os eletrodos foram posicionados assegurando-se que a membrana estava na orientação correta entre o gel e o eletrodo positivo, já que transferência deve ser feita no sentido (-) para (+), com uma corrente elétrica de 45 mA (0,8 mA/ cm² de gel) e 10 V por 90 minutos.

Terminada esta etapa, a eficiência da transferência pôde ser avaliada ao visualizar o padrão de massa molecular pré-corado incluído no gel, Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder ou BenchMark Pre-Stained Protein Ladder, de forma que as bandas coloridas pudessem ser visualizadas facilmente ou então por coloração das bandas com solução de vermelho de Ponceau incubado com a membrana em agitação por 5 minutos.

Por fim, para imunodeteção, a membrana de nitrocelulose foi incubada em solução de bloqueio (PBS-T 0,1% e leite em pó desnatado 5%) sob leve agitação por 1 hora. Então a solução de bloqueio foi removida e a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-T 0,1%. Em seguida foi adicionado o anticorpo primário anti-HA produzido em coelho (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído em PBS-T 0,1% (1:1000) em agitação leve por 1 hora seguida de 3 lavagens com 10 mL de PBS-T 0,1%. O anticorpo conjugado anti-coelho produzido em cabra (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA) marcado com *alkaline phosphatase* (AP) diluído 1:5000 em PBS-T 0,1% foi adicionado e ficou incubado por mais 1 hora em agitação leve. A membrana foi lavada mais 3 vezes com 10 mL de PBS-T 0,1% e 1 vez com 10 mL de APB (NaCl 100 mM; Tris-HCl 100 mM pH 9,5; MgCl₂ 5 mM). Dez mililitros do substrato cromogênico (NBT/BCIP) foram adicionados e foi visualmente controlado o aparecimento de bandas coloridas entre 2 e 20 minutos. Terminada essa reação, a membrana foi lavada com água em abundância, seca ao ar livre e analisada quanto a presença de proteínas dos anticorpos recombinantes, conforme descrito na tabela 8.

Tabela 8. Massa molecular das proteínas dos fragmentos de anticorpos scFv anti-TNF e scFv anti-IL1 β .

| Proteína | Tamanho Estimado¹ |
|-----------------------|-------------------------------------|
| scFv anti-TNF | 31 kDa |
| scFv anti-IL1 β | 30 kDa |

1. O cálculo da massa molecular estimada de cada proteína produzida foi realizado no site http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_06.html.

4.7 CONSTRUÇÃO DAS LINHAGENS *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-TNF*) E *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-IL1 β*)

4.7.1 Confeção de Células Eletrocompetentes e Transformação de *L. lactis* MG1363 FnBPA+

Para a produção de *L. lactis* eletrocompetente, foram inoculados 10 μ L da bactéria estocada a -80°C em 5 mL de caldo M17 suplementado com glicose 0,5% e eritromicina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sendo este pré-inóculo incubado em estufa a 30°C *overnight* sem agitação. Para o preparo do inóculo, foram retirados 2 mL do pré-inóculo e transferidos para 200 mL de caldo M17 suplementado com glicose 0,5% e eritromicina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), que foi incubado em estufa a 30°C sem agitação até alcançar a DO_{600} entre 0,4 e 0,6. Logo em seguida, o inóculo foi centrifugado a 4.000 rpm em 4°C por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento de células foi ressuspenso em 200 mL de solução gelada e estéril de sacarose 0,5 M e glicerol 10% e, novamente, as células foram centrifugadas a 4000 rpm em 4°C por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O processo de centrifugação para lavagem foi realizado ainda por 4 vezes, sendo que no último descarte do sobrenadante, as células foram estocadas em glicerol 80% estéril na proporção de 3:1. A mistura foi alíquotada em volumes de 100 μ L e usadas em seguida ou armazenadas em -80°C .

É importante que fique claro que as células foram transformadas separadamente ou com pValac::*anti-TNF* ou com pValac::*anti-IL1 β* .

Para transformação do *L. lactis* com cada plasmídeo, as alíquotas de 100 μ L foram colocadas em banho de gelo-água por 15 minutos. Em seguida, 3 μ L dos plasmídeos (200 ng/ μ L) foram adicionados às alíquotas com as bactérias eletrocompetentes, que foram deixadas em repouso em banho de gelo-água por mais 5 minutos. Passado o tempo adequado, a mistura foi transferida para cubetas de eletroporação (2 mm) (BioAgency®), já resfriadas e a eletroporação seguiu os seguintes parâmetros elétricos: pulso de 2,4 kV, capacitância de 25 μF e resistência de 200 Ω , no eletroporador GenePulser XCell™ Electroporation System Quick Guide (Bio-RAD). Imediatamente após o pulso, as cubetas foram lavadas com 1 mL de caldo M17

suplementado com glicose 0,5% e eritromicina (5 µg/mL) e as misturas foram incubadas em estufa a 30°C sem agitação durante 3 horas.

Alíquotas de 200 µL de cada mistura foram plaqueadas em placas de M17 ágar suplementado com glicose 0,5%, cloranfenicol (10 µg/mL) e eritromicina (5 µg/mL) e incubadas em estufa a 30°C sem agitação durante 24 horas. Passado este tempo, essas placas foram avaliadas quanto a presença de colônias de *L. lactis* MG1363 FnBPA+.

A etapa a seguir constou na seleção dos clones contidos nessas placas para que fosse possível proceder com a extração dos plasmídeos construídos.

4.7.2 Extração de DNA Plasmidial de *L. lactis* MG1363 FnBPA+ em Pequena Escala

Cada colônia selecionada foi inoculada em 5 mL de caldo M17 suplementado com glicose 0,5%, cloranfenicol (10 µg/mL) e eritromicina (5 µg/mL) e incubadas em estufa a 30°C sem agitação por 18 horas. A seguir, 2 alíquotas de 1,5 mL de cada cultura foram centrifugadas a 13.000 rpm por 7 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em 250 µL de TE - lisozima (TE 0,5 X e lisozima 10 mg/mL) e incubados a 37°C por 1 hora. Então, 1,5 µL de RNase (10 mg/mL) foram adicionados e, após 5 minutos, 200 µL da solução II (NaOH 0,2 M e SDS 1% (p/v) - que deve ser preparada na hora) foram acrescentados e homogeneizados. Depois de 2 minutos, a solução III (60 mL de acetato de potássio 5 M; 11,5 mL de ácido acético glacial e água destilada qsp 100 mL) foi adicionada no volume de 200 µL, sendo homogeneizada cada mistura e centrifugada a 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo tubo *ependorf* e 500 µL de isopropanol foram adicionados, homogeneizando a mistura e deixando-a em repouso por pelo menos 30 minutos a -20°C para precipitação do DNA. Então, a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado, sem ressuspender, a 13.000 rpm por 15 minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de cada amostra foi colocado em temperatura ambiente

para secagem. Uma vez seco, o precipitado, que continha o DNA plasmidial extraído, foi ressuspensionado em 30 μ L de água milli-Q estéril e armazenado a -20°C .

Para estimativa da qualidade da extração, uma alíquota de 2 μ L do produto ressuspensionado foi submetida a resolução em eletroforese (sessão 4.5.1.3.1).

4.7.3 Confirmação da Clonagem

Para confirmar a clonagem, foram realizadas reações de PCR com os plasmídeos construídos. Na figura 7 está representado o esquema de amplificação da região codificante de anti-TNF e de anti-IL1 β inseridas no vetor, com os dois fragmentos gerados a partir dos iniciadores pValF e pValR, descritos na tabela 9.

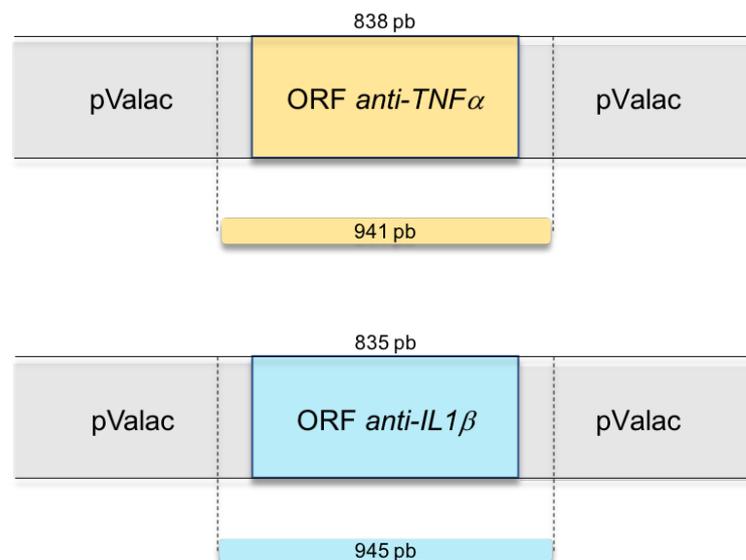


Figura 7. Representação esquemática das amplificações da região codificante das ORFs *scFv anti-TNF* e *scFv anti-IL1 β* , que ilustra os dois fragmentos gerados com tamanhos distintos. A estratégia consistiu em amplificar um fragmento do pValac que compreende o inserto, clonados em *L. lactis*.

Tabela 9. Sequência de iniciadores para PCR.

| Alvo | Iniciador 5'- 3' | Tamanho do fragmento (pb) |
|---|--|---------------------------|
| pValac+ <i>anti-TNF</i> | pValF: GCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGG pValR: GGCTGATCAGCGGGTTTAAACG | 941 |
| pValac+ <i>anti-IL1β</i> | | 945 |

Para tal, a reação de PCR foi composta por 5 μ L de *10 X PCR Buffer*; 1 μ L de dNTPs 10 mM; 1,5 μ L de MgCl₂ 50 mM; 1 μ L de cada iniciador (10 μ M) (IDT®); 0,2 μ L da enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase* (5 U/ μ L) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 1 μ L de DNA plasmidial e água milliQ qsp 50 μ L.

Assim, a amplificação foi realizada nas condições: desnaturação a 94°C por 1 minuto; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para estimativa da qualidade da amplificação e para identificação da massa molecular dos fragmentos amplificados, uma alíquota de 2 μ L do produto ressuspendido foi submetida a resolução em eletroforese (sessão 4.5.1.3.1).

4.7.4 Curvas de Crescimento das Linhagens de *L. lactis*

Para os experimentos em modelo animal, foram utilizadas neste trabalho diferentes linhagens de *L. lactis* para grupos-controle além da linhagem de *L. lactis* MG1363 FnBPA+ transformada com os plasmídeos construídos até a etapa presente. Uma vez que parte deste trabalho foi feita em colaboração com o professor Anderson Miyoshi do LGCM, as linhagens dos grupos-controle foram fornecidas por ele para determinação das curvas de crescimento e dos experimentos *in vivo*.

Assim, curvas de crescimento de cada linhagem bacteriana foram realizadas para identificação do tempo que cada uma delas necessita para entrar na fase logarítmica de crescimento (fase com atividade metabólica alta), possibilitando, assim, uma padronização das unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de cultura e, conseqüentemente, a dose a ser administrada *in vivo* de cada linhagem.

Para realização das curvas, foi feito um pré-inóculo de cada linhagem tomando 100 µL da cultura-estoque congelada e adicionando em 3 mL de caldo M17 suplementado com glicose 0,5% e cloranfenicol (10 µg/mL) e/ou eritromicina (5 µg/mL), se necessário, e incubados em estufa a 30°C sem agitação *overnight*. No dia seguinte, foram feitos inóculos, em duplicata, com o volume de pré-inóculo determinado para que a DO₆₀₀ inicial do inóculo fosse de 0,05. Assim, a DO₆₀₀ foi medida a cada hora até que houvesse 2 medidas repetidas. Ainda, nas horas 4, 10 e 12, foi feito o plaqueamento de 100 µL nas diluições 10⁻⁴, 10⁻⁶ e 10⁻⁸ para contagem de UFC.

4.8 ENSAIOS COM AS LINHAGENS RECOMBINANTES DE *L. lactis* EM MODELO ANIMAL DE COLITE

Os animais utilizados no presente trabalho foram camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp, São Paulo, Brasil). O projeto foi aprovado na Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB) cujo número do protocolo é 51069/2015. Todos os procedimentos e manipulações com os animais obedeceram aos Princípios Éticos na Experimentação Animal.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (1 grupo/gaiola) em ambiente com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de 16 a 20°C e alimentados *ad libitum* com ração balanceada para roedores proveniente do próprio biotério.

4.8.1 Indução da Colite Experimental

Para inflamação do cólon, foi adicionado DSS 2% (p/v) na água dos animais durante todo o período do experimento, período este que variou a cada ensaio *in vivo*.

O consumo de líquido foi monitorado e todos os grupos de camundongos consumiram volumes semelhantes de água com DSS 2% equivalentes à média de ± 5 mL/camundongo/dia.

4.8.2 Preparo das Doses e Administração da Bactéria

As doses foram calculadas com base no número de animais de cada grupo experimental e no número de dias do experimento. Cada animal recebeu de 5×10^8 a 5×10^9 UFC/dia, variando neste intervalo a cada ensaio.

Foram feitos pré-inóculos de 1 a 2 colônias de *L. lactis* MG1363, *L. lactis* MG1363 FnBPA+, *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-TNF*) e *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-IL1 β*) em 5 mL de caldo M17 suplementado com glicose 0,5% e cloranfenicol (10 μ g/mL) e/ou eritromicina (5 μ g/mL), se necessário, e incubados em estufa a 30°C sem agitação *overnight*. No dia seguinte, foram feitos inóculos com os volumes determinados pelo número de doses necessárias para cada ensaio. Assim que a DO₆₀₀ alcançou 1, cada inóculo foi centrifugado a 7000 x g, a 4°C por 5 minutos e estocado em glicerol 80% estéril na proporção de 3:1 a -80°C.

Nos dias da administração das doses, as culturas estocadas foram descongeladas e centrifugadas a 7000 x g e 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as bactérias foram ressuspendidas em volume pré-determinado de salina 0,9% estéril (0,9 g de NaCl e 1 L de água destilada) de modo que cada 100 μ L contivesse a concentração bacteriana determinada em cada ensaio.

Para controle do número de UFC por dose, foi realizado plaqueamento das doses em dias alternados nas diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} .

A administração do volume de 100 μ L se deu pela via intragástrica com a técnica de gavagem através de uma agulha de aço inox, própria para gavagem, sem causar qualquer prejuízo para o tecido animal, uma vez que possuía a ponta arredondada.

4.8.3 Padronização do Protocolo de Indução de Colite Experimental com DSS em Camundongo

Dada a importância das IBDs e sua crescente incidência a cada ano, é necessário desenvolver e otimizar protocolos que sirvam como ferramentas para estudar a doença em modelo animal, de modo que permita a descoberta de novos medicamentos e estratégias para uma terapia alternativa mais eficaz, mais barata e, principalmente, com poucos efeitos colaterais.

Foram necessários 3 experimentos em modelo animal para que a técnica fosse padronizada. Cada experimento permitiu a otimização de doses de *L. lactis* recombinantes; o tempo necessário de tratamento; o tempo do agente químico a ser administrado e sua concentração; a idade e o peso adequados dos camundongos para iniciar os experimentos; e a determinação dos critérios bioquímicos, fisiológicos e imunológicos a serem testados, até que no último experimento, já com todos estes parâmetros otimizados, foram analisados os efeitos anti-inflamatórios locais e sistêmicos induzidos pelo esquema de tratamento testado e padronizado.

4.8.3.1 Experimento Animal 1

O primeiro experimento, que teve a duração de 14 dias, pode ser considerado como um experimento piloto. Esse experimento foi composto por 6 grupos com o total de 42 animais os quais tinham 7 semanas de idade e pesavam entre 14 e 20 gramas. A dose administrada de bactéria foi de 5×10^8 UFC/dia. Dos dias 1 ao 7 foi induzida a colite com DSS 2% e dos dias 8 ao 14 foi administrado o DSS 2% concomitantemente com bactéria.

Para facilitar a compreensão de cada experimento animal, será exibida uma tabela com o esquema de tratamento associada com uma linha do tempo do respectivo esquema de tratamento.

A tabela 10 e a figura 8 listam o esquema de tratamento do experimento animal 1.

Tabela 10. Esquema de tratamento do experimento animal 1.

| Grupo (n° de animais) | Dias 1 a 7 | Dias 8 a 14 | Dia 15 |
|-----------------------|-------------|-------------------|-----------|
| CN (6) | Salina 0,9% | Salina 0,9% | |
| DSS (6) | DSS 2% | DSS 2% | |
| LL-F (7) | DSS 2% | DSS 2% + Bactéria | Eutanásia |
| LL-FT (8) | DSS 2% | DSS 2% + Bactéria | |
| LL-FI (7) | DSS 2% | DSS 2% + Bactéria | |
| LL-FTI (8) | DSS 2% | DSS 2% + Bactéria | |

Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo da colite; DSS, grupo controle positivo da colite; F, grupo *L. lactis* MG1363 FnBPA+; FT, grupo *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-TNF*); FI, grupo *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-IL1 β*) e FTI, grupo com associação de *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-TNF*) e *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-IL1 β*).

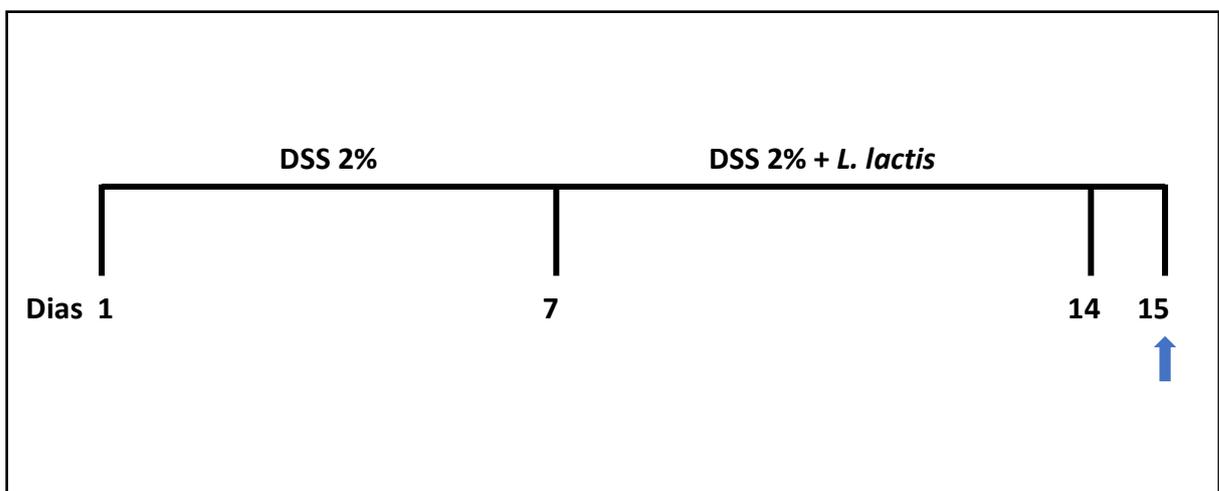


Figura 8. Linha do tempo do experimento animal 1. O experimento 1 foi composto por 42 animais, dos quais os do grupo CN ingeriram somente salina e água filtrada durante todo o experimento. Os grupos DSS, LL-F, LL-FT, LL-FI e LL-FTI ingeriram DSS 2% adicionado à água filtrada durante todo o experimento. Dos dias 8 ao 14, os grupos LL-F, LL-FT, LL-FI e LL-FTI receberam *L. lactis* recombinantes. Os animais foram sacrificados no dia 15 (seta).

4.8.3.2 Experimento Animal 2

O experimento animal 2 foi realizado com 2 esquemas distintos de tratamento divididos em 2A e 2B.

O esquema 2A foi composto por 21 animais divididos em 5 grupos, conforme a tabela 11 e a figura 9. Dos dias 1 ao 4 foi administrado DSS 2% seguidos por administração de DSS 2% e bactéria por mais 4 dias, totalizando 8 dias de experimento. Os animais tinham 10 semanas de idade e o peso inicial variou de 18 a 23 gramas. A dose de bactéria administrada foi de 5×10^9 UFC/dia.

Tabela 11. Esquema de tratamento do experimento animal 2A.

| Grupo (n° de animais) | Dias 1 a 4 | Dias 5 a 8 | Dia 9 |
|-----------------------|-------------|-------------------|-----------|
| CN (3) | Salina 0,9% | Salina 0,9% | |
| DSS (3) | DSS 2% | DSS 2% | |
| LL-F (5) | DSS 2% | DSS 2% + Bactéria | Eutanásia |
| LL-FT (5) | DSS 2% | DSS 2% + Bactéria | |
| LL-FI (5) | DSS 2% | DSS 2% + Bactéria | |

Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo da colite; DSS, grupo controle positivo da colite; F, grupo *L. lactis* MG1363 FnBPA+; FT, grupo *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-TNF*) e FI, grupo *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-IL1 β*).

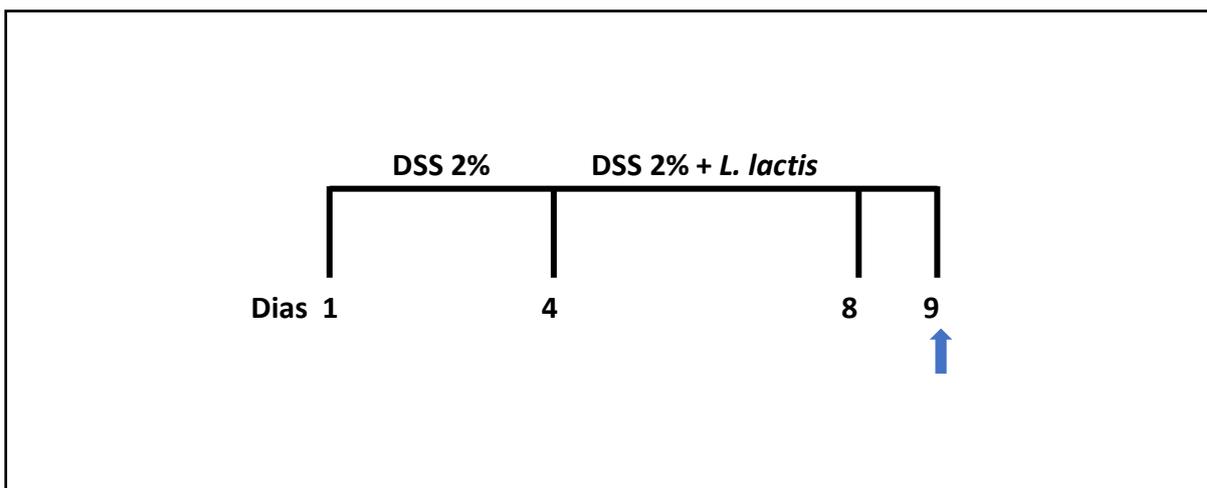


Figura 9. Linha do tempo do experimento animal 2A. O experimento 2A foi composto por 21 animais, dos quais os do grupo CN ingeriram somente salina e água filtrada durante todo o experimento. Os grupos DSS, LL-F, LL-FT e LL-FI ingeriram DSS 2% adicionado à água filtrada durante todo o experimento. Dos dias 5 ao 8, os grupos LL-F, LL-FT e LL-FI receberam *L. lactis* recombinantes. Os animais foram sacrificados no dia 9 (seta).

Já o esquema de tratamento 2B (Tabela 12 e figura 10), que também foi composto por 21 animais divididos em 5 grupos, durou 12 dias divididos em 3 fases: administração de DSS 2% dos dias 1 ao 4, administração de DSS 2% e bactéria nos dias 5 ao 8, e do 9º dia em diante foi interrompido o DSS 2% e administrada somente bactéria até o 12º dia. Os animais tinham 10 semanas de idade e o peso inicial variou de 18 a 23 gramas. A dose de bactéria administrada foi de 5×10^9 UFC/dia.

Tabela 12. Esquema de tratamento do experimento animal 2B.

| Grupo (nº de animais) | Dias 1 a 4 | Dias 5 a 8 | Dias 9 a 12 | Dia 13 |
|-----------------------|-------------|-------------------|-------------|-----------|
| CN (3) | Salina 0,9% | Salina 0,9% | Salina 0,9% | |
| DSS (3) | DSS 2% | DSS 2% | DSS 2% | |
| LL-F (5) | DSS 2% | DSS 2% + Bactéria | Bactéria | Eutanásia |
| LL-FT (5) | DSS 2% | DSS 2% + Bactéria | Bactéria | |
| LL-FI (5) | DSS 2% | DSS 2% + Bactéria | Bactéria | |

Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo da colite; DSS, grupo controle positivo da colite; F, grupo *L. lactis* MG1363 FnBPA+; FT, grupo *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-TNF*) e FI, grupo *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-IL1 β*).

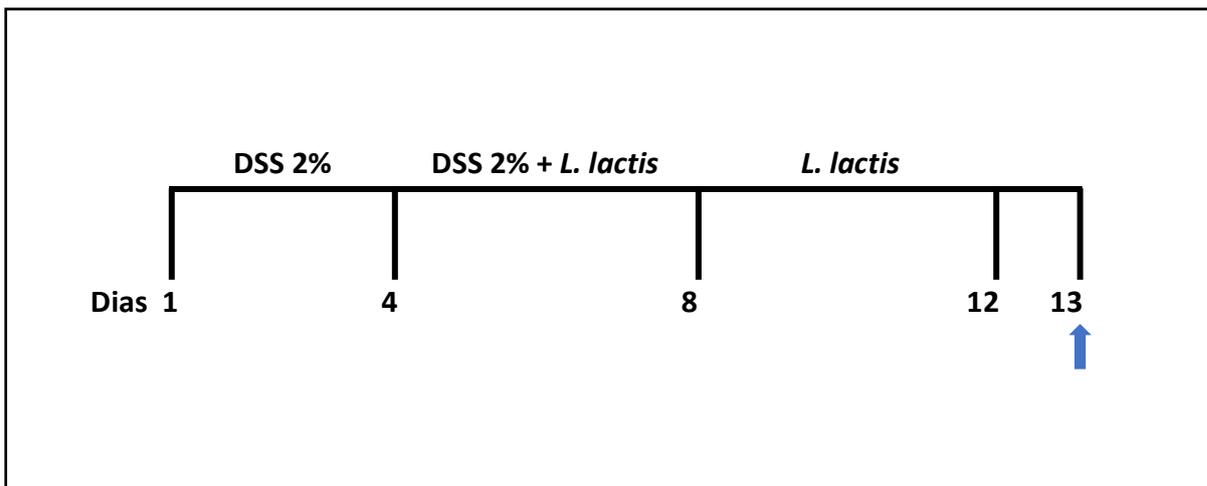


Figura 10. Linha do tempo do experimento animal 2B. O experimento 2B foi composto por 21 animais, dos quais os do grupo CN ingeriram somente salina e água filtrada durante todo o experimento. O grupo DSS ingeriu a substância química durante todo o experimento. Os grupos LL-F, LL-FT e LL-FI ingeriram DSS 2% dos dias 1 ao 8, e dos dias 5 ao 12 estes grupos receberam *L. lactis* recombinantes. Os animais foram sacrificados no dia 13 (seta).

4.8.3.3 Experimento Animal 3

Com base nos 2 experimentos com modelo animal realizados e seus respectivos resultados, chegamos a um desenho experimental bem delineado, que foi testado no experimento 3. Este experimento foi composto por 7 grupos com o total de 41 animais com 10 semanas de idade. O peso inicial dos animais variou de 15 a 20 gramas. A dose administrada de bactéria foi de $2,5 \times 10^9$ UFC/dia. Dos dias 1 ao 4 foi induzida a colite com DSS 2% e dos dias 5 ao 8 foi administrado DSS 2% concomitantemente com bactéria. A tabela e a figura a seguir listam o esquema de tratamento do experimento animal 3 (Tabela 13 e figura 11).

Tabela 13. Esquema de tratamento do experimento animal 3.

| Grupo (n° de animais) | Dias 1 a 4 | Dias 5 a 8 | Dia 9 |
|-----------------------|-------------|-------------------|-----------|
| CN (4) | Salina 0,9% | Salina 0,9% | |
| DSS (6) | DSS 2% | DSS 2% | |
| LL-M (4) | DSS 2% | DSS 2% + Bactéria | Eutanásia |
| LL-F (6) | DSS 2% | DSS 2% + Bactéria | |
| LL-FT (7) | DSS 2% | DSS 2% + Bactéria | |

| | | |
|------------|--------|-------------------|
| LL-FI (7) | DSS 2% | DSS 2% + Bactéria |
| LL-FTI (7) | DSS 2% | DSS 2% + Bactéria |

Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo da colite; DSS, grupo controle positivo da colite; M, grupo *L. lactis* MG1363; F, grupo *L. lactis* MG1363 FnBPA+; FT, grupo *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-TNF*); FI, grupo *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-IL1 β*) e FTI, grupo com associação de *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-TNF*) e *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-IL1 β*).

