



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Mariana Gabriela Dantas de Azevêdo

**Expressão heteróloga de fragmentos de anticorpos em  
*Saccharomyces boulardii* para tratamento da colite experimental**



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Mariana Gabriela Dantas de Azevêdo

**Expressão heteróloga de fragmentos de anticorpos em  
*Saccharomyces boulardii* para tratamento da colite experimental**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade e Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre (a) em Patologia Molecular.

**Orientadora:** Andréa Queiroz Maranhão

**Coorientador:** Marcelo de Macedo Brígido

2021

Mariana Gabriela Dantas de Azevêdo

**Expressão heteróloga de fragmentos de anticorpos em  
*Saccharomyces boulardii* para tratamento da colite experimental**

Trabalho desenvolvido no laboratório de  
Imunologia Molecular da Universidade  
de Brasília, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
Andréa Queiroz Maranhão.

**BANCA EXAMINADORA**

Dra. Andréa Queiroz Maranhão	Presidente da banca
Dr. Spartaco Astolfi Filho	Membro titular
Dra. Lidia Maria Pepe de Moraes	Membro titular
Dra. Juliana Franco Almeida	Membro suplente

“Os grandes feitos são conseguidos  
não pela força, mas pela perseverança.”

Samuel Johnson

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me abençoado em mais uma conquista, por ter me dado força e determinação para superar os momentos difíceis e concluir essa etapa.

Aos meus pais, Manoel e Luzia e ao meu irmão Arthur, pelo apoio total durante toda a minha vida. Sou eternamente grata por todo amor, carinho, motivação, acolhimento, torcida e força que me deram durante esse período, sem vocês eu nada seria e a vocês dedico essa vitória.

À professora Andrea Maranhão e ao professor Marcelo Brígido, pela oportunidade e confiança, por todos os ensinamentos, correções e incentivos desde a iniciação científica. Agradeço muito pela amizade, dedicação, disponibilidade e paciência durante todos os momentos.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Molecular, que compartilharam muitos momentos bons e principalmente pelas ajudas e dicas nos experimentos. À Maria José pelos ensinamentos que me ajudaram durante o mestrado. À Suélen que iniciou essa pesquisa comigo, pela amizade e por sempre me motivar. À Manuela e Vitor que passaram todos os perrengues do experimento com os animais comigo, em especial à Manu que compartilhou tantas frustrações e vitórias, sempre me ajudou com novas ideias e a programar os experimentos. À Sylvia, que me acompanhou e ajudou na reta final. À Jacyelle e Phillipe pela amizade, companhia, momentos de descontração e cafés na copa. E todos outros colegas pelos bons momentos e amizade: Luís, Isabel, Ronny, Renato, Amanda, Ana Clara e Daiane.

Aos meus familiares, que mesmo de longe torceram por mim. Aos meus amigos que me incentivaram e estiveram presentes nos momentos que mais precisei me alegrando e apoiando. Aos amigos do mexe-mexe por todos os momentos de descontração e pela torcida. Amo todos vocês!

Aos diferentes professores e alunos que me ajudaram nos experimentos com dicas e protocolos. Aos funcionários do biotério, por todo o apoio durante o experimento *in vivo*. À Viviane Reis, pelos plasmídeos, *primers*, dicas e dúvidas sanadas. Às professoras Anamélia e Janice, por toda ajuda e por sempre serem tão solícitas.

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

À Faculdade de Medicina e ao programa de pós-graduação em Patologia Molecular da UnB, pelo apoio financeiro e tecnológico.

Aos membros da banca, pela disponibilidade para participação e avaliação.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

## RESUMO

Doenças Inflamatórias Intestinais são um grupo de desordens inflamatórias crônicas que envolve a Doença de Crohn e a Colite Ulcerativa. A Colite Ulcerativa é uma inflamação recorrente da mucosa que se inicia no reto e pode se estender até o cólon. Atualmente anticorpos neutralizantes de TNF aplicados por via intravenosa são os melhores medicamentos disponíveis para induzir e manter a remissão nos pacientes, mas o custo dessas terapias é muito alto além de gerar efeitos colaterais. *Saccharomyces boulardii* é uma levedura probiótica utilizada em medicamentos comerciais para tratamento de doenças intestinais, estudos sugerem o potencial de probióticos serem adaptados para a síntese e entrega de terapias orais. Assim a *S. boulardii* pode ser usada como veículo de entrega de anticorpos neutralizantes ao trato gastrointestinal, restringindo a resposta ao local da inflamação, para tratamento de diferentes doenças como a Colite Ulcerativa. Determinou-se a curva de crescimento desta levedura, bem como o grau de sensibilidade ao antibiótico G418 (50 µg/mL). Em experimentos com camundongos foi possível ainda estabelecer que o tempo de permanência desta levedura no trato digestório de camundongos quando administrada por gavagem era de 48 horas. Dois vetores foram construídos possibilitando a expressão de dois fragmentos scFv de anticorpos (anti-TNF e anti-CD3) na levedura. O protocolo de transformação da levedura foi otimizado e leveduras recombinantes obtidas. As condições de cultivo visando a maior eficiência de expressão dos genes foram estudadas, tendo sido estabelecida: 30°C, 200 rpm, em meio definido YNB tamponado (pH 5,5) por 72 horas. A expressão do scFv anti-TNF foi monitorada no sobrenadante de cultura, sendo este o primeiro relato de expressão heteróloga de um anticorpo pela *S. boulardii*. Já o scFv anti-CD3 foi expresso fusionado à proteína de parede SED1, sendo este o primeiro relato de apresentação de um fragmento de anticorpo na parede celular dessa levedura. Quando a *S. boulardii* produtora do scFv anti-TNF foi administrada oralmente em camundongos com colite induzida por Dextrana Sulfato de Sódio houve uma melhora do índice de atividade da doença quando comparado ao grupo doente sem tratamento, o que indica o efeito da neutralização do TNF para diminuição da inflamação.

**Palavras-chave:** *Saccharomyces boulardii*; scFv; anti-TNF; anticorpos neutralizantes; Colite Ulcerativa.

## ABSTRACT

Inflammatory Bowel Diseases are a group of chronic inflammatory disorders that involve Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. Ulcerative Colitis is a recurrent inflammation of the mucosa that begins in the rectum and can extend to the colon, the best available drugs to induce and maintain remission in patients are intravenously administered antibodies that neutralize TNF, but the costs of these therapies are very high in addition to generating side effects. *Saccharomyces boulardii* is a probiotic yeast used in commercial medicines for the treatment of intestinal diseases, studies suggest the potential of probiotics to be adapted for the synthesis and delivery of oral therapies. Thus, *S. boulardii* can be used as a vehicle for the delivery of neutralizing antibodies to the gastrointestinal tract, restricting the response to the inflammation site, for the treatment of different diseases such as Ulcerative Colitis. The growth curve of this yeast was determined, as well as the sensitivity to the antibiotic G418 (50 µg/mL). In experiments with mice, it was established that the time of permanence of this yeast in the digestive tract of mice when administered by oral gavage was 48 hours. Two vectors were constructed allowing the expression of two scFv fragments (anti-TNF and anti-CD3) by the yeast. Yeast transformation protocol has been optimized and recombinant yeasts were obtained. The best cultivation conditions for gene expression were studied, and established as: 30°C, 200 rpm, in the defined medium YNB with buffer (pH 5.5). The expression of the scFv anti-TNF was monitored in the culture supernatant, which was the first report of a heterologous expression of an antibody by *S. boulardii*. Anti-CD3 scFv, on the other hand, was expressed fused to the SED1 wall protein, this being the first report of an antibody fragment presentation on the cell wall. When the *S. boulardii* producing the scFv anti-TNF was administered orally to mice with colitis induced by Dextran Sodium Sulfate, the disease activity index improved when compared to the untreated sick group, which indicates the effect of TNF neutralization for decreasing inflammation.

**Key words:** *Saccharomyces boulardii*; scFv; anti-TNF; neutralizing antibodies; Ulcerative Colitis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Incidência da Colite Ulcerativa no mundo dos anos 1990 a 2016 .....	25
Figura 2 - Cronograma do experimento <i>in vivo</i> .....	41
Figura 3 - Efeito da temperatura no crescimento da <i>S. boulardii</i> .....	46
Figura 4 – Aumento da taxa de crescimento da <i>S. boulardii</i> .....	48
Figura 5 - Curva de crescimento da <i>S. boulardii</i> em meio definido.....	49
Figura 6 - Curva de resistência a Geneticina.....	50
Figura 7 – Representação esquemática dos plasmídeos pYC230 e pYCTNF.....	53
Figura 8 - Análise do perfil de restrição dos vetores pYC230 e pYCTNF .....	54
Figura 9 - Análise dos amplicons obtidos a partir de PCR de colônia de transformantes da <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	55
Figura 10 - Curva de crescimento das diferentes linhagens de <i>S. boulardii</i> .....	56
Figura 11 – Comparação da produção e secreção do scFv anti-TNF em diferentes temperaturas .....	57
Figura 12 - Imunodeteção do scFv anti-TNF em diferentes extratos celulares .....	58
Figura 13 – Produção do scFv anti-TNF nas condições ótimas de cultivo da levedura.....	59
Figura 14 – Produção do fragmento scFv anti-TNF em meio definido.....	60
Figura 15 - Purificação do anticorpo anti-TNF por Cromatografia de Exclusão Molecular....	61
Figura 16 – Avaliação da atividade biológica do scFv anti-TNF .....	63
Figura 17 - Tempo de permanência da <i>S. boulardii</i> no TGI de camundongos C57Black.....	64
Figura 18 - Parâmetros macroscópicos da Colite no dia da eutanásia.....	65
Figura 19 - Efeito do tratamento com <i>S. boulardii</i> no peso corporal dos grupos.....	66
Figura 20 - Níveis de expressão do RNA no cólon dos grupos.....	68
Figura 21 - Representação esquemática do plasmídeo para expressão do scFv anti-CD3.....	70
Figura 22 - Confirmação da síntese do vetor de expressão pYCCD3 .....	71
Figura 23 - Curva de crescimento da <i>S. boulardii</i> transformada com o pYCCD3.....	72
Figura 24 – Imunodeteção do fragmento scFv anti-CD3 em diferentes extratos celulares....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos anticorpos monoclonais anti-TNF aprovados pela FDA para tratamento de DIIs. ....	23
Tabela 2 - Descrição das linhagens recombinantes construídas utilizadas no trabalho. ....	30
Tabela 3 - Sequência dos iniciadores para PCR.....	34
Tabela 4 - Separação dos grupos do experimento <i>in vivo</i> .....	41
Tabela 5 - Escores do índice de atividade da doença. ....	42
Tabela 6 - Iniciadores para os diferentes genes utilizados na qPCR. ....	43
Tabela 7 - Condições de ciclagem para qPCR com RNA total do cólon. ....	44
Tabela 8 - Efeito da Geneticina na <i>S. boulardii</i> . ....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

AP	Fosfatase Alcalina
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	DNA complementar
CDR	Regiões Determinantes de Complementaridade
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEUA	Comitê de Ética de Uso Animal
CU	Colite Ulcerativa
DAI	Índice de Atividade da Doença
DC	Doença de Crohn
DIIs	Doenças Inflamatórias Intestinais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSS	Dextrana Sulfato de Sódio
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FDA	Food and Drug Administration
<i>g</i>	Força gravitacional
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GRAS	Microrganismo Geralmente Considerado Como Seguro
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
kb	quilobase
kDa	quilodalton
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
mAB	Anticorpo Monoclonal
NHS	Nacional Health Service
OD <sub>600</sub>	Densidade Óptica a 600nm
pb	Pares de base
PCR	Reação de Cadeia Polimerase
pI	Ponto Isoelétrico
qPCR	PCR quantitativa em tempo real

RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações Por Minuto
scFv	Fragmento Variável de Cadeia Única
SDS	Sódio Duodecil Sulfato
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
TGF	Fator de Crescimento Transformante
TGI	Trato gastrointestinal
Th	Linfócito T helper
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Treg	Linfócito T regulatório
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV <sub>280</sub>	Ultravioleta a 280 nm
YNB	Meio de cultura Yeast Nitrogen Base

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT .....	VIII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS .....	XI
SUMÁRIO.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Probióticos como terapias.....	17
1.1.1 Probióticos geneticamente modificados .....	17
1.2 <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	18
1.2.1 Expressão Heteróloga em <i>S. boulardii</i> .....	19
1.3 Colite Ulcerativa.....	20
1.4 Terapias com anticorpos monoclonais .....	22
1.4.1 Terapias com anti-TNF.....	22
1.4.2 Terapias com anti-CD3.....	23
2. JUSTIFICATIVA .....	25
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivo Geral .....	28
3.2. Objetivos Específicos .....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1. Linhagens Utilizadas e Condições de Cultivo.....	29
4.1.1. Otimização do Crescimento.....	29
4.1.2. Cultivo em Meio YNB .....	29
4.2. Plasmídeos .....	30

4.3.	Curva de Crescimento e de Resistencia ao Antibiótico.....	30
4.4.	Determinação das faixas de concentrações inibitória e fungicida da Geneticina.....	31
4.5.	Digestão Enzimática dos Plasmídeos .....	31
4.6.	Eletroforese em Gel de Agarose.....	32
4.7.	Transformação em <i>Saccharomyces boulardii</i> por Eletroporação.....	32
4.8.	PCR de Colônia .....	33
4.9.	Produção do scFv Anti-TNF.....	34
4.9.1.	Produção em meio YPD .....	34
4.9.2.	Produção em meio YNB.....	34
4.9.3.	Preparo das Amostras do Sedimento de Células .....	35
4.9.4.	Preparo das Amostras do Sobrenadante de Cultura.....	35
4.9.5.	Gel Desnaturante de Poliacrilamida .....	35
4.9.6.	Condições de Corrida .....	36
4.9.7.	Coloração do gel com Coomassie Blue.....	36
4.9.8.	Coloração do gel com prata .....	36
4.9.9.	Imunodeteção por Western Blot .....	37
4.10.	Purificação e quantificação do scFv Anti-TNF .....	38
4.11.	ELISA.....	38
4.12.	Contagem de Células Viáveis.....	39
4.13.	Experimento <i>in vivo</i> .....	39
4.13.1.	Tempo de Permanência da <i>S. boulardii</i> no Intestino de Camundongo .....	39
4.13.2.	Preparo das Doses para Gavagem .....	40
4.13.3.	Separação dos Grupos .....	40
4.13.4.	Indução da Colite Experimental e Eutanásia.....	41
4.13.5.	Disease Activity Index (DAI).....	42
4.13.6.	Extração de RNA Total do Tecido Intestinal .....	42

4.13.7.	qPCR.....	42
4.14.	Produção do anticorpo anti-CD3 associado à parede .....	44
4.14.1.	Cultivo em meio YPD .....	44
4.14.2.	Preparo das Amostras .....	45
4.14.3.	Imunodeteção por Dot Blot.....	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1.	Caracterização da <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	46
5.1.1.	Determinação da Temperatura Ótima de Crescimento.....	46
5.1.2.	Estabelecimento de Condições Ideias de Crescimento.....	47
5.1.3.	Crescimento em Meio YNB .....	48
5.1.4.	Curva de Resistência a Neomicina .....	49
5.1.5.	Determinação da faixa de concentração fungicida e fungistática do antibiótico. ....	50
5.2.	Construção do vetor pYCTNF.....	51
5.3.	Transformação da Levedura <i>S. boulardii</i> .....	54
5.3.1.	Curva de Crescimento dos Transformantes.....	55
5.4.	Produção do scFv Anti-TNF.....	56
5.4.1.	Produção a 30°C e 37°C.....	56
5.4.2.	Compartimentalização do anticorpo recombinante .....	57
5.4.3.	Otimização da Produção.....	58
5.4.4.	Produção em Meio YNB .....	59
5.5.	Purificação do scFv .....	60
5.6.	ELISA.....	62
5.7.	Experimento <i>in vivo</i> .....	63
5.8.	Construção do plasmídeo de expressão pYCCD3.....	69
5.9.	Confirmação do plasmídeo e Transformação na <i>S. boulardii</i> .....	70
5.10.	Curva de Crescimento .....	71

5.11. Produção em meio YPD .....	72
6. CONCLUSÃO.....	74
7. PERSPECTIVAS.....	75
8. REFERÊNCIAS .....	76

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Probióticos como terapias

Probióticos são microrganismos vivos não patogênicos que conferem benefícios à saúde humana quando administrados em quantidades adequadas, sendo que muitos fazem parte da microbiota intestinal humana normal. Os probióticos têm sido usados para tratar condições não gastrointestinais, mas há mais evidências do uso de probióticos para tratamento de condições relacionada ao Trato Gastrointestinal (TGI) principalmente para Diarreia aguda (ISLAM, 2016).

Há comprovações de que probióticos são eficazes para Diarreia infecciosa aguda, Diarreia associada a antibióticos, Diarreia associada a *Clostridium difficile*, Encefalopatia Hepática, Colite Ulcerativa, Síndrome do Intestino Irritável e Enterocolite Necrosante, mas há indícios de que não são eficazes para Pancreatite Aguda e Doença de Crohn. A eficácia dos probióticos pode ser específica para cada espécie, dose e doença, e a duração da terapia depende da indicação clínica (WILKINS; SEQUOIA, 2017).

As espécies de probióticos mais estudadas incluem *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces*. Quando ingeridos por via oral, os probióticos passam pelo estômago e se fixam na mucosa intestinal, impedindo a fixação epitelial de bactérias patogênicas e também possuem efeitos imunomoduladores. Assim têm um papel importante na manutenção do equilíbrio imunológico no TGI por meio da interação direta com as células do sistema imune. Entre os benefícios de saúde atribuídos aos probióticos, a sua capacidade de interagir com o sistema imunológico do hospedeiro é a mais estudada. Ademais, os probióticos também podem atuar reduzindo o estresse oxidativo e mantendo a homeostase da barreira epitelial. Esses microrganismos são seguros para crianças, adultos e idosos, mas recomenda-se cautela em populações imunologicamente vulneráveis (BERMÚDEZ-HUMARÁN; LANGELLA, 2017; ISLAM, 2016; WILKINS; SEQUOIA, 2017).

### 1.1.1 Probióticos geneticamente modificados

Novas abordagens combinando probióticos e engenharia genética para criação de probióticos geneticamente modificados que permitem o direcionamento preciso de moléculas de interesse para a mucosa representam uma alternativa para o tratamento de doenças intestinais. Vários estudos mostram a eficácia desses microrganismos modificados, como por

exemplo administração oral em camundongos com o cólon inflamado de *Bifidobacterium longum* geneticamente modificada para produzir Interleucina-10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória. A administração oral de *L. casei* BL23 que produz Elafina (um inibidor de protease endógeno encontrado no intestino humano) previne a inflamação, acelera a cicatrização da mucosa e restaura a homeostase do cólon em modelo de Colite em camundongos. Além disso, um ensaio clínico de fase II utilizou *L. lactis* expressando IL-10 humana para tratamento de pacientes com Doença de Crohn. Atualmente, vários modelos estão em estudo para apoiar o uso de probióticos geneticamente modificados como novas terapias para doenças humanas, em particular Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs) (BERMÚDEZ-HUMARÁN; LANGELLA, 2017).

Um estudo feito no Laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília, utilizou o probiótico *Lactococcus lactis* como veículo de entrega de um vetor de expressão do anticorpo anti-TNF para os enterócitos de camundongos em modelo de Colite induzida por Dextrana Sulfato de Sódio (DSS) (CHIABAI *et al.*, 2019). Esse trabalho demonstrou a diminuição da inflamação atestando os efeitos benéficos da bactéria e do anticorpo neutralizante de Fator de Necrose Tumoral (TNF), diminuindo os sintomas da doença nos camundongos tratados.

## 1.2 *Saccharomyces boulardii*

A levedura *Saccharomyces boulardii* foi descoberta na fruta lichia pelo microbiologista francês Henri Boulard nos anos 1920 na Indochina (ALTMANN, 2018). *S. boulardii* é uma levedura poliploide e probiótica, amplamente utilizada em medicamentos comerciais (como por exemplo o Floratil®) que atuam por meio da reconstituição da microbiota intestinal para o tratamento de diversas doenças gastrointestinais como por exemplo: Diarreia infecciosa, Diarreia associada a antibióticos, e DIIs (ALTMANN, 2018; DOURADINHA *et al.*, 2013).

Nesse contexto, a *S. boulardii* é classificada como GRAS (do inglês, *generally recognized as safe*) pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), é um microrganismo geralmente considerado como seguro e seu caráter probiótico garante uma ampla variedade de efeitos benéficos ao hospedeiro: a estabilização da barreira gastrointestinal, regulação da homeostase da microbiota intestinal, interferência na capacidade de patógenos colonizar a mucosa do intestino e modulação das respostas imunes locais e sistêmicas (KELESIDIS; POTHOUKAKIS, 2012).

Para preservar a integridade da barreira epitelial, essa levedura atua fortalecendo as junções comunicantes dos enterócitos aumentando a expressão de E-cadherina e catenina p120, estimula a produção de glicoproteínas e ácidos graxos de cadeia curta, reduz a Mucosite gastrointestinal, além de prevenir a apoptose e síntese de TNF. Ainda, ela é capaz de interferir direta e indiretamente na colonização de patógenos intestinais pois além de inibir seu crescimento, interfere com a ligação aos receptores intestinais e neutraliza os fatores de virulência (KELESIDIS; POTHOUKAKIS, 2012; MCFARLAND, 2010).

A *S. boulardii* é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro por meio da atenuação da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF e IFN- $\gamma$ ) e aumento da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10; estimulação de células T regulatórias (Treg); aumento dos níveis de Imunoglobulina A (IgA) secretado; inibição da ativação de células T por células dendríticas; e retenção das células T auxiliares nos linfonodos mesentéricos, reduzindo assim a inflamação. A levedura estabelece uma redução da resposta pro-inflamatória e promove uma sinalização anti-inflamatória nas mucosas que compreende: interferência com as vias de transdução de sinal mediadas por NF- $\kappa$ B, bloqueio da ativação de ERK1/2 e MAP quinases e a estimulação da produção de moléculas anti-inflamatórias em colonócitos, como PPAR- $\gamma$  (KELESIDIS; POTHOUKAKIS, 2012; MCFARLAND, 2010).

### **1.2.1 Expressão Heteróloga em *S. boulardii***

Estudos sugerem o potencial de microrganismos probióticos de serem adaptados para a síntese e entrega de terapias orais. A *Saccharomyces boulardii* seria especialmente adequada para este propósito devido à sua capacidade de realizar modificações pós-traducionais, o que não ocorre em células procarióticas, assim tem o potencial de expressar uma ampla variedade de proteínas terapêuticas. Foi demonstrado que a *S. boulardii* consegue expressar proteínas heterólogas a um nível comparável a de *S. cerevisiae*, e consegue manter esses níveis de expressão mesmo após a passagem pelo TGI murino (HUDSON *et al.*, 2014). Como um veículo de entrega de drogas ou agentes antimicrobianos ao TGI, *S. boulardii* é mais adequada do que *S. cerevisiae*, devido à melhor tolerância de sobreviver a alta temperatura e baixo pH, ou seja, melhor sobrevivência na passagem pelo estômago (LI *et al.*, 2020).

Poucos estudos focaram na produção de proteínas heterólogas pela *S. boulardii*, sendo demonstrado até o momento a produção de: IL-10, Microneme-2 (proteína do parasita *Eimeria tenella*), GFP (proteína fluorescente verde), Lisozima humana, Ovalbumina e Leucocina C. Essas proteínas foram produzidas e secretadas ou apresentadas na parede celular. Por meio da

expressão heteróloga, os benefícios da *S. boulardii* poderiam ser aumentados com a combinação dos seus efeitos probióticos e distribuição de substâncias bioativas de interesse terapêutico (LI *et al.*, 2020).

### 1.3 Colite Ulcerativa

Desordens inflamatórias crônicas como a Doença de Crohn (DC) e Colite Ulcerativa (CU), são classificadas em um grupo de Doenças Inflamatórias Intestinais. A inflamação na DC se apresenta com lesões irregulares que podem estar espalhadas em qualquer parte do TGI, causando inflamação transmural (de todas as camadas da parede intestinal). Em contraste, a CU é caracterizada pela inflamação recorrente da mucosa e submucosa, causando dano superficial à parede intestinal, que se inicia no reto e pode se estender até o cólon de forma contínua (KOBAYASHI *et al.*, 2020).

Sabe-se que a CU pode ocorrer em todas as idades, apresentando seu pico de início em pacientes entre 30 e 40 anos, mas estudos recentes sugerem que a fisiopatologia da doença é diferente em crianças e adultos, apesar de ter o mesmo fenótipo. Além disso é relatado que a incidência da CU é igual entre os sexos, e ainda que sejam necessários mais estudos, a etnia aparentemente não desempenha um papel importante na epidemiologia dessa enfermidade (KOBAYASHI *et al.*, 2020; UNGARO *et al.*, 2017).

Os sintomas da CU incluem: diarreia sanguinolenta, aumento da frequência de evacuações, perda de peso e de apetite, dores e cólicas abdominais, náuseas, febre e anemia (Chrons and Colitis Foundation, 2020). Essas apresentações podem variar de acordo com a severidade da doença, e além disso pacientes com Colite podem desenvolver manifestações extra intestinais, sendo a Artrite Periférica a mais comum, e com maiores chances de desenvolver Tromboembolismo Venoso, Câncer Colorretal, Câncer Anal e outras patologias intestinais (UNGARO *et al.*, 2017).

O tratamento atual dessas enfermidades tem como objetivo principal melhorar a qualidade de vida e saúde do paciente, eliminando completamente os sintomas da doença ou mantendo a doença em estabilidade, evitando o tratamento cirúrgico (colectomia). O tratamento varia a depender do grau da doença e da resposta de cada indivíduo à terapia, e pode envolver a administração de altas doses de corticosteroides, aminosalicilatos, imunossupressores ou anticorpos monoclonais. Todos esses medicamentos são eficazes no tratamento dos sintomas e podem levar à remissão da doença, mas geram vários efeitos colaterais nos pacientes e nenhum leva à cura da doença (NEURATH, 2017; NHS, 2019).

A etiologia da CU ainda é desconhecida, mas acredita-se que vários fatores contribuem para o seu desenvolvimento, incluindo: pré-disposição genética, uma resposta imune desregulada, microbiota intestinal alterada (disbiose) e fatores ambientais, que juntos levam à perda da tolerância imunológica pela microbiota entérica mediada por uma produção anômala de citocinas (KOBAYASHI *et al.*, 2020; SANCHEZ-MUÑOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-FURUSHO, 2008). Assim, ocorre uma diminuição da diversidade de espécies na microbiota o que leva a suscetibilidade do hospedeiro à colonização por microrganismos patogênicos (ANANTHAKRISHNAN *et al.*, 2018).

Um dos principais fatores da patogênese da CU é a quebra da integridade e perda da função da barreira epitelial, resultando na estimulação das células imunes locais, produção de quimiocinas e infiltração de células imunes que exacerbam a inflamação, o que pode levar a cronicidade da doença. Além disso, pacientes com Colite apresentam uma camada de muco mais fina e elevados níveis de TNF que contribuem para a menor resistência da barreira intestinal (KOBAYASHI *et al.*, 2020).

Citocinas estão amplamente envolvidas na patogênese das DIIs por terem um papel crucial no controle da inflamação intestinal, nos sintomas clínicos associados e por possivelmente regular as manifestações extra intestinais. TNF solúvel e na sua forma associada à membrana, produzido por células mononucleares da lâmina própria (camada de tecido conjuntivo subjacente ao epitélio) como macrófagos CD14<sup>+</sup>, fibroblastos, células T e adipócitos, é uma das principais citocinas dessa patologia (NEURATH, 2014). A sinalização por TNF induz efeitos pró-inflamatórios como: aumento da produção de moléculas de adesão e angiogênese; indução da produção das interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6, eicosanóides e glicocorticoides; indução de necroptose e apoptose; ativação e proliferação de macrófagos, fibroblastos, células T e células Natural Killers. O TNF atua em células vizinhas, por mecanismos parácrinos, e nas próprias células produtoras, em um mecanismo autócrino (NEURATH, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Pacientes com CU tem a produção de TNF aumentada, assim como IL-6, IL-1, IL-13, IL-36 e IL-23 (KOBAYASHI *et al.*, 2020; NEURATH, 2014).

Vários estudos mostram que a *Saccharomyces boulardii* tem um potencial terapêutico para o tratamento de CU. Essa levedura age diminuindo a inflamação causada pela doença através de uma alteração do comportamento migratório das células T (que se acumulam nos linfonodos mesentéricos), o que limita a infiltração de células Th1 no cólon inflamado; melhorando a integridade da barreira intestinal; reduzindo a superprodução de citocinas pró-

inflamatórias TNF e IL-6 e reequilibrando a composição da microbiota intestinal (DONG *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019; ZANELLO *et al.*, 2009).

## **1.4 Terapias com anticorpos monoclonais**

Anticorpos são moléculas tetraméricas que possuem domínios bem característicos e podem ser sinteticamente produzidos como uma molécula inteira ou na forma de fragmentos como FvFc, Fab e scFv. Um de seus menores fragmentos é o scFv (fragmento variável de cadeia única), que apresenta os domínios variáveis das cadeias leve e pesada conectados por um peptídeo hidrofílico e flexível. Esses anticorpos resguardam a capacidade de reconhecimento ao antígeno sem ativar a resposta imune, sendo utilizados para a neutralização de um antígeno. Tratando-se de uma molécula menor, é mais facilmente produzido por microrganismos (BREEDVELD, 2000).