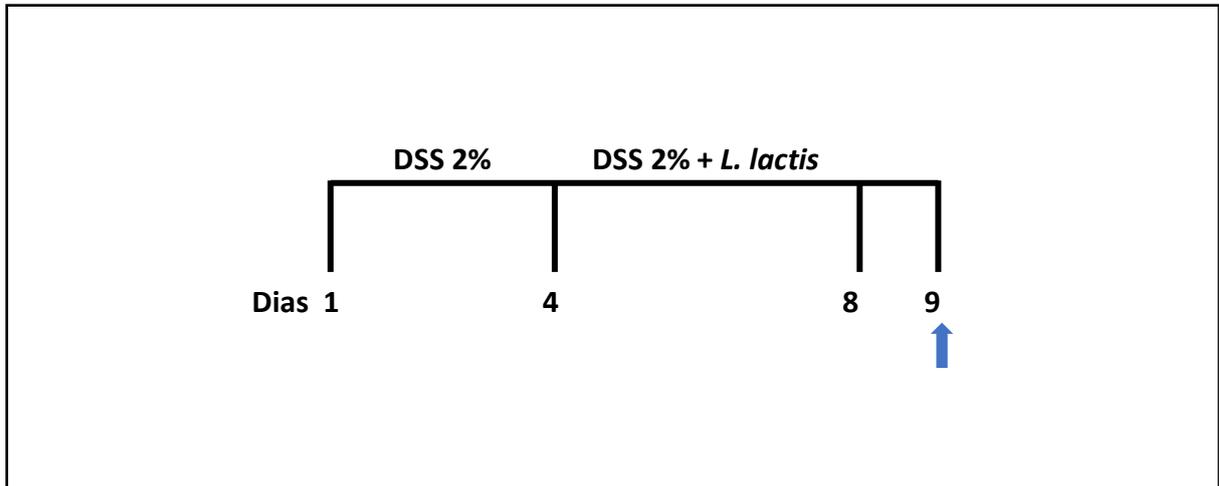


Figura 11. Linha do tempo do experimento animal 3. O experimento 3 foi composto por 41 animais, dos quais os do grupo CN ingeriram somente salina e água filtrada durante todo o experimento. Os grupos DSS, LL-M, LL-F, LL-FT, LL-FI e LL-FTI ingeriram DSS 2% adicionado à água filtrada durante todo o experimento. Dos dias 5 ao 8, os grupos LL-M, LL-F, LL-FT, LL-FI e LL-FTI receberam *L. lactis*. Os animais foram sacrificados no dia 9 (seta).

4.8.4 Disease Activity Index (DAI)

No dia da eutanásia, que variou entre os experimentos, os parâmetros macroscópicos da colite induzida por DSS foram determinados por meio do *disease activity index* (DAI), como descrito (Cooper et al., 1993). Este índice combinou os scores de perda de peso, consistência das fezes e sangramento retal, divididos por 3. Estas características foram graduadas como descrito na tabela 14. A perda de peso foi definida como a diferença entre o peso inicial e final. A consistência das fezes e o sangramento retal foram determinados por exame do cólon no momento da eutanásia. O DAI foi determinado somente nos experimentos 2 e 3.

Tabela 14. Disease activity index (DAI).

| Score | Perda de peso (%) | Consistência das Fezes | Sangramento Retal |
|-------|-------------------|------------------------|-------------------|
| 0 | Nenhuma | Normal | Ausente |
| 1 | 1 – 5 | | |
| 2 | 5 – 10 | Pastosa | Moderado |
| 3 | 10 – 20 | | |
| 4 | > 20 | Diarreica | Avançado |

Adaptado (Cooper et al., 1993).

Além do DAI, foram também registrados e analisados o comprimento do cólon de cada animal, na eutanásia e durante o experimento, foram registrados diariamente o peso dos animais.

4.8.5 Índice de Danos Histológicos da Inflamação Intestinal

Posto que o experimento 3 foi baseado nos anteriores e apresentou o padrão de danos macroscópicos que era esperado com o tratamento analisado, determinamos que seria determinado o índice de danos histológicos assim como a quantificação de genes envolvidos no processo inflamatório e de marcadores bioquímicos e imunológicos, descritos adiante.

Para análise dos danos teciduais causados pelo DSS e avaliação histológica do tratamento com a bactéria recombinante, na eutanásia, o cólon distal foi removido e dividido em 2 fragmentos: um fragmento foi utilizado para determinações bioquímicas e o outro foi selecionado para estudo histológico.

Primeiramente, o tecido colônico foi fixado em formaldeído 10%. Posteriormente, as amostras foram processadas, momento este em que foram desidratadas, liofilizadas e impregnadas de parafina. Finalmente, os blocos de parafina foram cortados com 4 μ m de espessura e os cortes foram corados com hematoxilina-eosina. Os animais que vieram a óbito durante o experimento foram ignorados em todas as análises.

Um patologista cego ao desenho experimental avaliou os danos histológicos no intestino. A análise histológica foi feita com base nos achados morfológicos referentes a presença de infiltrado inflamatório comprometendo as camadas mucosa, submucosa, muscular ou serosa; atividade inflamatória em glândulas; abscessos de

criptas; erosão ou ulceração da mucosa, espessamento da camada muscular e depleção de células globosas; herniação na camada muscular. Foi considerado como erosão da mucosa o simples descolamento do revestimento epitelial enquanto que a ulceração foi uma lesão mais profunda comprometendo seja a lâmina própria da mucosa ou atingindo a *muscularis mucosae* ou se estendendo até a submucosa. A herniação na camada muscular foi caracterizada morfológicamente pelo extravasamento da mucosa e submucosa pelos espaços da muscular própria. Tais achados morfológicos foram classificados em leve, moderado ou acentuado, conforme a intensidade de cada achado nos cortes histológicos.

Baseado nos achados referentes à intensidade do infiltrado inflamatório, presença de atividade inflamatória em glândulas ou de abscessos de criptas, profundidade e intensidade da ulceração, foram atribuídas pontuações, definidas como *scores*, que seguiram a classificação da tabela 15. A pontuação para cada animal pode variar de 0 até 39.

Tabela 15. Índice de danos histológicos.

| Score | Achado Histológico |
|--------------|---|
| 0 | Mucosa de aspecto normal, sem qualquer alteração ou com leve infiltrado inflamatório em mucosa ou submucosa. |
| 1 | Presença de infiltrado inflamatório leve a moderado com atividade inflamatória em glândulas ou abscessos de criptas com erosão porém sem ulceração. |
| 2 | Presença de todos os achados acima associados a ulcerações maiores na mucosa porém um quantidade leve (1 úlcera) ou acentuada (2 úlceras). |
| 3 | Presença de ulcerações comprometendo extensas áreas da mucosa. |

4.8.6 Isolamento de RNA Colônico e Análise por qPCR

4.8.6.1 Obtenção de RNA do Tecido Intestinal

A extração de RNA foi realizada com RNeasy® Protect Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) e utilizou parte do cólon distal do intestino murino para maceração em TissueLyser LT (Qiagen, Valencia, CA, USA).

4.8.6.2 Quantificação e Qualificação do RNA Extraído

Após a extração, o RNA obtido foi quantificado no NanoDrop 1000 Spectrophotometer, nos comprimentos de onda (λ) de 260 nm e 280 nm. O grau de pureza da amostra se deu pela relação 260/280 nm, sendo considerada uma boa pureza aquela que apresentou valores de razão entre 1,7 a 2,0. Uma segunda quantificação das amostras foi realizada com o Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Então, uma alíquota de RNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose RNase free 1,0% e analisada no Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies Genomics, CA, USA) por meio de RNA Nano Chips (Agilent Technologies, Waldbronn, German) para determinação da integridade das amostras, permitindo, assim, a observação das duas subunidades do RNA ribossômico, 18S e 28S, e eventuais contaminações com DNA. O High DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foi usado como marcador de massa molecular.

4.8.6.3 Tratamento do RNA com DNase

Se verificada a presença de DNA genômico (gDNA) nas amostras de RNA, estas foram tratadas com DNase. Para tal, o RNA foi incubado a 37°C por 45 minutos com DNase (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Após o tratamento, essas amostras foram precipitadas com 10% de sal (Acetato de sódio 3 M pH 5,2) e isopropanol por 20 horas a -20°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 45 minutos a 4°C e posteriormente lavadas com etanol 70% gelado.

4.8.6.4 Síntese de cDNA

Aproximadamente 500ng de RNA total isolado do cólon de camundongo foram usados para síntese de cDNA usando RT² First Strand Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), seguindo as instruções determinadas pelo fabricante.

4.8.6.5 Ensaio de qPCR

Os ensaios de qPCR foram realizados utilizando 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) para amplificação e quantificação. Para análise dos dados, o 7500 Software v2.0.6 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) foi utilizado. O método utilizado para representar a expressão gênica dos transcritos de mRNA foi a quantificação relativa (*fold change*). Assim, a expressão relativa apresentou os dados do gene alvo em relação ao gene calibrador, ou endógeno, proteína ribossomal S9 (RPS9), gene que amplifica o RNA mensageiro da proteína ribossomal 40S, por meio da fórmula $2^{-\Delta Ct}$ (Schmittgen and Livak, 2008). Os experimentos foram realizados em triplicata técnica. A expressão de cada gene foi determinada usando Fast SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), observando instruções do fabricante. O volume de 3,5 μ L de cDNA, 1,1 μ L de água deionizada, 0,2 μ M de cada iniciador específico (*forward* e *reverse*) e 5 μ L de SYBR Green formaram a reação com volume final de 10 μ L. Os iniciadores utilizados foram validados previamente e estão listados na tabela 16.

Tabela 16. Iniciadores usados para qPCR.

| Gene Alvo | Sequência 5'- 3' |
|--------------|---|
| <i>tbx21</i> | FW TCAGGACTAGGCGAAGGAGA RV GCCTTCGGTTTCCTTATCAA |
| <i>stat1</i> | FW TCACAGTGGTTCGAGCTTCAG RV GCAAACGAGACATCATAGGCA |
| <i>rorc</i> | FW TGCAAGACTCATCGACAAGG RV AGGGGATTCAACATCAGTGC |
| <i>arg1</i> | FW GTTCCCAGATGTACCAGGATTC RV CGATGTCTTTGGCAGATATGC |
| <i>nos2</i> | FW CGAAACGCTTCACTTCCAA |

| | |
|--------------|-------------------------------|
| <i>foxp3</i> | RV TGAGCCTATATTGCTGTGGCT |
| | FW ACTCGCATGTTGCGCTACTT |
| | RV AGGGATTGGAGCACTTGTTG |
| <i>il6</i> | FW TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC |
| | RV TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC |
| <i>il10</i> | FW CGCAGCTCTAGGAGCATGTG |
| | RV GCTCTTACTGACTGGCATGAG |
| <i>tgfb</i> | FW CTGACGTCCTGGAGTTGTACGG |
| | RV GGTTTCATGTCATGGATGGTGC |
| <i>il1b</i> | FW CTGACGTCCTGGAGTTGTACGG |
| | RV CAGCACGAGGCTTTTTTGTG |
| <i>tnf</i> | FW GTACCTTGTCTACTCCCAGGTTCTCT |
| | RV GTGGGTGAGGAGCACGTAGTC |
| <i>muc3</i> | FW 5CGTGGTCAACTGCGAGAATGG |
| | RV 5CGGCTCTATCTCTACGCTCTC |
| <i>il22</i> | FW GGTGACGACCAGAACATCCA |
| | RV CCCAATCGCCTTGATCTCTC |
| <i>rps9</i> | FW CGCCAGAAGCTGGGTTTGT |
| | RV CGAGACGCGACTTCTCGAA |
| <i>il17a</i> | FW TTAACTCCCTTGCGCAAAA |
| | RV CTTTCCCTCCGCATTGACAC |

Neste experimento, as condições de ciclagem e da curva de dissociação estão descritas na tabela 17.

Tabela 17. Condições de ciclagem para qPCR.

| Ciclagem | Curva de Dissociação |
|--|----------------------|
| 1 - 50°C / 2 min | 1 - 95°C / 15 min |
| 2 - 95°C / 5 min | 2 - 60 °C / 1 h |
| 3 - 95°C / 3 s | 3 - 95°C / 15 min |
| 4 - 60°C / 30 s | |
| As etapas 3 e 4 são repetidas 40 vezes | |

4.8.7 Avaliação de Parâmetros Bioquímicos

4.8.7.1 Quantificação Sérica de Proteína-C Reativa

As concentrações de proteína-c reativa foram medidas nos soros dos camundongos utilizando Mouse CRP ELISA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), seguindo o protocolo do fabricante. Para tal, cerca de 500 μ L de sangue foi coletado pelo complexo retro-orbital dos animais, no momento da eutanásia. Os tubos ficaram em repouso em temperatura ambiente até a formação de coágulo e depois foram centrifugados a 7.000 x g e 4°C por 5 minutos. A seguir, os soros (sobrenadante) foram transferidos para novos tubos e estocados a -20°C. Para o ELISA, diluições de 1:20.000 de cada soro foram utilizadas em triplicata. A leitura da placa foi realizada em VersaMax™ ELISA Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

4.8.7.2 Quantificação de IgA Fecal

As concentrações de imunoglobulina A (IgA) foram detectadas em amostras de extrato fecal dos camundongos usando Mouse IgA ELISA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), seguindo o protocolo do fabricante. Para isto, 30 minutos antes da eutanásia, cada grupo de camundongos do experimento foi colocado em gaiolas sem maravalha e um *pool* de fezes por grupo foi coletado e registrado o seu peso. A seguir, cada *pool* foi transferido para um tubo Falcon contendo 5mL de PBS com o inibidor de protease na concentração de 0,2% de PMSF 100mM e foi deixado em repouso no gelo por 15 minutos. Os extratos foram homogeneizados por inversão dos tubos e deixados no gelo por mais 15 minutos. Novamente os extratos foram homogeneizados e centrifugados a 3.000 rpm, 4°C por 30 minutos. Assim, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C. Para o ELISA, diluições de 1:10 e 1:100 de cada *pool* de extrato fecal foram utilizadas em triplicata. A leitura da placa foi realizada em VersaMax™ ELISA Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

4.8.7.3 Quantificação Sérica de Citocinas

Os soros dos animais foram diluídos 1:10 e quantificados usando CBA Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) no citômetro de fluxo Accuri™

C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os dados adquiridos foram analisados por meio do FCAP Array™ Software Version 3.0. Os procedimentos seguiram as recomendações técnicas do fabricante.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados de todos os experimentos foram expressos como a média \pm EPM (erro padrão da média). Diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste Mann-Whitney, com o programa Graph Pad Prism version 6.0 for Mac OS X (La Jolla, CA, USA). Quando o valor de p foi $< 0,05$, a diferença foi considerada estatisticamente significativa.

RESULTADOS



5. RESULTADOS

5.1 ETAPAS DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS pValac::*anti-TNF* E pValac::*anti-IL1 β*

As sequências sintéticas com as ORFs *scFv anti-TNF* e *scFv anti-IL1 β* foram produzidas e clonadas no vetor pBluescript II SK (-). Estes dois plasmídeos foram transformados em *E. coli* XL1-Blue, extraídos por meio da técnica de extração de DNA plasmidial em média escala (sessão 4.5.1.2) com consequente confirmação com gel de agarose, onde foram visualizadas as bandas de entre 3000 pb e 4000 pb do plasmídeo pBluescriptII SK(-)::*anti-IL1 β* (tamanho de 3690 pb) e do plasmídeo pBluescriptII SK(-)::*anti-TNF* (tamanho de 3698 pb), nas canaletas 1 e 3, respectivamente (Figura 12).

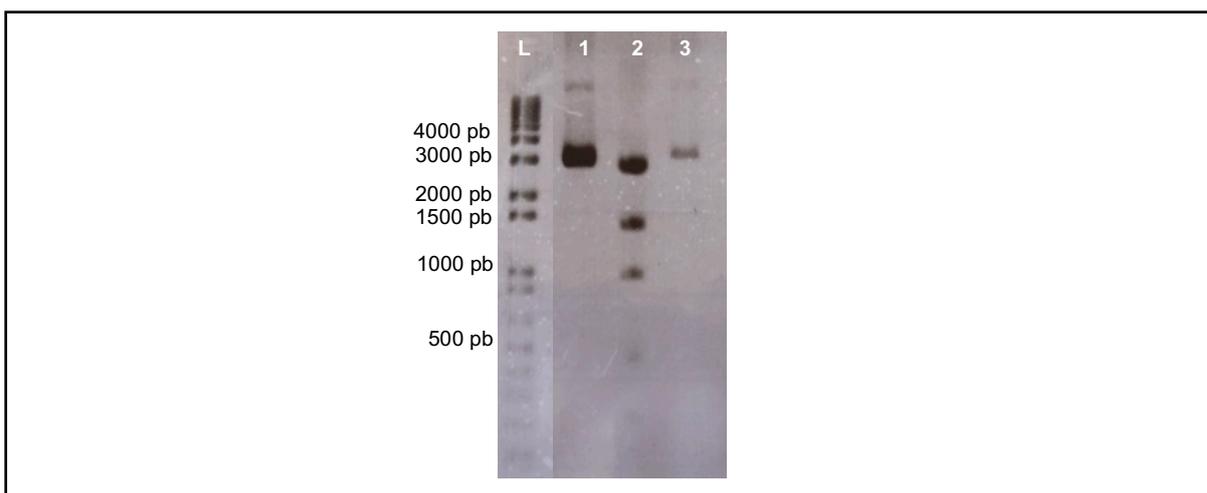


Figura 12. Visualização do DNA plasmidial em média escala dos plasmídeos pBluescriptII SK(-)::*anti-IL1 β* e pBluescriptII SK(-)::*anti-TNF*. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. L: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1: pBluescriptII SK(-)::*anti-IL1 β* , 2: High DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 3: pBluescriptII SK(-)::*anti-TNF*.

O perfil de digestão com Nhe I e EcoR I (sessão 4.5.1.3.2) também foi realizado para detecção dos tamanhos dos fragmentos que estavam ligados ao vetor anteriormente, confirmando o sucesso da clonagem por meio da visualização, na canaleta 1, do vetor pBluescriptII SK(-) de aproximadamente 2800 pb (tamanho de 2848 pb) e da ORF *scFv*

anti-IL1 β de aproximadamente 850 pb (tamanho de 835 pb), e na canaleta 2, do vetor pBluescriptIISK(-) e da ORF *scFv anti-TNF* de aproximadamente 850 pb (tamanho de 838 pb) (Figura 13).

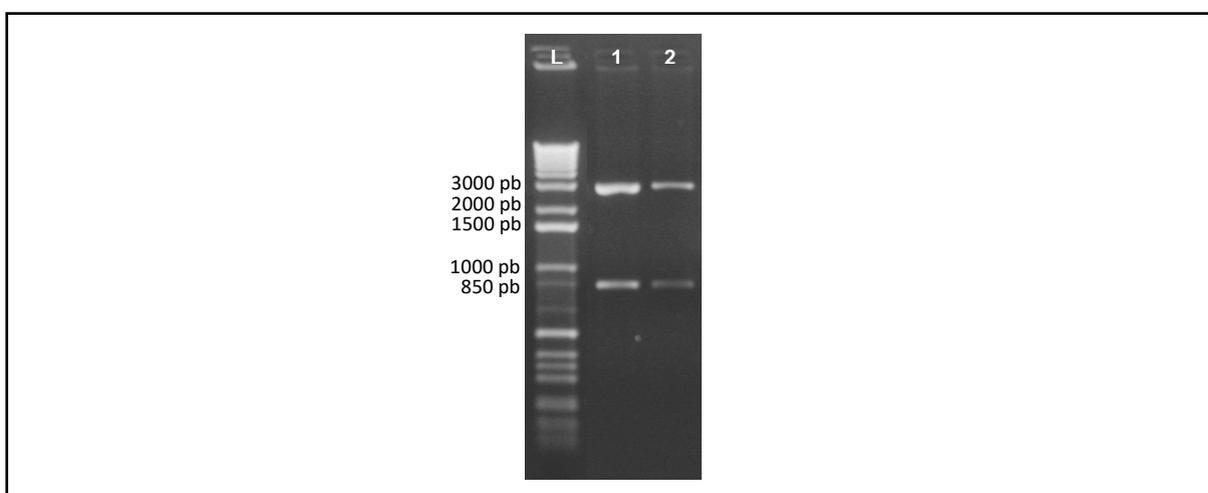


Figura 13. Produto da digestão enzimática dos plasmídeos pBluescriptIISK(-)::*anti-IL1 β* e pBluescriptIISK(-)::*anti-TNF* com as enzimas Nhe I e EcoR I. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. L: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1: vetor pBluescriptIISK(-) e ORF *scFv anti-IL1 β* e 2: vetor pBluescriptIISK(-) e ORF *scFv anti-TNF*.

Uma vez confirmados e detectados os fragmentos de DNA referentes às ORFs *scFv anti-TNF* e *scFv anti-IL1 β* , estes fragmentos foram excisados e purificados (sessão 4.5.1.4) a partir de um gel de agarose (Figura 14) para posteriormente serem clonados no vetor pValac.

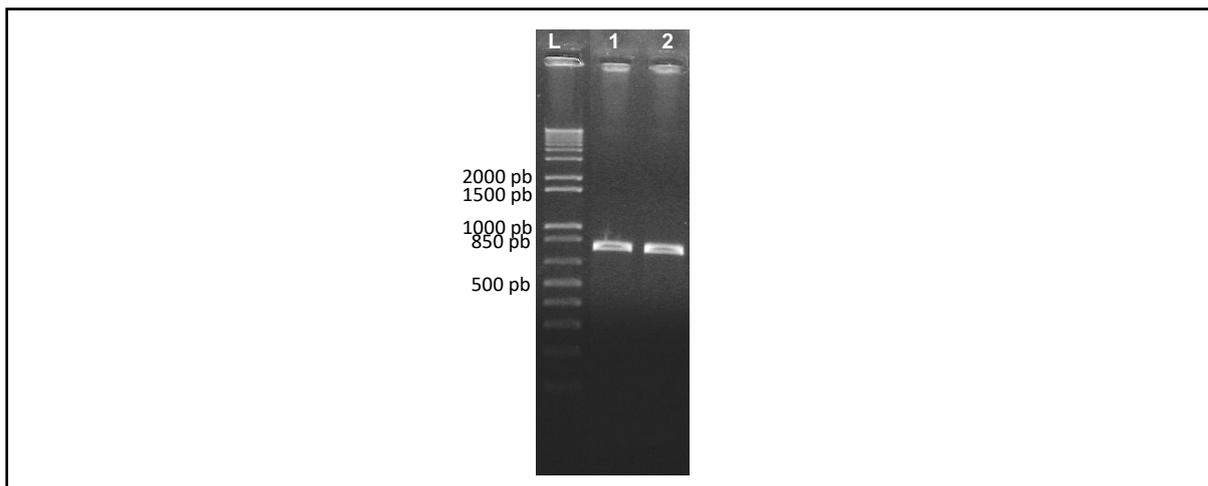


Figura 14. Purificação das ORFs *scFv anti-IL1 β* e *scFv anti-TNF* a partir de um gel preparatório de agarose. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. L: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1: ORF *scFv anti-IL1 β* e 2: ORF *scFv anti-TNF*.

Em seguida, o vetor pValac::*gfp* (previamente transformado em *E. coli* TG1) também foi submetido a digestão enzimática com Nhe I e EcoR I para separação da ORF *gfp* do pValac (sessão 4.5.2.1). A digestão foi confirmada em gel de agarose com a visualização de uma banda de aproximadamente 4000 pb (tamanho de 3742 pb) (Figura 15).

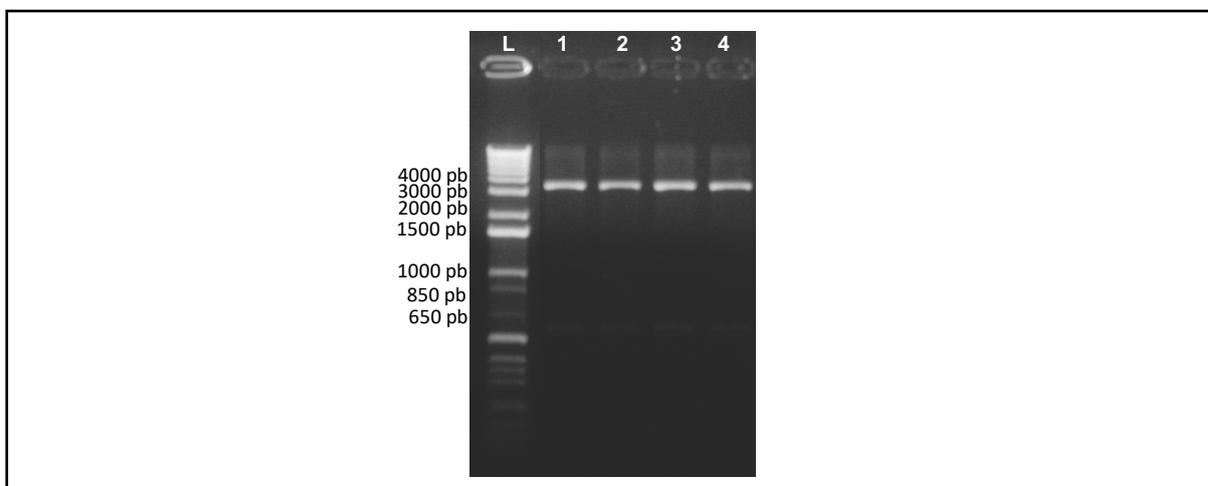


Figura 15. Produto da digestão enzimática do plasmídeo pValac::*gfp* com as enzimas Nhe I e EcoR I. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. L: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 a 4: vetor pValac.

Após a reação de digestão, pValac foi purificado a partir de um gel de agarose (4.5.2.2), cuja eficiência foi conferida por eletroforese em gel de agarose, com a visualização das bandas de aproximadamente 4000 pb (Figura 16).

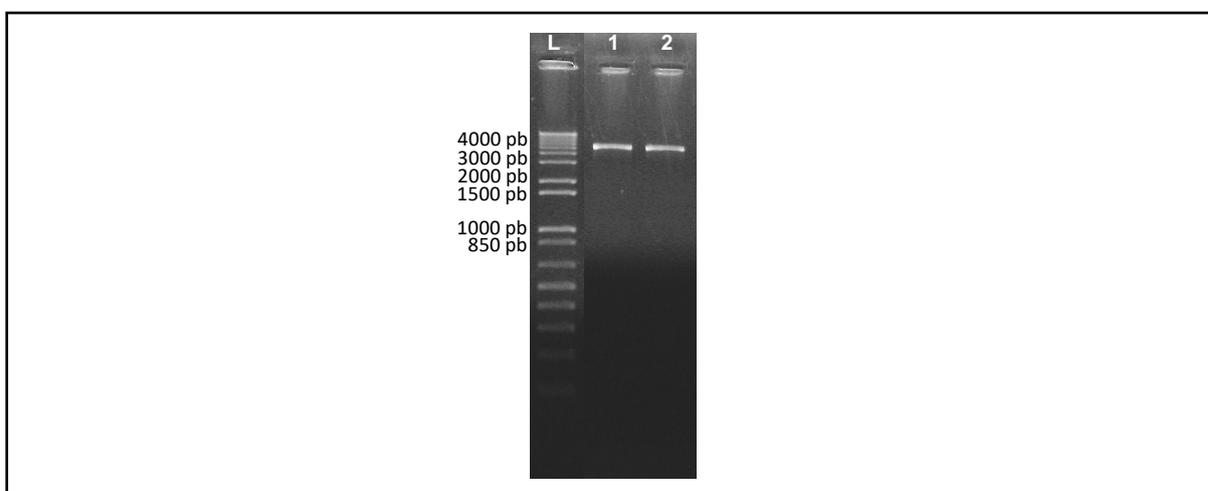


Figura 16. Purificação do vetor pValac sem a ORF *gfp* a partir de um gel preparatório de agarose. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. L: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 e 2: vetor pValac.

Com plasmídeo e insertos purificados, o próximo passo foi a reação de ligação inserto::vetor. Por meio da enzima T4 DNA Ligase, a ORF *scFv anti-TNF* e a ORF *scFv anti-IL1 β* foram ligadas independentemente ao pValac (sessão 4.5.3). Estes 2 plasmídeos construídos foram transformados em *E. coli* TG1 por eletroporação e foram extraídos pela técnica de DNA plasmidial em pequena escala (sessão 4.5.4). Uma estratégia para confirmação da clonagem foi a digestão enzimática dos plasmídeos (sessão 4.5.4.3.1) com aplicação dos produtos em gel de agarose. Puderam ser detectadas as bandas de aproximadamente 600 pb e 3500 pb (tamanhos de 619 e 3594 pb) nas canaletas 2 e 4, e as bandas de aproximadamente 850 pb e 4000 pb (tamanhos de 802 e 3708) nas canaletas 6 e 8, sendo que todas estas bandas são oriundas da digestão com endonucleases (Figura 17). A segunda estratégia utilizada para confirmação da clonagem foi o sequenciamento de Sanger, cujo serviço foi realizado por empresa terceirizada (Helixxa).

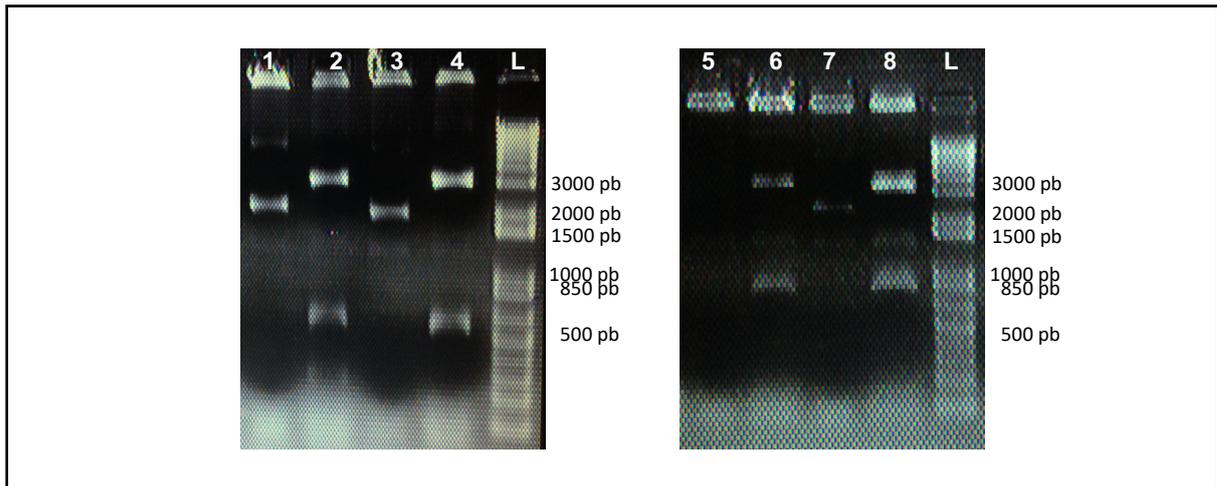


Figura 17. Produtos da digestão enzimática dos plasmídeos pValac::*anti-IL1 β* e pValac::*anti-TNF* com as enzimas *Nco* I e *Xba* I, respectivamente. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. L: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 1 e 3: pValac::*anti-IL1 β* intacto; 2 e 4: pValac::*anti-IL1 β* digerido por *Nco*I; 5 e 7: pValac::*anti-TNF* intacto; 6 e 8: pValac::*anti-TNF* digerido por *Xba*I.