Anticorpos monoclonais (mAb) são produzidos por um único clone de célula B, o que os tornam homogêneos e monoespecíficos, sendo instrumentos eficazes para o desenvolvimento de diagnósticos e terapias (BREEDVELD, 2000). Hoje em dia, temos mais de 70 mAbs aprovados para o tratamento de diversas doenças como autoimunidade, inflamação e Câncer, entre outras, e mais de 500 mAbs em desenvolvimento clínico (MOTLEY; BANERJEE; FRIES, 2019).

O uso de anticorpos como terapia teve vários desafios técnicos ao longo dos anos, principalmente a apresentação de respostas imunogênicas, assim, o desenvolvimento de tecnologias de anticorpos quiméricos, humanizados e humanos levou a um menor risco de induzir respostas imunes em humanos. Os anticorpos quiméricos possuem a região variável murina e região constante humana. A humanização resulta em um anticorpo onde apenas as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) das regiões variáveis são de origem de sequências murinas (HARDING *et al.*, 2010).

### **1.4.1 Terapias com anti-TNF**

O primeiro anticorpo aprovado para uso terapêutico em DIIs, foi o Infliximabe (um mAb quimérico que liga ao TNF solúvel e associado à membrana com alta afinidade) em 1998 para o tratamento da DC. Até hoje, uma das formas mais utilizada e eficaz para o tratamento de doenças inflamatórias é a utilização de anticorpo cujo alvo é o TNF, aprovados não apenas para o tratamento da Doença de Crohn, mas também para o tratamento da Colite Ulcerativa, Espondilite Anquilosante, Artrite Reumatoide, Artrite Psoriática, e Psoríase em placas (CHAN; CARTER, 2010).

Muitos pacientes são insubmissos ou intolerantes à terapia com os imunossupressores ou anti-inflamatórios clássicos, por isso os anticorpos anti-TNF têm grande sucesso no tratamento das DIIs, além de diminuir a necessidade do uso de corticoides. Eles se tornaram os melhores medicamentos disponíveis para induzir e manter a remissão nos pacientes. Atualmente 4 anticorpos são aprovados pela FDA com essa finalidade: Infliximabe (Remicade®), Adalimumabe (Humira®), Golimumabe (Simponi®) e Certolizumabe pegol (Cimzia®), estão descritos na Tabela 1. Apesar de terem o mesmo alvo, esses mAbs anti-TNF diferem no mecanismo de ação, eficiência, contraindicações e forma de administração (GRIFFITHS *et al.*, 2020; GUBERNATOROVA; TUMANOV, 2016; NEURATH, 2017).

Tabela 1 – Características dos anticorpos monoclonais anti-TNF aprovados pela FDA para tratamento de DIIs. Adaptado (GUBERNATOROVA; TUMANOV, 2016).

Anticorpo	Aplicação	Administração	Formato	Meia-Vida	Estrutura	Esquema
Infliximabe (Remicade)	UC E CD	Intravenoso	Quimérico	7-12 Dias	Fab murino e o restante, humano. Liga 2 moléculas de TNF	
Adalimumabe (Humira)	UC E CD	Subcutâneo	mAb Humano	10-20 Dias	Liga 2 moléculas de TNF	
Golimumabe (Simponi)	UC	Subcutâneo	mAb Humano	7-20 Dias	Sequência de aminoácidos idêntica ao infliximab. Liga 2 moléculas de TNF	
Certolizumabe pegol (Cimzia)	CD	Subcutâneo	Composto Monovalente Humanizado	14 Dias	Fabs ligados covalentemente ao polietilenoglicol. Fc é ausente. Liga 1 molécula de TNF	

As terapias que utilizam anticorpos anti-TNF para tratamento de DIIs mostram a melhora da cicatrização da mucosa, do escore clínico e prolongam os períodos sem reincidência em muitos pacientes. Neutralizando o TNF esses mAbs levam a duas respostas nos pacientes: a indução de macrófagos do tipo M2 e a rápida indução a apoptose de células T, que juntas contribuem para a cicatrização da mucosa. Apesar do sucesso dessa terapia, os principais desafios da doença permanecem, principalmente para aqueles que não respondem às terapias de primeira linha e evoluem para doença crônica com complicações de longo prazo, como a Fibrose (FRIEDRICH; POHIN; POWRIE, 2019; LEVIN; WILDENBERG; VAN DEN BRINK, 2016).

### 1.4.2 Terapias com anti-CD3

As células Treg, caracterizadas pela expressão de Foxp3, estão crucialmente envolvidas na manutenção da homeostase da mucosa intestinal, suprimindo respostas imunes anormais contra a microbiota comensal ou antígenos dietéticos. Essas células exercem sua função produzindo as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$  (Fator de Crescimento Transformante) e prevenindo a ativação e a função efetora de células T que escaparam de outros mecanismos de tolerância. No entanto, foi observado que na lâmina própria de pacientes com DIIs, as células T efetoras não respondem à ação de Tregs. Essa diminuição da atividade anti-inflamatória de Tregs pode ser um importante fator para a patogênese das DIIs, pois as células T medeiam o desenvolvimento da inflamação nessas DIIs (GEREMIA *et al.*, 2014; VOSSENKÄMPER *et al.*, 2014).

Assim, a administração de mAb anti-CD3 tem se mostrado promissora no tratamento de condições inflamatórias, e já foi testada em doenças como DIIs, Câncer, Diabetes e doenças autoimunes (KUHN; WEINER, 2016). A administração oral de anti-CD3 em camundongos com enteropatia reduziu os níveis de citocinas inflamatórias como: Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), TNF e IL-6; também aumentou os níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e do TGF- $\beta$  (FORSTER *et al.*, 2012). No tecido intestinal de pacientes com DIIs o tratamento com esse anticorpo reduziu a produção de IFN- $\gamma$ , IL-17A e outras citocinas e quimiocinas inflamatórias, além de aumentar a produção de IL-10, induzir células Tregs e reduzir a ativação de células T (KUHN; WEINER, 2016; VOSSENKÄMPER *et al.*, 2014).

O primeiro mAb terapêutico aprovado pela FDA foi o Muromomab (um mAb murino anti-CD3), usado para a prevenção da rejeição de transplantes renais, seguido pela aprovação de vários mAbs quiméricos (SINGH *et al.*, 2018). A administração oral de anticorpos anti-CD3 poderia ser uma forma alternativa de indução da tolerância, pois diminui os efeitos colaterais associados à administração parenteral. Atualmente estão sendo testados em ensaios clínicos para DIIs tratamentos com Anti-CD3 por administração oral, onde por meio da tolerância oral pode-se induzir alterações no sistema imunológico. A administração oral de mAb Anti-CD3, principalmente pela indução de Tregs, mostrou eficácia terapêutica em modelos de doenças autoimunes e inflamatórias como Encefalomielite Autoimune experimental, diabetes induzido por Estreptozocina em dose baixa, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Artrite induzida por colágeno e Diabetes tipo 2 (KUHN; WEINER, 2016).

## 2. JUSTIFICATIVA

A incidência e prevalência das DIIs (Figura 1) estão aumentando em todo o mundo. Atualmente aproximadamente 1,6 milhões de residentes dos Estados Unidos são afetados por DIIs, 785.000 com DC e 910.000 com CU (RAMOS; PAPADAKIS, 2019). As maiores incidências de CU estão relatadas no norte da Europa (24,3/100.000), Canadá (19,2/100.000) e Austrália (17,4/100.000) (UNGARO *et al.*, 2017). A incidência de CU é menor em países em desenvolvimento em comparação aos desenvolvidos, mas dados emergentes revelam um grande aumento na incidência em países em desenvolvimento na América do Sul, Ásia, África e Europa Oriental. Entre as regiões em desenvolvimento do mundo, a Índia tem a maior incidência relatada com 9,31 casos por 100.000 habitantes sendo uma incidência de 5,41 casos por 100.000 pessoas para CU (KOBAYASHI *et al.*, 2020; RAMOS; PAPADAKIS, 2019).

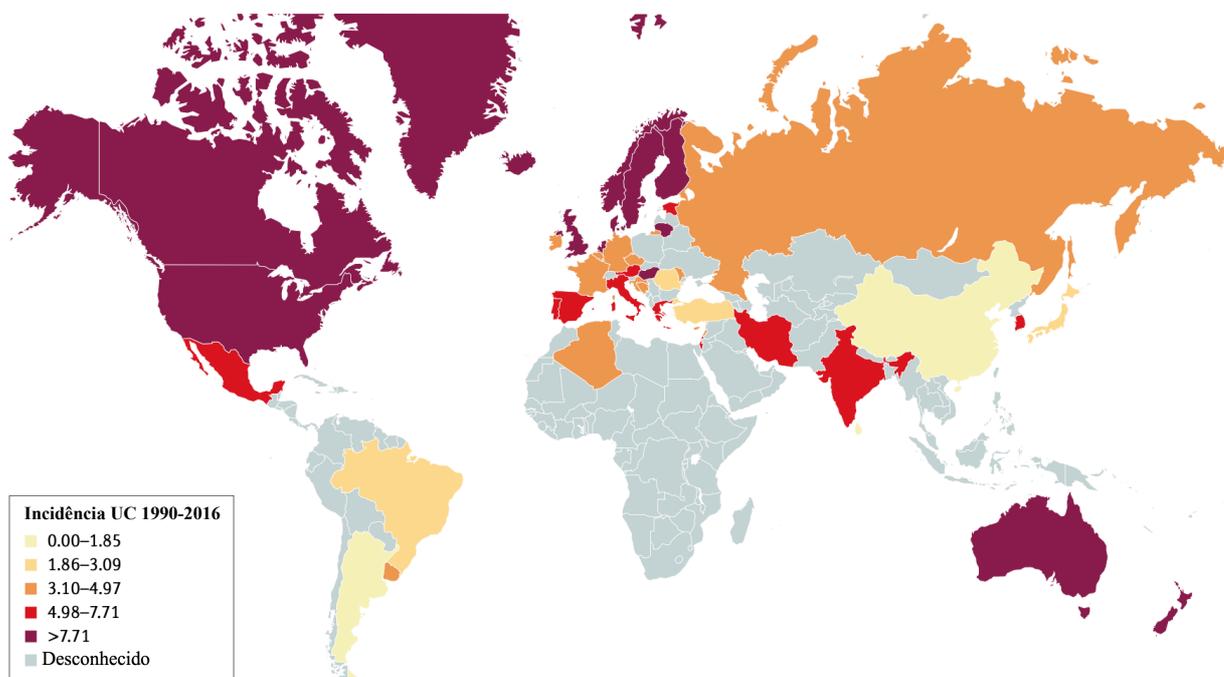


Figura 1 – Incidência da Colite Ulcerativa no mundo dos anos 1990 a 2016. Adaptado (KOBAYASHI, T. *et al.*, 2020).

O aumento da incidência em países em desenvolvimento está amplamente relacionado ao processo de industrialização. O efeito da urbanização no desenvolvimento dessas doenças pode ser mediado por uma variedade de mudanças incluindo: exposição à poluição ambiental, mudanças no estilo de vida e comportamento, alteração na dieta (aumento da exposição a alimentos processados, açúcares refinados, laticínios e menos fibras vegetais), falta de atividade

física, obesidade e tabagismo (ANANTHAKRISHNAN *et al.*, 2018; JAIRATH; FEAGAN, 2020).

Com os tratamentos atuais que melhoraram a sobrevivência dos pacientes, a mortalidade nas DIIs é baixa, o que leva a prevalência dessas doenças a continuar crescendo em todo o mundo. Atualmente 2 milhões de pacientes sofrem dessas condições na Europa, local com a maior taxa de prevalência. Essas taxas são mais altas em países ocidentais desenvolvidos: na Europa (505/100.000), Canadá (248/100.000) e nos Estados Unidos (214/100.000) (RAMOS; PAPADAKIS, 2019; UNGARO *et al.*, 2017). Assim percebemos como as DIIs têm se tornado um crescente problema em todo o mundo.

Apesar dos bons resultados do tratamento de DIIs com mAbs anti-TNF, até 20% dos pacientes são não-respondedores primários (não respondem à administração inicial do anti-TNF), e até 46% dos pacientes são não-respondedores secundários (param de responder a terapia com mAbs em algum momento do tratamento). Ainda, medicamentos administrados por via intravenosa, além de necessitarem de um profissional para aplicação, não se restringem ao local de tratamento, sendo dispersos por todo o corpo o que gera muitos de seus efeitos colaterais (GRIFFITHS *et al.*, 2020; GUBERNATOROVA; TUMANOV, 2016).

Um grande problema é o alto custo dessas terapias, a auditoria nacional de DIIs do Reino Unido estimou os gastos do NHS (do inglês, *Nacional Health Service*) com o tratamento de DIIs em 1 bilhão de libras em 2010 (GRIFFITHS *et al.*, 2020). Atualmente, um frasco do Remicade® custa R\$ 4.997 no Brasil (Consulta Remédios, 2020). Assim percebemos a necessidade de desenvolver tratamentos que sejam mais toleráveis pelos pacientes, gerem menos efeitos colaterais e com um menor custo de produção.

Dentre as formas de indução da tolerância, a tolerância oral decorre da administração de antígenos por via oral que, no TGI, ocorre por meio da regulação negativa das respostas imunes sistêmicas agindo como um mecanismo protetor contra a hipersensibilidade (BUENO; PACHECO-SILVA, 1999). Essa tolerização induz células Tregs que levam a produção de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$  e suprime as respostas de Th1 e Th2 (SRICHARUNRAT; PUMIRAT; LEAUNGWUTIWONG, 2018).

A administração oral é a via mais conveniente de administração de medicamentos devido à sua simplicidade, natureza não invasiva e baixos níveis de desconforto para os pacientes (BERMÚDEZ-HUMARÁN; LANGELLA, 2017). Com isso em mente, através da tolerância oral, a administração por via oral de anticorpos pode ser uma alternativa para o tratamento de diversas doenças como por exemplos as DIIs. Essa forma de administração da

terapia pode ser usada para entregar localmente os anticorpos ao alvo, e assim neutralizar citocinas e toxinas no TGI. Isso permite que a dose administrada seja reduzida (cerca de um décimo a um centésimo da dose necessária para mABs intravenosos), diminuindo o custo do tratamento e a ocorrência de efeitos colaterais. Ainda não se sabe se os pacientes que não respondem à terapia anti-TNF intravenosa responderiam à terapia anti-TNF administrada por via oral (GRIFFITHS *et al.*, 2020; JONES; MARTINO, 2015).