5.2 ENSAIOS DE TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS

A partir da construção e confirmação das sequências dos plasmídeos, a próxima etapa foi a investigação de sua funcionalidade e expressão proteica em células eucarióticas. O kit de transfecção Lipofectamine[®] LTX foi utilizado para que os plasmídeos pValac::*anti-TNF* e pValac::*anti-IL1 β* pudessem transfectar células das linhagens HEK-293, CHO-K1 e Caco-2 (sessão 4.6.3). Para confirmação da produção dos fragmentos de anticorpos anti-TNF (31 kDa) e anti-IL1 β (30 kDa) foram realizadas a técnica de SDS-PAGE e imunodeteção por *western blot* (sessão 4.6.4), cujo resultado está exposto na figura 18.

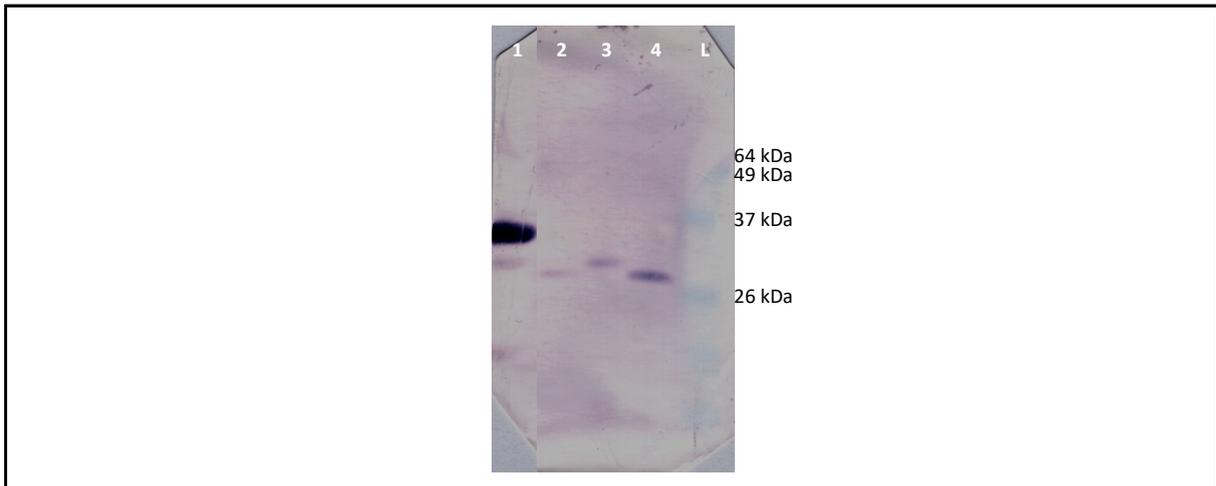


Figura 18. Imunodeteção dos scFvs de anti-TNF e anti-IL1 β no sobrenadante de cultivo de células após a transfecção. 1: controle positivo de uma proteína scFv; 2: anti-IL1 β detectado em sobrenadante de Caco-2; 3: anti-TNF detectado em sobrenadante de HEK-293; 4: anti-IL1 β detectado em sobrenadante de HEK-293; L: BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

5.3 CONSTRUÇÃO DAS LINHAGENS *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-TNF*)

E *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-IL1 β*)

As células da linhagem *L. lactis* MG1363 FnBPA+ foram transformadas com os plasmídeos pValac::*anti-TNF* e pValac::*anti-IL1 β* , independentemente, por meio de eletroporação. Após a transformação, o DNA plasmidial foi extraído em pequena escala (sessão 4.7). A confirmação da clonagem dos plasmídeos em *L. lactis* foi feita com PCR (Figura 19), por meio da detecção dos fragmentos, descritos na Tabela 10, de aproximadamente 1000 pb (tamanho de 945 pb do produto da amplificação de pValac::*anti-IL1 β* e de 941 pb do produto de amplificação de pValac::*anti-TNF*).

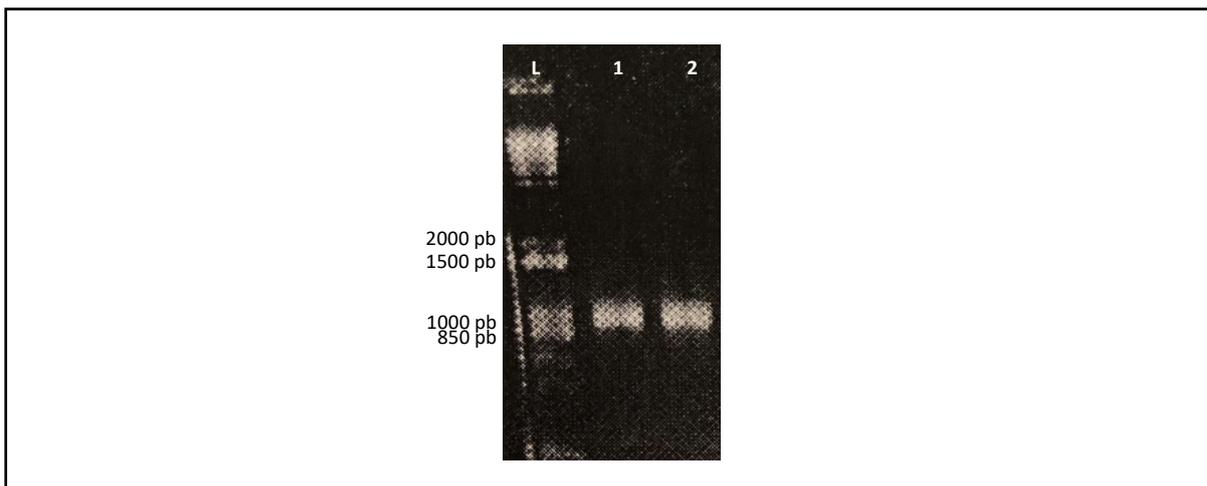


Figura 19. Produtos de amplificação do PCR confirmando a presença dos plasmídeos em *L. lactis*. L: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 1: produto da amplificação de pValac::*anti-IL1 β* ; 2: produto de amplificação de pValac::*anti-TNF*.

5.4 CURVAS DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Todas as linhagens utilizadas neste trabalho tiveram suas curvas de crescimento determinadas: *L. lactis* MG1363, *L. lactis* MG1363 FnBPA+, *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-TNF*) e *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-IL1 β*), identificadas daqui para frente pelas siglas LL-M, LL-F, LL-FT e LL-FI, respectivamente (sessão 4.7.4).

Assim, a DO de cada cultura de bactéria transformada foi lida de hora em hora até que houvesse 2 medidas semelhantes. As curvas de crescimento (Figura 21) foram fundamentais para que fosse possível a determinação das doses bacterianas a serem administradas nos experimentos com animais.

Para isso, a caracterização do crescimento de cada linhagem foi realizada por meio do preparo de diluições seriadas de 10 vezes seguida por semeadura, em duplicata, de 100 μ L das diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} em ágar M17 e antibióticos específicos, nos tempos 4h, 10h e 12h. As placas foram incubadas a 30°C e as UFCs foram contadas entre 24 e 48 após plaqueamento.

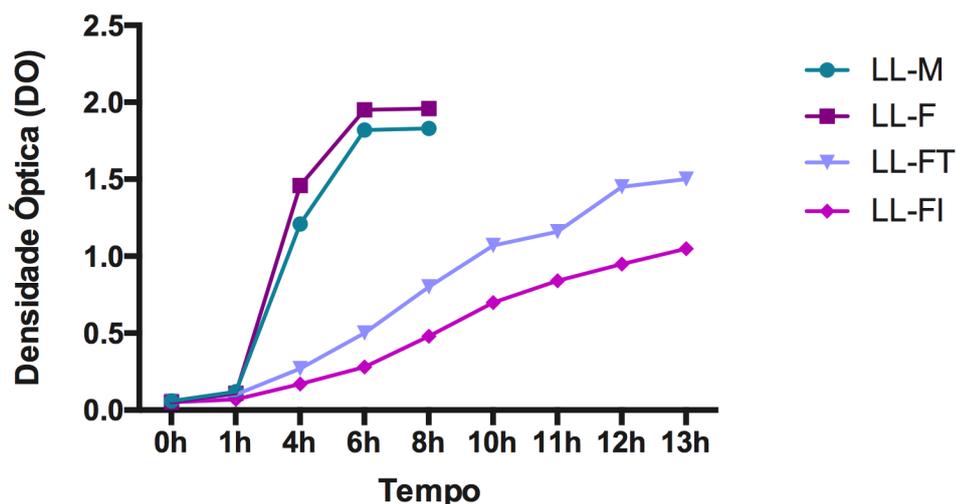


Figura 20. Curvas de crescimento das diferentes linhagens de *L. lactis*, de acordo com a relação DO_{600} versus tempo. LL-M, *L. lactis* MG1363; LL-F, *L. lactis* MG1363 FnBPA+; LL-FT, *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (*pValac::anti-TNF*), e LL-FI, *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (*pValac::anti-IL1 β*).

LL-M é a linhagem selvagem, cujas medições serviram como base para as demais linhagens. Por meio das contagens de UFCs nas placas, para cada linhagem, pode ser correlacionado o tempo no qual cada linhagem alcançou a DO_{600} 1,0 e sua respectiva concentração bacteriana. Assim, com 4 horas de crescimento, LL-M e LL-F alcançaram a DO_{600} 1,0 o que correspondeu a $2,7 \times 10^8$ UFC/mL e $1,05 \times 10^9$ UFC/mL. Passadas 10 horas de crescimento, LL-FT e LL-FI atingiram a DO_{600} 1,0 correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e $2,6 \times 10^8$ UFC/mL, respectivamente.

5.5 ENSAIOS COM AS LINHAGENS RECOMBINANTES DE *L. lactis* EM MODELO ANIMAL DE COLITE

5.5.1 Experimento Animal 1

O experimento animal 1 foi o experimento piloto, para treinamento da manipulação de camundongos e para se iniciar os ajustes de cada parâmetro testado. Dentre os 6 grupos de animais, 3 deles foram grupos controle: CN, controle negativo de animais saudáveis que ingeriram apenas água; DSS, controle positivo de animais doentes cuja colite foi induzida por DSS e que não recebeu nenhum tratamento com lactococos; e

LL-F, grupo que serviu como o controle positivo da inflamação em todos os experimentos, pois a colite foi induzida e foram tratados somente com *L. lactis* transformado com o plasmídeo de FnBPA+ e sem vetor pValac.

O peso dos animais foi determinado no dia anterior ao início da administração de DSS 2% (dia 0) e nos dias 9, 14 e 15. Como mostrado na figura 21A, o peso corporal dos camundongos diminuiu durante o tratamento com DSS nos 7 primeiros dias, quando comparado com o grupo controle saudável, que recebeu apenas salina. Quando se iniciou o tratamento, no dia 8, com as cepas recombinantes de *L. lactis*, os animais tratados continuaram a perder peso ou o mantiveram até o dia da eutanásia, não havendo melhora deste parâmetro.

Este experimento foi composto por 42 animais, mas 8 deles foram a óbito (19%). A alta mortalidade provavelmente se deve ao pouco tempo de vida dos animais, 7 semanas de idade. Na eutanásia, o comprimento do cólon foi anotado e, quando analisado, foi observado que todos os grupos que ingeriram DSS tiveram encurtamento do cólon, tendo os grupos LL-F e LL-FTI um encurtamento com diferença estatística quando comparado ao grupo CN. Mesmo os grupos que receberam a bactéria com pValac não tiveram recuperação do tamanho do cólon (Figura 21B).

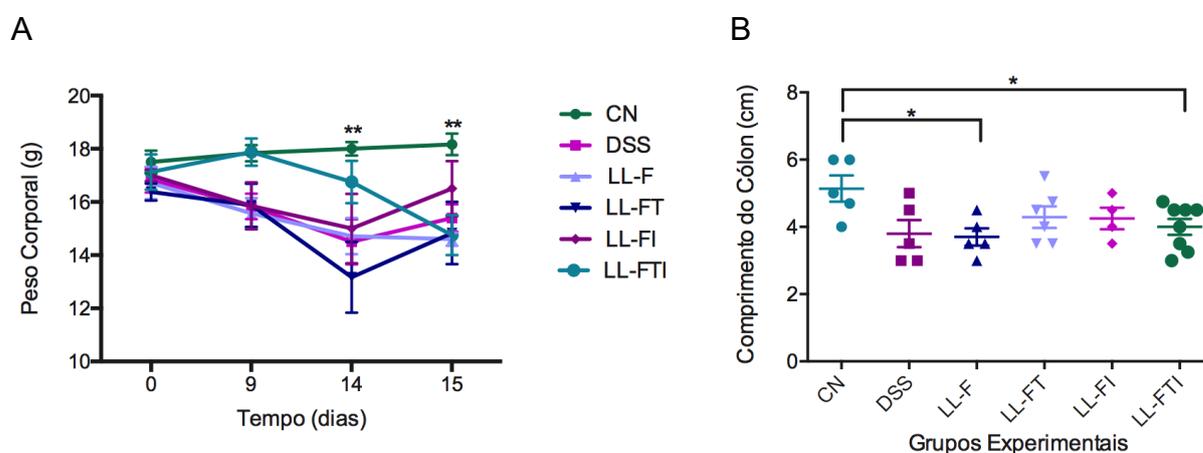


Figura 21. A. Peso (g) e B. Comprimento do cólon (cm) do experimento 1. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-TNF); LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::IL1 β); e LL-FTI: grupo que recebeu concomitantemente LL-FT e LL-FI. As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney para o gráfico e ANOVA two-way para as curvas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

O sangramento retal, avaliado na eutanásia, já estava ausente em todos os animais, tanto os do grupo DSS e LL-F quanto os tratados com *L. lactis* carreando pValac. A diarreia, também avaliada na eutanásia, estava presente em todos os grupos que ingeriram DSS (DSS, LL-F, LL-FT, LL-FI e LL-FTI), variando de branda a moderada.

Uma análise microscópica foi realizada no sentido de verificar se a inflamação induzida pelo DSS nos animais estava reproduzindo o modelo da colite ulcerativa em humanos, dado este que foi confirmado pelo patologista. Além disso, 1 amostra intestinal de cada grupo foi escolhida aleatoriamente e analisada, porém sem a possibilidade de aplicação de cálculos estatísticos (Figura 22). Pode ser observado que o score do grupo LL-FT foi o menor de todos os grupos que ingeriram DSS, sugerindo que houve uma melhora da inflamação intestinal.

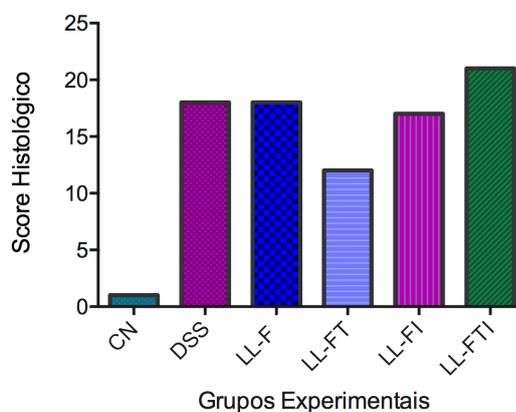


Figura 22. Score histológico do experimento 1. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF*); LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*IL1 β*); e LL-FTI: grupo que recebeu concomitantemente LL-FT e LL-FI.

5.5.2 Experimento Animal 2

No experimento 2A, o peso dos camundongos foi registrado diariamente. Na figura 23A é possível observar que, durante o experimento, os animais que ingeriram DSS perderam peso até o final do experimento e mesmo aqueles que foram tratados com pValac não o recuperaram. Somente o grupo controle (CN) manteve a média de peso, o que indica que o tratamento não contribuiu para manutenção ou recuperação do

peso. Além disso, o comprimento do cólon entre os grupos se manteve homogêneo, sem diferenças estatísticas (Figura 23B).

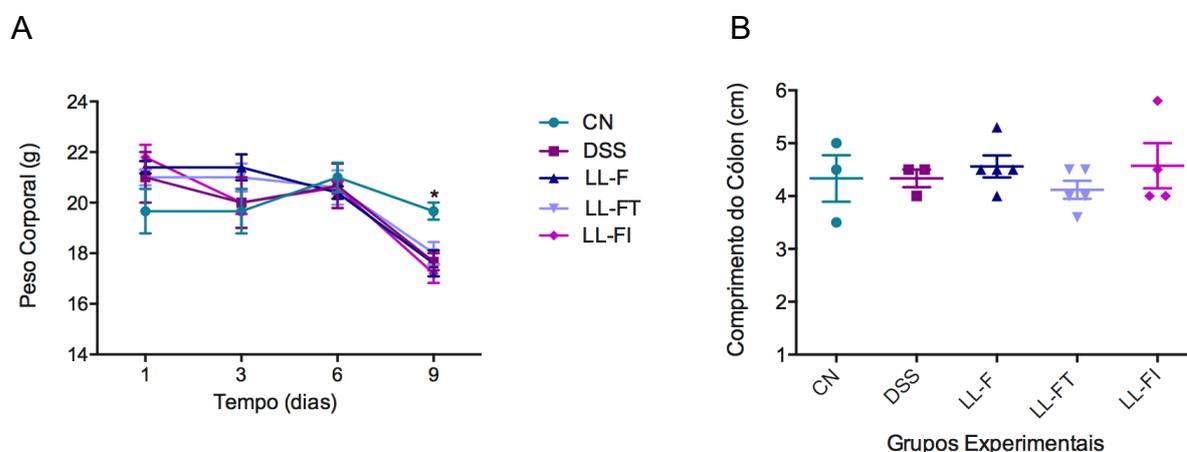


Figura 23. A. Peso (g) e B. Comprimento do cólon (cm) do experimento 2A. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-TNF); e LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::IL1 β). As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney para o gráfico e ANOVA two-way para as curvas. * $p < 0,05$.

Dos 21 animais estudados, em 18 deles foi induzida a colite por DSS 2%. Macroscopicamente, já no 3º dia de experimento, 1 animal mostrou sinais de sangramento retal e no 5º dia, 4 dos 18 animais (22,2%) já tinham o sintoma. No dia 9, na eutanásia, 11 animais estavam com sangramento (61,1%), sendo representados por 66,7% (2 de 3 animais) do grupo DSS, 60% (3 de 5 animais) do grupo LL-F, 40% (2 de 5 animais) do grupo LL-FT e 80% (4 de 5 animais) do grupo LL-FI.

Uma nova análise foi incluída a partir do experimento 2: DAI. Este índice reflete os sintomas macroscópicos da colite e auxilia na avaliação da funcionalidade do tratamento, tendo uma relação proporcional ao score histológico, ou seja, quanto maior o DAI, mais sintomático está o animal e, em teoria, mais inflamação intestinal o animal tem e maior o score histológico. No experimento 2A, o DAI (Figura 24) estava aumentado nos grupos DSS, LL-F e LL-FI, e somente o grupo LL-FT apresentou melhora significativa, em relação a um dos controles positivos da doença (LL-F) e em relação ao outro grupo que recebeu pValac (LL-FI).

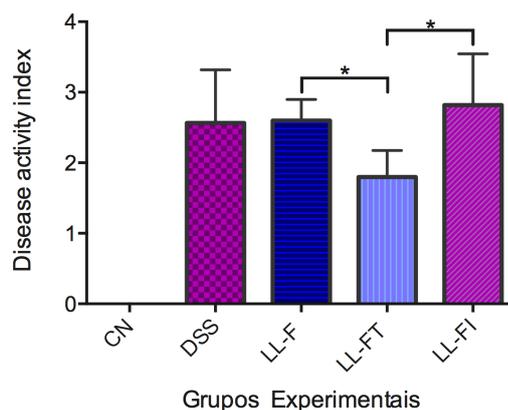


Figura 24. DAI do experimento 2A. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF*); e LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*IL1 β*). As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

O experimento 2B começou concomitantemente ao 2A, porém teve 4 dias a mais de duração, com interrupção do DSS para todos os animais, que continuaram a serem tratados lactococos até a eutanásia.

Na figura 25A é possível observar que todos os animais que ingeriram DSS perderam peso até o final do experimento e que somente o grupo CN manteve a média de peso. O comprimento do cólon não teve qualquer diferença estatística (Figura 25B), apesar de parecer que todos grupos que ingeriram DSS tiveram uma média menor em relação ao grupo CN.

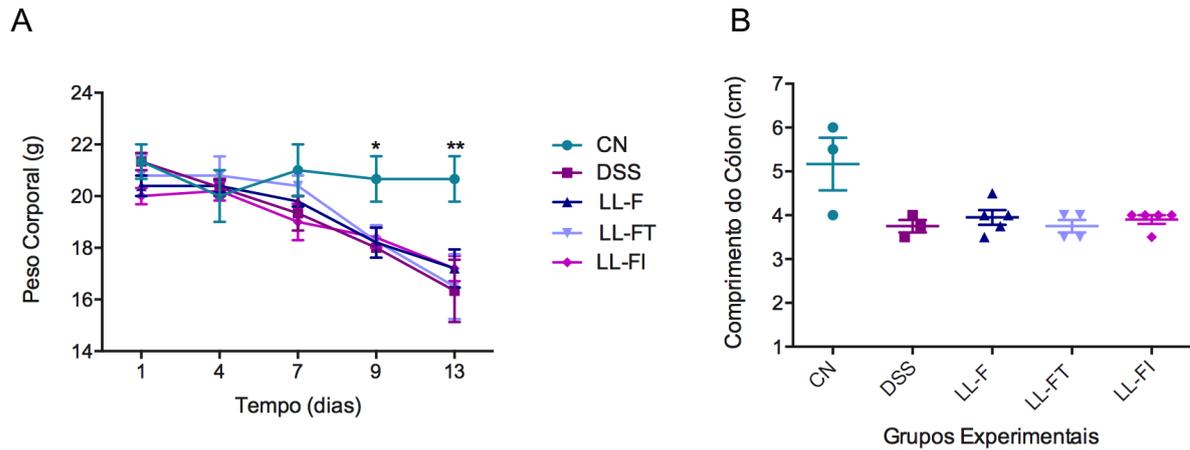


Figura 25. Peso (g) e comprimento do cólon (cm) do experimento 2B. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-TNF); e LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::IL1 β). As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney para o gráfico e ANOVA two-way para as curvas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Dos 21 animais do experimento 2B, 1 animal do grupo LL-FT foi à óbito. Assim, considerando que 20 animais foram analisados, 17 deles ingeriram DSS 2%. Macroscopicamente, no 3º dia de experimento, 1 animal mostrou sinais de sangramento retal e no 5º dia, 4 dos 17 animais (23,5%) já tinham o sintoma. No dia de interrupção do DSS (dia 8), 3 animais (17,6%) foram detectados com sangramento. No dia 13, na eutanásia, apenas 1 animal (grupo LL-F) foi identificado com sangramento retal.

A consistência das fezes foi verificada diariamente. No 5º dia, 1 dos 17 animais que ingeriram DSS estava com diarreia branda. No 8º dia (interrupção do DSS), 13 dos 17 animais (76%) já apresentavam diarreia. Na eutanásia (13º dia), a mesma quantidade de animais com o sintoma foi encontrada, sendo representados por 33,3% (1 de 3 animais) do grupo DSS, 100% (5 de 5 animais) do grupo LL-F, 75% (3 de 4 animais) do grupo LL-FT e 80% (4 de 5 animais) do grupo LL-FI.

No experimento 2B, o DAI (Figura 26) não evidenciou nenhuma diferença estatística entre os grupos.

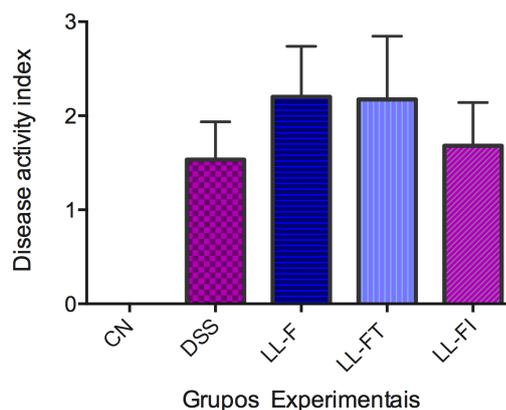


Figura 26. DAI do experimento 2B. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF*); e LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*IL1 β*). As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.5.3 Experimento Animal 3

Após a realização de 2 experimentos, das habilidades adquiridas em experimento com animais e dos critérios pré-definidos, foi realizado o experimento 3. Neste experimento, foi realizada a avaliação bioquímica e imunológica necessária para saber se, então, o tratamento com *L. lactis* recombinantes funcionou, como indicava a avaliação do DAI, visto que a indução de danos no epitélio colônico em camundongos C57BL/6 foi associada com diarreia, perda de consistência das fezes e fezes sanguinolentas, detectados na avaliação macroscópica, como descrito por Yang *et al* (Yang *et al.*, 2017).

O experimento 3 começou com 41 camundongos. Dois animais do grupo LL-FT foram a óbito no 8º dia. Os animais foram pesados todos os dias, o que permitiu a observação que todos aqueles que ingeriram DSS perderam peso até o final (Figura 27A).

O comprimento do cólon se mostrou bastante heterogêneo entre os grupos, com diferenças estatisticamente significantes (Figura 27B). Em síntese, o grupo CN teve a maior média de comprimento do cólon, como esperado já que eram animais saudáveis (3,950 cm \pm 0,050). Já o grupo LL-F teve a menor média (2,917 cm \pm 0,083), o que significou maior encurtamento do cólon entre os grupos, como também esperado, porque ingeriu DSS e foi tratado com *L. lactis* - FnBPA (invasina inflamatória). Assim,

com estatística significativa, os grupos que obtiveram recuperação do tamanho do órgão quando comparados com o grupo LL-F, foram LL-FT (3,460 cm \pm 0,128) e LL-FTI (3,486 cm \pm 0,112).

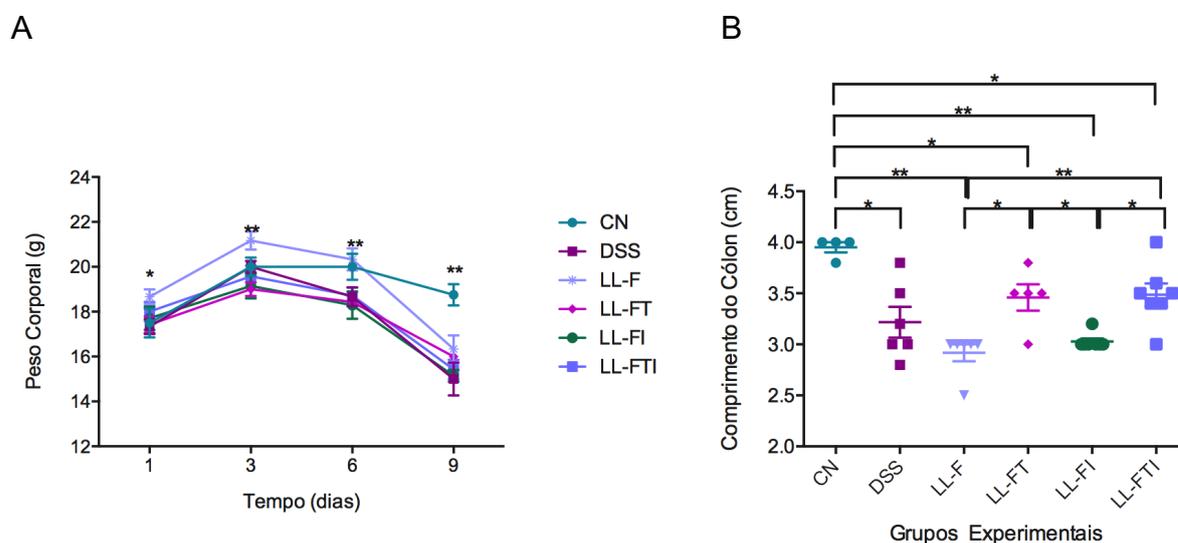


Figura 27. A. Peso (g) e B. Comprimento do cólon (cm) do experimento 3. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-TNF); LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::IL1 β); e LL-FTI, grupo que recebeu concomitantemente LL-FT e LL-FI. As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney para o gráfico e ANOVA two-way para as curvas * p < 0,05 e ** p < 0,01.

Dos 39 animais avaliados, 35 deles ingeriram DSS 2%. Em relação a análise macroscópica, no 4º dia já foram observados 3 animais com sangramento retal e o dia que teve o maior número de animais com sangramento retal foi o dia 7, no qual 12 dos 35 animais (34,3%) tiveram o sintoma. Já na eutanásia, apenas 5 dos 35 animais (14,3%) apresentaram sangramento retal, sendo estes 14,3% representados por 25% (1 de 4 animais) do grupo LL-M, 16,7% (1 de 6 animais) do grupo LL-F e 42,8% (3 de 7 animais) do grupo LL-FI. Nenhum animal dos grupos DSS, LL-FT e LL-FTI tiveram mais o sintoma.

Quanto à análise da consistência das fezes, dos 35 animais nos quais foi induzida a colite, 10 deles (28,6%) tinham diarreia no 6º dia do experimento. Na eutanásia, foi observado, no grupo DSS, que 2 animais tinham fezes pastosas e 4, diarreia; no grupo LL-M, 3 tinham fezes pastosas e 1 tinha fezes formadas; no grupo LL-F, 4

camundongos tinham fezes pastosas e 2, diarreia; no grupo LL-FT, 3 tinham fezes pastosas e 2, fezes formadas; no grupo LL-FI, 5 tinham fezes pastosas, 1 tinha diarreia e 1 tinha fezes formadas; e no grupo LL-FTI, 6 animais tinham fezes pastosas e 1, fezes formadas.

O DAI (Figura 28A) reproduz perda de peso, consistência das fezes e sangramento retal causados nos camundongos pela colite; ou seja, quanto maior o DAI mais intensos são os sinais macroscópicos e mais doente o animal se encontra. Somente os grupos LL-FT e LL-FTI tiveram o DAI menor e com relevância estatística dentre os outros grupos que ingeriram DSS.

Quanto ao *score* histológico (Figura 28B), curiosamente, o grupo LL-FT apresentou um índice de danos histológicos significativamente menor do que o índice dos grupos controle positivo da doença, pois as amostras de tecido dos cólons dos animais desse grupo apresentaram uma melhora muito significativa dos padrões histológicos quando comparado com o grupo DSS ($p=0,0043$) e com o grupo LL-F ($p=0,0022$). Em suma, somente o grupo LL-FT corroborou melhoras significativas tanto nos parâmetros macroscópicos (DAI) quanto nos microscópicos da colite.

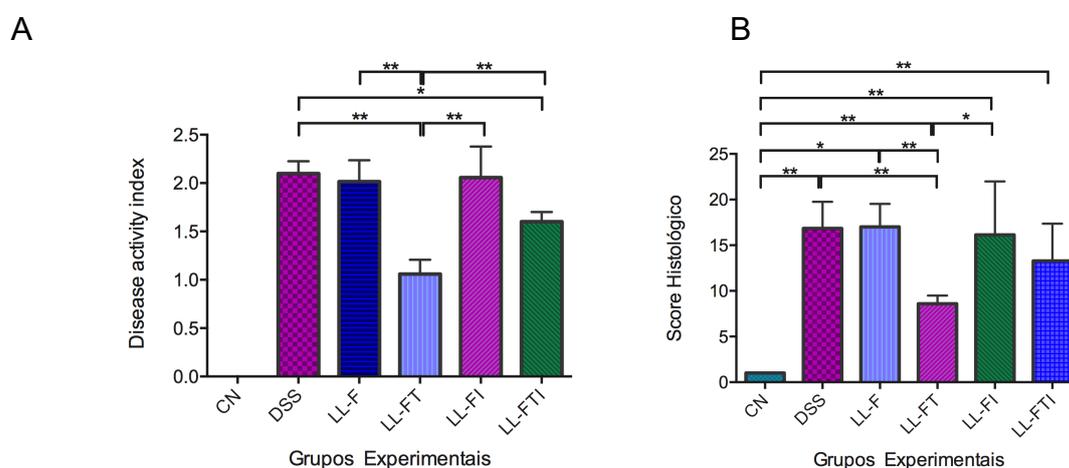


Figura 28. A. DAI e B. Score histológico do experimento 3. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF*); LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*IL1 β*); e LL-FTI, grupo que recebeu concomitantemente LL-FT e LL-FI. As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Ainda, para visualização das alterações histológicas induzidas pelo DSS e pelo tratamento, fotos de lâminas histopatológicas representativas de cada grupo de animais foram adquiridas e verificadas. Por meio desta análise, foi possível afirmar que os cólons dos animais do grupo CN se mantiveram íntegros, sem nenhuma mudança na arquitetura histológica normal na mucosa do cólon dos camundongos (Figura 29A). Ao se comparar o grupo DSS (Figura 29B) ao grupo LL-F (Figura 29C), não houve diferença entre as amostras de tecidos colônico analisadas, uma vez que foi possível observar infiltrado inflamatório mucoso e submucoso, em ambos os grupos, que variou de moderado a avançado. Ainda, foi associada a presença de erosão com ulceração extensa, abscessos de criptas, espessamento da muscular e depleção de células globosas.

O grupo LL-FT (Figura 29D), por sua vez, apresentou discreto infiltrado inflamatório: os infiltrados mucoso, submucoso, muscular e seroso se apresentaram leves ou com nenhuma área de erosão da mucosa e pouca atividade inflamatória de glândula. Além disso, não foi detectada área com ulceração de mucosa ou espessamento da muscular, assemelhando-se ao grupo CN. Os grupos LL-FI (Figura 29E) e LL-FTI (Figura 29F) se assemelharam aos grupos DSS e LL-F, sendo observado também presença de infiltrado inflamatório mucoso e submucoso de grau moderado e depleção de células globosas de intensidade moderada.

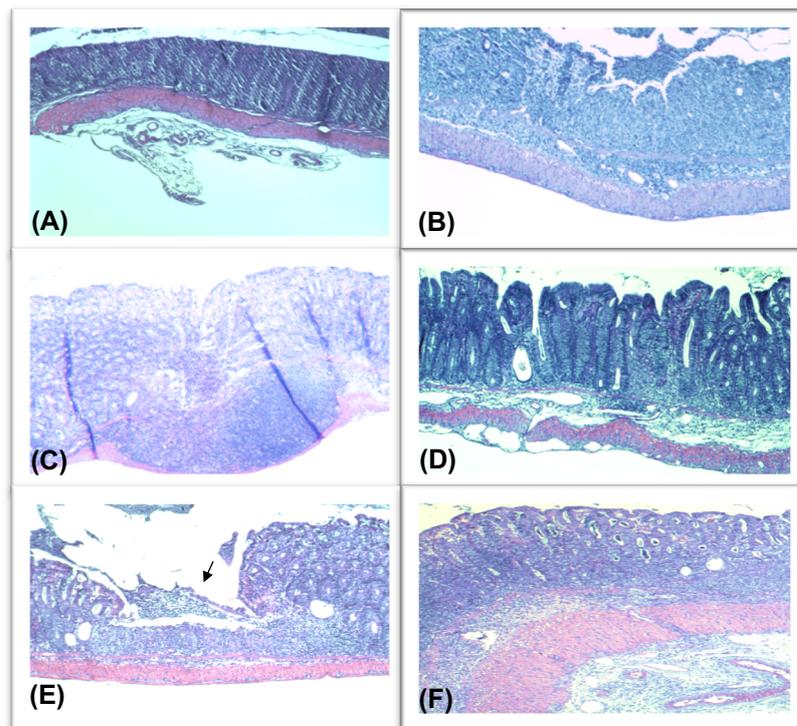


Figura 29. Análise histopatológica. Lâminas representativas do tecido colônico distal de cada grupo de animais do experimento 3. **(A)** grupo CN, parede intestinal de aspecto normal; **(B)** grupo DSS, extensa úlcera e exsudato fibrino-purúleto na superfície e infiltrado inflamatório estendido até a submucosa; **(C)** grupo LL-F, intenso infiltrado inflamatório comprometendo todas as camadas da parede intestinal; **(D)** grupo LL-FT, parede intestinal com mucosa íntegra e discreto infiltrado inflamatório que se estende até a submucosa, e muscular própria de aspecto normal; **(E)** grupo LL-FI, área de ulceração na mucosa (seta preta); **(F)** grupo LL-FI, infiltrado inflamatório intenso comprometendo todas as camadas da parede intestinal.

Uma vez que o modelo animal de colite foi reproduzido adequadamente com base no DAI e na avaliação histológica e que o tratamento com *L. lactis* reduziu a inflamação causada pelo DSS, a etapa seguinte foi detectar o padrão a nível molecular da inflamação gerada no tecido intestinal e identificar como o tratamento com *L. lactis* recuperou essa inflamação colônica. Assim, estes experimentos são reportados a seguir.

5.6 ENSAIOS DE qPCR

O RNA foi extraído do cólon intestinal dos camundongos, quantificado e tratado com DNase para síntese do cDNA. Assim, puderam ser realizados os ensaios de qPCR e obtidas as medidas de expressão relativa de cada gene alvo (Figura 30), quando

comparados com o gene endógeno RPS9. Após a obtenção e análise dos dados, obtivemos os seguintes resultados: os níveis de mRNA de IL-6 aumentaram nos grupos controle da doença e bactéria sem plasmídeo (DSS e LL-F, respectivamente), sendo que o grupo LL-FT teve os níveis menores significativamente em relação aos grupos DSS e LL-F; ainda, o grupo LL-FTI também diminuiu com significância quando comparado com o grupo DSS. Os níveis de mRNA de TNF estavam elevados nos grupos DSS e LL-F, diminuíram no grupo LL-FT (que recebeu pValac::*anti-TNF*), e nos grupos LL-FI e LL-FTI, mesmo recebendo a bactéria transformada, os níveis se mantiveram elevados. Quanto aos níveis de mRNA de IL-1 β , estes também estavam elevados nos grupos DSS e LL-F, e diminuíram significativamente no grupo LL-FT.

Na análise dos transcritos de IL-17A, pode-se observar que a expressão relativa dos grupos DSS e LL-F aumentou quase 8 vezes em relação ao grupo CN e que LL-FT teve os níveis de mRNA baixos, semelhante ao grupo CN; ainda, o grupo LL-FTI foi menor significativamente em relação ao grupo LL-F. Entretanto, os níveis de mRNA de ROR γ t diminuiu em todos os grupos, quando comparado com o grupo CN. Já os níveis de TGF β de todos os grupos mantiveram-se muito próximos, havendo diferença estatística apenas entre o grupo LL-F, o qual teve níveis mais elevados em relação ao grupo LL-FI.

Os fatores de transcrição T-bet, STAT-1 e Foxp3 também foram tiveram seus transcritos quantificados. Todos os grupos tiveram os níveis de T-bet mais baixos quando comparados com o grupo CN, mas os grupos DSS, LL-F e LL-FT apresentaram diferenças, sendo estatisticamente menores em relação ao grupo CN. Os transcritos de STAT-1 também se apresentaram baixos em todos os grupos em relação ao CN, com exceção do grupo LL-FTI, que se manteve semelhante a CN; porém os níveis de LL-FT foram significativamente menores em relação os grupos CN, LL-F e LL-FTI. Já os níveis de mRNA de Foxp3 aumentaram significativamente nos grupos DSS e LL-F em relação ao grupo CN, enquanto que os grupos que receberam o pValac (LL-FT, LL-FI e LL-FTI) diminuíram significativamente comparados com estes dois grupos controle da doença e bactéria sem plasmídeo (DSS e LL-F).

No que se refere aos níveis de mRNA de IL-10, o grupo LL-FT apresentou níveis significativamente menores em relação aos grupos DSS e LL-F quando comparados com os níveis do grupo LL-FT; e o grupo LL-FTI também estava com níveis mais baixos em relação ao grupo LL-F. A enzima iNOS estava com seus níveis de transcritos elevados nos grupos DSS, LL-F, LL-FI e LL-FTI e, somente o grupo LL-FT mostrou-se significativamente com níveis menores em relação aos grupos LL-F e LL-FTI. A outra enzima analisada, arginase, teve sua expressão relativa aumentada apenas nos grupos DSS e LL-F, enquanto que LL-FT, LL-FI e LL-FTI tinham níveis de mRNA próximos aos do grupo CN.

IL-22, uma citocina da família da IL-10, mostrou seus níveis aumentados em todos os grupos que ingeriram DSS e mesmo naqueles que receberam o tratamento com pValac. Exatamente ao contrário de IL-22, a MUC-3 teve sua expressão relativa menor que 1 em todos os grupos que ingeriram DSS e mesmo naqueles que receberam o pValac.

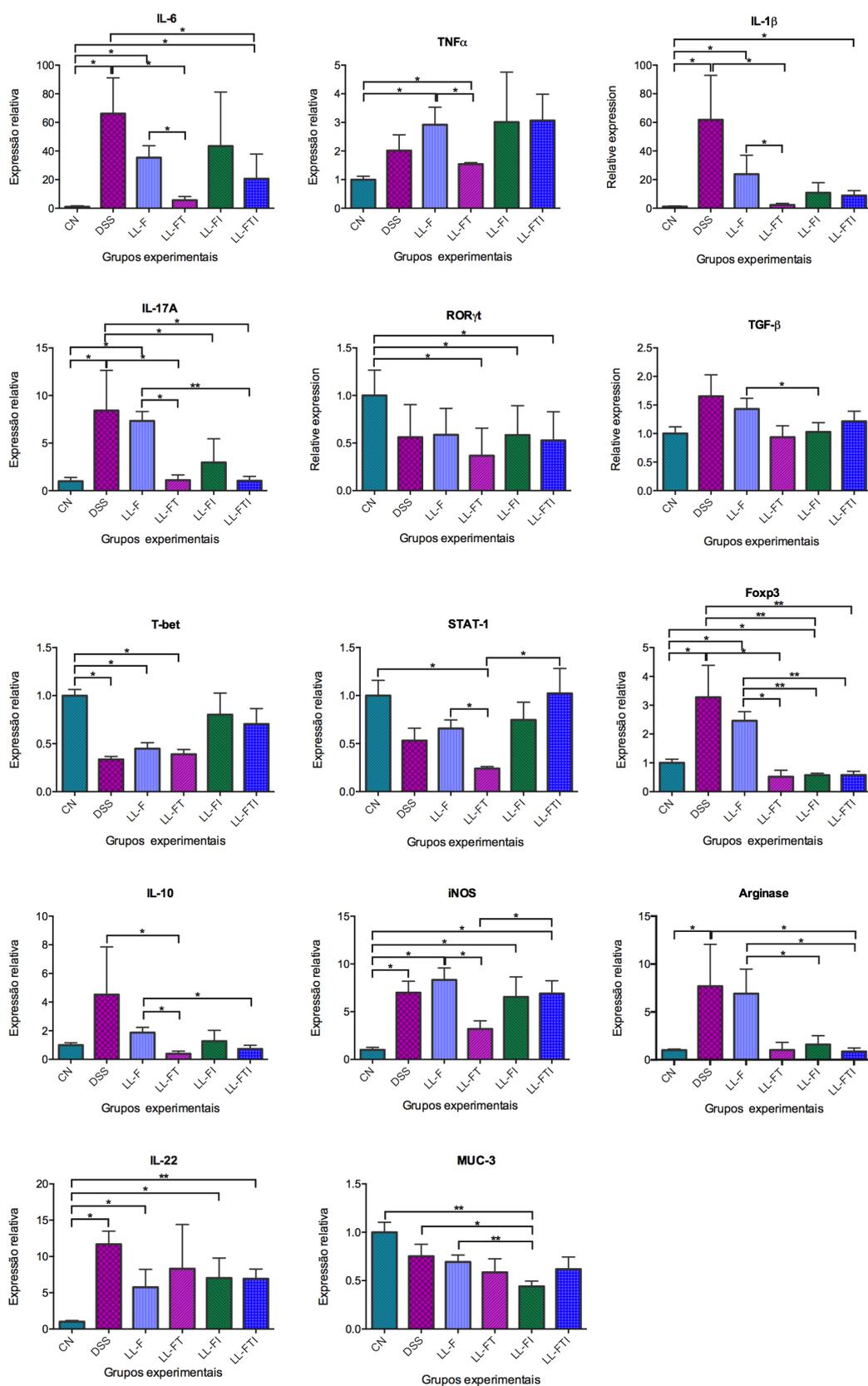


Figura 30. Níveis de expressão de mRNA no tecido colônico após tratamento com *L. lactis*. Os níveis de mRNA foram normalizados com o gene endógeno RPS9. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-TNF); LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::IL1 β); e LL-FTI, grupo que recebeu concomitantemente LL-FT e LL-FI. As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney. * p < 0,05 e ** p < 0,01.

5.7 DOSAGEM SÉRICA DE PROTEÍNA-C REATIVA

Uma vez que a proteína-c reativa é um marcador de reações inflamatórias de fase aguda, cuja produção, no fígado, é estimulada pelas citocinas IL-6, TNF e IL1 β (Vermeire et al., 2004), foi realizada a sua dosagem para acompanhamento da inflamação gerada pela colite. Desse modo, todos os grupos de camundongos que ingeriram DSS na água (DSS, LL-F, LL-FT, LL-FI e LL-FTI) tiveram seus níveis séricos de proteína-c reativa aumentados significativamente, quando comparado com o grupo CN (Figura 31). Porém, o único grupo que mostrou redução significativa em relação ao grupo controle com a bactéria sem vetor (LL-F) foi o LL-FT. Pode ser percebido também que mesmo os outros grupos que receberam o pValac (LL-FI e LL-FTI) mostraram um aumento significativo dos níveis de proteína-c reativa em relação ao grupo LL-FT.

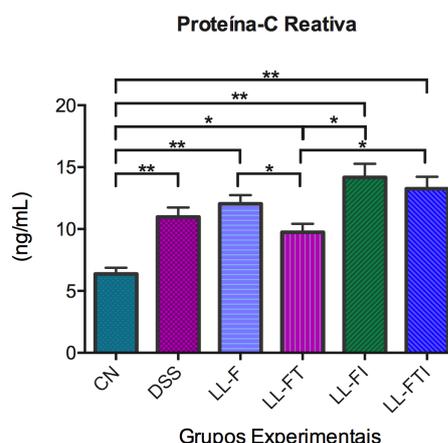


Figura 31. Concentração de proteína-c reativa sérica. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF*); LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*IL1 β*); e LL-FTI, grupo que recebeu concomitantemente LL-FT e LL-FI. As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.8 DOSAGEM DE IGA FECAL

A IgA é a principal imunoglobulina da superfície de mucosas sendo considerada a primeira linha de defesa, controlando processos inflamatórios e preservando a integridade da barreira epitelial (Mathias et al., 2015; Zagato et al., 2016). Devido a sua funcionalidade, seus níveis no extrato fecal dos animais foram quantificados para

verificar a integridade da mucosa intestinal após o tratamento com pValac. Os animais que ingeriram DSS tiveram níveis mais elevados de IgA em relação ao grupo CN e, apesar de nenhuma significância estatística, apenas o grupo LL-FT teve seus níveis próximos aos dos animais não tratados (CN) (Figura 32).

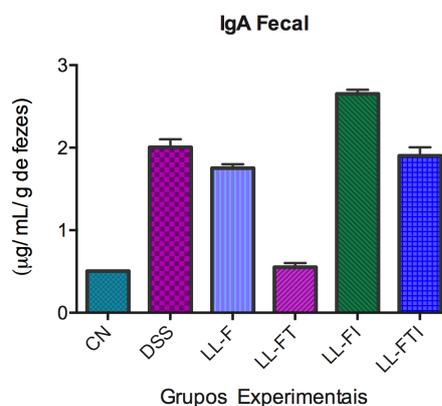


Figura 32. Quantificação de IgA fecal. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF*); LL-FI, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*IL1β*); e LL-FTI, grupo que recebeu concomitantemente LL-FT e LL-FI. As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney.

5.9 QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DE CITOCINAS

Por fim, o soro dos camundongos foi utilizado para quantificar IL-6, TNF e IL-10 e avaliar se LL-FT poderia alterar estas citocinas a nível sistêmico. Os níveis das 3 citocinas aumentaram no grupo DSS e diminuíram no grupo LL-FT (Figura 33). Entretanto, das 3 citocinas analisadas, apenas os níveis de TNF no grupo LL-FT foram menores significativamente em relação ao grupo DSS, sugerindo o retorno à homeostase após o tratamento com LL-FT. As comparações em todos os outros grupos não diferiram significativamente.

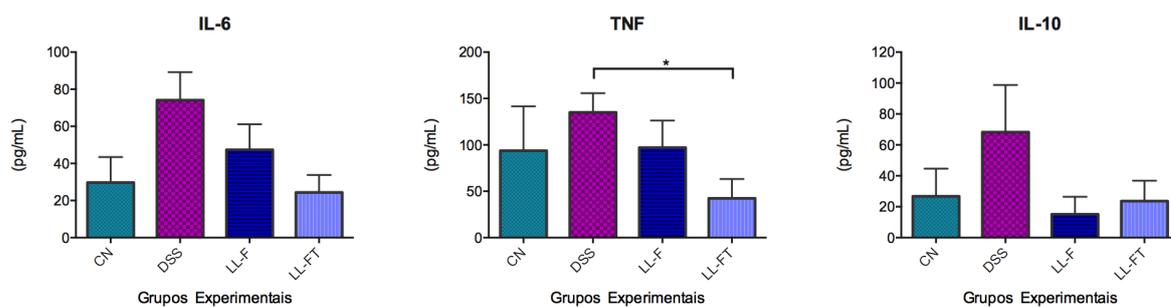


Figura 33. Quantificação Sérica de IL-6, TNF e IL-10. Grupos experimentais: CN, grupo controle negativo; DSS, grupo DSS 2%; LL-F, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ e LL-FT, grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF*). As barras representam as médias \pm EPM de cada grupo. A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

DISCUSSÃO



6. DISCUSSÃO

As IBDs, incluindo a colite ulcerativa e a doença de Crohn, são doenças com incidência global de 0,3% cuja característica é uma inflamação crônica do trato gastrointestinal (Ng et al., 2018; Podolsky, 2002). Apesar da etiologia de IBDs ser ainda idiopática, sabe-se que a patogênese é multifatorial, englobando predisposição genética, defeitos na barreira epitelial, resposta imune alterada e fatores ambientais (Ungaro et al., 2017).

A UC geralmente é acompanhada de sangramento retal e diarreia com ou sem muco. O diagnóstico é feito por achados histopatológicos e colonoscopia. UC classificada como leve a moderada é tratada principalmente com aminossalicilatos e esteroides, enquanto que a forma moderada a grave da doença é tratada com imunossupressores e imunobiológicos (Danese and Fiocchi, 2011; Ungaro et al., 2017).

Até o momento, TNF, a citocina pró-inflamatória mais potente, é o principal alvo das terapias para IBDs em humanos (Chassaing et al., 2014; Gubernatorova and Tumanov, 2016). Apesar da alta eficácia, não se sabe ao certo os mecanismos de ação dos mAbs neutralizantes e a administração, ainda via intravenosa, causa imunogenicidade e efeitos colaterais graves, oriundos da aplicação sistêmica de anti-TNF (Gubernatorova and Tumanov, 2016; Nielsen and Munck, 2007).

Portanto, neste trabalho, propusemos a entrega de um cassete de expressão da molécula de anti-TNF, na forma de *scFv*, diretamente no intestino para conferir benefícios aos pacientes, com o propósito de restringir a terapia somente no sítio da inflamação, sem atingir níveis sistêmicos de ação e, como consequência, minimizar os efeitos colaterais. Para que essa entrega ocorra *in loco*, utilizamos como veículo para atravessar todo o trato gastrointestinal e suportar as variações de pH, a bactéria *L. lactis*, uma bactéria láctica de classificação GRAS seguramente utilizada para esse *delivery* de proteínas. O uso de bactérias lácticas geneticamente modificadas para a produção de biofármacos (mAbs) pavimenta o caminho de novas rotas biotecnológicas de baixo custo para o tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias.

Além de anti-TNF, ainda testamos no mesmo modelo um *scFv* de anti-IL1 β , porque esta citocina altera as *tight junctions* e aumenta a permeabilidade intestinal, sendo provavelmente imprescindível na fase inicial da cascata inflamatória que leva à inflamação do cólon. Assim, avaliamos a produção *in loco* destas 2 moléculas de anticorpos e o papel biológico delas na colite ulcerativa em modelo animal. Apresentamos adiante os resultados alcançados.

A escolha de fragmentos de anticorpos no formato de *scFv* ao invés da molécula de tamanho completo se fez porque estas preservam a região variável do anticorpo, mantendo a especificidade enquanto conservam o sítio de ligação ao antígeno (Brigido et al., 1993). Além disso, uma molécula de menor tamanho possibilita uma melhor penetrabilidade e não demanda modificações pós-traducionais, como a glicosilação.

Para tanto, utilizamos o modelo de colite em camundongos da linhagem C57BL/6, visto que esse modelo apresenta níveis muito aumentados de TNF na inflamação intestinal, além de níveis elevados de IL-1 β na mucosa do cólon e em macrófagos peritoneais (Chassaing et al., 2014; Gubernatorova and Tumanov, 2016; Ki et al., 2005).

O modelo murino de colite aguda induzida quimicamente por DSS é o modelo experimental que melhor mimetiza características imunológicas e histopatológicas de UC em humanos (Chassaing et al., 2014), embora não simule totalmente a sua complexidade, e tem sido de grande utilidade na compreensão da fisiologia da inflamação intestinal. Uma vez que a resposta inflamatória aguda é independente de células B e T, esse modelo é utilizado não somente para estudar mecanismos da imunidade inata na inflamação intestinal como também para analisar a disfunção da barreira epitelial que ocorre na doença (Bauer et al., 2010; Wirtz et al., 2017). Além disso, seu uso, cada vez mais comum em grupos de pesquisa, tem sido uma ferramenta poderosa para avaliar intervenções de prevenção ou melhora da doença uma vez que esse modelo tem o potencial de fornecer informações essenciais sobre as interações entre o hospedeiro e as influências da imunidade inata, da microbiota intestinal e da dieta na homeostase gastrointestinal (Chassaing et al., 2014).

O DSS, geralmente utilizado na concentração de 2 a 5 %, é um polissacarídeo sulfatado altamente solúvel em água e seu potencial colitogênico depende da massa molecular. Geralmente, o DSS com massa molecular entre 36 kDa e 50 kDa é utilizado para a indução da colite, ao contrário da substância com massa molecular de 5 kDa, que induz uma colite muito branda e da substância com massa molecular de 500 kDa, que não induz danos teciduais ao cólon (Chassaing et al., 2014; Gubernatorova and Tumanov, 2016; Kitajima et al., 2000). Como o DSS é administrado aos animais por via oral, ocorre a morte das células epiteliais, que compromete a função da barreira intestinal e permite a penetração de bactérias comensais da microbiota intestinal, a indução da resposta imune com formação de úlceras, perda de células epiteliais e infiltrações com neutrófilos, assemelhando-se a UC humana (Gubernatorova and Tumanov, 2016; Okayasu et al., 1990; Wirtz et al., 2017).

Um possível mecanismo molecular para indução da colite com DSS seria que ele carrega uma carga altamente negativa devido à presença de grupamentos sulfato, o que confere alta toxicidade ao epitélio colônico e causa erosões, comprometendo a integridade da barreira e aumentando a permeabilidade epitelial. Ainda, por possuir propriedades anticoagulantes, o sangramento intestinal é agravado. Por motivos não esclarecidos, os danos causados pelo DSS são restritos ao intestino grosso, mais precisamente ao cólon distal, local com maior número de microrganismos (Chassaing et al., 2014). Ademais, achados recentes sugerem que o DSS se associa, no cólon, aos ácidos graxos de cadeia média que estão presentes em abundância nos alimentos e que estes complexos sejam absorvidos e metabolizados pelas células epiteliais. Após a lesão do epitélio com consequente integridade da barreira comprometida, as células imunes das mucosas e submucosas ficam expostas a antígenos do lúmen e microrganismos resultando em resposta inflamatória rápida e profunda (Laroui et al., 2012; Perse and Cerar, 2012; Wirtz et al., 2017; Yan et al., 2009).

Dessa forma, após a construção em *E. coli* dos plasmídeos construídos pValac::*anti-TNF* e pValac::*anti-IL1 β* , a funcionalidade do vetor pValac de entregar as ORFs codificadoras de *scFv* à células eucarióticas foi confirmada por meio de transfecção de HEK-293 e visualização dos fragmentos proteicos produzidos (tamanhos encontrados de 31 kDa e 30 kDa, respectivamente) a partir de imunodeteção. Assim, atestada a funcionalidade dos plasmídeos, a linhagem invasiva de *L. lactis* FnBPA+

foi transformada para que pudesse ser examinada a entrega no intestino de cassetes de DNA codificador de anti-TNF e de anti-IL1 β em modelo animal de colite, para identificar qual o efeito anti-inflamatório local e sistêmico derivado dessa produção de anticorpos.

Em virtude de estudos mostrarem que algumas linhagens de camundongos, como Balb/c por exemplo, são capazes de limitar e eliminar a inflamação no cólon causada pelo DSS enquanto que outras linhagens, como C57BL/6, não são capazes de reparar o processo inflamatório e progridem para a forma crônica da colite (Melgar, 2005; Perse and Cerar, 2012), a linhagem de camundongos escolhida foi a C57BL/6, mais sensível à inflamação intestinal por DSS e sem potencial de evolução para a cura espontânea (Wirtz et al., 2017).

Foram realizados 2 experimentos com animais para que o modelo de colite e de tratamento fossem padronizados, e um terceiro experimento, já com os critérios definidos. Baseado tanto nos dados adquiridos experimentalmente, quanto em revisões e atualizações da literatura, foram então padronizados os seguintes parâmetros: idade média dos camundongos de 10 semanas; necessidade de *cohousing* dos animais (para eliminação do efeito gaiola); concentração de DSS de 2%; tempo de administração de DSS de 8 dias; tempo de administração da bactéria de 4 dias; período de tratamento com a bactéria do 5° ao 8° dia (concomitantemente ao DSS); tempo total de experimento de 8 dias; dose bacteriana diária/ animal de $2,5 \times 10^9$ UFC; parte distal do cólon a ser utilizada para avaliação da inflamação intestinal e registro diário do peso, sangramento retal e classificação das fezes dos animais para certificação da indução da colite (perda de 10 a 20% do peso).