Assim, a levedura *S. boulardii* por meio da tolerância oral pode ser usada como veículo de entrega de diferentes anticorpos (como anti-TNF e anti-CD3) no TGI para tratamento de diferentes doenças como DIIs, doença do enxerto e diabetes, restringindo a resposta ao TGI, diminuindo a inflamação, os sintomas e o desconforto causado pelas doenças, e principalmente reduzindo o preço de produção dessas terapias.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo foi construir uma levedura (*Saccharomyces boulardii*) geneticamente modificada, capaz de produzir fragmentos scFv de anticorpos monoclonais recombinantes anti-TNF (Infliximabe®) e anti-CD3 para ser utilizada como uma nova rota biotecnológica no tratamento doenças inflamatórias como por exemplo a Colite Experimental em camundongos.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- a) Desenho do gene para construção do vetor de expressão do fragmento scFv do infliximabe;
- b) Desenho do gene para construção do vetor de expressão do fragmento scFv anti-CD3 associado a parede;
- c) Obtenção de linhagens recombinantes de *S. boulardii*;
- d) Análise da expressão das proteínas recombinantes;
- e) Avaliação da atividade biológica do scFv anti-TNF recombinante;
- f) Avaliação dos efeitos anti-inflamatórios da linhagem construída na Colite experimental em camundongos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Linhagens Utilizadas e Condições de Cultivo

A *Escherichia coli* XL10 Gold foi semeada em meio Luria-Bertani (LB) ágar (Peptona de Caseína 1%, Extrato de Levedura 0,5%, Cloreto de Sódio 1%, Ágar 1,4%, pH 7,2) suplementado com 10-50 µg/mL de Tetraciclina e 10-20 µg/mL de Cloranfenicol. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A bactéria foi cultivada em meio LB (Peptona de Caseína 1%, Extrato de Levedura 0,5%, Cloreto de Sódio 1%, pH 7,2), suplementado com 10-50 µg/mL de Tetraciclina e 10-20 µg/mL de Cloranfenicol. O crescimento foi feito em incubadora do tipo *shaker* à 37°C, 250 rpm, durante a noite (*overnight*).

Foi utilizada a linhagem *Saccharomyces boulardii* 17 liofilizada. Para o isolamento de colônias um comprimido do Repoflor® (Lote 1J2568) foi diluído em meio rico YPD (Extrato de Levedura 1%, Peptona de Caseína 2%, Glicose 2%) e a levedura foi semeada em meio YPD Ágar (1,4%) com pérolas de vidro, as placas foram incubadas a 30°C ou 37°C por 48 horas. Para crescimento da *S. boulardii* em meio líquido, foi utilizado o meio de cultura YPD, em incubadora sob agitação de 200 rpm a 30°C ou 37°C por até 72 horas. Quando necessário o meio foi suplementado com 400 µg/mL de Geneticina (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

#### 4.1.1. Condições de Cultivo para Aumento da Taxa de Crescimento

Para aumentar a taxa de crescimento da levedura, foi utilizado Erlenmeyer aletado, com o objetivo de aumentar a aeração durante o cultivo. A *S. boulardii* foi cultivada sob agitação de 200 rpm a 30°C em Erlenmeyer aletado de um litro com 100 mL de meio YPD, suplementado com 1% de glicose a cada 24 horas quando necessário.

#### 4.1.2. Cultivo em Meio YNB

Visando facilitar a purificação do anticorpo, a levedura foi cultivada no meio definido Yeast Nitrogen Base (YNB) 0,67% (sem aminoácidos). Inicialmente a levedura foi estriada em placa com meio YNB Ágar (1,4%) e incubada a 30°C por 48 horas. Em seguida, uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio YNB, suplementado com 2% de glicose e incubado a 30°C, 200 rpm *overnight*. No dia seguinte foi feito o inóculo em Erlenmeyer de 1 litro com 100 mL de meio YNB suplementado com 2% de glicose e incubado a 30°C, 200 rpm por 24 horas. Quando necessário foi adicionado 400 µg/mL de Geneticina (Thermo Scientific, Waltham, MA,

EUA). Para aumentar a taxa de crescimento nesse meio foi adicionado tampão 0,4% de ácido aspártico e 0,4% de ácido glutâmico pH 5,5 – 6,0.

#### 4.2. Plasmídeos

Para esse trabalho foram utilizados quatro plasmídeos: pYC230, Y1PGK $\alpha$ , pYCTNF e pYCCD3. O pYC230 (6.2 kb) foi utilizado como vetor de expressão em leveduras. O plasmídeo Y1PGK $\alpha$  (7.7 kb) foi usado para obter a sequência do promotor, peptídeo sinal e terminador. Utilizando esses dois plasmídeos, foi construído o vetor de expressão do anticorpo anti-TNF, o pYCTNF (8.7kb), que possui a marca de seleção G418R, a origem de replicação 2 $\mu$  e o cassete de expressão do anticorpo, que contém o promotor, peptídeo sinal, gene do scFv e terminador, desenhado com códons preferenciais de *Saccharomyces cerevisiae*.

O plasmídeo para a produção do anticorpo de parede anti-CD3 foi feito utilizando o mesmo promotor e terminador do pYCTNF. O cassete de expressão do anti-CD3 contém o peptídeo sinal SUC2, a sequência do anticorpo scFv 2c11, o FLAG, o peptídeo GS2 e a parte carboxi terminal da proteína de ancoragem SED1. A construção do pYCCD3 se deu com o promotor, cassete de expressão e terminador inseridos no pYC230.

Tabela 2 - Descrição das linhagens recombinantes construídas utilizadas no trabalho.

Nome da Linhagem	Descrição
Sb WT	<i>S. boulardii</i> selvagem
Sb VV	<i>S. boulardii</i> transformada com o vetor pYC230
Sb TNF	<i>S. boulardii</i> transformada com o vetor pYCTNF
Sb CD3	<i>S. boulardii</i> transformada com o vetor pYCCD3

#### 4.3. Curva de Crescimento e de Resistência ao Antibiótico

Uma colônia isolada da Sb WT crescida em meio YPD Ágar foi inoculada em 5 mL de meio YPD e incubada overnight a 30°C e 37°C. No dia seguinte a *S. boulardii* foi inoculada em meio YPD e incubada em *shaker* sob agitação 200 rpm a 30°C e 37°C por até 72 horas, a Densidade Óptica a 600nm (OD<sub>600</sub>) foi medida a cada duas horas. Posteriormente a curva de

crescimento foi repetida com todas as linhagens (Sb WT, Sb VV, Sb TNF5 e Sb TNF10), a 30°C.

Uma colônia isolada crescida em meio YNB Ágar foi inoculada em 5 mL de meio YNB e incubada overnight a 30°C. No dia seguinte a *S. boulardii* foi inoculada em meio YNB e incubada em *shaker* sob agitação de 200 rpm a 30°C por 29 horas, a OD<sub>600</sub> foi medida a cada duas horas.

Para a curva de resistência ao antibiótico a levedura foi cultivada em meio YPD a 30°C e 37°C com diferentes concentrações de Geneticina (0 µg/mL – 1600 µg/mL) (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Foi utilizado o software Bio TEK Gen 5 Data Analysis, e o equipamento EPOCH 2 Microplate Spectrophotometer (Biotek, Winooski, VT, EUA) para medição da OD<sub>600</sub> de duas em duas horas, durante 52 horas.

#### **4.4. Determinação das faixas de concentrações inibitória e fungicida da Geneticina.**

Para testar o efeito do antibiótico na levedura, esta foi cultivada em meio YPD a 30°C e 37°C em três diferentes concentrações de Geneticina (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA): 0 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL. Nos tempos 0, 4, 8, 12 e 24 horas, a OD<sub>600</sub> foi medida e alíquotas de 50 µL foram coletadas e plaqueadas em meio YPD Ágar com e sem o antibiótico. Após 48 horas foi feita a contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

#### **4.5. Digestão Enzimática dos Plasmídeos**

Foi realizada uma digestão enzimática para confirmação dos plasmídeos pYC230 e pYCTNF. Foi utilizada a endonuclease NotI (NEB, Ipswich, MA, EUA) para linearização dos plasmídeos e confirmação do tamanho dos fragmentos por gel de eletroforese. Para cada amostra foi feita a seguinte reação: 500 ng do plasmídeo extraído, 1 µL da enzima NotI, 4 µL do NEB 2 Buffer (NEB, Ipswich, MA, EUA) e água Milli-Q para um volume final de 40 µL, esta reação foi incubada a 37°C por 3 horas. Em seguida 8 µL das digestões foram analisadas por eletroforese em gel de agarose segundo o item 4.6.

Para a confirmação do tamanho do inserto (cassete de expressão) no vetor pYCTNF, foi feita uma digestão dupla com as enzimas NotI e PstI (NEB, Ipswich, MA, EUA). A reação foi feita com 500 ng do plasmídeo extraído, 1 µL de cada enzima, 4 µL do NEB 2 Buffer (NEB, Ipswich, MA, EUA) e água Milli-Q para um volume final de 40 µL, esta reação foi incubada a

37°C por 3 horas. Em seguida 8 µL da digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose segundo o item 4.6.

Para a confirmação do vetor de expressão do anti-CD3 foi feita uma linearização com a enzima NcoI FastDigest (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e confirmação do tamanho por gel de eletroforese. A reação da digestão foi feita com: 500 ng do plasmídeo extraído, 1 µL da enzima NcoI FastDigest, 4 µL do FastDigest Buffer (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e água Milli-Q para um volume final de 40 µL, esta reação foi incubada a 37°C por 3 horas. Em seguida 8 µL dessa digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose segundo o item 4.6.

#### **4.6. Eletroforese em Gel de Agarose**

As amostras de DNA foram analisadas por Eletroforese em gel de Agarose. Estas foram misturadas ao Tampão de Amostra 1X (Azul de bromofenol 0,041%, Sacarose 6,67%) e aplicadas em gel de agarose 0,8% - 1,2% adicionado de Brometo de Etídio (0,5 µg/mL). Para preparação do gel e corrida foi utilizado o tampão TAE 1X (Tris Base 40 mM, Ácido Acético Glacial 20 mM, EDTA 10 mM pH 8,0), a corrida foi feita em corrente de 30-70 volts. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram estimados por meio da comparação ao marcador de massa molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Quando necessário a quantificação foi feita pelo NanoDrop™ One Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

#### **4.7. Transformação em *Saccharomyces boulardii* por Eletroporação**

A transformação da levedura foi feita de acordo com o protocolo de Eletroporação adaptado de HUDSON *et al.*, 2016.

Uma colônia isolada em meio YPD Ágar foi inoculada em 5 mL de meio YPD e incubada em *shaker* a 200 rpm, 30°C overnight. No dia seguinte uma alíquota dessa cultura foi diluída em 100 mL de meio YPD para uma OD<sub>600</sub> de 0,3, e incubada sob as mesmas condições anteriores até atingir a OD<sub>600</sub> de 1,6. Todas as centrifugações desse protocolo foram realizadas a 4°C, 3,000 x g por 10 minutos. Após atingir a OD desejada, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspendidas em 50 mL de água gelada, essa centrifugação foi repetida mais duas vezes. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em 50 mL de Tampão de Eletroporação (Sorbitol 1M, Cloreto de Cálcio 1mM) gelado, e novamente centrifugadas e ressuspendidas em 20 mL de Tampão de Incubação

(Acetato de Lítio 0,1 M e Dithiothreitol 10 mM) preparado na hora e incubadas em Forno de Hibridização a 30°C por 30 min. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 50 mL de Tampão de Eletroporação e novamente centrifugadas e ressuspensas em Buffer de Eletroporação para um volume final de 1 mL. Imediatamente após a ressuspensão final, foi adicionado a uma Cubeta de Eletroporação 0,2 cm gelada: 400 µL de células, 5 µg de DNA plasmidial e 10 µg de DNA carreador. Essa reação foi incubada no gelo por 5 min e prontamente eletroporada com os seguintes parâmetros elétricos: pulso de 2,5 kV, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω, no eletroporador GenePulser Xcell™ Electroporation System (Bio-RAD, Hercules, CA, EUA). Logo após o choque as células foram recuperadas com 8 mL de uma mistura 1:1 de YPD e Sorbitol 1M e incubadas em Forno de Hibridização a 30°C por 1 hora. Seguidamente, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 100 µL. O volume total foi plaqueado em 1:1 meio YPD Ágar e 1M Sorbitol suplementado com 400 µg/mL de Geneticina (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), e incubado a 30°C de 2-5 dias. Todas as soluções e materiais utilizados foram previamente refrigerados para evitar a perda da eficiência.

#### **4.8. PCR de Colônia**

Iniciadores específicos para as sequências do G418R, do fragmento scFv anti-TNF e do anticorpo anti-CD3 foram desenhados (Tabela 2). Todas as colônias que cresceram no meio seletivo após a transformação tiveram fragmentos retirados com a ponteira, que foram diluídos em 10 - 20 µL de água Milli-Q e fervidos por 15-20 min, para a reação de PCR foi utilizado 2 µL desse material. Para completar a reação foi adicionado 5 µL de 10 X PCR Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 4 µL de dNTPs (10 mM), 3 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1,25 µL de cada iniciador (10 µM), 0,5 µL da enzima Taq DNA Polymerase recombinante (5 U/µL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e água Milli-Q para um volume final de 50 µL. A amplificação foi feita nas condições: desnaturação a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de: desnaturação a 95°C por 35 segundos, anelamento a 48°C ou 55°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto ou 1 minuto e 45 segundos; e extensão final a 72°C por 5 minutos. Para confirmação da amplificação, uma alíquota de 8 µL de cada reação foi submetida a eletroforese (seção 4.6).

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores para o gene de resistência a Geneticina, o gene do fragmento scFv do anticorpo infliximabe, e o gene do fragmento scFv do anticorpo de membrana anti-CD3.

<b>Fragmento</b>	<b>Sequência dos Iniciadores</b>	<b>T<sub>m</sub></b>	<b>Tamanho do amplicon</b>
G418R	5'TCGGTTTCCCTCCTTCTTGAA3' 5'GTGGATGTTGTTTCGAGAGTAGG3'	55°C	1650 pb
Anti-TNF	5'GTATCTCTTGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGA GCTCAAATTAGAAGAATCAGGTGGTG3' 5'CAATTCAATTCAATGCGGCCGGAATTCTTATGAAGC ATAATCTGGAACATC3'	48°C	850 pb
Anti-CD3	5'CCAACAAAAGCCAGGTAAGG3' 5'CGTCGTCGTCCTTGTAGTCA3'	55°C	260 pb

## 4.9. Produção do scFv Anti-TNF

### 4.9.1. Produção em meio YPD

Uma colônia isolada em meio YPD Ágar, suplementado com 400 µg/mL de Geneticina (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), de cada linhagem foi inoculada em 5 mL de meio YPD suplementada com 400 µg/mL de Geneticina e incubada em *shaker* a 200 rpm, 30°C overnight. No outro dia, a partir do pre-inóculo, foram feitos inóculos em Erlenmeyer de um litro com 100 mL de meio YPD padronizando a OD<sub>600</sub> inicial para 0,2 e incubados a 30°C 200 rpm por até 72 horas. Dois clones da *S.boulardii* transformada com o anticorpo (Sb TNF5 e Sb TNF10) e um com o vetor vazio (Sb VV) foram cultivados. Aliquotas foram coletadas a cada 24 horas, centrifugadas 3,000 x g por 10 minutos, e o sobrenadante foi separado do sedimento.