No experimento 3, o nosso protocolo desenvolvido foi capaz de reproduzir o modelo de colite por DSS, uma vez que os animais perderam peso, tiveram sangramento retal e fezes diarreicas. Mesmo os grupos tratados com LL-FT, LL-FI e LL-FTI não recuperaram o peso até o final do experimento. Provavelmente a incapacidade de recuperação do peso se deve ao fato da utilização de *L. lactis* contendo FnBPA, que é uma invasina inflamatória (Veloso et al., 2013) e que pode reduzir os efeitos benéficos exercidos pelos anticorpos produzidos *in loco*.

Os parâmetros macroscópicos investigados apresentaram melhora em alguns grupos, como descrito a seguir. O comprimento do cólon é um parâmetro que reflete a inflamação intestinal, ou seja, quanto mais encurtado o cólon, mais significa que ele está em processo inflamatório. Os únicos grupos que tiveram recuperação do tamanho foram os grupos LL-FT e LL-FTI, quando comparados com o grupo LL-F, indicando que o tratamento com pValac::*anti-TNF* e a associação deste com pValac::*anti-IL1 β* beneficiaram os animais, como observado na figura 27.

Estudos mostram que a partir de 1 dia de administração do DSS já ocorrem mudanças nas *tight junctions* com aumento da permeabilidade intestinal e aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF e IL-6 (Al-Sadi and Ma, 2007; Poritz et al., 2007; Yan et al., 2009). Também, dentro de 3 a 4 dias, camundongos altamente susceptíveis ao DSS já tem sangramento retal e perda de peso visíveis, que são associados com afinamento e encurtamento do cólon e aumento do baço (Chassaing et al., 2014).

Compatível com a literatura, nossas observações realizadas ao longo dos 8 dias de tratamento registraram 3 animais com sangramento retal. Três grupos com perda de peso foram registrados depois de 4 dias ingerindo DSS, e 6 animais tinham diarreia ou fezes amolecidas depois de 5 dias de DSS. Ademais, o DAI, que reflete estes sintomas de forma quantitativa, mostrou que somente os grupos LL-FT e LL-FTI tiveram melhora estatística, corroborando o mesmo resultado encontrado em relação a recuperação de tamanho do cólon, observado na figura 28.

No modelo de colite reproduzido por nós, o cólon dos animais não tratados (CN) se apresentou de aspecto saudável com toda a arquitetura histológica preservada à medida que a análise microscópica, assim como o *score* histopatológico, retratou os danos histológicos observados nos animais dos grupos controle da colite (DSS e LL-F) os quais tiveram características de inflamação induzida por DSS em murinos, caracterizada pelo surgimento de erosões no epitélio e ulcerações, formação de abscesso de criptas, perda da camada de muco devido a depleção de mucina e de células de *goblet*, padrões estes que foram ao encontro das características microscópicas descritas por Chassaing *et al.* (Chassaing et al., 2014).

Ainda, por meio do *score* histopatológico, pode-se afirmar que somente o grupo LL-FT teve melhora da inflamação com diminuição do *score* e significância estatística em relação aos grupos de controle da colite (DSS e LL-F), podendo-se inferir que estes animais que receberam pValac::*anti-TNF* tiveram benefícios na recuperação da colite, assim como foi mostrado no comprimento do cólon e no DAI.

Entretanto, o grupo LL-FI não obteve qualquer melhora, nem nos parâmetros macroscópicos e de comprimento do cólon e nem na análise microscópica da inflamação, ocorrendo o oposto do que era esperado. Também, apesar do grupo LL-FTI ter tido melhora significativa no comprimento do cólon e no DAI, não apresentou melhora da inflamação a nível tecidual, quando verificado o *score* histológico.

Para acompanhar o padrão de inflamação induzido pelo DSS e a melhora esperada do tratamento com anti-TNF e anti-IL1 β , os níveis de proteína-c reativa foram quantificados a partir do soro dos animais. Como a proteína-c é um marcador de inflamação de mucosa, produzido em reações de fase aguda, quanto mais branda a inflamação, mais baixa ela se encontra (Sproston and Ashworth, 2018). Um trabalho recentemente publicado mostrou em pacientes uma associação entre níveis séricos de proteína-c reativa e IL-6 e o risco de incidência de UC e CD (Lochhead et al., 2016). Nos nossos resultados, mais uma vez, o único grupo que teve melhora desse marcador e diferença estatística foi o LL-FT. Curiosamente, os grupos LL-FI e LL-FTI tiveram níveis altos da proteína-c reativa, mais altos do que os próprios grupos de controle da colite, que eram o DSS e o LL-F. Possivelmente, a presença de anti-TNF no intestino alterou de alguma forma o ambiente e induziu a reversão da colite nestes animais.

O DSS rompe a barreira epitelial intestinal e permite a penetração de bactérias da microbiota na mucosa lesionada, induzindo a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (Eichele and Kharbanda, 2017). Devido a este processo inflamatório, foram analisados, no tecido colônico, transcritos de RNA codificadores de citocinas e de fatores de transcrição associados a resposta imune, bem como a concentração de citocinas séricas, para verificar as alterações causadas pelo DSS e pela administração de *L. lactis* carregando pValac::*anti-TNF* e pValac::*anti-IL1 β* .

No nosso modelo, os níveis de mRNA de IL-6, TNF e IL-1 β aumentaram com a inflamação por DSS, conforme esperado, uma vez que níveis elevados destas 3 citocinas são detectados na IBD ativa e estão relacionados com a gravidade da doença (Geremia et al., 2014; Ishiguro, 1999; Sartor, 1994). Após o tratamento, o grupo LL-FT teve os níveis de IL-6, TNF e IL-1 β menores em comparação os grupos controle da colite (DSS e LL-F), assemelhando-se aos níveis de mRNAs do controle saudável (CN). Entretanto, o grupo LL-FI não apresentou redução dos níveis de mRNA de nenhuma destas 3 citocinas. Já o grupo LL-FTI teve diminuição nos níveis de mRNA de IL-6 quando comparado com o grupo DSS, mas não apresentou redução estatisticamente significativa nos níveis de mRNA de TNF e IL-1 β .

Os transcritos da citocina pró-inflamatória IL-17A aumentaram mais de 8 vezes no grupo DSS e quase 8 vezes no grupo LL-F, indicando que no modelo de colite, a resposta imune foi direcionada para o tipo Th17. Por outro lado, os níveis de IL-17A voltaram ao normal nos grupos tratados com LL-FT e LL-FTI. Esses resultados corroboram o padrão encontrado na literatura, em que as respostas Th17-Treg são importantes na prevenção do desenvolvimento da colite (Yang et al., 2017). Contudo, os níveis de mRNA de ROR γ τ , um fator de transcrição associado a diferenciação de células Th17, não aumentaram significativamente em nenhum dos grupos que ingeriu DSS.

As células T regulatórias suprimem as funções pró-inflamatórias dos macrófagos de mucosa e de células T efetoras ao expressarem TGF β e IL-10 (Neurath, 2014). Apesar dos transcritos de TGF β não terem tido alterações importantes, os níveis de mRNA de IL-10 aumentaram consideravelmente nos grupos controle da colite (DSS e LL-F) e diminuíram nos grupos LL-FT e LL-FTI, sugerindo o aparecimento de uma resposta regulatória após a agressão com DSS que diminui com a supressão do quadro inflamatório. Assim como IL-10, os níveis de mRNA de Foxp3, o principal fator de transcrição de células T regulatórias de mucosa, retornaram aos níveis saudáveis nos três grupos que receberam o tratamento com pValac. A análise conjunta dos dados sugere um papel fundamental que as células T regulatórias exerceram na tentativa de suprimir a inflamação da colite. Reforçando este conceito de regulação, diversos autores descreveram o papel das células T regulatórias de estarem potencialmente envolvidas na reação que a inflamação provoca com o estímulo da colite, pois este

subgrupo de células T possui ação fundamental na manutenção da homeostase e tolerância da mucosa intestinal ao suprimir uma resposta imune anormal contra a microbiota e antígenos da dieta alimentar (Bersudsky et al., 2014; Geremia et al., 2014; Mayne and Williams, 2013; Yang et al., 2017).

T-bet, um fator transcricional T-box fundamental da resposta Th1 (Garrett and Glimcher, 2009), e STAT-1, um fator de transcrição citoplasmático que regula a polarização da resposta imune para Th1 na fase inicial de diferenciação de células T (Mudter et al., 2005), não aumentaram em nenhum dos grupos do experimento em relação ao grupo CN. Pelo contrário, a expressão relativa dos 2 fatores de transcrição foi menor do que a do grupo CN, o que permite afirmar que a colite induzida quimicamente no nosso modelo não desenvolveu uma resposta do tipo Th1, resposta esta que é característica da doença de Crohn (Neurath, 2014).

Muitos mediadores inflamatórios são expressos nas IBDs em humanos, como citocinas, eicosanoides, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. De forma semelhante, a colite induzida por DSS também está associada com a superregulação de citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) (Perse and Cerar, 2012).

Os níveis dos transcritos de iNOS, um mediador pró-inflamatório cujos níveis aumentados causam efeitos deletérios na função intestinal (Camuesco et al., 2004), diminuíram somente no grupo LL-FT em relação aos grupos controle da colite (DSS e LL-F). Assim, este resultado da diminuição significativa nos transcritos de iNOS no grupo LL-FT corroboraram a descrição de Gobert et al., que mostraram que os sintomas da colite por DSS melhoraram em camundongos iNOS^{-/-} (Gobert et al., 2004), o que sugere, de fato, que o tratamento exerceu efeitos benéficos aos animais doentes com colite.

A arginase, uma enzima que tem efeito biológico na resposta imune e é relacionada a macrófagos anti-inflamatórios do tipo M2 (Gobert et al., 2004), também aumentou quando os animais foram expostos ao DSS e diminuiu significativamente nos grupos tratados com pValac. A associação de aumento de arginase e aumento de IL-10 sugere que há o acúmulo de macrófagos M2 no tecido colônico com colite induzida por DSS (Lin et al., 2014) e a diminuição destes marcadores após o tratamento com

LL-FT levou à resolução da inflamação tecidual, indicando benefícios do tratamento testado.

Outro transcrito analisado foi da citocina pró-inflamatória IL-22, produzida principalmente por células Th17, que induz o aumento da produção de peptídeos antimicrobianos pelas células epiteliais e a produção de mucinas, componentes importantes na defesa da mucosa intestinal (Gubernatorova and Tumanov, 2016; Lochner et al., 2008). Neste trabalho, todos os grupos de animais que ingeriram DSS e foram submetidos ou não ao tratamento com pValac, tiveram os níveis de IL-22 aumentados em relação ao grupo CN. Mesmo nos animais tratados, os níveis de IL-22 continuaram elevados.

Sugimoto *et al.* mostraram que IL-22 contribui para a restauração do muco produzido pelas células de Goblet e atenuação rápida da inflamação local associada a colite mediada por Th2 (Sugimoto et al., 2008). MUC-3 é uma proteína responsável pela produção de mucina transmembrana e consequente formação de uma camada protetora de muco intestinal, sendo considerado como um marcador de função de barreira epitelial (Garrido-Mesa et al., 2015). No trabalho de Garrido-Mesa *et al.*, seus transcritos se apresentaram elevados durante a recuperação de lesões intestinais oriundas de colite aguda (Garrido-Mesa et al., 2015). Nos nossos resultados, a expressão de mRNA de MUC-3 se mostrou reduzida em todos os grupos com colite e não teve aumento nos grupos tratados (LL-FT, LL-FI ou LL-FTI), o que sugere um possível dano tecidual ainda existente.

Para manutenção da homeostase do TGI, além da camada protetora de muco, a imunoglobulina IgA também merece atenção, uma vez que é o anticorpo da primeira linha de defesa das mucosas e constitui um marcador efetivo de inflamação na microbiota e de controle da microbiota (Corthésy, 2013; Macpherson et al., 2018). No presente trabalho, o próximo passo foi quantificar IgA no extrato fecal de cada grupo de camundongos, no final do tratamento, mas os dados encontrados não mostraram diferenças estatísticas entre os grupos. Nem mesmo o grupo LL-FT teve um aumento significativo na concentração de IgA fecal. Apesar da falta de diferença estatística, os grupos DSS e LL-F tiveram maiores concentrações de IgA em comparação aos grupos CN e os que receberam pValac. Provavelmente, este pequeno aumento de IgA nas fezes reflita a atividade da doença, visto que a imunoglobulina pode ter extravasado

do plasma devido ao dano tecidual induzido pelo DSS e, por isso, aumentado nas fezes. Estes resultados corroboram os resultados de Gomes-Santos *et al.*, em que eles utilizaram *L. lactis* no modelo de colite por DSS e também não encontrou diferenças estatísticas na quantificação de IgA de lavado intestinal (Gomes-Santos *et al.*, 2017). Ainda, com relação a quantificação de IgA diretamente das fezes ou a partir de lavado intestinal, é importante ressaltar que não é possível a determinação de IgA secretório e, erroneamente, Zurita *et al.* publicaram dados de medição de IgA secretório, quando, de fato, foram medidos IgA do fluido intestinal (Zurita-Turk *et al.*, 2014).

As células T e suas citocinas secretadas são os principais contribuintes na indução e na manutenção da inflamação intestinal (Hundorfean *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2017). Baseado nesta assertiva, foram realizadas dosagens séricas de citocinas e seus resultados corroboraram os níveis intestinais de mRNA. Apesar de não ter sido encontrado diferença estatística nas análises, o fenômeno biológico, de produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, foi reproduzido no nosso modelo experimental.

A redução de TNF em níveis sistêmicos observada nas análises de citocinas no soro dos animais ocorreu, possivelmente, como uma consequência da resolução local da inflamação que refletiu na diminuição da produção sistêmica desta citocina.

Durante o desenho experimental, a escolha dos anticorpos foi criteriosa no sentido de utilizar anticorpos que agiam tanto em humanos quanto em camundongos. No entanto, vale destacar um estudo recente que sugeriu que o infliximabe não se liga diretamente ao TNF murino, mesmo que apresente efeitos anti-inflamatórios (Assas *et al.*, 2017). Estes dados contestam o mecanismo em modelo animal atualmente aceito de que o infliximabe neutralize a molécula de TNF (Bhol *et al.*, 2013; Vandenbroucke *et al.*, 2010). Apesar de dados controversos na literatura, é fato que comprovamos que o anti-TNF agiu diminuindo a citocina bem como seus níveis de mRNA e que, conseqüentemente, melhorou a severidade da colite de forma significativa. É provável que a presença do anticorpo anti-TNF no cólon tenha sido capaz de alterar o sítio intestinal de maneira que tenha induzido a cura dos animais do grupo LL-FT.

Quando nos baseamos em dados da literatura, esperávamos que o anti-IL1 β proporcionaria também melhora da colite diminuindo a inflamação localmente. Entretanto, ao contrário do que era aguardado, resultados de agravamento da doença foram encontrados ao testar a molécula de anti-IL1 β nos animais. Ao se utilizar o anticorpo no modelo de inflamação com DSS, os sinais macroscópicos da colite se agravaram ainda mais, bem como houve piora no *score* microscópico da doença. Ainda, os marcadores moleculares também indicaram piora da doença, como por exemplo, a detecção de altos níveis de IL-6 e de TNF nos animais que receberam o anti-IL1 β (grupo LL-FI).

Coerentemente com nossos resultados referentes ao tratamento com anti-IL1 β , dados publicados mostraram que a neutralização de IL-1 na colite aguda piorou os sintomas, sugerindo que IL-1 possa ter um efeito protetor na fase aguda, efeito estes explicado pelas suas propriedades pleiotrópicas de estar envolvido tanto na inflamação quanto na regeneração do epitélio intestinal (Kojouharoff et al., 1997). Em outro trabalho, Bersudsky *et al.* induziram colite por DSS em camundongos IL-1 $\alpha^{-/-}$ e em camundongos IL-1 $\beta^{-/-}$ e viram que a deficiência de IL-1 α está relacionada com a forma branda da doença e aumento do reparo tecidual, ao passo que a deficiência de IL-1 β está relacionada com a forma grave da doença sem reparo tecidual. Ainda neste trabalho, foi salientado o papel de IL-1 α das células epiteliais intestinais como o principal indutor da inflamação na colite por DSS, enquanto que a função dominante de IL-1 β está no processo de reparação da barreira epitelial intestinal. Além disso, a deficiência de IL-1 β resultou em prejuízos no reparo tecidual devido ao aumento da permeabilidade do cólon, diminuição da proliferação de células epiteliais e defeitos nas proteínas das *tight junctions*. Concluiu-se, portanto, que embora IL-1 β possa contribuir para a inflamação, seu efeito dominante na colite é participar do processo de reparo e cura durante a fase de resolução da colite e que sua deficiência está correlacionada com a exacerbação da doença (Bersudsky et al., 2014).

Por fim, os resultados encontrados nos animais que foram tratados com a associação de anti-TNF e anti-IL1 β não refletiram melhora relevante da doença. Ao se observar os dados analisados, é importante frisar que, de forma geral, houve melhora nos sinais da colite nesses animais em relação aos grupos controle DSS e LL-F, porém sem significância estatística. Provavelmente, a pequena redução dos marcadores

inflamatórios ocorreu devido ao efeito do anti-TNF, uma vez que vimos no grupo que foi tratado somente com LL-FI que o anti-IL1 β não melhorou os marcadores moleculares de inflamação.

De maneira a complementar a discussão deste trabalho, muito estudos publicados relacionam a UC com uma inflamação mediada pela resposta imune Th2, pois os mediadores desse perfil de resposta, marcados por infiltrados celulares mais superficiais e associados com maior dano à camada epitelial, são parecidos com UC. Porém, esta é uma correlação imprecisa, porque UC não tem um perfil Th2 bem definido e exato. Portanto, se Th2 está presente em UC, é uma inflamação Th2 totalmente atípica (Strober et al., 2002). Esta indefinição se deve ao fato que IL-5 apresenta-se aumentada em colite, porém IL-4 se mantém com níveis diminuídos, e ambas são relacionadas a resposta Th2, por isso seria uma inflamação Th2 atípica (Neurath, 2014).

É interessante ressaltar que a administração de *L. lactis* ao camundongos, por si só, não induziu a cura da colite, e que, de fato, a produção de anti-TNF no intestino foi fundamental para recuperação dos animais, visto que a produção de anti-IL1 β ocasionou o agravamento da doença, servindo assim, como uma contraprova do experimento.

CONCLUSÃO



7. CONCLUSÃO

Por meio deste trabalho, utilizamos técnicas de clonagem molecular para construção de dois plasmídeos, o pValac::anti-TNF e o pValac::anti-IL1 β . Com o imunoensaio de *western blot*, foi possível a detecção dos dois fragmentos de anticorpos produzidos por células eucarióticas a partir da transfecção de um cultivo celular, o que nos permitiu afirmar que as ORFs inseridas no pValac foram transcritas e traduzidas no núcleo celular e transportadas para o meio extracelular, permitindo sua detecção e funcionalidade.

Uma vez concluída etapa inicial *in vitro*, foi avaliado o efeito terapêutico tanto de anti-TNF quanto de anti-IL1 β em modelo animal de colite quimicamente induzida por DSS. Assim, foi possível detectar que a linhagem *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::anti-TNF) exerceu efeitos benéficos ao induzir a recuperação da doença em camundongos testados, tanto a nível local quando a nível sistêmico da inflamação. Por meio dos ensaios moleculares, imunológicos e bioquímicos, foi permitido afirmar que a presença *in loco* da supracitada linhagem bacteriana tem potencial para possível cura da colite em animais.

Terapias anti-TNF estão sendo cada vez mais utilizadas no tratamento de IBDs em humanos, o que acarreta também elevados custos aos serviços de saúde e diminuição da qualidade de vida dos pacientes, que sofrem recorrentes efeitos colaterais importantes decorrentes do uso sistêmico destes bloqueadores de anti-TNF. Por isso, estratégias baseadas na entrega a nível de mucosa por *L. lactis*, que é resistente às grandes variações de pH do trato gastrointestinal, é a melhor forma para produção de anticorpos terapêuticos diretamente no intestino destes pacientes.

Vandenbroucke *et al.* reportaram o uso de anti-TNF no formato de *nanobodies* secretados por *L. lactis* no modelo de colite induzida por DSS em camundongos IL-10^{-/-}, e observaram a resolução do processo inflamatório da doença. No trabalho, foi utilizado um sistema de secreção pela bactéria do fragmento de anticorpo derivado do domínio único de camelídeos. Esse sistema foi baseado na produção heterólogas do anticorpo no formato *scFv* diretamente no epitélio intestinal dos animais

(Vandenbroucke et al., 2010). Portanto, a produção de anti-TNF foi restrita ao ambiente intestinal com foco na intervenção terapêutica.

Assim, nós propusemos um sistema de entrega por bactéria láctica que pode representar uma alternativa para terapia com anticorpos orais, já que nosso sistema utiliza uma rota não invasiva de transportar biofármacos para o local da inflamação. Portanto, *L. lactis* geneticamente modificado carreando um plasmídeo de expressão eucariótica de anti-TNF pelos enterócitos intestinais pode, no futuro, se tornar uma alternativa para o tratamento das IBDs.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

AAVV. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Fao Who 2001. doi:10.1201/9781420009613.ch16.

Afif W, Loftus E V., Faubion WA, Kane S V., Bruining DH, Hanson KA, et al. Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2010. doi:10.1038/ajg.2010.9.

Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 2012. doi:10.1182/blood-2011-04-325225.

Al-Sadi RM, Ma TY. IL-1 Causes an Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability. *J Immunol* 2007;178:4641–9. doi:10.4049/jimmunol.178.7.4641.

Assas BM, Levison SE, Little M, England H, Battrick L, Bagnall J, et al. Anti-inflammatory effects of infliximab in mice are independent of tumour necrosis factor α neutralization. *Clin Exp Immunol* 2017. doi:10.1111/cei.12872.

Aubry C, Michon C, Chain F, Chvatchenko Y, Goffin L, Zimmerli SC, et al. Protective effect of TSLP delivered at the gut mucosa level by recombinant lactic acid bacteria in DSS - induced colitis mouse model. *Microb Cell Fact* 2015:1–10. doi:10.1186/s12934-015-0367-5.

Azevedo V, Miyoshi A. Novas utilizações Biotecnológicas e terapêuticas das Bactérias do Ácido Lático. *Genômica*, Sao Paulo: Editora Atheneu; 2004, p. 801–18.

Baert F, Noman M, Vermeire S, Van Assche G, D'Haens G, Carbonez A, et al. Influence of Immunogenicity on the Long-Term Efficacy of Infliximab in Crohn's Disease. *N Engl J Med* 2003. doi:10.1056/NEJMoa020888.

Bahey-EI-Din M, Gahan CG. *Lactococcus lactis*: From the Dairy Industry to Antigen and Therapeutic Protein Delivery. *Discov Med* 2010.

Bauer C, Duewell P, Mayer C, Lehr HA, Fitzgerald KA, Dauer M, et al. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut* 2010. doi:10.1136/gut.2009.197822.

- Berlec A, Perše M, Ravnikar M, Lunder M, Erman A, Cerar A, et al. Dextran sulphate sodium colitis in C57BL/6J mice is alleviated by *Lactococcus lactis* and worsened by the neutralization of Tumor necrosis Factor α . *Int Immunopharmacol* 2017;43:219–26. doi:10.1016/j.intimp.2016.12.027.
- Bernstein CN, Wajda A, Blanchard JF. The clustering of other chronic inflammatory diseases in inflammatory bowel disease: A population-based study. *Gastroenterology* 2005. doi:10.1053/j.gastro.2005.06.021.
- Bersudsky M, Luski L, Fishman D, White RM, Ziv-Sokolovskaya N, Dotan S, et al. Non-redundant properties of IL-1 α and IL-1 β during acute colon inflammation in mice. *Gut* 2014. doi:10.1136/gutjnl-2012-303329.
- Bhol KC, Tracey DE, Lemos BR, Lyng GD, Erlich EC, Keane DM, et al. AVX-470: A novel oral Anti-TNF antibody with therapeutic potential in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013. doi:10.1097/MIB.0b013e3182a11958.
- Brigido MM, Polymenis M, Stollar BD. Role of mouse VH10 and VL gene segments in the specific binding of antibody to Z-DNA, analyzed with recombinant single chain Fv molecules. *J Immunol* 1993.
- Bugelski PJ, Achuthanandam R, Capocasale RJ, Treacy G, Bouman-Thio E. Monoclonal antibody-induced cytokine-release syndrome. *Expert Rev Clin Immunol* 2009. doi:10.1586/eci.09.31.
- Butts B, Gary RA, Dunbar SB, Butler J. The Importance of NLRP3 Inflammasome in Heart Failure. *J Card Fail* 2015. doi:10.1016/j.cardfail.2015.04.014.
- Camuesco D, Comalada M, Rodríguez-Cabezas ME, Nieto A, Lorente MD, Concha A, et al. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol* 2004;143:908–18. doi:10.1038/sj.bjp.0705941.
- del Carmen S, Martín Rosique R, Saraiva T, Zurita-Turk M, Miyoshi A, Azevedo V, et al. Protective Effects of Lactococci Strains Delivering Either IL-10 Protein or cDNA in a TNBS-induced Chronic Colitis Model. *J Clin Gastroenterol* 2014;48:S12–7. doi:10.1097/MCG.0000000000000235.
- Del Carmen S, Zurita-Turk M, Alvarenga Lima F, Coelho Dos Santos JS, Leclercq SY, Chatel JM, et al. A novel interleukin-10 DNA mucosal delivery system attenuates intestinal inflammation in a mouse model. *Eur J Inflamm* 2013.

doi:10.1177/1721727X1301100308.

Carr FJ, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit Rev Microbiol* 2002;28:281–370. doi:10.1080/1040-840291046759.

Casellas F, Borruel N, Papo M, Guarner F, Antolín M, Videla S, et al. Antiinflammatory effects of enterically coated amoxicillin-clavulanic acid in active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 1998. doi:10.1097/00054725-199802000-00001.

Chan AC, Carter PJ. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010. doi:10.1038/nri2761.

Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol* 2014. doi:10.1002/0471142735.im1525s104.

Chatel JM, Pothelune L, Ah-Leung S, Corthier G, Wal JM, Langella P. In vivo transfer of plasmid from food-grade transiting lactococci to murine epithelial cells. *Gene Ther* 2008;15:1184–90. doi:10.1038/gt.2008.59.

Chaves S, Perdigon G, de Moreno de LeBlanc A. Yoghurt Consumption Regulates the Immune Cells Implicated in Acute Intestinal Inflammation and Prevents the Recurrence of the Inflammatory Process in a Mouse Model. *J Food Prot* 2011;74:801–11. doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-375.

Chen GY, Nez G. Inflammasomes in intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* 2011. doi:10.1053/j.gastro.2011.10.002.

Cook DP, Gysemans C, Mathieu C. *Lactococcus lactis* as a versatile vehicle for tolerogenic immunotherapy. *Front Immunol* 2018. doi:10.3389/fimmu.2017.01961.

Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993;69:238–49. doi:doi:PubMed PMID: 8350599.

Corthésy B. Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Front Immunol* 2013. doi:10.3389/fimmu.2013.00185.

Coskun M, Nielsen OH. Tumor necrosis factor inhibitors for inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2013;369:2561–2. doi:10.1056/NEJMc1312800.

Courvalin P, Goussard S, Grillot-Courvalin C. Gene transfer from bacteria to mammalian cells. *C R Acad Sci III* 1995.

- Croft M, Benedict CA, Ware CF. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nat Rev Drug Discov* 2013. doi:10.1038/nrd3930.
- Da Cunha AP, Weiner HL. Induction of immunological tolerance by oral anti-CD3. *Clin Dev Immunol* 2012. doi:10.1155/2012/425021.
- Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2011. doi:10.1056/NEJMra1102942.
- De-Souza MT, Brígido MM, Maranhão AQ. *Técnicas Básicas em Biologia Molecular*. 2a edição. 2016.
- Dhimolea E. Canakinumab. *MAbs* 2010;2:3–13.
- Dieterich W, Schink M, Zopf Y. Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Med Sci* 2018;6:116. doi:10.3390/medsci6040116.
- Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996. doi:10.1007/s007830050018.The.
- Dreesen E, Van Stappen T, Ballet V, Peeters M, Compennolle G, Tops S, et al. Anti-infliximab antibody concentrations can guide treatment intensification in patients with Crohn's disease who lose clinical response. *Aliment Pharmacol Ther* 2018. doi:10.1111/apt.14452.
- Eichele DD, Kharbanda KK. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2017. doi:10.3748/wjg.v23.i33.6016.
- FAO/WHO. Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live actic acid bacteria. 2001.
- Faria AMC, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev* 2005. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00280.x.
- Field J, Nikawa J, Broek D, MacDonald B, Rodgers L, Wilson IA, et al. Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol* 1988;8:2159–65. doi:10.1128/MCB.8.5.2159.
- Garrett WS, Glimcher LH. T-bet^{-/-} RAG2^{-/-} ulcerative colitis: The role of T-bet as a peacekeeper of host-commensal relationships. *Cytokine* 2009. doi:10.1016/j.cyto.2009.07.007.