### 4.9.2. Produção em meio YNB

Uma colônia isolada crescida em meio YNB Ágar suplementado com 2% de glicose e com 400 µg/mL de Geneticina (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), de cada linhagem (Sb VV, Sb TNF5 e Sb TNF10) foi inoculada em 5 mL de meio YNB suplementado com 2% de glicose e com 400 µg/mL de Geneticina e incubada em *shaker* a 200 rpm, 30°C *overnight*.

No outro dia, a partir do pre-inóculo, foram feitos inóculos em Erlenmeyer de um litro com 100 mL de meio YNB suplementado com 2% de glicose e com 400 µg/mL de Geneticina padronizando a OD<sub>600</sub> inicial para 0,2. Os inóculos foram incubados a 30°C, 200 rpm por 24 horas, e então o meio de cultura foi centrifugado a 3,000 x g por 10 minutos, e o sobrenadante foi separado do sedimento.

#### **4.9.3. Preparo das Amostras do Sedimento de Células**

Para analisar se a proteína estava sendo secretada, as células sedimentadas por centrifugação foram lisadas e a fração solúvel intracelular foi analisada por Western Blot. O pellet sedimentado por centrifugação foi congelado a -20°C, e em seguida foi fervido em banho de água por pelo menos 20 minutos e imediatamente congelado novamente a -20°C. Esse processo foi repetido pelo menos 3 vezes para o rompimento total das células. Prontamente, as células foram centrifugadas a 9,000 rpm por 20 minutos e a fase aquosa (fração solúvel intracelular) foi coletada.

#### **4.9.4. Preparo das Amostras do Sobrenadante de Cultura**

Os sobrenadantes de cultura foram concentrados até o volume desejado utilizando Millipore Centriprep™ Centrifugal Filter Units 10,000 MWCO (Merck, Darmstadt, Germany). À uma alíquota de 40 µL das amostras dos sobrenadantes concentrados e fração solúvel intracelular foram adicionados 10 µL de tampão de amostra 5 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)]. Após a adição do tampão, as amostras foram fervidas em banho de água por pelo menos 15 minutos para a desnaturação total das proteínas, em seguida foram aplicadas em gel desnaturante de poliacrilamida – SDS-PAGE (Soduim Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis), para a detecção da expressão do fragmento scFv do anticorpo *in vitro*.

#### **4.9.5. Gel Desnaturante de Poliacrilamida**

O gel de poliacrilamida foi feito em espessura de 1 mm. O gel separador foi preparado a 12% (3 mL de acrilamida/ bisacrilamida (29:1); 2,5 mL 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 destilada para um final de 10 mL) os catalisadores TEMED e APS foram adicionados por último. Adicionado o líquido as placas de vidro (1 mm), este foi coberto com uma fina camada de isopropanol. Após a polimerização, o isopropanol foi removido e o gel lavado com água destilada. Em seguida foi feito o gel

concentrador a 5% (468,8 µL de acrilamida/ bisacrilamida (29:1); 472,5 µL de Tris-HCl 1M pH 6,8; 37,5 µL de SDS 10%; 3,75 µL de TEMED; 37,5 µL de APS 10% e água destilada para um final de 3,8 mL), este foi adicionado em cima do gel separador e imediatamente colocado o pente para a polimerização e formação dos poços. Após polimerização o pente foi removido e as amostras fervidas foram aplicadas em cada poço.

#### **4.9.6. Condições de Corrida**

Após a preparação do gel, este foi inserido na cuba de eletroforese com tampão de corrida 1X (Tris 25 mM; glicina 0,192 M; SDS 0,1% (p/v); pH 8,3 - 8,4). As amostras fervidas e o marcador molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) foram aplicados em cada poço. A corrente para a migração das proteínas foi fixada a 100 V. A migração pelo gel foi acompanhada pelo Azul de Bromofenol presente no tampão de amostra, com a saída total deste pelo gel sabe-se que houve uma separação efetiva das proteínas. Prontamente após a saída do marcador foi feita a retirada do gel que seguiu para coloração com Coomassie Blue ou Prata, e imunodeteção por Western Blot.

#### **4.9.7. Coloração do gel com Coomassie Blue**

Após a finalização da corrida, o gel concentrador foi removido e o gel separador foi corado com Solução Corante [Azul Brilhante de Comassie R-250 0,25% (p/v); Metanol 30% (v/v); Ácido Acético Glacial 7% (v/v)] por pelo menos duas horas sob leve agitação. Seguidamente a Solução Corante foi descartada e a Solução Descorante [Metanol 30% (v/v); Ácido Acético Glacial 7% (v/v)] adicionada. Esta foi incubada sob leve agitação e trocada até a visualização das bandas de proteínas.

#### **4.9.8. Coloração do gel com prata**

Após a finalização da corrida, o gel concentrador foi removido e o gel separador foi corado com prata. Todos os passos foram feitos sob leve agitação. Inicialmente foi feita a fixação com uma solução de 60 mL de acetona, 1,5 mL de Ácido Tricloroacético 50% e 25 µL de Formaldeído 37% por 5 minutos. Em seguida o gel foi lavado 3 vezes com água Milli-Q, incubado por 5 minutos com água Milli-Q e lavado mais 3 vezes com água Milli-Q. Logo após, foi feito o pré-tratamento com 60 mL de acetona por 5 minutos. A acetona foi descartada e 60 mL de água Milli-Q com 100 µL de Tiosulfato de Sódio 10% foram adicionados, o gel foi incubado por 1 minuto, e seguidamente lavado 3 vezes com água Milli-Q. Então o gel foi corado

com uma solução de 800 µL de Nitrato de Prata 20%, 600 µL de Formaldeído 37% e 60 mL de água Milli-Q por 8 minutos, e prontamente lavado 3 vezes com água Milli-Q. Para a revelação foi utilizada a solução de 1,2 g de Carbonato de Sódio, 25 µL de Formaldeído 37%, 25 µL de Tiosulfato de Sódio 10% e 60 mL de água Milli-Q, o gel foi agitado até o aparecimento das bandas. A solução de revelação foi descartada e a solução de bloqueio (ácido acético 1% em água Milli-Q) adicionada.

#### **4.9.9. Imunodeteção por Western Blot**

Finalizada a corrida do gel, este seguiu para a imunodeteção da proteína Anti-TNF por Western Blot. Após a eletroforese, foi realizada a transferência das proteínas para a membrana de nirocelulose PROTRAN 0,45 µm (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, EUA). O sistema semi seco foi utilizado, assim o papel filtro e a membrana foram 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). A corrente constante de 150 mA e 10 V foi ligada por 45 minutos. Em seguida foi feita a checagem da eficiência da transferência conferindo o marcador pré-corado, e corando a membrana com Vermelho de Ponceau por 1 minuto. Terminada a transferência, seguiu-se para a imunodeteção, onde todas as etapas foram feitas a temperatura ambiente e incubadas sob leve agitação. A membrana de nitrocelulose foi incubada com a solução de bloqueio [PBS (NaCl 150mM, NaHPO<sub>4</sub> 10 mM) contendo 5% de leite desnatado (marca Molico)], por pelo menos 1 hora, e então a solução foi desprezada e a membrana foi lavada 3 vezes com PBST (PBS contendo 0,1% de Tween 20). Em seguida, foi adicionado o anticorpo murinho primário HA-probe F-7 sc-7392 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) em uma diluição de 1:1000 em PBS. Após 1 hora, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBST 0,1% e prontamente incubada com o anticorpo secundário, diluído 1:2000 em PBS, Bovine anti-mouse IgG-AP sc-2377 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) marcado com Fosfatase Alcalina (AP), por 1 hora. Logo após, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBST 0,1%, incubada por 5 minuto com APB (NaCl 100 mM; Tris-HCl 100 mM pH 9,5; MgCl<sub>2</sub> 5 mM) preparado na hora, e então foi adicionado o substrato cromogênico NBT/BCIP Stock Solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) até o aparecimento das bandas. A membrana foi lavada com água destilada, seca a temperatura ambiente e analisada comparando as bandas ao marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

#### **4.10. Purificação e quantificação do scFv Anti-TNF**

Após a concentração da proteína até o volume de 500  $\mu$ L, está foi submetida a purificação por cromatografia de exclusão molecular utilizando a coluna Superdex 75 Increase 10/300 GL (Cytiva Life Sciences, Chicago, IL, EUA) e o equipamento ÄKTA Pure (Cytiva Life Sciences, Chicago, IL, EUA). O tampão utilizado foi 0,15 – 0,3 M de Cloreto de Sódio e 10 - 25 mM de Fosfato de Sódio pH 7,4. O sobrenadante da cultura em meio YNB foi concentrado até o volume de 500  $\mu$ L, que é 2% do volume da coluna utilizada (24 mL), e em seguida lavado com 10 - 15 mL do tampão para deixar a amostra no mesmo pH. O tampão foi passado pela coluna a uma velocidade de 0.5 mL/min. As frações foram coletadas manualmente de 1 em 1 mL, e ao final foram submetidas a análise por Western Blot segundo o item 4.9.9 para identificar em qual fração a proteína se encontrava. As frações coletadas foram quantificadas pelo método de dosagem de proteínas de Bradford, descrito em DE-SOUZA; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2016 usando uma curva padrão de IgG humana.

#### **4.11. ELISA**

Para testar a ligação do anticorpo ao TNF foi feito um ELISA. Foi utilizado a placa Nunc MaxiSorp™ flat-bottom (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A sensibilização da placa foi feita durante a noite a uma temperatura de 4°C, com 150  $\mu$ L do anticorpo murino HA-probe F-7 sc-7392 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) na concentração 1  $\mu$ g/mL. Para o controle positivo a sensibilização da placa foi feita com 150  $\mu$ L do Infliximab (Merck, Darmstadt, Germany) a 1  $\mu$ g/mL. No dia seguinte, foram feitas 3 lavagens com PBST (0,1% de Tween 20), e em seguida, foi feito o bloqueio com 200  $\mu$ L de BSA 1% diluído em PBST 0,1% e a placa foi incubada em estufa a 37°C por 1 hora. Após o bloqueio, foram feitas 3 lavagens com PBST 0,1%, e foi adicionado 150  $\mu$ L da proteína purificada ou PBS (para ser usado como controle negativo), e a placa foi incubada em estufa a 37°C por 2 horas. Logo após, foram feitas 3 lavagens com PBST 0,1%, e foram adicionados 150  $\mu$ L do TNF humano Biotinilado (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) a cada poço, em três concentrações diferentes (1,66  $\mu$ g/mL; 0,83  $\mu$ g/mL; 0,41  $\mu$ g/mL), e novamente a placa foi incubada em estufa por 2 horas a 37°C. Seguidamente, foram feitas 3 lavagens com PBST 0,1%, e foram adicionados 150  $\mu$ L de Streptavidina conjugada a AP (KLP, Gautherburg, MD, EUA) diluída 1:250 em TBS (Tris 25mM, NaCl 150 mM) a cada poço, e a placa foi incubada a 37°C por 1 hora. Foram feitas 4 lavagens com PBST 0,1%, e para a revelação, 150  $\mu$ L do substrato pNPP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído em Pierce™ Diethanolamine Substrate Buffer

(1X) (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) foram adicionados aos poços. A placa foi incubada ao abrigo da luz, e a leitura das placas foi feita usando o espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, LLC, San Jose, CA, EUA) com comprimento de onda 405 nm após 10 minutos.

#### **4.12. Contagem de Células Viáveis**

Foi selecionada uma colônia isolada crescida em meio YPD Ágar da SbWT, SbVV, SbTNF5 e SbTNF10, que foram inoculadas em 5 mL de meio YPD e incubadas a 30°C overnight. Seguidamente uma alíquota de cada pré-inóculo foi adicionada a 100 mL de meio YPD e incubadas em shaker sob agitação 200 rpm a 30°C. Alíquotas das culturas foram coletadas com 12, 24, 28, 36 e 48 horas, a OD<sub>600</sub> foi medida e as alíquotas foram diluídas de 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-8</sup> e plaqueadas com perolas de vidro em meio YPD Ágar e incubadas a 30°C. Após 48 horas foi feita a contagem de UFC, e calculado a quantidade de células viáveis em cada OD<sub>600</sub>.

#### **4.13. Experimento *in vivo***

Para os experimentos *in vivo* deste trabalho foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57Black, com 10 semanas de vida, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, com número de Protocolo 78/2018. Todas as manipulações e procedimentos realizados com os animais obedeceram aos princípios éticos.

Os animais foram mantidos no Biotério da Universidade de Brasília, em gaiolas coletivas (com 4-6 animais por gaiola), em ambiente com ciclo claro escuro de 12 horas, a temperatura ambiente e alimentados *ad libitum* com ração para roedores proveniente do próprio biotério.

##### **4.13.1. Tempo de Permanência da *S. boulardii* no Intestino de Camundongo**

Para saber como a *Saccharomyces boulardii* trafega pelo TGI de camundongos foi realizada uma gavagem oral em fêmeas C57Black. Os animais foram divididos em 2 grupos de 2 animais: o grupo controle que recebeu salina, e o grupo que recebeu a levedura. A *S. boulardii* foi crescida em meio YPD e foram preparadas doses de 100 µL contendo 1 x 10<sup>9</sup> células. Foi realizada uma única gavagem da levedura seguida de coleta das fezes em vários intervalos desde 15 minutos até 48 horas. As fezes coletadas foram pesadas e ressuspensas em 1 mL

de salina, e em seguida diluídas até  $10^{-3}$ . 30  $\mu\text{L}$  de cada diluição foi plaqueado em meio YPD Ágar com e sem Geneticina (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), e incubada a  $30^\circ\text{C}$  por 48 horas. Em seguida foi feita a contagem de UFC das placas com o meio seletivo, e algumas colônias de todas as placas foram selecionadas aleatoriamente para realização de PCR de colônia de acordo com o item 4.8.

#### **4.13.2. Preparo das Doses para Gavagem**

Foi feito um pré-inóculo a partir de uma colônia isolada de SbWT, SbVV e SbTNF10 em 5 mL de meio YPD e se necessário 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Geneticina (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), que foram incubados em shaker a  $30^\circ\text{C}$ , 200 rpm, overnight. No dia seguinte, foram feitos os inóculos em 50 mL de meio YPD, e assim que atingiram a  $\text{OD}_{600}$  necessária cada cultura foi centrifugada  $3000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  por 10 minutos, e ressuspensa em 500  $\mu\text{L}$  de meio YPD. Foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de glicerol 50% estéril para estocagem a  $-80^\circ\text{C}$ . Um mL de cada cultura foi aliqotado, diluído de  $10^{-6}$  a  $10^{-8}$  e plaqueado para contagem de células viáveis de acordo com o item 4.12.

Para a administração das doses, as células estocadas foram descongeladas e centrifugadas a  $3000 \times g$  por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em salina estéril para um volume final pré-determinado, onde cada 100  $\mu\text{L}$  continha de  $7,7 \times 10^8 - 1,77 \times 10^9$  células, a depender de cada linhagem.

#### **4.13.3. Separação dos Grupos**

Os camundongos foram separados em grupos de acordo com a Tabela 3. O grupo NT foi o controle negativo da doença, os animais não receberam DSS (Dextrana Sulfato de Sódio) (MPBiomedicals, CA, EUA) e foram gavados com salina 0.9%. O grupo DSS é o controle positivo da doença, os animais receberam DSS para indução dos sintomas, mas não foram tratados com a levedura. Os grupos Sb WT e Sb VV foram controles do tratamento, foi induzida a doença nos animais e estes foram tratados com a levedura selvagem e Vetor Vazio respectivamente. Por fim o grupo Sb TNF recebeu o DSS e o tratamento com a levedura produtora do anticorpo anti-TNF.

Tabela 4 - Separação dos grupos do experimento *in vivo*. Os animais foram divididos em 4 grupos controle (NT, DSS, Sb WT e Sb VV) e o grupo que recebeu o tratamento completo (Sb TNF).

Grupo	Nº de animais	Tratamento
NT	4	Salina 0,9%
DSS	4	DSS 2-3% + Salina 0,9%
Sb WT	4	DSS 2-3% + Sb WT
Sb VV	4	DSS 2-3% + Sb VV
Sb TNF	6	DSS 2-3% + Sb TNF

#### 4.13.4. Indução da Colite Experimental e Eutanásia

Para indução da doença, os animais receberam DSS 2-3% (p/v) (MPBiomedicals, CA, EUA) diluído na água de beber, *ad libitum*, durante todos os dias do experimento. A quantidade de água ingerida por grupo foi monitorada diariamente, com uma média de consumo de 9,44 mL/dia/grupo.

O esquema do cronograma do experimento se encontra na Figura 2: a indução da doença ocorreu durante todos os dias, com um aumento da concentração do DSS no 4º dia. Foi necessário aumentar a concentração do DSS pois o reagente estava vencido e os animais não estavam mostrando nenhum sinal de indução da doença. No 10º dia foi iniciado o tratamento dos animais com a gavagem oral da levedura, e os grupos DSS e NT foram gavados com salina 0,9%. No 15º dia ocorreu a eutanásia dos camundongos.

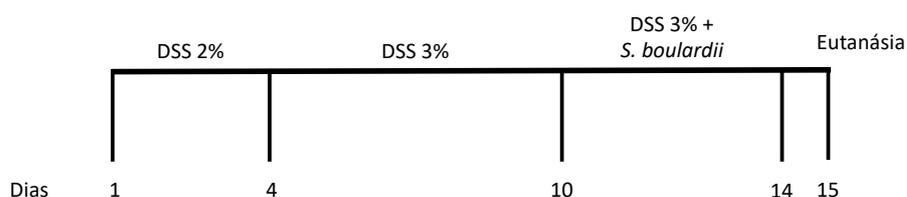


Figura 2 - Cronograma do experimento *in vivo*. Fase inicial de indução da doença com adição de DSS 2% na água dos animais por 4 dias, seguido de um aumento na concentração do DSS para 3% por 5 dias. Fase de tratamento por 5 dias com a gavagem oral (salina ou a levedura), e a eutanásia dos animais ocorrendo no 15º dia.

No dia da Eutanásia foram medidos os parâmetros macroscópicos: peso, comprimento do cólon, peso do cólon, sangramento retal e consistência das fezes. Os camundongos foram sacrificados por overdose de anestésico (Ketamina e Xilazina). Foram coletados o cólon e o lavado do cólon, os linfonodos mesentéricos e sangue de todos os animais.

#### 4.13.5. Disease Activity Index (DAI)

Durante todos os dias do experimento e no dia da eutanásia parâmetros macroscópicos da doença foram medidos utilizando o Disease Activity Index (DAI) (COOPER *et al.*, 1993). Este índice é determinado calculando a média de escores de sangramento retal, consistência das fezes e porcentagem de perda de peso (diferença entre o peso inicial e final), que foram graduados de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5 - Escores do índice de atividade da doença. Adaptado (Cooper *et al.*, 1993).

Score	Perda de Peso (%)	Consistência das Fezes	Sangramento Retal
0	Nenhuma	Normal	Ausente
1	1-5	Pastosa 1	Moderado 1
2	6-10	Pastosa 2	Moderado 2
3	11-20	Diarreica 3	Avançado 3
4	>20	Diarreica 4	Avançado 4

#### 4.13.6. Extração de RNA Total do Tecido Intestinal

Após a coleta do intestino, este foi armazenado em RNA Later (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Posteriormente foi adicionado 700 µL de Trizol e o material foi macerado no TissueLyser LT (Qiagen, Valencia, CA, EUA) em velocidade máxima. Logo em seguida, a extração do RNA foi feita utilizando o miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA).

Após a extração, o RNA foi quantificado pelo NanoDrop™ One Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. O grau de pureza da amostra foi medido pela relação 260/280 nm, considerando-se uma boa pureza amostras que apresentaram valores perto de 2. Uma alíquota de 1 µL foi analisada em eletroforese de gel de agarose RNase free 1,0% para visualização das duas subunidades do RNA ribossômico (18S e 28S), e possível contaminação com DNA genômico.

#### 4.13.7. qPCR

Para a síntese de cDNA foi utilizado 1 µg do RNA total do cólon, usando o RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

Os ensaios de qPCR foram realizados em duplicada, utilizando o equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA). Os dados foram analisados pelo StepOnePlus™ Software v2.3 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA). A reação foi montada usando o Fast SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), 0,2 µM de cada iniciador (forward e reverso) e 10 ng de RNA total. As sequencias dos iniciadores estão listadas na Tabela 5, e as condições de ciclagem na Tabela 6. A expressão genica foi representada utilizando o método de quantificação relativa fold change, calculado de acordo com Sean C. Taylor *et al.*, 2019.

Tabela 6 - Iniciadores para os diferentes genes utilizados na qPCR.

<b>Gene Alvo</b>	<b>Sequência 5'-3'</b>
Tbx21	F: TCAGGACTAGGCGAAGGAGA R: GCCTTCGGTTTCCTTATCAA
Stat 1	F: TCACAGTGGTTCGAGCTTCAG R: GCAAACGAGACATCATAGGCA
IFN $\gamma$	F: AAGTTTGAGGTCAACAACCCAC R: AATCTCTTCCCCACCCCGAA
Gata 3	F: TTTACCCTCCGGCTTCATCCTCCT R: TGCACCTGATACTTGAGGCACTCT
Stat 6	F: GGATTTCAGATTTGGAAGCGGC R: AATTTCCACCAGGCTTTCACAC
Stat 5	F: CACTCCTGTACTTGGTTCGTCA R: CCAGGTCAAACCTCGCCATCT
Ror C	F: TGCAAGACTCATCGACAAGG R: AGGGGATTCAACATCAGTGC
Stat 3	F: CTGCCCCGTACCTGAAGAC R: AACGTGAGCGACTCAAACCTG
IL-17a	F: TTAACTCCCTTGGCGCAAAA R: CTTTCCCTCCGCATTGACAC
IL-22	F: GCTCAGCTCCTGTCACATCA R: CAGTTCCCCAATCGCCTTGA
IL-6	F: GCCTTCTGGGACTGATGCT R: TGCCATTGCACAACTCTTTTCT
FoxP3	F: ACTCGCATGTTTCGCTACTT R: AGGGATTGGAGCACTTGTTG
IL-10	F: GGTTGCCAAGCCTTATCGGA R: GAGAAATCGATGACAGCGCC
IL-1b	F: TGCCACCTTTTGACAGTGATG R: TGTGCTGCTGCGAGATTTGA
TNF	F: GTAGCCCACGTCGTAGCAAA R: ACAAGGTACAACCCATCGGC

IL-23a	F: CAGCTCTCTCGGAATCTCTGC R: GATCCTTTGCAAGCAGAACTGG
Nos2	F: GGTGAAGGGACTGAGCTGTT R: ACGTTCTCCGTTCTCTTGCAG
Arg1	F: GTACATTGGCTTGCGAGACG R: ATCGGCCTTTTCTTCCTTCCC
C-Maf	F: GGATGGCTTCAGAACTGGCA R: AACATATTCCATGGCCAGGG
B2M	F: TGCTATCCAGAAAACCCCTCA R: TTTCAATGTGAGGCGGGTGG
IL-5	F: CTCTGTTGACAAGCAATGAGACG R: TCTTCAGTATGTCTAGCCCCTG
TGF $\beta$	F: CTGACGTCCTGGAGTTGTACGG R: GGTTTCATGTCATGGATGGTGC
Muc 3	F: CGTGGTCAACTGCGAGAATGG R: CGGCTCTATCTCTACGCTCTC

Tabela 7 - Condições de ciclagem para qPCR com RNA total do cólon.

Ciclagem	
50°C	2 min
95°C	10 min
95°C	15 s
60°C	30 s
72°C	30 s

} 40x

#### 4.14. Produção do anticorpo anti-CD3 associado à parede

##### 4.14.1. Cultivo em meio YPD

Um clone da *S. boulardii* transformada com o vetor de expressão do anticorpo (Sb CD3) foi isolado em meio YPD Ágar, suplementado com 400  $\mu\text{g/mL}$  de Geneticina (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e incubado a 30°C por 48 horas, em seguida uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio YPD suplementada com 400  $\mu\text{g/mL}$  de Geneticina e incubada em shaker a 200rpm, 30°C overnight. No outro dia, a partir do pré-inóculo, foi feito o inóculo em Erlenmeyer de um litro com 100 mL de meio YPD padronizando a OD<sub>600</sub> inicial para 0.2. O inóculo foi incubado a 30°C, 200 rpm por 24 horas, e então a cultura foi centrifugada a 3,000 x g por 10 minutos, e o sobrenadante foi separado do pellet.

#### **4.14.2. Preparo das Amostras**

As células sedimentadas por centrifugação foram lisadas e a fração solúvel intracelular foi separada da parede celular para análise por Dot Blot. O pellet sedimentado por centrifugação foi submetido a rompimento mecânico utilizando pérolas de vidro de 1 mm de diâmetro, que foram adicionadas a um eppendorff de 1,5 mL em uma proporção de 1:1 com as células sedimentadas ressuspendidas em PBS. As células foram então submetidas a intensa agitação em agitador do tipo *vórtex* por 20 minutos, e em seguida centrifugadas a velocidade máxima ate a separação completa do sedimento e da fração solúvel intracelular. O sobrenadante de cultura foi concentrado até o volume de 500 µL utilizando o Millipore Centriprep™ Centrifugal Filter Units 10,000 MWCO (Merck, Darmstadt, Germany).

As amostras do sedimento celular, fração solúvel intracelular e sobrenadante de cultura concentrado foram submetidos a análise por Dot Blot para a detecção da expressão do anticorpo anti-CD3 *in vitro*.

#### **4.14.3. Imunodeteccção por Dot Blot**

Após a preparação das amostras, foi realizado um Dot Blot utilizando a membrana de nirocelulose PROTRAN 0,45 mm (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, EUA). Cinco µL de cada amostra foi pipetado na membrana, que em seguida foi incubada com a solução de bloqueio (PBS 1X e Molico 5%) por pelo menos 1 hora, sob leve agitação. A solução foi desprezada e a membrana foi lavada 3 vezes com PBST 0,1%. Logo após, foi adicionado o anticorpo primário murino HA-probe F-7 sc-7392 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) em uma diluição de 1:1000 em PBS. Após 1 hora sob leve agitação, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBST 0,1% e prontamente incubada com o anticorpo secundário, diluído 1:2000 em PBS, Bovine anti-mouse IgG-AP sc-2377 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), por 1 hora sob leve agitação. A membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBST 0,1%, e incubada por 5 minutos com APB (NaCl 100 mM; Tris-HCl 100 mM pH 9,5; MgCl<sub>2</sub> 5 mM) preparado na hora, em seguida foi adicionado o substrato cromogênico NBT/BCIP Stock Solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) até o aparecimento da proteína. A membrana foi lavada com água destilada, seca a temperatura ambiente.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização da *Saccharomyces boulardii*

#### 5.1.1. Determinação da Temperatura Ótima de Crescimento

A *Saccharomyces boulardii* foi inicialmente isolada de um comprimido Repoflor®, e então cultivada de acordo com o item 4.1. Devido a uma divergência na literatura sobre a sua temperatura ótima de crescimento, foi feita uma curva de crescimento a diferentes temperaturas para teste da condição ideal. Segundo ALTMANN, 2018 a temperatura ideal de crescimento da levedura é 30°C, já DOURADINHA *et al.*, 2013 reportaram que a temperatura ótima é 37°C. Assim, o cultivo da linhagem selvagem foi feito em meio rico YPD a temperatura de 30°C e 37°C, onde a densidade ótica foi monitorada ao longo de 72 horas (Figura 3). Foi determinado 30°C como a melhor temperatura para o cultivo, uma vez que nessa temperatura a *S. boulardii* alcança maiores OD<sub>600</sub> em menor tempo, além de alcançar o platô em uma OD<sub>600</sub> de 36 enquanto a cultura a 37°C chegou apenas a OD<sub>600</sub> de 28. Apesar de ter a melhor temperatura de crescimento a 30°C, o seu crescimento a 37°C lhe garante a vantagem de ser uma das poucas leveduras que sobrevive e tem um bom crescimento a temperatura corporal humana, como relataram KELESIDIS; POTHOUKAKIS, 2012.

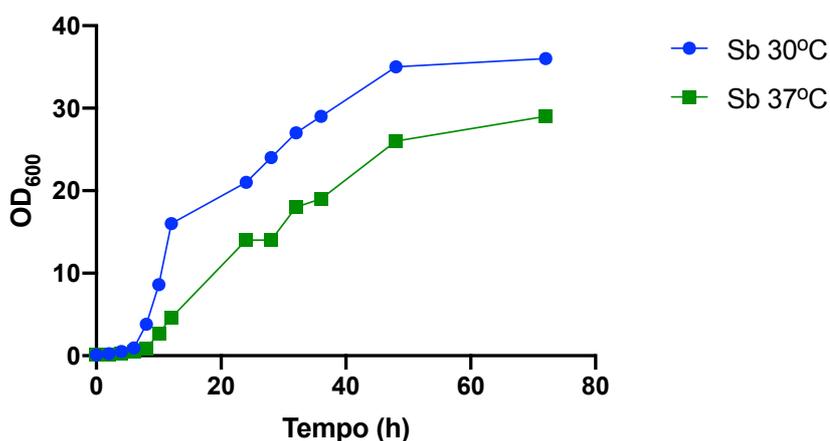


Figura 3 - Efeito da temperatura no crescimento da *S. boulardii*. O crescimento da *S. boulardii* selvagem a 30°C (Círculo azul) e 37°C (Quadrado verde) em meio foi monitorado ao longo de 72 horas. A levedura foi cultivada em meio YPD em incubadora a 200 rpm e o crescimento foi medido pela densidade ótica a 600nm.