- Garrido-Mesa J, Algieri F, Rodriguez-Nogales A, Utrilla MP, Rodriguez-Cabezas ME, Zarzuelo A, et al. A new therapeutic association to manage relapsing experimental colitis: Doxycycline plus *Saccharomyces boulardii*. *Pharmacol Res* 2015. doi:10.1016/j.phrs.2015.04.005.
- Gasson MJ. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J Bacteriol* 1983;154:1–9. doi:10.11.625.2641.
- Geiler J, McDermott MF. Gevokizumab, an anti-IL-1 β mAb for the potential treatment of type 1 and 2 diabetes, rheumatoid arthritis and cardiovascular disease. *Curr Opin Mol Ther* 2010.
- Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev* 2014. doi:10.1016/j.autrev.2013.06.004.
- Gobert AP, Cheng Y, Akhtar M, Mersey BD, Blumberg DR, Cross RK, et al. Protective role of arginase in a mouse model of colitis. *J Immunol* 2004;173:2109–17. doi:10.4049/jimmunol.173.3.2109.
- Gomes-Santos AC, de Oliveira RP, Moreira TG, Castro-Junior AB, Horta BC, Lemos L, et al. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents inflammatory intestinal disease in mice by IL-10- and TLR2-dependent pathways. *Front Immunol* 2017;8:1–12. doi:10.3389/fimmu.2017.00030.
- Grishman EK, White PC, Savani RC. Toll-like receptors, the NLRP3 inflammasome, and interleukin-1 β in the development and progression of type 1 diabetes. *Pediatr Res* 2012. doi:10.1038/pr.2012.24.
- Gubernatorova EO, Tumanov A V. Tumor necrosis factor and lymphotoxin in regulation of intestinal inflammation. *Biochem* 2016;81:1309–25. doi:10.1134/S0006297916110092.
- van de Guchte M, Kok J, Venema G. Gene expression in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Rev* 1992. doi:10.1016/0378-1097(92)90685-H.
- Guimarães V, Innocentin S, Chatel JM, Lefèvre F, Langella P, Azevedo V, et al. A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. *Genet Vaccines Ther* 2009;7:1–7. doi:10.1186/1479-0556-7-4.

- Haens GRD, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early Lesions of Recurrent Crohn ' s Disease Caused by Infusion. *Gastroenterology* 1998. doi:10.1016/S0016-5085(98)70476-7.
- Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 2006. doi:10.1097/01.MIB.0000195385.19268.68.
- Herzyk DJ, Berger AE, Allen JN, Wewers MD. Sandwich ELISA formats designed to detect 17 kDa IL-1 β significantly underestimate 35 kDa IL-1 β . *J Immunol Methods* 1992. doi:10.1016/0022-1759(92)90178-V.
- Hundorfean G, Neurath MF, Mudter J. Functional relevance of T helper 17 (Th17) cells and the IL-17 cytokine family in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012. doi:10.1002/ibd.21677.
- Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 2000. doi:10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H.
- Innocentin S, Guimarães V, Miyoshi A, Azevedo V, Langella P, Chatel JM, et al. *Lactococcus lactis* expressing either *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A or *Listeria monocytogenes* internalin A can efficiently internalize and deliver DNA in human epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:4870–8. doi:10.1128/AEM.00825-09.
- Ishiguro Y. Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1999. doi:10.1007/s005350050218.
- Issafras H, Corbin JA, Goldfine ID, Roell MK. Detailed Mechanistic Analysis of Gevokizumab, an Allosteric Anti-IL-1 Antibody with Differential Receptor-Modulating Properties. *J Pharmacol Exp Ther* 2013. doi:10.1124/jpet.113.205443.
- Kamada N, Núñez G. Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria. *Gastroenterology* 2014. doi:10.1053/j.gastro.2014.01.060.
- Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2018. *MAbs* 2018a;10:183–203. doi:10.1080/19420862.2018.1415671.
- Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2019. *MAbs* 2018b:1–20. doi:10.1080/19420862.2018.1556465.

- Katsanos KH, Papadakis KA. Inflammatory bowel disease: Updates on molecular targets for biologics. *Gut Liver* 2017. doi:10.5009/gnl16308.
- Kelley B. Industrialization of mAb production technology: The bioprocessing industry at a crossroads. *MAbs* 2009. doi:10.4161/mabs.1.5.9448.
- Ki HK, Murakami A, Hayashi R, Ohigashi H. Interleukin-1 β targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005. doi:10.1016/j.bbrc.2005.09.107.
- Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Histological Analysis of Murine Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium of Different Molecular Weights. *Exp Anim* 2000. doi:doi.org/10.1538/expanim.49.9.
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975. doi:10.1038/256495a0.
- Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, Männel DN, Andus T, Schölmerich J, et al. Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1997;107:353–8. doi:10.1111/j.1365-2249.1997.291-ce1184.x.
- Kuhbacher T, Fölsch UR. Practical guidelines for the treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007;13:1149–55.
- Laroui H, Ingersoll SA, Liu HC, Baker MT, Ayyadurai S, Charania MA, et al. Dextran sodium sulfate (dss) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. *PLoS One* 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0032084.
- Li X, Conklin L, Alex P. New serological biomarkers of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:5115–24. doi:10.3748/wjg.14.5115.
- Ligumsky M, Simon PL, Karmeli F, Rachmilewitz D. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease -- enhanced production during active disease. *Gut* 1990. doi:10.1136/gut.31.6.686.
- Lin Y, Yang X, Yue W, Xu X, Li B, Zou L, et al. Chemerin aggravates DSS-induced colitis by suppressing M2 macrophage polarization. *Cell Mol Immunol* 2014;11:355–66. doi:10.1038/cmi.2014.15.
- Linares DM, Kok J, Poolman B. Genome sequences of *Lactococcus lactis* MG1363

- (revised) and NZ9000 and comparative physiological studies. *J Bacteriol* 2010. doi:10.1128/JB.00533-10.
- Lochhead P, Khalili H, Ananthakrishnan AN, Richter JM, Chan AT. Association Between Circulating Levels of C-Reactive Protein and Interleukin-6 and Risk of Inflammatory Bowel Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016. doi:10.1016/j.cgh.2016.01.016.
- Lochner M, Peduto L, Cherrier M, Sawa S, Langa F, Varona R, et al. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma+ T cells. *J Exp Med* 2008. doi:10.1084/jem.20080034.
- Le Loir Y, Nouaille S, Commissaire J, Brétigny L, Gruss A, Langella P. Signal Peptide and Propeptide Optimization for Heterologous Protein Secretion in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 2001. doi:10.1128/AEM.67.9.4119-4127.2001.
- Luerce TD, Gomes-Santos AC, Rocha CS, Moreira TG, Cruz DN, Lemos L, et al. Anti-inflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. *Gut Pathog* 2014. doi:10.1186/1757-4749-6-33.
- Macpherson AJ, Yilmaz B, Limenitakis JP, Ganai-Vonarburg SC. IgA Function in Relation to the Intestinal Microbiota. *Annu Rev Immunol* 2018;36:annurev-immunol-042617-053238. doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053238.
- Manichanh C, Borrueal N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012. doi:10.1038/nrgastro.2012.152.
- Marteau P. Living drugs for gastrointestinal diseases: The case for probiotics. *Dig Dis* 2006;24:137–47. doi:10.1159/000090317.
- Martin A, Tisch RM, Getts DR. Manipulating T cell-mediated pathology: Targets and functions of monoclonal antibody immunotherapy. *Clin Immunol* 2013. doi:10.1016/j.clim.2013.04.011.
- Martín R, Miquel S, Ulmer J, Kechaou N, Langella P, Bermúdez-Humarán LG. Role of commensal and probiotic bacteria in human health: A focus on inflammatory bowel disease. *Microb Cell Fact* 2013a;12:1–11. doi:10.1186/1475-2859-12-71.
- Martín R, Miquel S, Ulmer J, Kechaou N, Langella P, Bermúdez-Humarán LG. Role of commensal and probiotic bacteria in human health: A focus on inflammatory bowel disease. *Microb Cell Fact* 2013b. doi:10.1186/1475-2859-12-71.

- Mathias A, Pais B, Favre L, Benyacoub J, Corthösy B. Role of secretory IgA in the mucosal sensing of commensal bacteria. *Gut Microbes* 2015;5:688–95. doi:10.4161/19490976.2014.983763.
- Mayne CG, Williams CB. Induced and natural regulatory T cells in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013. doi:10.1097/MIB.0b013e318281f5a3.
- Melgar S. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *AJP Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G1328–38. doi:10.1152/ajpgi.00467.2004.
- Méndez-Vilas A, Pereira MO. Microbial pathogens and strategies for combating them science, technology and education. 2013.
- Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012. doi:10.1053/j.gastro.2011.10.001.
- Monaco C, Nanchahal J, Taylor P, Feldmann M. Anti-TNF therapy: Past, present and future. *Int Immunol* 2015. doi:10.1093/intimm/dxu102.
- de Moreno de LeBlanc A, del Carmen S, Zurita-Turk M, Santos Rocha C, van de Guchte M, Azevedo V, et al. Importance of IL-10 Modulation by Probiotic Microorganisms in Gastrointestinal Inflammatory Diseases. *ISRN Gastroenterol* 2011;2011:1–11. doi:10.5402/2011/892971.
- Mudter J, Weigmann B, Bartsch B, Kiesslich R, Strand D, Galle PR, et al. Activation Pattern of Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) Factors in Inflammatory Bowel Diseases. *Am J Gastroenterol* 2005. doi:10.1111/j.1572-0241.2005.40615.x.
- Mukherjee S, Ayanambakkam A, Ibrahimi S, Schmidt S, Chakrabarty JH, Khawandanah M. Ibritumomab tiuxetan (Zevalin) and elevated serum human anti-murine antibody (HAMA). *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2018. doi:10.1016/j.hemonc.2017.12.004.
- Nelson AL, Reichert JM. Development trends for therapeutic antibody fragments. *Nat Biotechnol* 2009;27:331–7. doi:10.1038/nbt0409-331.
- Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2014.

doi:10.1038/nri3661.

Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet* (London, England) 2018;390:2769–78. doi:10.1016/S0140-6736(17)32448-0.

Ni J, Wu GD, Albenberg L, Tomov VT. Gut microbiota and IBD: Causation or correlation? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017. doi:10.1038/nrgastro.2017.88.

Nielsen OH, Munck LK. Drug Insight: Aminosalicylates for the treatment of IBD. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007;4:160–70. doi:10.1038/ncpgasthep0696.

Nouaille S, Ribeiro L a, Miyoshi A, Pontes D, Le Loir Y, Oliveira SC, et al. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res* 2003;2:102–11.

Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990;98:694–702. doi:S0016508590000725 [pii].

Owyang AM, Issafras H, Corbin J, Ahluwalia K, Larsen P, Pongo E, et al. XOMA 052, a potent, high-affinity monoclonal antibody for the treatment of IL-1 β -mediated diseases. *MAbs* 2011;3:49–60. doi:10.4161/mabs.3.1.13989.

Peake STC, Bernardo D, Mann ER, Al-Hassi HO, Knight SC, Hart AL. Mechanisms of Action of Anti-tumor Necrosis Factor [alpha] Agents in Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* June 2013 2013. doi:10.1097/MIB.0b013e318281333b.

Pereira VB, da Cunha VP, Preisser TM, Souza BM, Turk MZ, De Castro CP, et al. *Lactococcus lactis* carrying a DNA vaccine coding for the ESAT-6 antigen increases IL-17 cytokine secretion and boosts the BCG vaccine immune response. *J Appl Microbiol* 2017;122:1657–62. doi:10.1111/jam.13449.

Pereira VB, Saraiva TDL, Souza BM, Zurita-Turk M, Azevedo MSP, De Castro CP, et al. Development of a new DNA vaccine based on mycobacterial ESAT-6 antigen delivered by recombinant invasive *Lactococcus lactis* FnBPA+. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014a. doi:10.1007/s00253-014-6285-3.

Pereira VB, Zurita-Turk M, Saraiva TDL, De Castro CP, Souza BM, Mancha Agresti P, et al. DNA Vaccines Approach: From Concepts to Applications. *World J Vaccines*

2014b;04:50–71. doi:10.4236/wjv.2014.42008.

Perse M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: Traps and tricks. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012. doi:10.1155/2012/718617.

Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347:417–29. doi:10.1056/NEJMra020831.

Pontes D, Innocentin S, del Carmen S, Almeida JF, LeBlanc JG, de Moreno de LeBlanc A, et al. Production of Fibronectin Binding Protein A at the Surface of *Lactococcus lactis* Increases Plasmid Transfer In Vitro and In Vivo. *PLoS One* 2012;7:1–6. doi:10.1371/journal.pone.0044892.

Pontes DS, De Azevedo MSP, Chatel JM, Langella P, Azevedo V, Miyoshi A. *Lactococcus lactis* as a live vector: Heterologous protein production and DNA delivery systems. *Protein Expr Purif* 2011;79:165–75. doi:10.1016/j.pep.2011.06.005.

Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res* 2007. doi:10.1016/j.jss.2006.07.050.

Que YA, Francois P, Haefliger JA, Entenza JM, Vaudaux P, Moreillon P. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infect Immun* 2001;69:6296–302. doi:10.1128/IAI.69.10.6296-6302.2001.

Reichert JM. Antibodies to watch in 2015. *MAbs* 2015;7:1–8. doi:10.4161/19420862.2015.988944.

Reichert JM. Next generation and biosimilar monoclonal antibodies: Essential considerations towards regulatory acceptance in Europe - February 3-4, 2011, Freiburg, Germany. *MAbs*, 2011. doi:10.4161/mabs.3.3.15475.

Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Kenney JS, Baumann R, et al. Increased production of tumour necrosis factor-alpha interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut* 1996;39:684–9. doi:10.1136/gut.39.5.684.

Sambrook J, W Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harb Lab Press Cold Spring Harb NY 2001:999. doi:10.1016/0092-8674(90)90210-6.

Sanchez-Muñoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in

- inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:4280–8. doi:10.3748/wjg.14.4280.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977;74:5463–7. doi:10.1073/pnas.74.12.5463.
- Santos Rocha C, Gomes-Santos AC, Garcias Moreira T, De Azevedo M, Diniz Luerce T, Mariadassou M, et al. Local and systemic immune mechanisms underlying the anti-colitis effects of the dairy bacterium *Lactobacillus delbrueckii*. *PLoS One* 2014;9:1–8. doi:10.1371/journal.pone.0085923.
- Sartor RB. Cytokines in intestinal inflammation: Pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 1994. doi:10.1016/0016-5085(94)90614-9.
- Schaffner W. Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980. doi:10.1073/pnas.77.4.2163.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 2008;3:1101–8. doi:10.1038/nprot.2008.73.
- Schoen C, Stritzker J, Goebel W, Pilgrim S. Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *Int J Med Microbiol* 2004. doi:10.1016/j.ijmm.2004.03.001.
- Schotte L, Steidler L, Vandekerckhove J, Remaut E. Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*. *Enzyme Microb Technol* 2000;27:761–5. doi:10.1016/S0141-0229(00)00297-0.
- Scott Crowe J, Roberts KJ, Carlton TM, Maggiore L, Cubitt MF, Clare S, et al. Preclinical Development of a Novel, Orally-Administered Anti-Tumour Necrosis Factor Domain Antibody for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Sci Rep* 2018. doi:10.1038/s41598-018-23277-7.
- Sekirov I, Russell S, Antunes L. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010. doi:10.1152/physrev.00045.2009.
- Slevin SM, Egan LJ. New Insights into the Mechanisms of Action of Anti-Tumor Necrosis Factor- α Monoclonal Antibodies in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2015. doi:10.1097/MIB.0000000000000533.
- Song AAL, In LLA, Lim SHE, Rahim RA. A review on *Lactococcus lactis*: From food to factory. *Microb Cell Fact* 2017. doi:10.1186/s12934-017-0669-x.
- Souza BM, Preisser TM, Pereira VB, Zurita-Turk M, Castro CP, Cunha VP, et al.

- Lactococcus lactis carrying the pValac eukaryotic expression vector coding for IL-4 reduces chemically-induced intestinal inflammation by increasing the levels of IL-10-producing regulatory cells. *Microb Cell Fact* 2016;15:1–18. doi:10.1186/s12934-016-0548-x.
- Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. *Front Immunol* 2018. doi:10.3389/fimmu.2018.00754.
- Steeland S, Libert C, Vandebroucke RE. A new venue of TNF targeting. *Int J Mol Sci* 2018. doi:10.3390/ijms19051442.
- Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeier F, Falk W, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* (80-) 2000;289:1352–5. doi:10.1126/science.289.5483.1352.
- Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The Immunology of Mucosal Models of Inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064816.
- Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2008. doi:10.1172/JCI33194.
- Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 1997. doi:10.1056/NEJM199710093371502.
- Targownik LE, Bernstein CN. Infectious and malignant complications of tnf inhibitor therapy in ibd. *Am J Gastroenterol* 2013. doi:10.1038/ajg.2013.294.
- Thorlund K, Druyts E, Toor K, Mills EJ. Comparative efficacy of golimumab, infliximab, and adalimumab for moderately to severely active ulcerative colitis: A network meta-analysis accounting for differences in trial designs. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2015. doi:10.1586/17474124.2015.1024657.
- Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel JF. Ulcerative colitis. *Lancet* 2017. doi:10.1016/S0140-6736(16)32126-2.
- Vandebroucke K, De Haard H, Beirnaert E, Dreier T, Lauwereys M, Huyck L, et al. Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in

- chronic colitis. *Mucosal Immunol* 2010;3:49–56. doi:10.1038/mi.2009.116.
- Veloso TR, Chaouch A, Roger T, Giddey M, Vouillamoz J, Majcherczyk P, et al. Use of a human-like low-grade bacteremia model of experimental endocarditis to study the role of staphylococcus aureus adhesins and platelet aggregation in early endocarditis. *Infect Immun* 2013. doi:10.1128/IAI.01030-12.
- Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:661–5. doi:10.1097/00054725-200409000-00026.
- Vesa T, Pochart P, Marteau P. Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:823–8. doi:10.1046/j.1365-2036.2000.00763.x.
- Wallace KL, Zheng L-B, Kanazawa Y, Shih DQ. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014. doi:10.3748/wjg.v20.i1.6.
- Wells JM, Mercenier A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2008. doi:10.1038/nrmicro1840.
- Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* 2017. doi:10.1038/nprot.2007.41.
- Wyszyńska A, Kobińska P, Bardowski J, Jagusztyn-Krynicka EK. Lactic acid bacteria—20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015. doi:10.1007/s00253-015-6498-0.
- Yan Y, Kolachala V, Dalmasso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman S V., et al. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One* 2009. doi:10.1371/journal.pone.0006073.
- Yang F, Wang D, Li Y, Sang L, Zhu J, Wang J, et al. Th1/Th2 Balance and Th17/Treg-Mediated Immunity in relation to Murine Resistance to Dextran Sulfate-Induced Colitis. *J Immunol Res* 2017. doi:10.1155/2017/7047201.
- Zagato E, Mazzini E, Rescigno M. The variegated aspects of Immunoglobulin A. *Immunol Lett* 2016;178:45–9. doi:10.1016/j.imlet.2016.04.009.
- Zhou W, Huang Y, Lai J, Lu J, Feely M, Liu X. Anti-Inflammatory Biologics and Anti-Tumoral Immune Therapies-Associated Colitis: A Focused Review of Literature.

Gastroenterol Res 2018. doi:10.14740/gr1041w.

Zisman TL, Cohen RD. Pharmacoeconomics and quality of life of current and emerging biologic therapies for inflammatory bowel disease. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2007. doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s11938-007-0012-4>.

Zurita-Turk M, del Carmen S, Santos ACG, Pereira VB, Cara DC, Leclercq SY, et al. *Lactococcus lactis* carrying the pValac DNA expression vector coding for IL-10 reduces inflammation in a murine model of experimental colitis. *BMC Biotechnol* 2014;14:1–11. doi:10.1186/1472-6750-14-73.

Mucosal delivery of *Lactococcus lactis* carrying an anti-TNF scFv expression vector ameliorates experimental colitis in mice

Maria José Chiabai¹, ¹Laboratório de Imunologia Molecular, Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil. Email: mchiabai@hotmail.com

Juliana Franco Almeida², ²Centro de Biotecnologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil. Email: jfa1911@gmail.com

Mariana Gabriela Dantas de Azevedo¹, ¹Laboratório de Imunologia Molecular, Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil. Email: marianaus13@hotmail.com

Suelen Soares Fernandes¹, ¹Laboratório de Imunologia Molecular, Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil. Email: suelensfernandes@outlook.com

Vanessa Bastos Pereira³, ³Laboratório de Tecnologia Genética, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Email: vanessabastospereira@yahoo.com.br

Raffael Júnior Araújo de Castro⁴, ⁴Laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil. Email: raffaeljunio@yahoo.com.br

Márcio Sousa Jerônimo⁴, ⁴Laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil. Email: marciosj@gmail.com

Isabel Garcia Sousa¹, ¹Laboratório de Imunologia Molecular, Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil. Email: isagarsousa@gmail.com

Leonora Maciel de Souza Vianna⁵, ⁵Departamento de Patologia, Escola de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil. Email: leonoravianna@hotmail.com

Anderson Miyoshi³, ³Laboratório de Tecnologia Genética, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Email: miyoshi@icb.ufmg.br

Anamelia Lorenzetti Bocca⁴, ⁴Laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil. Email: anamelia.bocca@gmail.com

Andrea Queiroz Maranhão^{1,6}, ¹Laboratório de Imunologia Molecular, Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil. ⁶Instituto Nacional de Investigação em Imunologia, INCTii. Email: andreaqm@unb.br

Marcelo Macedo Brigido^{1,6}, ¹Laboratório de Imunologia Molecular, Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil. ⁶Instituto Nacional de Investigação em Imunologia, INCTii. Email: brigido@unb.br

***Correspondence:** Marcelo Macedo Brigido. Email: brigido@unb.br

Abstract

Background: Anti-Tumor Necrosis Factor-alpha therapy has become clinically important for treating inflammatory bowel disease. However, the use of conventional immunotherapy requires a systemic exposure of patients and collateral side effects. Lactic acid bacteria have been shown to be effective as mucosal delivering system for cytokine and single domain antibodies, and it is amenable to clinical purposes. Therefore, lactic acid bacteria may function as vehicles for delivery of therapeutic antibodies molecules to the gastrointestinal tract restricting the pharmacological effect towards the gut. Here, we use the mucosal delivery of

Lactococcus lactis carrying an anti-TNF α scFv expression plasmid on a DSS-induced colitis model in mice.

Results: Colitis was induced with DSS in drinking water prior to administration of *L. lactis* carrying the expression plasmid. Treated animals showed an improvement in histological and disease scores compared to those of untreated animals, along with a reduction in inflammatory molecular and immunological markers, suggesting amelioration of the disease.

Conclusion: Hence, these results provide evidence for the use of this alternative system for delivering therapeutic biopharmaceuticals *in loco* for treating inflammatory bowel disease, paving the way for a novel low-cost and site-specific biotechnological route for the treatment of inflammatory disorders.

Keywords: *Lactococcus lactis*, mucosal delivery, anti-TNF α , scFv, colitis, DSS

Background

Inflammatory bowel disease (IBD), which includes Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), is characterized by chronic inflammation of the gastrointestinal tract (GIT) and a cryptogenic origin [1], with a global incidence of 0.3% [2]. The characteristic tissue damage of the disorder occurs due to the abnormal expression of anti-inflammatory and pro-inflammatory molecules from both the innate and adaptive responses [3]. Tumor necrosis factor- α (TNF α) plays a crucial role in the pathogenesis of IBD, and indeed, monoclonal antibodies targeting TNF α are the most powerful treatment for IBD; however, the intravenous administration route causes immunogenic and systemic side effects [4,5]. Therefore, the local delivery of this pharmaceutical would benefit patients restricting therapy towards the inflamed tissue.

Recently, using bacteria as a vehicle, novel approaches for the treatment of intestinal inflammation in IBD animal models have been proposed, showing promising anti-inflammatory results such as those described by Gomes-Santos et al. [6] and Luerce et al. [7]. The *Lactococcus lactis* subspecies cremoris MG1363 is one of the most explored bacteria; it is a noninvasive and nonpathogenic gram-positive species. It is the best characterized microorganism of the group named lactic acid bacteria (LAB) and is generally regarded as safe (GRAS) by the U. S. Food and Drug Administration (FDA) [8,9]. Although these bacteria are used in the manufacture of dairy products such as cheese and yogurt [10], *L. lactis* subsp. cremoris MG1363 is considered a potential strategy for the treatment of IBD, once it has the

ability to survive the gastric acid environment and is able to replicate and deliver therapeutic molecules locally to the GIT [11]. Moreover, the medical use of engineered bacteria to produce biopharmaceuticals will pave the way for a novel biotechnological route for the low-cost treatment of immune disorders.

The use of LAB as a drug delivery system has been proposed (8) as a substitute for the oral administration of biopharmaceuticals [12–14]. However, bacterial expression systems show a limited capacity for recombinant protein production. Complex heterologous eukaryotic protein production in bacteria is normally limited by the lack of specific chaperones and other modification enzymes. Therefore, the efficient delivery of monoclonal antibodies to the animal gut depends on novel strategies. In this work, we explored the ability of *L. lactis* MG1363 FnBPA+ [15] to locally deliver a single-chain fragment variable (scFv) of anti-TNF α antibody cloned in the eukaryotic expression plasmid pValac [16] for expression in the GIT lining. We use this delivery system in a dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice and tested its effect on the inflammatory process. We showed that treating mice orally with *L. lactis* carrying pValac::*anti-TNF α* ameliorates disease indexes as well as immunological and molecular markers. The data support the use of this alternative delivery system for treating IBD.

Results

Construction of pValac::*anti-TNF α*

The synthetic *anti-TNF α* coding ORF was cloned into the pValac vector (Additional file 1: Figure S1A), forming an expression cassette for eukaryotic cells. The pValac::*anti-TNF α* construction was checked by restriction endonuclease digestion profile, PCR and sequencing to confirm ORF integrity (data not shown). To evaluate the ability of gene expression under the control of the CMV promoter, we transfected the plasmid pValac::*anti-TNF α* into the HEK-293 cell line. The cell culture supernatant was collected 48 h post-transfection, and soluble scFv was probed with anti-HA primary antibody by western blot. A reactive band at the expected size of 31 kDa was detected, showing the production and secretion of the expected antibody fragment (Additional file 1: Figure S1B).

Oral Administration of the LL-FT Strain Ameliorates Disease in DSS-Induced Colitis

The LL-F strain was transformed with the pValac::*anti-TNF α* plasmid by electroporation, and selected clones were checked by their restriction endonuclease digestion profile and PCR. The

effects of LL-FT were evaluated in an animal model of acute colitis induced by DSS. An experimental protocol to mimic ulcerative colitis in humans was carried out. The mice received 2% DSS in drinking water for 4 days followed by a further 4 consecutive days of 2% DSS plus LL-F or LL-FT (Figure 1A). As shown in Figure 1B, body weight decreased with DSS ingestion, and there was no weight recovery in the mice that received LL-FT, despite clear clinical signs of improvement of inflammation, such as cessation of rectal bleeding and no signs of diarrhea. The colon length was examined after euthanasia. We found a shortening of the colons in the mice from the DSS group (average length of 3.2 ± 0.15 cm) in comparison with the group of mice that drank only saline (average length of 3.9 ± 0.05 cm). However, the group that received LL-FT showed a significant recovery of colon length (average length of 3.5 ± 0.13 cm) when compared with the LL-F group (average length of 2.9 ± 0.08 cm) (Figure 1C). The effect of LL-FT on colitis in mice was evaluated using the disease activity index (DAI). This index reflects weight loss, diarrhea and rectal bleeding, parameters that had a milder occurrence in comparison with the LL-F group. This score was analyzed on day 9, before euthanasia. The mice treated with DSS alone without bacteria administration showed a score of 2.1 ± 0.13 , and mice treated with LL-F showed a score of 2.0 ± 0.22 . The mice that received LL-FT showed a significantly lower DAI of 1.1 ± 0.15 and thus a reduced inflammatory process compared to mice in the LL-F group (Figure 1D). Moreover, CRP was measured (Figure 1E). CRP levels increased among groups that received DSS, but the levels were significantly decreased in the LL-FT group, which reflects an anti-inflammatory effect.

LL-FT Prevents Colonic Mucosal Injury

DSS induces extensive injury in the mouse colon [17]. Thus, histological analysis was performed for all animals to evaluate histological damage caused by DSS and *L. lactis* treatment. We developed a histological score considering several histopathological parameters (Additional file 1: Table S1). The histological scores for the LL-FT-treated animals were statistically significantly lower ($p= 0.0022$) compared with the scores of the DSS and LL-F groups (Figure 2A). The colonic samples of negative control animals remained intact, with no change in the normal histological architecture in the mucosa (Figure 2B NC). When comparing the mice in the LL-F group (Figure 2B LL-F) to the mice in the DSS group (Figure 2B DSS), the mucosal and submucosal inflammatory infiltrate ranged from moderate to severe. Furthermore, erosion with extensive ulceration, crypt abscesses, muscle herniation and depletion of goblet cells was observed. On the other hand, in the LL-FT group (Figure 2B LL-

FT), the mucosa, submucosa, muscular and serosal infiltrates were mild, with small or no erosion area and little gland inflammatory activity. In addition, mucosal ulceration or muscle thickening was not found, resembling the negative control of colitis. Hence, the presence of the *anti-TNF α* plasmid carried by *L. lactis* ameliorated the inflammatory symptoms, suggesting the participation of locally produced anti-TNF α .