### 5.1.2. Estabelecimento de Condições Ideais de Crescimento

Apesar da *S. boulardii* conseguir crescer em ambientes anaeróbicos como relataram HUDSON *et al.*, 2014, foi observado em cultivos anteriores que uma maior aeração levava a um melhor crescimento da levedura, pois com um menor volume de meio no Erlenmeyer a cultura alcançou maiores ODs<sub>600</sub>. A quantidade adequada de oxigênio melhora o crescimento da levedura como demonstraram DU *et al.*, 2012, porém, nos nossos últimos cultivos foi observado o melhor crescimento da *S. boulardii* utilizando 1/10 do volume do Erlenmeyer, enquanto DU *et al.*, 2012 otimizaram o crescimento da levedura com 1/5 do volume. Assim, em todos os cultivos desse trabalho o volume de meio utilizado foi sempre 1/10 do volume do Erlenmeyer.

Com isso em mente, foi testado o crescimento da levedura em Erlenmeyer aletado com o objetivo de aumentar a aeração durante o cultivo e aumentar o crescimento da *S. boulardii* para um possível aumento da produção do anticorpo (Figura 4A). Sabe-se que elevadas concentrações do substrato inibe o crescimento da levedura (MULLER *et al.*, 2007) então foi testado o crescimento com suplementação de 1% de glicose a cada 24 horas (Figura 8B) para evitar o choque osmótico que poderia ser causado ao aumentar o substrato de uma vez só.

O aumento da aeração no cultivo utilizando o Erlenmeyer aletado melhorou o crescimento da levedura em comparação ao crescimento normal, pois com o Erlenmeyer normal a cultura alcançou o platô em uma OD<sub>600</sub> de 30, enquanto a cultura no Erlenmeyer aletado alcançou uma OD<sub>600</sub> de 40 após 52 horas de cultivo. A suplementação de glicose (fonte de carbono da levedura) a cada 24 horas aumentou ainda mais o crescimento da *S. boulardii*, levando a cultura em Erlenmeyer aletado a alcançar uma OD<sub>600</sub> de 54 após 72 horas (Figura 4B). Estes resultados diferem do que MULLER *et al.*, 2007 demonstraram, pois os autores sugerem que apenas o aumento da oxigenação seja responsável pelo aumento do crescimento da levedura, e aqui foi comprovado que com o aumento do substrato e da aeração tem-se a maior quantidade de células. Desse modo as condições ideais de crescimento da levedura (que levam ao maior número de células) são: a 30°C, 200 rpm em meio YPD 2% de glicose com suplementação de 1% de glicose a cada 24 horas em Erlenmeyer aletado.

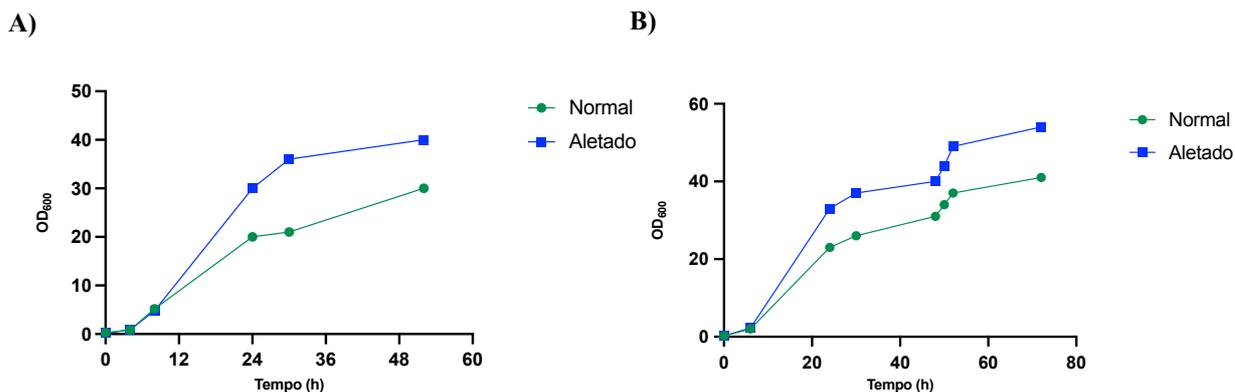


Figura 4 – Aumento da taxa de crescimento da *S. boulardii*. Os cultivos foram feitos em meio YPD a 30°C. (A) Comparação do crescimento da levedura cultivada em Erlenmeyer aletado (Quadrado azul) e normal (Círculo verde); (B) Comparação do crescimento da *S. boulardii* cultivada em Erlenmeyer aletado (Quadrado azul) e normal (Círculo verde) com suplementação de 1% de glicose a cada 24 horas.

### 5.1.3. Crescimento em Meio YNB

Foi realizado o crescimento da levedura em meio definido visando posteriormente facilitar a purificação do anticorpo, por ser um meio definido de sais que contém menos proteínas. A curva de crescimento foi feita com a *S. boulardii* por 28 horas a 30°C em meio YNB, suplementado com 2% de glicose (Figura 5). Nota-se que em meio definido a levedura alcança OD<sub>600</sub> bem mais baixa (chegando na fase estacionária na OD<sub>600</sub> de 7,0) quando comparado ao crescimento em meio rico. Esse menor crescimento já era esperado, pois como relataram HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2005 geralmente microrganismos crescem mais vigorosamente em meios ricos do que em meios definidos, devido aos meios ricos conterem precursores biossintéticos que podem ser canalizados diretamente para as vias anabólicas, reduzindo a necessidade de produzir esses precursores e economizando energia metabólica.

Para melhorar o crescimento da *S. boulardii* nesse meio sem aminoácidos, foi adicionado o tampão (0,4% ácido aspártico e 0,4% ácido glutâmico pH 5,5 – 6,0) para evitar a acidificação, pois após 24 horas o meio está no pH de 2,0 – 2,5. Observa-se que a adição do tampão ao meio leva a levedura a OD<sub>600</sub> mais altas, alcançando o platô na OD<sub>600</sub> de 12,0, o que apoia o demonstrado por DU *et al.*, 2012, que o pH ótimo de crescimento da *S. boulardii* é 5,5. HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2005 relataram que a suplementação de aminoácidos em meio YNB não aumentou as taxas de crescimento em *S. cereviceae* utilizando glicose como fonte de carbono, o que apoia a ideia de que o pH do tampão levou ao melhor crescimento da *S. boulardii*. Também foi testado o crescimento em Erlenmeyer aletado, que levou a levedura a alcançar a maior OD<sub>600</sub> (de 14,0), mas como não houve muita diferença no crescimento optamos

por utilizar o Erlenmeyer normal para o cultivo. Desse modo, todos os cultivos com meio YNB foram feitos em Erlenmeyer normal, com adição do tampão, a 30°C.

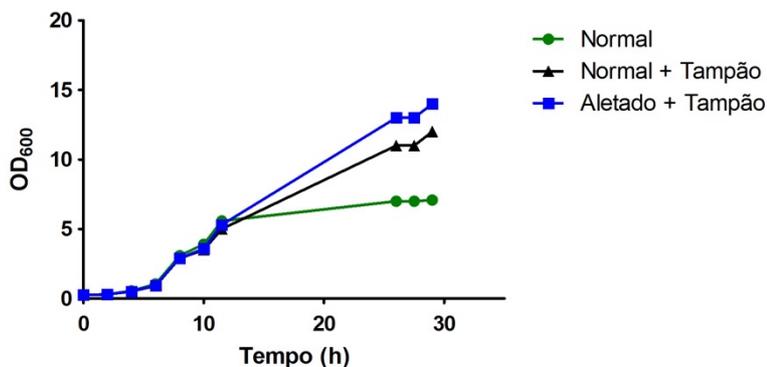


Figura 5 - Curva de crescimento da *S. boulardii* em meio definido. A levedura foi cultivada em meio YNB 0,67% sem aminoácidos a 30°C. (Círculo verde) cultivo em Erlenmeyer normal; (Triângulo preto) cultivo em Erlenmeyer normal com adição do tampão pH 5,5; (Quadrado azul) cultivo em Erlenmeyer aletado com adição do tampão pH 5,5.

#### 5.1.4. Curva de Resistência a Geneticina

Para o gene de resistência a Geneticina (G418R) ser usado como uma marca de seleção, a levedura precisa ser sensível a Geneticina, que é um antibiótico seletivo para leveduras recombinantes (ALTMANN, 2018). O uso de marcadores de seleção é crucial na manipulação do DNA, e até o momento, apenas 2 foram usados com sucesso na seleção de transformantes de *S. boulardii*: higromicina B e G418R (DOURADINHA *et al.*, 2013). Desse modo, foi feita a curva de resistência a Geneticina cultivando a *S. boulardii* selvagem a 30°C e 37°C na presença e ausência do antibiótico (Figura 6). A concentração da Geneticina variou de 50 µg/mL - 1600 µg/mL. Houve aumento da OD<sub>600</sub> apenas na cultura sem a Geneticina (círculo vermelho), a levedura não conseguiu crescer na presença do antibiótico em nenhuma das concentrações testadas, apoiando assim os resultados de ASTROMSKAS; COHN, 2007 que demonstraram que até a concentração de 30 µg/mL era suficiente para impedir o crescimento de *Saccharomyces*. Assim, a *Saccharomyces boulardii* é sensível ao efeito do antibiótico em todas as concentrações e temperaturas testadas, então a Geneticina pode ser utilizada como marca de seleção para a levedura.

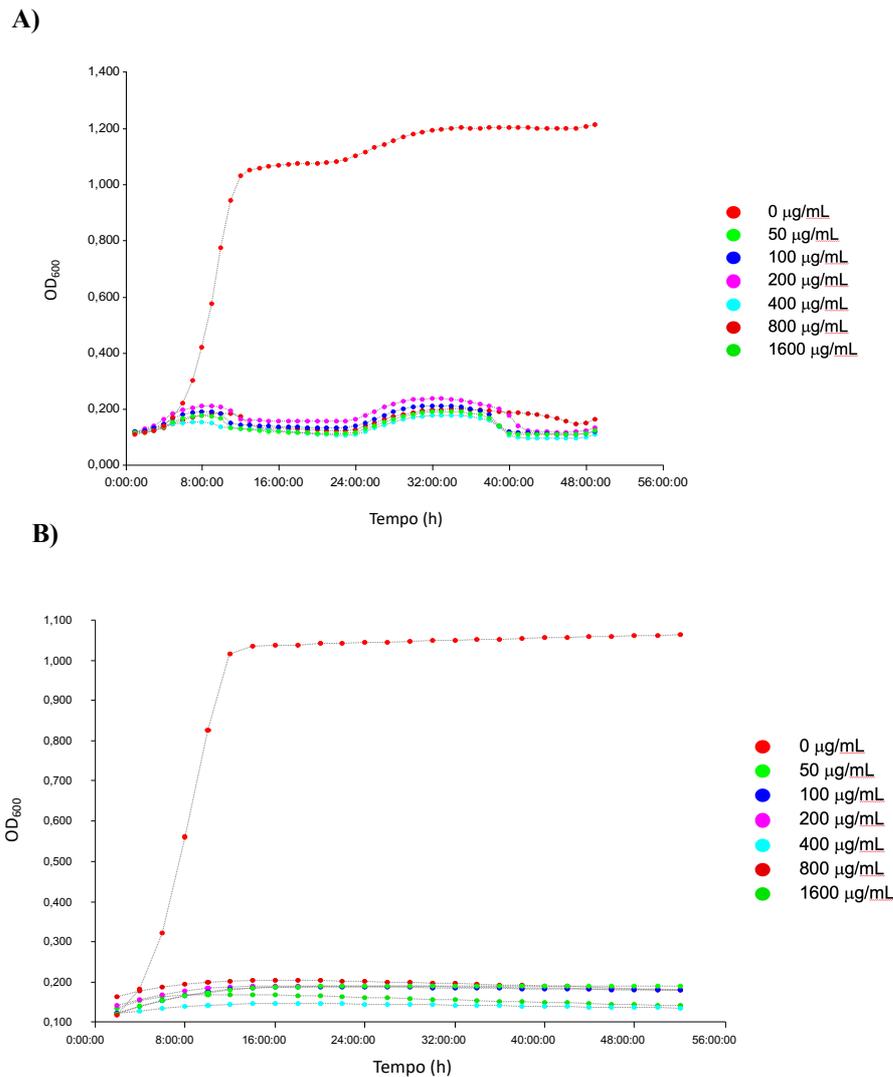


Figura 6 - Curva de resistência a Geneticina. O cultivo da *S. boulardii* selvagem foi realizado a 30°C (A) e 37°C (B) com diferentes concentrações de Geneticina: (vermelho) 0 µg/mL; (verde claro) 50 µg/mL; (azul escuro) 100 µg/mL; (rosa) 200 µg/mL; (azul claro) 400 µg/mL; (vinho) 800 µg/mL; (verde escuro) 1600 µg/mL. O crescimento da levedura foi medido pela OD<sub>600</sub>.

### 5.1.5. Determinação da faixa de concentração fungicida e fungistática do antibiótico.

A concentração ideal de Geneticina a ser adicionada no meio pode variar para diferentes espécies e cepas, usualmente usado na faixa de 25 µg/mL - 400 µg/mL. Geralmente, para experimentos de seleção da *S. cerevisiae* é utilizado 200 µg/mL de Geneticina, e para a *S. castellii* é rotineiramente utilizado a concentração de 75 µg/mL (ASTROMSKAS; COHN, 2007). A fim de encontrar a melhor concentração de uso do antibiótico para a *S. boulardii* foi feito um teste do efeito da Geneticina na levedura de acordo com o item 4.4. A contagem de colônias se encontra na Tabela 8. Observa-se que a cultura com a concentração de 200 µg/mL

de Geneticina, quando plaqueada sem a pressão seletiva volta a crescer, sugerindo um efeito fungistático do antibiótico. Já na concentração de 400 µg/mL, mesmo com a retirada do antibiótico na placa não houve crescimento, sugerindo um efeito fungicida. Assim, durante todo o trabalho, quando necessário nos cultivos foi utilizado a concentração 400 µg/mL de Geneticina para garantir a melhor seleção dos transformantes.

Tabela 8 - Efeito da Geneticina na *S. boulardii*. Contagem de UFC das placas com e sem antibiótico dos cultivos até 24 horas em meio YPD com diferentes concentrações do antibiótico.