Modulation of Inflammatory Gene Markers Suggests Disease Reversal

Cytokines and transcription factors involved in the mucosal immune response to colitis in mice were investigated by qPCR of the colonic total RNA. The mice treated with LL-FT were compared to control mice for the production of markers of T-cell and macrophage populations to investigate if anti-TNF α delivered by recombinant *L. lactis* could evoke specific sets of immune cell populations. As shown in Figure 3, we found that the mRNA levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6, TNF α and IL-1 β were induced in mice that received DSS but that they significantly decreased in mice treated with LL-FT towards mRNA levels found in healthy animals (Figure 3A, B, C). Similarly, IL-17A levels increased in DSS and LL-F groups and decreased to healthy levels after LL-FT treatment (Figure 3D). ROR γ t mRNA levels decreased compared to those in untreated animals after colitis induction or *L. lactis* treatment. However, no statistical significance was observed except for the LL-FT group (Figure 3E). Similarly, TGF- β mRNA levels did not change significantly by DSS or *L. lactis* treatment despite a small increase after DSS treatment (Figure 3F). The relative expression of the Th1 marker T-bet decreased significantly in all groups that received DSS (DSS, LL-F and LL-FT group) compared with that of the NC group (Figure 3G). Additionally, STAT1 mRNA levels were significantly lower in the LL-FT group in comparison to those in the NC and LL-F groups (Figure 3H) suggesting a marked effect of LL-FT on the expression of STAT1 in the colon tissue. The Foxp3 expression increased in groups that received DSS and decreased significantly in mice treated with LL-FT (Figure 3I), showing a profile similar to IL-17A. Likewise, the IL-10 anti-inflammatory cytokine transcripts were increased after DSS but decreased in the LL-FT group, showing significant differences (Figure 3J). iNOS expression increased in groups that received DSS or DSS plus LL-F but decreased significantly in the LL-FT group (Figure 3K). The arginase mRNA levels were similar to iNOS levels, but statistically significant differences only occurred between the NC group and the LL-F group, and the LL-FT group which received the recombinant *L. lactis* with pValac::*anti-TNF α* seemed to recover the NC

group levels (Figure 3L). We also tested MUC-3 levels, but they were not affected by DSS or *L. lactis* treatment (Additional file 1: Figure S2).

In addition to the mRNA transcripts, we evaluated if LL-FT could alter the serum levels of cytokines in mice. The cytokines were quantified at the end of the experiments on day 9. Levels of IL-6, TNF and IL-10 increased with DSS administration followed by a decrease when mice were treated with LL-FT, repeating the tendency of cytokine mRNA levels (Additional file 1: Figure S3). However, only TNF levels in the DSS group were significantly different compared to those in the LL-FT group. Thus, corroborating with a return to homeostasis after treatment.

Because IgA on the mucosal surfaces is considered the first line of defense controlling the pro-inflammatory processes and preserving the integrity of the epithelial barrier (21, 22), we measured IgA levels in the fecal extracts of mice to verify the integrity of the mucosal tissue following treatment. We observed that mice receiving DSS presented higher IgA levels than the negative control group and that treatment with LL-F did not rescue untreated levels. However, no significance was observed at $p < 0.05$ (Additional file 1: Figure S4). On the other hand, LL-FT treatment showed a tendency to return IgA levels to untreated levels.

Discussion

In this work, we showed the construction of an anti-TNF α scFv eukaryotic expression vector to be delivered by oral administration to the gut of animals. This vector is based on a previously described vector (pValac) that allows the expression of a transgene in gut epithelial cells [16]. We showed that this vector induces the synthesis of a 31 kDa scFv in transfected HEK-293 cells, suggesting its competence to induce synthesis in the gut cells of animals. Therefore, we expected to delivery an anti-TNF α in the gut of mice via a genetically modified microorganism, *L. lactis*. We tested this hypothesis by treating mice suffering from ulcerative colitis induced by DSS, an experimental disease model known to be ameliorated by anti-TNF therapy. Furthermore, we tested the use of LAB as a delivery system for antibody fragments as an alternative strategy for the treatment of IBD.

Wild-type *L. lactis* are able to be internalized by eukaryotic cells and to deliver DNA efficiently, as shown previously both *in vitro* [20] and *in vivo* [21]. However, a recombinant *L. lactis*

expressing a fibronectin-binding protein A (FnBPA) of *Staphylococcus aureus* has an improved ability to deliver DNA since FnBPA is an invasin that mediates invasivity in nonphagocytic host cells [22], facilitating intracellular spreading [15]. Therefore, for this study, we used a modified bacteria transformed with the plasmid pValac::*anti-TNF α* to adhere to eukaryotic cells of the intestinal mucosa [23]. Thus, LL-F transformed with the pValac::*anti-TNF α* (LL-FT) plasmid was administered by gavage to a DSS-induced colitis in mice.

DSS is a high molecular weight and irritating chemical known to induce colitis. At a concentration of 2%, it causes severe inflammation in the mucosa of the intestinal colon [24]. After receiving DSS, the mice presented distinguished weight loss, diarrhea and rectal bleeding. C57BL/6 mice were used in this work because this strain is highly susceptible to DSS colitis and because these mice do not evolve spontaneously to healing but rather develop a chronic state (28, 29). In our model, mice exhibited the same disease characteristics, and after the treatment with LL-FT, we showed improvement in a variety of macroscopic parameters. The shortening of the colon length reflects the inflammatory process, and the treatment of mice with LL-FT improved the colon length compared to that of the LL-F group. Moreover, the same group LL-FT showed no significant difference compared to the untreated group. However, the macroscopic score (DAI), which reflects multiple macroscopic pathological parameters, showed that the mice that received the *anti-TNF α* transgene had a lower DAI than other control groups, suggesting a reversal of the disease.

The histopathological score as computed here gives an assessment of the microscopic aspect of the pathological process. The colon of the untreated animals appeared healthy, showing an integral histological architecture with visible microvillousities. This healthy aspect was lost after DSS treatment. Moreover, our experiments of inducing acute colitis by DSS was reproduced since, histologically, we found lesions with inflammatory infiltrate, focal crypt lesions and goblet cell loss [27]. The damage induced by DSS was not reduced after treatment with LL-F; however, a statistically significant benefit to tissue integrity was observed in mice receiving LL-FT. Therefore, the beneficial effect of LL-FT treatment must be the consequence of the *anti-TNF α* transgene expression after *L. lactis* treatment. The findings in the histopathology of the colon agreed with the macroscopic parameters and histopathological scores observed by other authors [26], and *L. lactis* harboring *anti-TNF α* treatment seemed to ameliorate colon tissue integrity. It is noteworthy that even though we are describing the results of a single

experiment, these effects were reproducible by at least three independent experiments (data not shown).

To follow the inflammatory response of our model, we measured CRP, an acute-phase protein produced by the liver in acute inflammatory conditions and is a useful marker of IBD [28]. Although CRP is a nonspecific mucosal inflammatory marker, our data indicate that lower levels of this protein were associated with a lower active disease index in mice and could be used as a functional biomarker for the evaluation of intestinal inflammation. It is noteworthy that FnBPA acts as an inflammatory marker per se [29] that may counteract in part the beneficial effect of LL-F or LL-FT. Therefore, the administration of *L. lactis* delivering anti-TNF α after the fourth day of DSS treatment improved the overall aspect of disease, suggesting a reversal of the DSS-induced process.

DSS-induced colitis disrupts the epithelial barriers, allowing intestinal bacteria to invade the damaged mucosa and inducing excessive production of pro-inflammatory cytokines [30] that could be reduced with anti-TNF therapy [12]. In our model system, the mRNA levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, TNF α and IL-1 β increased after disease induction, as expected (34, 35) and decreased to levels similar to those of healthy controls after LL-FT treatment. IL-17A levels respond similarly, showing a clear upregulation after disease induction, supporting the Th17 axis in the experimental murine colitis model [32–35]. Coherently, T-bet, a hallmark of the Th1 response, was not affected by recombinant bacteria, corroborating an immune response associated with the Th17 phenotype. Regulatory T cells (Treg) are able to suppress abnormal immune responses, and they are involved in homeostasis of the intestinal mucosa [36]. These cells, marked by the expression of Foxp3, produce IL-10 and TGF- β and inhibit the effector function of T cells [3]. Treg markers are increased in the gut of CD and UC patients [37]. Our data suggest that mice treated with LL-FT recover to healthy levels of Foxp3 and IL-10, suggesting a reduction in Tregs, which possibly reflects the improvement in the disease index after treatment with anti-TNF α and a return to homeostasis.

Gobert et al. [38] showed an amelioration of colitis symptoms induced by DSS in iNOS-deficient mice, and our data showed a significant decrease in mRNA iNOS when mice were treated with LL-FT, suggesting that treatment exerted a beneficial effect. Arginase, an M2 macrophage-associated gene, also showed an increase when mice were exposed to DSS

followed by a decrease with recombinant *L. lactis*. The association of increased arginase and increased IL-10 suggests that there is an accumulation of M2 macrophages in the colonic tissue of DSS-induced colitis as described by Lin et al. [39], and a lowering of these markers after LL-FT treatment leads to the resolution of the inflammatory process.

The homeostasis of the gastrointestinal tract is achieved by immune mechanisms such as secretion of mucus and IgA, which protects the intestinal epithelium against commensal and pathogenic microorganisms. MUC-3 codes for a structural protein are involved in the healthy epithelium. Some authors showed that MUC-3 is upregulated during the recovery of a damaged bowel after acute colitis [40]. In our model, MUC-3 seems to be downregulated, even though there was no statistical significance. IgA immunoglobulin is the most abundant isotype produced by the mucosa and constitutes an effective marker of inflammation within the microbiota, controlling and modulating it (44, 45). In our model, the administration of LL-FT did not significantly increase IgA levels in the intestine. Surprisingly, those animals treated with DSS and received saline or LL-F without plasmid had high levels of IgA in comparison with the negative control group and treatment group. Souza et al. [13] also found no increase in IgA levels in mice that received doses of LL-F. On the other hand, a study showed that the use of this same strain carrying pValac::*il-10* was associated with high IgA levels when compared to those in the DSS group [14]. Despite the lack of statistical significance, our results suggest that the induction of disease shows a tendency to increase intestinal IgA levels compared to levels in healthy and anti-TNF α -treated groups. This increase may reflect disease activity directly or indirectly since IgA may be lacking from plasma due to colon tissue damage associated with DSS treatment.

Several cytokines are known to be involved in IBD (46, 47), therefore their serum concentrations were evaluated, and the results corroborated with local mRNA levels, validating the data achieved via qPCR. Even though we see scarce significant differences, the excessive secretion of pro-inflammatory cytokines is related to intestinal inflammation (3, 29, 40, 46), and this biological phenomenon seemed to be reproduced in our model system. The significative reduction of the systemic levels of TNF α could be reflecting a neutralization of this cytokine, hitherto a key player of the inflammatory process in human colitis. Infliximab and adalimumab [45], both anti-TNF α monoclonal antibodies, are currently used for treating Crohn's disease. Moreover, it lessens DSS induced colitis in mice (49, 50). However, recent

data suggests that neither infliximab binds TNF α [48], nor TNF α is necessary for colitis in TNF $\alpha^{-/-}$ mice [49] contradicting current admitted mechanism for infliximab action on mouse model based on TNF α neutralization (12, 53, 54). Despite of the mechanism, infliximab ameliorates DSS induced colitis that is corroborated by our results. It is possible that other mechanism, such as an apoptosis based one may underlie colitis mouse models response to anti-TNF α therapy [52–54], not TNF α neutralization. Consistently, the observed reduction of systemic TNF α observed in our experiment correlated to a decline in its mRNA levels, thus, TNF α seemed to decline due to a reduction of synthesis rather than from neutralization.

Anti-TNF α therapies have become popular for treating UC and CD in humans, and mucosal delivery of biopharmaceuticals may improve the outpatient's quality of life. However, the oral delivery of antibodies is hindered by the harsh conditions of the digestive tract. Thus, strategies based on mucosal delivery by microorganisms may overcome this obstacle by producing the antibody directly in the gut. We show here that genetically engineered *L. lactis* can be used to deliver an scFv anti-TNF α to the mammalian intestine. Vandembroucke et al. [12] had previously reported the use of anti-TNF nanobodies secreting *L. lactis* in DSS-induced colitis in the IL-10 $^{-/-}$ mouse, where they found the resolution of the inflammatory process. Their system was based on a single-domain camelid antibody fragment constitutively secreted from the bacteria. The expression system used here is based on the heterologous production of an scFv vector directly in the epithelium of the intestine in a eukaryotic expression system [16]. Therefore, anti-TNF α production is restricted to the gut milieu focusing the therapeutic intervention. Moreover, the scFv anti-TNF α was engineered inspired on the well-studied agent infliximab [55]. Hence, the delivery system proposed here may represent a more reliable model system for simulated anti-TNF treatment for UC in human subjects. Because this system uses a noninvasive route to carry the biopharmaceutical to the site of inflammation, it may represent an alternative for oral antibody therapies.

Conclusions

The use of LAB for delivering biopharmaceuticals may represent an alternative route for immunotherapy. The results reported here suggests that oral administration of *Lactococcus lactis* carrying the eukaryotic expression vector coding for an anti-TNF α induces a reduction of colitis associated inflammatory and histopathological markers suggesting an amelioration in

disease. Novel therapeutic approach based on delivering recombinant antibodies may soon substitute systemic immunotherapy for gut-associated diseases.

Abbreviations

IBD: inflammatory bowel disease; CD: Crohn's disease; UC: ulcerative colitis; TNF α : Tumor necrosis factor- α ; LAB: lactic acid bacteria; GRAS: generally regarded as safe; scFv: single-chain fragment variable; DSS: dextran sulfate sodium; ORF: open read frame; DAI: disease activity index; CRP: C-reactive protein; FnBPA: fibronectin-binding protein A; PCR: polymerase chain reactions; FBS: fetal bovine serum; CFU: colony forming units, qPCR: quantitative PCR; CBA: cytometric bead array; LL-F: *Lactococcus lactis* MG1363 FnBPA+; LL-FT: *Lactococcus lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*).

Methods

Bacterial Strains, Media and Growth Conditions

Escherichia coli XL1-Blue and *E. coli* TG1 were grown in Luria-Bertani (LB) medium with tetracycline (Tet; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 30 μ g/mL (only for XL1-Blue) at 37°C and 250 rpm overnight. *L. lactis* MG1363 FnBPA+ were grown in M17 medium (Difco, Detroit, MI, USA) supplemented with 0.5% glucose, and, when necessary, chloramphenicol (Cm; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 10 μ g/mL and erythromycin (Ery; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 5 μ g/mL, at 30°C without agitation for 18 h. The plasmids and bacterial strains used are described in Table 1.

Construction of pValac::*anti-TNF α* and Development of LL-FT

An anti-TNF α scFv expression vector was constructed based on infliximab variable chain sequences (GenBank accession numbers: 471270577 and 471270576). A synthetic scFv was designed based on mouse codon usage and cloned in the pValac shuttle vector. The synthetic gene fragment was cloned into the pValac::*gfp* vector digested with *EcoR* I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and *Nhe* I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), yielding pValac::*anti-TNF α* . An HA tag was included in the carboxy terminus of the scFv. This vector was used to transform *E. coli* TG1 as described by Sambrook and Russel [56]. Cloning was checked via the restriction endonuclease digestion profile, polymerase chain reactions (PCR) and sequencing, confirming the integrity of sequences. LL-F was transformed with pValac::*anti-TNF α* using

electroporation as previously described [56], resulting in LL-FT. The presence of plasmid was confirmed by PCR and enzymatic digestion.

Transfection Assays of Mammalian HEK-293 Cells with pValac::*anti-TNF α*

The pValac::*anti-TNF α* plasmid was tested for anti-TNF α protein expression by human embryonic kidney (HEK-293) cell line transfection. HEK-293 cells (ATCC number: CRL-1573TM) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco[®], Glasgow, UK) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco[®], Glasgow, UK) and Antibiotic-Antimycotic (100X) (Gibco[®], Glasgow, UK) at 37°C in 5% CO₂. LipofectamineTM LTX reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used for the transfection assay with 2 μ g of pValac::*anti-TNF α* in wells containing 70-90% confluent cells according to the manufacturer's recommendations. After 48 h, samples were centrifuged at 10,000 \times g for 5 min, and the supernatant was stored at -20°C until anti-TNF α detection by western blot.

SDS-PAGE and Western Blot Analysis

Proteins from the supernatant of HEK-293 transfection were resolved by 12% SDS-PAGE using the Bio-Rad system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for electrophoresis. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) that was blocked with PBST-milk (PBS buffer added 5% skim milk and 0.1% Tween 20) and then incubated with anti-HA probe (1:1,000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After PBST washing, the membrane was incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:5,000; Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA). After washing with PBST and APB, enzymatic activity was performed using a BCIP/NBT chromogenic substrate (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Mice

Female C57BL/6 mice (10 week) were purchased from the CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica) of Universidade Estadual de Campinas (Unicamp – Campinas, Brazil). Animals belonging to the same experimental group were housed in a single cage in a controlled temperature (25°C) room with a 12:12-h light/dark cycle and *ad libitum* access to food and water. Sample number estimation in each experimental group and all animal procedures were performed following the rules of the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA/ICB-

UnB/Brazil) and approved by CEUA (51069/2015). All sections of this report adhere to the ARRIVE Guidelines for reporting animal research. A completed ARRIVE guidelines checklist is included in Checklist S1.

DSS-Induced Colitis and Treatment with *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::anti-TNF α)

Acute colitis was induced by adding 2% (w/v) DSS (MW 40-50 kDa; USB Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) to the drinking water from day 1 to day 8. Experiments were carried out with 4 to 5 mice per group. The mice were divided into the following groups: i) a healthy negative control group (NC) in which the mice were gavaged with 100 μ L of saline (0.9% NaCl) and allowed to ingest pure filtered water throughout the experiment, ii) a positive control group of colitis (DSS) in which the mice were gavaged with 100 μ L of saline, iii) the LL-F group in which the mice received 100 μ L of the corresponding bacterial strain as suspension without plasmid, and iv) the LL-FT group in which the mice received 100 μ L of the corresponding bacterial strain as suspension. The DSS, LL-F and LL-FT groups ingested filtered water with 2% DSS added throughout the experiment. The recombinant strains were administered once daily by gavage from day 5 to day 8. Each dose corresponded to 100 μ L of LL-FT suspension and contained $2.0\text{-}2.5 \times 10^9$ colony forming units (CFU). Animals were euthanized on day 9 in a carbon dioxide chamber with cervical dislocation to collect blood samples from the retro-orbital venous plexus; the colonic tissue was quickly removed and washed of feces. Animals that died during the experiment were not included in the analysis. The mean of the water-DSS intake per group was monitored, and each animal consumed 3-5 mL of water daily.

Disease Activity Index (DAI)

On day 9 (day of euthanasia), DSS-induced colitis was determined using the disease activity index (DAI) as described by Cooper et al. [57]. The DAI consisted of the combined scores for weight loss, stool consistency and rectal bleeding divided by 3. The features that were graded included the following: body weight loss (0, none; 1, 1-5% loss; 2, 5-10% loss; 3, 10-20% loss; and 4, > 20% loss), stool consistency (0, normal; 2, loose stools and 4, diarrhea) and rectal bleeding (0, absent; 2, moderate and 4, severe). Loss of body weight was defined by the difference between the initial and final weight. Stool consistency and rectal bleeding were confirmed by examination of the sectioned colon upon euthanasia.

Quantification of C-Reactive Protein in Blood Serum

C-Reactive Protein (CRP) was quantified in the blood serum of animals with a Mouse CRP ELISA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instruction. After euthanasia, collected blood samples were kept at room temperature until coagulation and then centrifuged at 5,000×g for 5 min. The serum samples (supernatant) were then transferred to new tubes and stored at -20°C. For ELISA, a dilution of 1:20,000 from each serum sample was used. The reading was performed at 450 nm on a VersaMax™ ELISA Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

Histopathological Score of Colitis

On the day of euthanasia, the colon was removed, and its length was measured. Distal colon samples were sectioned into two fragments to be used for histological study and biochemical determinations. Colonic tissue was fixed in 10% formaldehyde, and H&E staining was performed. The histological analyses were carried out in a blind design and were based on the morphological findings regarding the presence of inflammatory infiltrate reaching the mucosa, submucosa, muscular and serosal layers; inflammatory activities in glands; abscesses of crypts; erosion or ulceration of the mucosa; thickening of the muscular layer; and depletion of goblet cells and herniation of the muscular layer. These findings were classified as mild, moderate or severe. Thus, the following scores were assigned: 0, mucosa with normal structures, without any alteration or with slight inflammatory infiltrate in the mucosa or submucosa; 1, the presence of mild-to-moderate inflammatory infiltrate with inflammatory activity in glands or abscesses of crypts with erosion but without ulceration; 2, the presence of all the previous findings associated with greater ulcerations in the mucosa but one or two ulcers; and 3, the presence of ulcerations compromising large areas of the mucosa. The score of each animal could range from 0 to 39.

RNA Isolation and qPCR Analysis

For gene expression analysis of the colonic samples by quantitative PCR (qPCR), the tissue was stored in RNAlater (Qiagen, Valencia, CA, USA) until total RNA extraction using a RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and TissueLyser LT (Qiagen, Valencia, CA, USA) to disrupt the samples. The samples were quantified using a NanoDrop™ One^C Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). For reverse transcription, RT² First Strand Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) was used. For elimination of genomic DNA during RNA purification, RNase-Free DNase Set (Qiagen, Valencia, CA, USA) was used. Amplification and detection were performed on optical 96-well

plates (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) with the 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) using a Fast SyBR Green Master Mix Kit (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Levels of mRNA expression were normalized to ribosomal protein S9 (RPS9) mRNA, and RNA relative quantification was calculated using the method $2^{-\Delta Ct}$ [58]. The oligonucleotide primers are described in Table S2 in the Additional files 1.

Analysis of Blood Serum Cytokines by Flow Cytometry

The sera of mice were collected to measure the levels of interleukin-6 (IL-6), TNF and IL-10 using a Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) as recommended by the manufacturer. Samples were acquired in an Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed using FCAP Array™ Software version 3.0 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). At least 2,100 events were acquired for each sample.

Measurement of Fecal IgA

Levels of IgA were determined in fecal extract samples using a Mouse IgA ELISA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) following the manufacturer's protocol. Before euthanasia, the mice were placed in clean cages and kept for 30 min. A pool of feces per group was collected, weighed, transferred to a Falcon tube containing 5 mL of PBS added to 100 mM PMSF 0.2% and kept on ice for 15 min. The extracts were homogenized via inversion of the tube and kept on ice for 15 min. Then, the tubes were centrifuged for 30 min at 3,000 rpm at 4°C. The supernatants were saved and stored at -80°C. For ELISA, dilutions of 1:10 and 1:100 from each pool were used. The reading was performed at 450 nm on a VersaMax™ ELISA Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

Statistical Analysis

The results of experiments are expressed as the means \pm SEM. Statistical differences were determined by two-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test for curves and by the Mann-Whitney test for charts. All statistical analyses were performed with Graph Pad Prism version 6.0 for Mac OS X (La Jolla, CA, USA). Statistical significance was considered at $p < 0.05$.

Declarations

Ethics approval and animal use

All animal procedures were performed following the rules of the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA/ICB-UnB/Brazil) and approved by CEUA (51069/2015).

Consent to participate

N/A

Consent for publication

N/A

Availability of data and material

All data, plasmids and bacterial clones related to this work is available on request.

Competing interests

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Authors' contributions

MJC designed and performed all experiments and analysis and write manuscript; JFA designed experiments and strategies; MGDA and SSF performed animal experimentation and housing; VBP helped cloning expression vectors; RJAC and MSJ helped with animal experiments and collect histopathological data; IGS helped collecting data for molecular and immunological data; LMSV performed pathological analysis; AM helped design vector and transgene; ALB and AQM helped establishing experimental protocols; MMB design general strategies and experiments, performed analysis and write manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We are in debt with Christian Hoffmann for help with statistics and Fabiana Brandão for help with qPCR.

Funding

All experimentation was funded by Fundação de Apoio a Pesquisa do DF (grant application 193.000.834/2015). MJC and IGS received financial support of CAPES and Instituto Nacional de Investigação em Imunologia/CNPq.

Author details

¹Laboratório de Imunologia Molecular, Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil. ²Centro de Biotecnologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil. ³Laboratório de Tecnologia Genética, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ⁴Laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil. ⁵Departamento de Patologia, Escola de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil. ⁶Instituto Nacional de Investigação em Imunologia, INCTii.

References

1. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2002;347:417–29.
2. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet.* 2018;390:2769–78.
3. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun. Rev.* 2014. p. 3–10.
4. Nielsen OH, Munck LK. Drug Insight: Aminosalicylates for the treatment of IBD. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 2007. p. 160–70.
5. Scott Crowe J, Roberts KJ, Carlton TM, Maggiore L, Cubitt MF, Clare S, et al. Preclinical Development of a Novel, Orally-Administered Anti-Tumour Necrosis Factor Domain Antibody for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Sci Rep.* 2018.
6. Gomes-Santos AC, de Oliveira RP, Moreira TG, Castro-Junior AB, Horta BC, Lemos L, et al. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents inflammatory intestinal disease in mice by IL-10- and TLR2-dependent pathways. *Front Immunol.* 2017;8:1–12.
7. Luerce TD, Gomes-Santos AC, Rocha CS, Moreira TG, Cruz DN, Lemos L, et al. Anti-inflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. *Gut Pathog.* 2014;6:1–11.
8. Mancha-Agresti P, Drumond MM, Carmo FLR do, Santos MM, Santos JSC dos, Venanzi F,

- et al. A New Broad Range Plasmid for DNA Delivery in Eukaryotic Cells Using Lactic Acid Bacteria: In Vitro and In Vivo Assays. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* 2017;4:83–91.
9. Steidler L. *Lactococcus lactis*, A Tool for the Delivery of Therapeutic Proteins Treatment of IBD. *Sci World J.* 2001;1:216–7.
10. Carr FJ, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 2002. p. 281–370.
11. Vesa T, Pochart P, Marteau P. Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther.* 2000;14:823–8.
12. Vandembroucke K, De Haard H, Beirnaert E, Dreier T, Lauwereys M, Huyck L, et al. Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis. *Mucosal Immunol.* Nature Publishing Group; 2010;3:49–56.
13. Souza BM, Preisser TM, Pereira VB, Zurita-Turk M, Castro CP, Cunha VP, et al. *Lactococcus lactis* carrying the pValac eukaryotic expression vector coding for IL-4 reduces chemically-induced intestinal inflammation by increasing the levels of IL-10-producing regulatory cells. *Microb Cell Fact.* BioMed Central; 2016;15:1–18.
14. Zurita-Turk M, del Carmen S, Santos ACG, Pereira VB, Cara DC, Leclercq SY, et al. *Lactococcus lactis* carrying the pValac DNA expression vector coding for IL-10 reduces inflammation in a murine model of experimental colitis. *BMC Biotechnol.* 2014;14:1–11.
15. Que YA, Francois P, Haefliger JA, Entenza JM, Vaudaux P, Moreillon P. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infect Immun.* 2001;69:6296–302.
16. Guimarães V, Innocentin S, Chatel JM, Lefèvre F, Langella P, Azevedo V, et al. A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. *Genet Vaccines Ther.* 2009;7:1–7.
17. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology.* 1990;98:694–702.
18. Mathias A, Pais B, Favre L, Benyacoub J, Corthiüs B. Role of secretory IgA in the mucosal sensing of commensal bacteria. *Gut Microbes.* 2015. p. 688–95.
19. Zagato E, Mazzini E, Rescigno M. The variegated aspects of Immunoglobulin A. *Immunol Lett.* 2016;178:45–9.
20. Guimarães VD, Innocentin S, Lefèvre F, Azevedo V, Wal JM, Langella P, et al. Use of native lactococci as vehicles for delivery of DNA into mammalian epithelial cells. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:7091–7.

21. Chatel JM, Pothelune L, Ah-Leung S, Corthier G, Wal JM, Langella P. In vivo transfer of plasmid from food-grade transiting lactococci to murine epithelial cells. *Gene Ther.* 2008;15:1184–90.
22. Sinha B, Francois P, Que YA, Hussain M, Heilmann C, Moreillon P, et al. Heterologously expressed staphylococcus aureus fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun.* 2000;68:6871–8.
23. Innocentin S, Guimarães V, Miyoshi A, Azevedo V, Langella P, Chatel JM, et al. Lactococcus lactis expressing either Staphylococcus aureus fibronectin-binding protein A or Listeria monocytogenes internalin A can efficiently internalize and deliver DNA in human epithelial cells. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:4870–8.
24. Wirtz S, Popp V, Kindermann M, Gerlach K, Weigmann B, Fichtner-Feigl S, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nat Protoc.* Nature Publishing Group; 2017;12:1295–309.
25. Melgar S. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *AJP Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288:G1328–38.
26. Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15:341–52.
27. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol.* 2014;
28. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2004. p. 661–5.
29. Veloso TR, Chaouch A, Roger T, Giddey M, Vouillamoz J, Majcherczyk P, et al. Use of a human-like low-grade bacteremia model of experimental endocarditis to study the role of staphylococcus aureus adhesins and platelet aggregation in early endocarditis. *Infect Immun.* 2013;
30. Yan Y, Kolachala V, Dalmaso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman S V., et al. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One.* 2009;4.
31. Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2011;
32. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, et al. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut.*

2008;57:1682–9.

33. Cao AT, Yao S, Gong B, Elson CO, Cong Y. Th17 Cells Upregulate Polymeric Ig Receptor and Intestinal IgA and Contribute to Intestinal Homeostasis. *J Immunol.* 2012;
34. Nishikawa K, Seo N, Torii M, Ma N, Muraoka D, Tawara I, et al. Interleukin-17 induces an atypical M2-Like macrophage subpopulation that regulates intestinal inflammation. *PLoS One.* 2014;
35. Huang XL, Zhang X, Fei XY, Chen ZG, Hao YP, Zhang S, et al. Faecalibacterium prausnitzii supernatant ameliorates dextran sulfate sodium induced colitis by regulating Th17 cell differentiation. *World J Gastroenterol.* 2016;
36. Schmidt EGW, Larsen HL, Kristensen NN, Poulsen SS, Pedersen AML, Claesson MH, et al. TH17 cell induction and effects of IL-17A and IL-17F blockade in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;
37. Côtană CS, Neagoe IB, Cozma V, Magdaş C, Tăbăran F, Dumitraşcu DL. Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2015;21:5823–30.
38. Gobert AP, Cheng Y, Akhtar M, Mersey BD, Blumberg DR, Cross RK, et al. Protective role of arginase in a mouse model of colitis. *J Immunol.* 2004;173:2109–17.
39. Lin Y, Yang X, Yue W, Xu X, Li B, Zou L, et al. Chemerin aggravates DSS-induced colitis by suppressing M2 macrophage polarization. *Cell Mol Immunol.* 2014;11:355–66.
40. Garrido-Mesa J, Algieri F, Rodriguez-Nogales A, Utrilla MP, Rodriguez-Cabezas ME, Zarzuelo A, et al. A new therapeutic association to manage relapsing experimental colitis: Doxycycline plus *Saccharomyces boulardii*. *Pharmacol Res. Elsevier Ltd;* 2015;97:48–63.
41. Macpherson AJ, Yilmaz B, Limenitakis JP, Ganai-Vonarburg SC. IgA Function in Relation to the Intestinal Microbiota. *Annu Rev Immunol.* 2018;36.
42. Corthésy B. Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Front. Immunol.* 2013.
43. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2014. p. 329–42.
44. Park JH, Peyrin-Biroulet L, Eisenhut M, Shin J II. IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules. *Autoimmun Rev.* 2017;16:416–26.
45. Steeland S, Libert C, Vandenbroucke RE. A new venue of TNF targeting. *Int. J. Mol. Sci.* 2018.
46. Lopetuso LR, Petito V, Cufino V, Arena V, Stigliano E, Gerardi V, et al. Locally injected Infliximab ameliorates murine DSS colitis: Differences in serum and intestinal levels of drug

- between healthy and colitic mice. *Dig Liver Dis.* 2013;
47. Walldorf J, Hermann M, Porzner M, Pohl S, Metz H, Mäder K, et al. In-vivo monitoring of acute DSS-Colitis using Colonoscopy, high resolution Ultrasound and bench-top Magnetic Resonance Imaging in Mice. *Eur Radiol.* 2015;
48. Assas BM, Levison SE, Little M, England H, Battrick L, Bagnall J, et al. Anti-inflammatory effects of infliximab in mice are independent of tumour necrosis factor α neutralization. *Clin Exp Immunol.* 2017;
49. Naito Y, Takagi T, Handa O, Ishikawa T, Nakagawa S, Yamaguchi T, et al. Enhanced intestinal inflammation induced by dextran sulfate sodium in tumor necrosis factor- α deficient mice. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003;
50. Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, Männel DN, Andus T, Schölmerich J, et al. Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol.* 1997;107:353–8.
51. Bhol KC, Tracey DE, Lemos BR, Lyng GD, Erlich EC, Keane DM, et al. AVX-470: A novel oral Anti-TNF antibody with therapeutic potential in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;
52. Fries W, Muja C, Crisafulli C, Costantino G, Longo G, Cuzzocrea S, et al. Infliximab and etanercept are equally effective in reducing enterocyte apoptosis in experimental colitis. *Int J Med Sci.* 2008;
53. Shen C, De Hertogh G, Bullens DMA, Van Assche G, Geboes K, Rutgeerts P, et al. Remission-inducing effect of anti-TNF monoclonal antibody in TNBS colitis: Mechanisms beyond neutralization? *Inflamm Bowel Dis.* 2007;
54. Qiu W, Wu B, Wang X, Buchanan ME, Regueiro MD, Hartman DJ, et al. PUMA-mediated intestinal epithelial apoptosis contributes to ulcerative colitis in humans and mice. *J Clin Invest.* 2011;
55. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 2008;117:244–79.
56. Sambrook J, W Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harb Lab Press Cold Spring Harb NY. 2001;999.
57. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest.* 1993;69:238–49.
58. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 2008;3:1101–8.

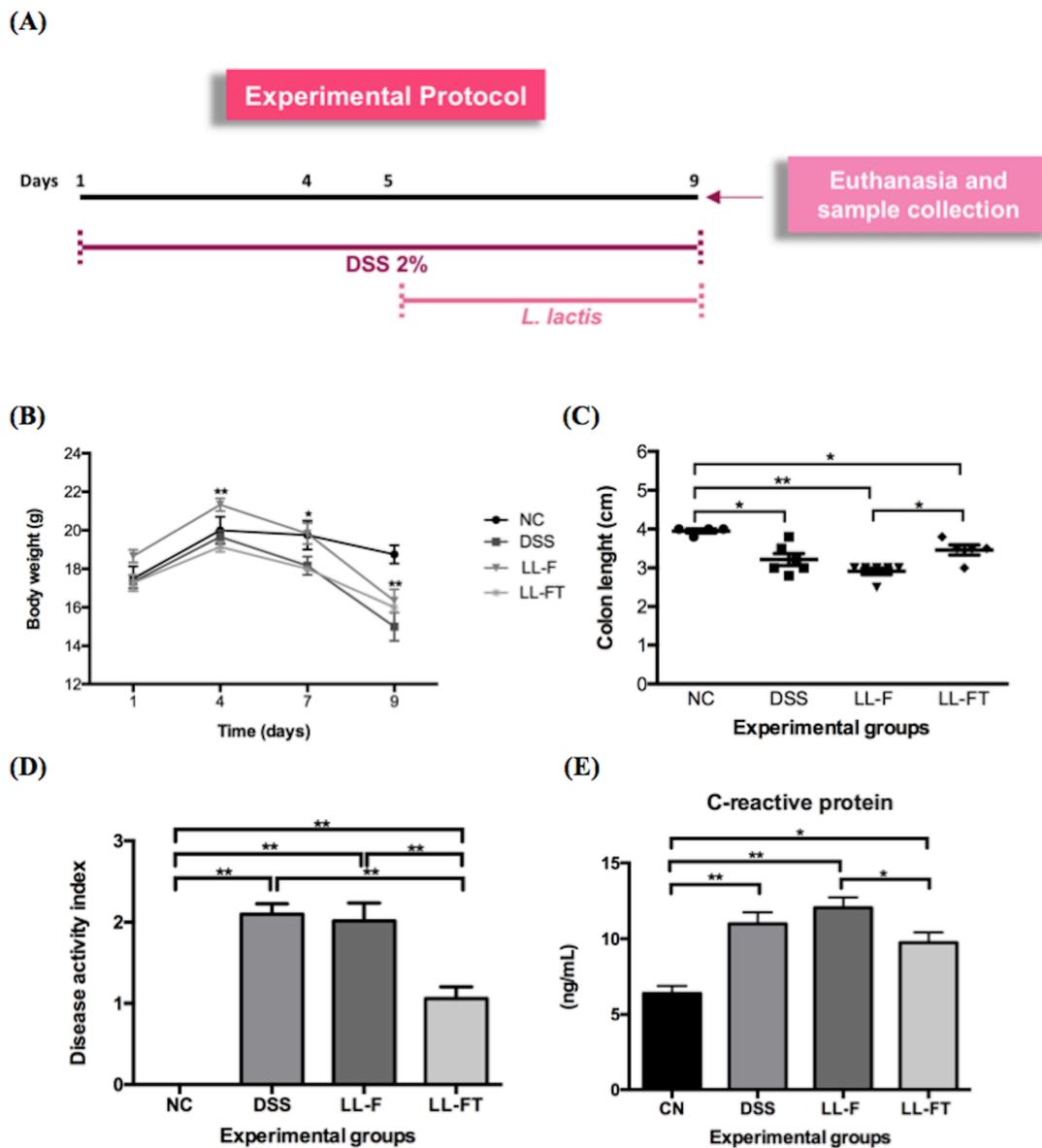


Figure 1 Effects of oral administration of LL-FT in DSS-induced colitis. (A) Experimental protocol is as follows: C57BL/6 mice received 2% DSS for 8 days (day 1 to day 8). Recombinant *L. lactis* was administered for 4 days (day 5 to day 8). Euthanasia occurred on day 9 (arrow). (B) Body weight was measured in grams from day 1 to 9. (C) Colon length was measured in centimeters after euthanasia. (D) Disease activity index (DAI) was evaluated on day 9 before euthanasia and included three major clinical signs related to weight loss, diarrhea and rectal bleeding. (E) Blood serum of mice was collected after euthanasia and measured by ELISA. Experimental groups are as follows: NC, negative control group; DSS, DSS group; LL-F, *L. lactis* MG1363 FnBPA+ group and LL-FT, *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::anti-TNF α) group. Data are expressed as the means \pm SEM from an experiment using 4-5 animals

per group. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test for charts and two-way ANOVA for curves; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

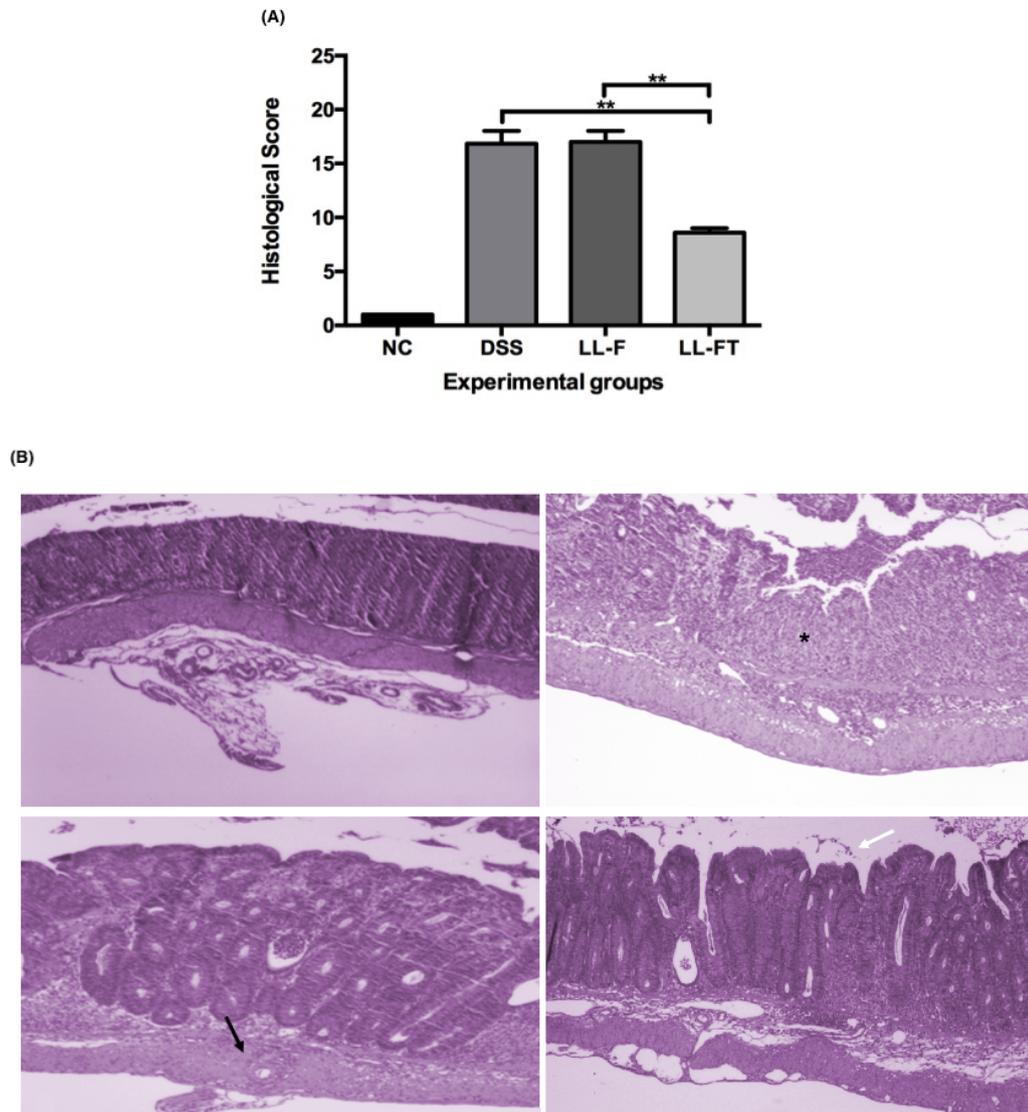


Figure 2 Histopathological score and histopathology of colonic tissue. (A) Histopathological score was determined from colon samples that were photographed in paraffin sections by H&E staining of a representative distal colon from each group. (B) Representative photos from distal colon tissue of a mouse from each experimental group are shown: *Star* ulceration; *black arrow* depletion of goblet cells; *white arrow* intestinal wall with intact mucosa and discrete inflammatory infiltrate. Experimental groups: NC, negative control group; DSS, DSS group; LL-F, *L. lactis* MG1363 FnBPA+ group and LL-FT, *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::anti-TNF α) group. Data are expressed as the means \pm SEM from an experiment using

4-5 animals per group and representative of three independent experiments. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

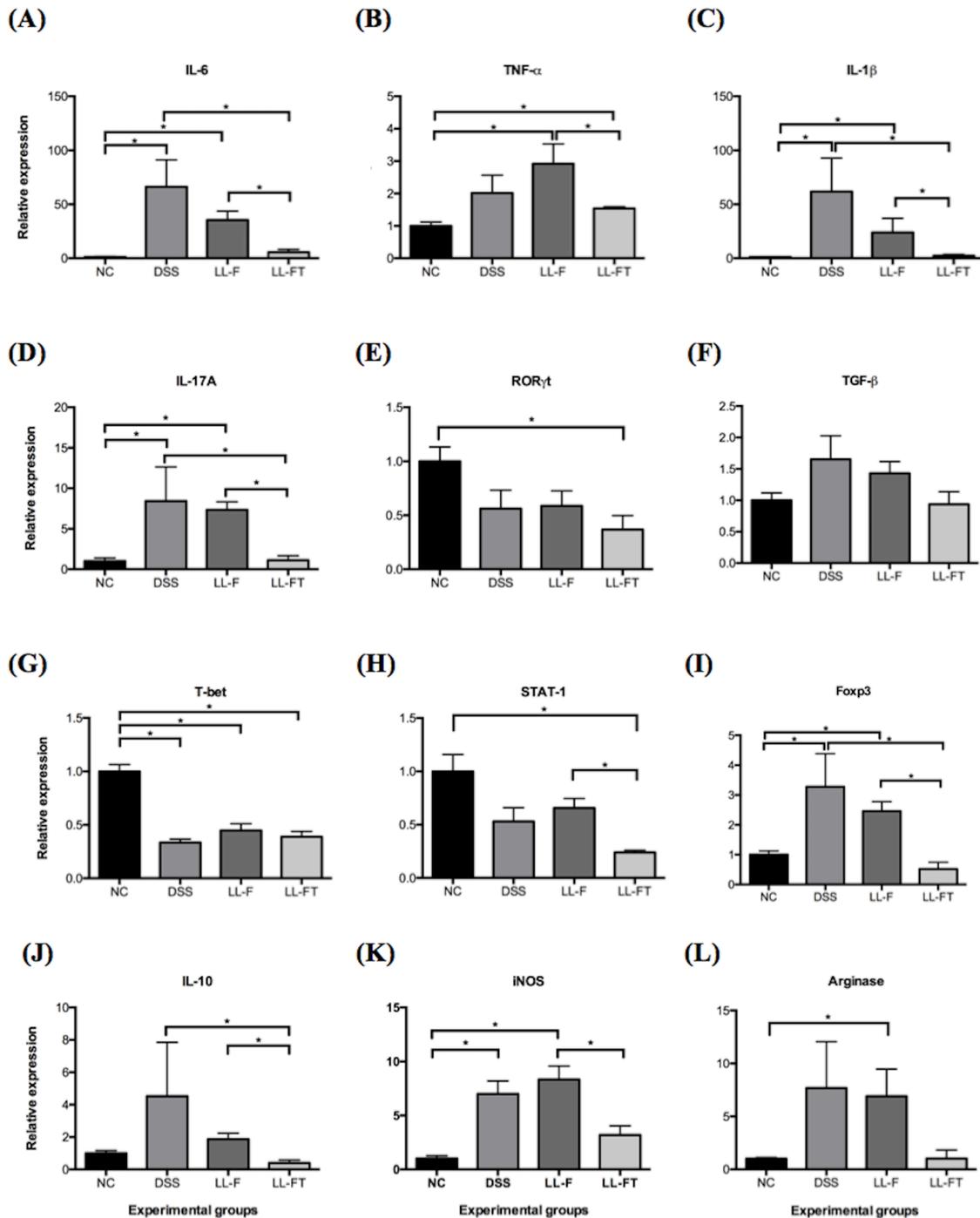


Figure 3 Effects of oral administration of LL-FT on mRNA expression levels in colonic tissue. Levels of mRNA were normalized to RPS9 mRNA. (A) IL-6, (B) TNF α , (C) IL-1 β , (D) IL-17A, (E) ROR γ t, (F) TGF- β , (G) T-bet, (H) STAT-1, (I) Foxp3, (J) IL-10, (K) iNOS, and (L) Arginase. Experimental groups: NC, negative control group; DSS, DSS group; LL-F, *L.*

lactis MG1363 FnBPA+ group and LL-FT, *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*) group. Data are expressed as the means \pm SEM from an experiment using 4-5 animals per group. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study.

| Plasmids | Characteristics | Reference |
|--|--|--|
| pValac | Eukaryotic expression vector (pCMV/Cm ^r /RepA/RepC) | [16] |
| pValac:: <i>anti-TNFα</i> | pValac containing <i>anti-TNFα</i> scFv ORF | This study. |
| Bacterial strain and plasmids | Characteristics | Reference |
| <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue | <i>E. coli</i> ; F'[Tn10 <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q $\Delta(lacZ)M15]$ <i>hsdR17</i> (<i>rK</i> ⁻ <i>mK</i> ⁺)/ Tet ^r | Stratagene® (Catalog n° #200249) |
| <i>Escherichia coli</i> TG1 | <i>E. coli</i> , K-12-derived strain; F' [<i>traD36 proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ <i>M15]</i> <i>supE thi-1</i> $\Delta(lac-proAB)$ $\Delta(mcrB-$ <i>hsdSM)5</i> , (<i>rK</i> ⁻ <i>mK</i> ⁻) | Lucigen, Middleton, MI, USA (Catalog n° 60502-1) [15], obtained from |
| <i>Lactococcus lactis</i> MG1363 FnBPA+ (LL-F) | <i>L. lactis</i> MG1363 strain expressing FnBPA of <i>S. aureus</i> (Ery ^r) | Laboratory of Cellular and Molecular Genetics (LGCM), Federal University of Minas Gerais (UFMG), Brazil, |

| | | |
|---|--|-------------|
| <i>Lactococcus lactis</i> MG1363 FnBPA+ (pValac:: <i>anti-TNFα</i>) (LL-FT) | <i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA+ strain carrying the pValac:: <i>anti-TNFα</i> plasmid (Cm ^r / Ery ^r) | This study. |
|---|--|-------------|

Cm^r chloramphenicol resistance; Tet^r tetracycline resistance; Ery^r erythromycin resistance.

Additional File

Mucosal delivery of an anti-TNF scFv expression vector carried by *Lactococcus lactis* ameliorates experimental colitis in mice

Maria José Chiabai¹, Juliana Franco Almeida², Mariana Gabriela Dantas de Azevedo¹, Suelen Soares Fernandes¹, Vanessa Bastos Pereira³, Raffael Júnior Araújo de Castro⁴, Márcio Sousa Jerônimo⁴, Isabel Garcia Sousa¹, Leonora Maciel de Souza Vianna⁵, Anderson Miyoshi³, Anamelia Lorenzetti Bocca⁴, Andrea Queiroz Maranhão¹, Marcelo de Macedo Brigido¹

Correspondence: Marcelo Macedo Brigido: brigido@unb.br

Additional Figures

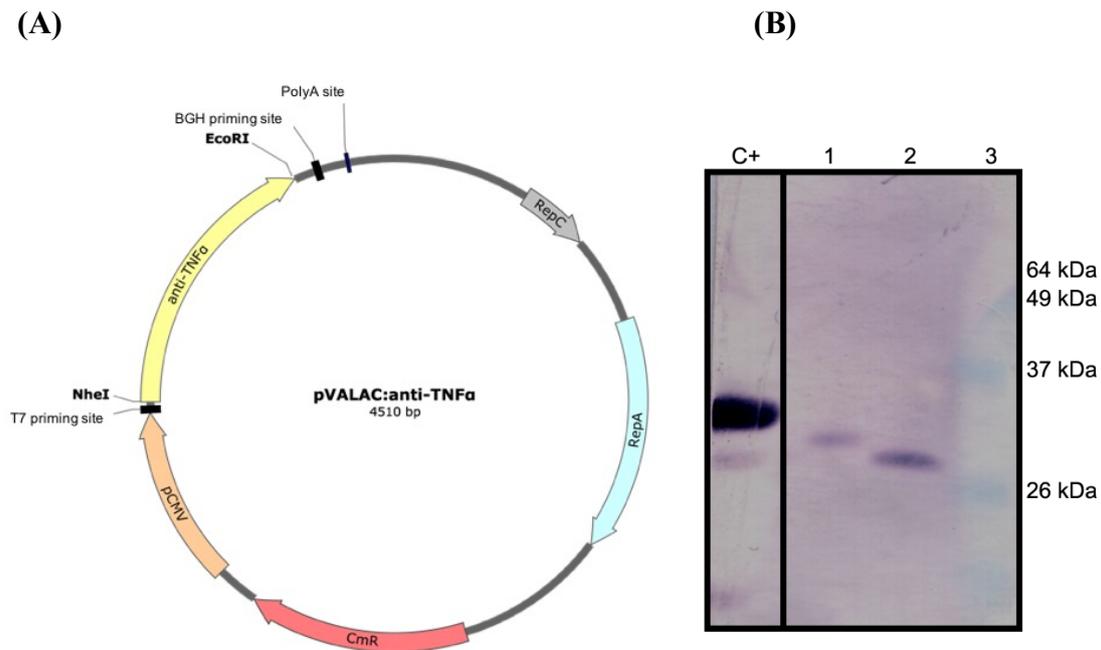


Figure S1 Structure of the eukaryotic expression vector pValac::*anti-TNF α* and scFv protein expression by HEK-293 on transfection assays. (A) Schematic representation of pValac::*anti-TNF α* plasmid harboring a cytomegalovirus promoter (pCMV), *anti-TNF α* ORF of *Mus musculus*, a polyadenylation signal of bovine growth hormone (BGH polyA), which are essential for expression of gene by eukaryotic host cells; *E. coli* (RepC) and *L. lactis* (RepA) origins of the replication to the prokaryotic region and chloramphenicol resistance gene (Cm) for bacterial selection. **(B)** Western blot shows the presence of scFv anti-TNF α (31 kDa) produced in the posttransfected supernatant of HEK-293 cell cultures. C+, scFv positive control; 1, supernatant of HEK-293 producing anti-TNF α ; 2, scFv anti-IL1 β positive control (30 kDa); and 3, BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

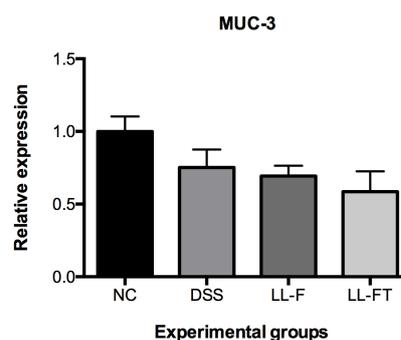


Figure S2 MUC-3 mRNA levels in colonic tissue. Levels of mRNA were normalized to RPS9 mRNA. Experimental groups: NC, negative control group; DSS, DSS group; LL-F, *L. lactis*

MG1363 FnBPA+ group and LL-FT, *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*) group. Data are expressed as the means \pm SEM from an experiment using 4-5 animals per group. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test.

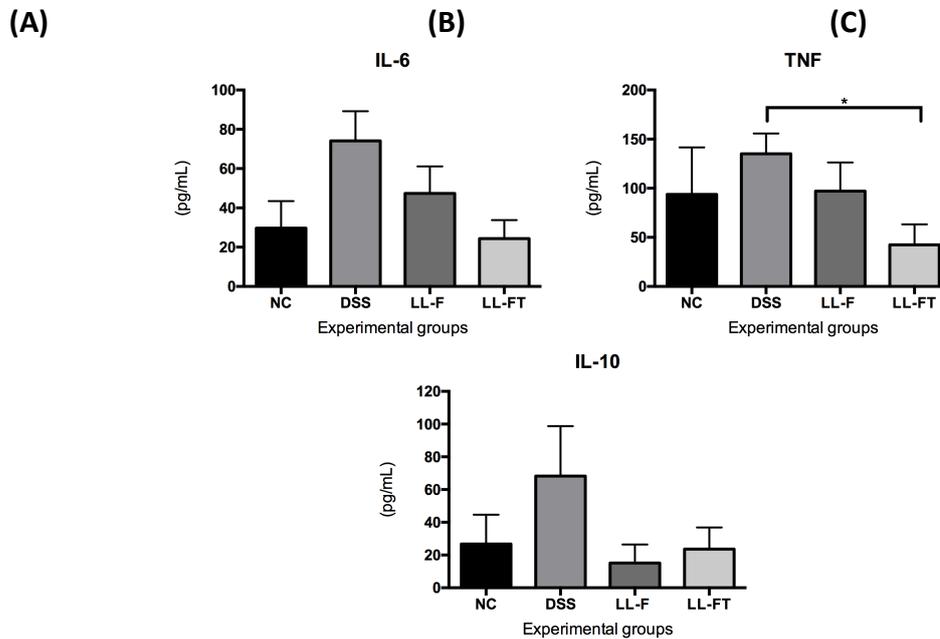


Figure S3 Effect of the treatment of colitis with LL-FT on systemic cytokines production. Systemic (A) IL-6, (B) TNF, and (C) IL-10 production levels in the serum of mice were analyzed by CBA. Experimental groups: NC, negative control group; DSS, DSS group; LL-F, *L. lactis* MG1363 FnBPA+ group and LL-FT, *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*) group. Data are expressed as the means \pm SEM from an experiment using 4-5 animals per group. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test. *p < 0.05.

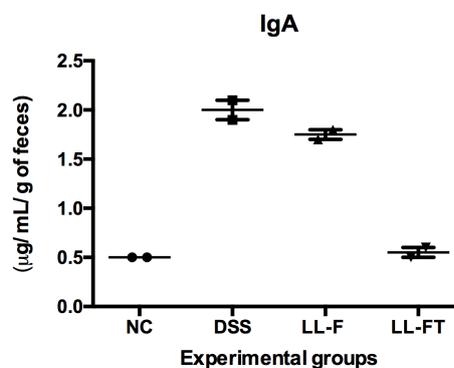


Figure S4 Changes in fecal IgA after oral administration of LL-FT. A pool of feces per group was collected 30 min before euthanasia, and the levels of fecal extract IgA were measured by ELISA. Experimental groups: NC, negative control group; DSS, DSS group; LL-F, *L. lactis* MG1363 FnBPA+ group and LL-FT, *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*) group.

Data are expressed as the means \pm SEM from an experiment using 4-5 animals per group. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test.

Additional Tables

Table S1 Primer sequences used in qPCR assay.

| Gene Target | Sequence 5' - 3' |
|--------------------|-------------------------------|
| <i>tbx21</i> | FW TCAGGACTAGGCGAAGGAGA |
| | RV GCCTTCGGTTTCCTTATCAA |
| <i>stat1</i> | FW TCACAGTGGTTCGAGCTTCAG |
| | RV GCAAACGAGACATCATAGGCA |
| <i>rorc</i> | FW TGCAAGACTCATCGACAAGG |
| | RV AGGGGATTCAACATCAGTGC |
| <i>arg1</i> | FW GTTCCCAGATGTACCAGGATTC |
| | RV CGATGTCTTTGGCAGATATGC |
| <i>nos2</i> | FW CGAAACGCTTCACTTCCAA |
| | RV TGAGCCTATATTGCTGTGGCT |
| <i>foxp3</i> | FW ACTCGCATGTTTCGCCTACTT |
| | RV AGGGATTGGAGCACTTGTTG |
| <i>Il6</i> | FW TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC |
| | RV TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC |
| <i>Il10</i> | FW CGCAGCTCTAGGAGCATGTG |
| | RV GCTCTTACTGACTGGCATGAG |
| <i>tgfb</i> | FW CTGACGTCACTGGAGTTGTACGG |
| | RV GGTTTCATGTCATGGATGGTGC |
| <i>il1b</i> | FW CTGACGTCACTGGAGTTGTACGG |
| | RV CAGCACGAGGCTTTTTTGTTG |
| <i>tnfa</i> | FW GTACCTTGTCTACTCCCAGGTTCTCT |
| | RV GTGGGTGAGGAGCACGTAGTC |
| <i>muc3</i> | FW 5CGTGGTCAACTGCGAGAATGG |
| | RV 5CGGCTCTATCTCTACGCTCTC |
| <i>il22</i> | FW GGTGACGACCAGAACATCCA |
| | RV CCCAATCGCCTTGATCTCTC |
| <i>rps9</i> | FW CGCCAGAAGCTGGGTTTGT |
| | RV CGAGACGCGACTTCTCGAA |
| <i>il17a</i> | FW TTTAACTCCCTTGCGCAAAA |
| | RV CTTTCCCTCCGCATTGACAC |

Table S2 Histological Score.

| Histological findings | Absent | Mild | Moderate | Severe |
|---|---------------|-------------|-----------------|---------------|
| Mucosal infiltrate | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Submucosal infiltrate | | | | |
| Muscle infiltrate | | | | |
| Serous infiltrate | | | | |
| Eosinophils | | | | |
| Muscle herniation | | | | |
| Inflammatory activity of glands | | | | |
| Abscesses of crypts | | | | |
| Erosion of mucosa | | | | |
| Mucosal ulceration without injury <i>Muscularis</i> | | | | |
| Long base ulcer | | | | |
| Muscle thickening | | | | |
| Depletion of goblet cells | | | | |