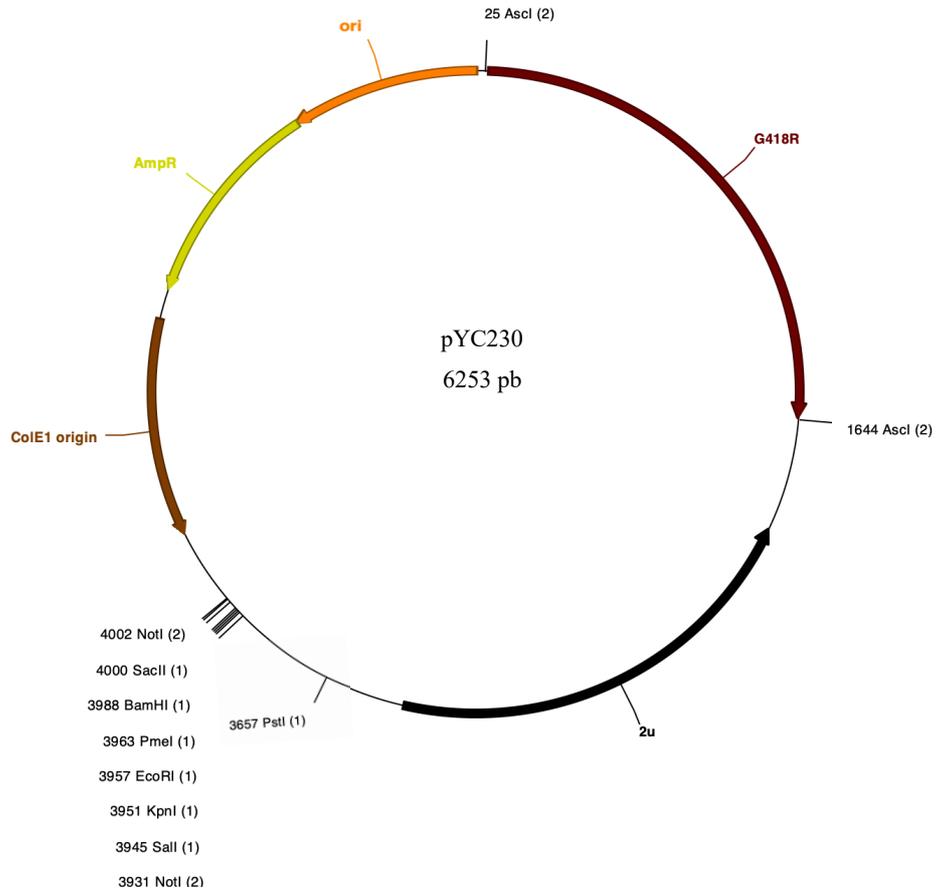
[Antibiótico no inoculo]	[Antibiótico na placa]	0h	4h	8h	12h	24h
0 µg/mL	0 µg/mL	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
200 µg/mL	0 µg/mL	>1000	>100	0	>1000	0
	200 µg/mL	0	0	0	0	0
400 µg/mL	0 µg/mL	>1000	19	0	0	0
	400 µg/mL	0	0	0	0	0

## 5.2. Construção do vetor pYCTNF

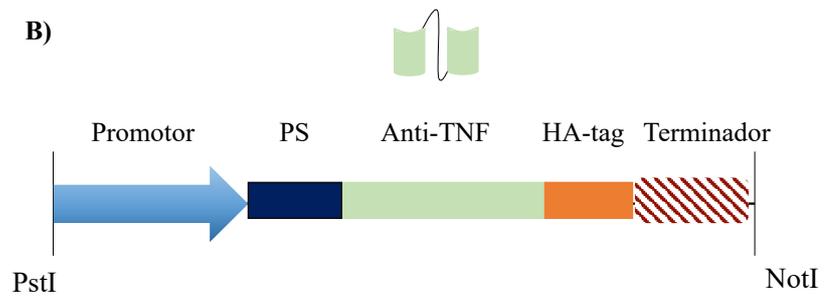
Para possibilitar a produção do fragmento de anticorpo anti-TNF em *Saccharomyces boulardii*, foi construído o vetor de expressão pYCTNF. Para sintetizar o cassete de expressão, foram utilizadas as sequencias do promotor e terminador de transcrição do gene PGK de *S. cerevisiae*, a sequência líder do peptídeo sinal *Mating Factor* Alpha, e a sequência do fragmento scFv do anticorpo Infliximabe. Para todas as sequencias foram utilizados os códons preferenciais de *Saccharomyces cerevisiae*.

Após a síntese, esse cassete de expressão foi clonado no vetor pYC230 (Figura 7A), um vetor de expressão em leveduras que contém a origem de replicação 2µ e o gene de resistência a Geneticina (G418R), resultando no vetor de expressão do anticorpo pYCTNF (Figura 7C). O pYCTNF contém então: o gene que codifica o scFv Anti-TNF sob controle do promotor e terminador de transcrição do gene PGK, a origem de replicação 2µ e o G418R que foi usado como marca de seleção. O esquema do cassete de expressão está na Figura 7B. Durante os experimentos o vetor pYC230 foi utilizado como o controle vetor vazio (VV).

A)



B)



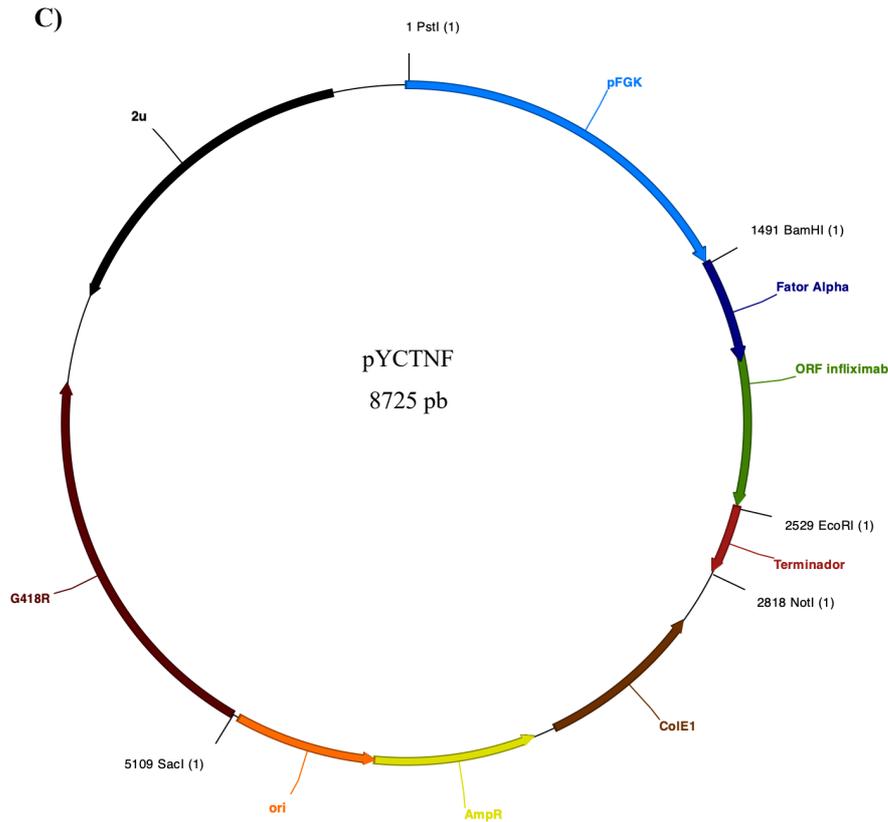


Figura 7 – Representação esquemática dos plasmídeos pYC230 e pYCTNF. (A) Vetor de expressão em leveduras pYC230 que contém o gene de resistência a Geneticina (G418R). (B) Esquema do cassete de expressão para a produção anticorpo, com o promotor PGK, a sequência líder do peptídeo sinal Fator Alpha Mating, fragmento scFv do anticorpo anti-TNF e terminador PGK. (C) Vetor de expressão do scFv anti-TNF que contém o cassete de expressão e a resistência Geneticina.

Os dois plasmídeos foram utilizados para transformar *E. coli* XL10Gold e extraídos por preparação em escala média com o kit QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Em seguida foi feita uma digestão com a endonuclease NotI, que possui apenas um sítio de clivagem nos vetores para linearização, e com as enzimas de restrição NotI e PstI para confirmação da presença do inserto sintético clonado no pYCTNF. A confirmação do tamanho foi feita por eletroforese em gel de agarose por comparação ao marcador de massa molecular. O perfil de restrição dos vetores pode ser analisado na Figura 8, onde as bandas esperadas de 6.2 kb para o pYC230 linearizado, 2.8 kb para o inserto (cassete de expressão) e 8.7 kb para o pYCTNF linearizado (uma vez que se tem a perda de 345 pb com a digestão do pYC230 para a inserção do cassete de expressão) podem ser visualizadas. Com essa análise confirmamos a obtenção do vetor de expressão do anticorpo anti-TNF pYCTNF que em seguida foi transformado na levedura *S. boulardii*.

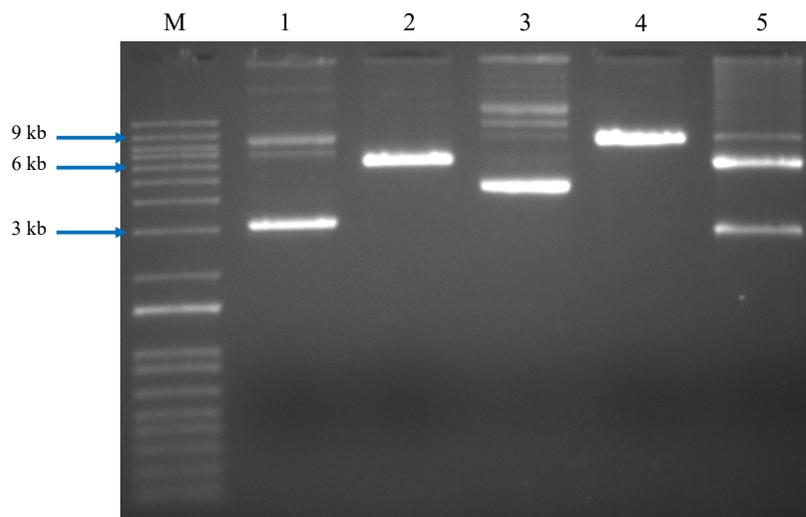


Figura 8 - Análise do perfil de restrição dos vetores pYC230 e pYCTNF. As amostras foram separadas em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídeo. (M) marcador 1kb Plus Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); (1) pYC230 intacto; (2) pYC230 digerido com NotI; (3) pYCTNF intacto; (4) pYCTNF digerido com NotI; (5) pYCTNF com digestão dupla (NotI e PstI).

### 5.3. Transformação da Levedura *S. boulardii*

Após a construção e confirmação dos plasmídeos, foi feita a transformação destes na levedura seguindo o protocolo adaptado de HUDSON *et al.*, 2016 (descrito no item 4.7). Com o crescimento dos clones transformados em placa com meio seletivo (YPD suplementado com 400 µg/mL de Geneticina), algumas colônias escolhidas aleatoriamente foram submetidas a PCR de colônia para identificação do gene alvo e confirmação da transformação. Foram desenhados iniciadores específicos para as sequências do G418R e do fragmento scFv anti-TNF a fim de confirmar a transformação com os vetores pYC230 e pYCTNF respectivamente. As sequências desses iniciadores estão listadas na Tabela 3.

Todos os clones transformados com o vetor vazio (Sb VV) testados mostraram um amplicon do tamanho esperado (1619 pb) referente à sequência do gene G418R (Figura 9A). O mesmo se repetiu para a transformação com o pYCTNF (Figura 9B), onde todos os clones (Sb TNF) testados mostraram um amplicon de 850 pb, tamanho esperado para a sequência do scFv, confirmando que os clones transformantes que cresceram no meio seletivo de fato internalizaram os vetores.

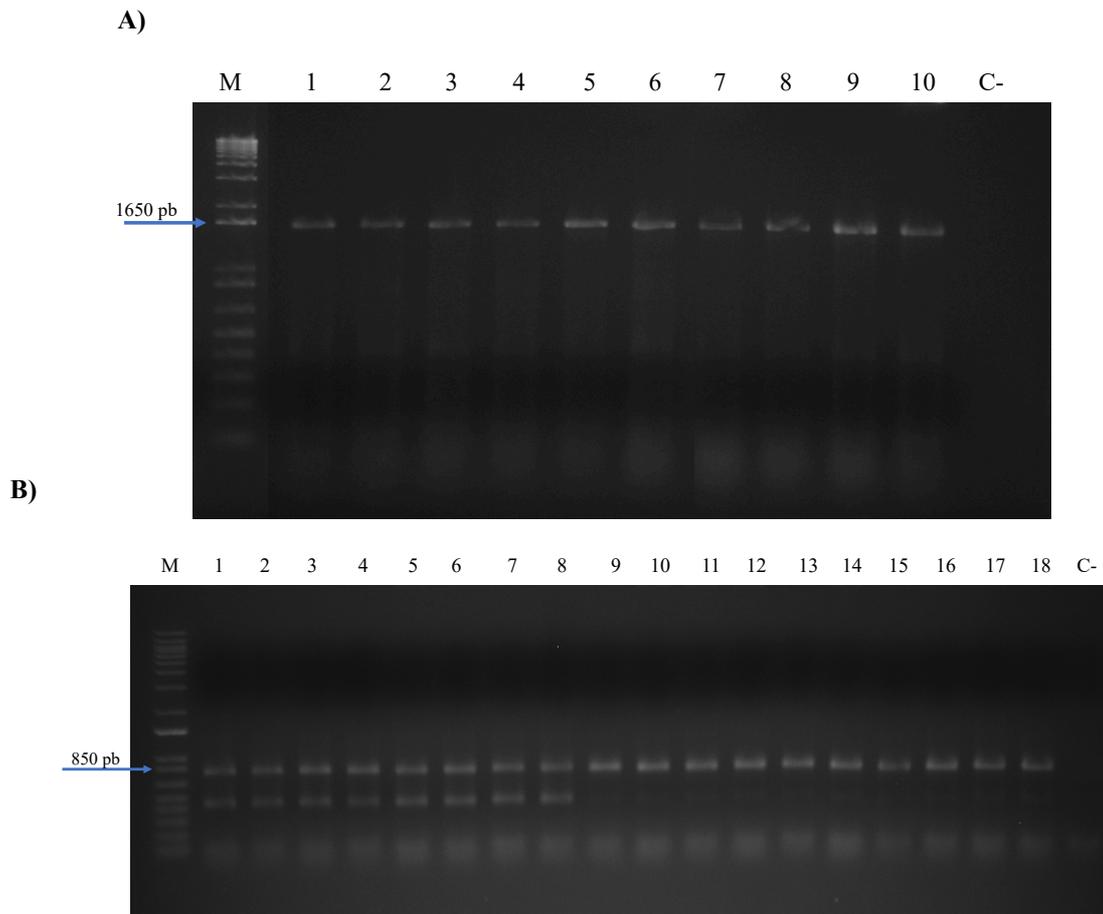


Figura 9 - Análise dos amplicons obtidos a partir de PCR de colônia de transformantes da *Saccharomyces boulardii*. Clones aleatórios obtidos a partir da transformação da *S. boulardii* com os vetores pYC230 e pYCTNF foram submetidos a PCR de colônia. (A) Amostras de clones de Sb::pYC230 (Sb VV) submetidos à PCR com os iniciadores para a sequência do G418R: (M) marcador 1kb plus ladder, (1 – 10) diferentes transformantes Sb VV, (C-) controle negativo da reação; (B) Amostras de clones de Sb::pYCTNF (Sb TNF) submetidos a PCR de colônia utilizando os iniciadores para sequência do gene codificador do scFv anti-TNF: (M) 1kb plus ladder, (1 – 18) diferentes transformantes Sb TNF, (C-) controle negativo da reação.

### 5.3.1. Curva de Crescimento dos Transformantes

Após a determinação das condições ideais de cultivo, foi feita a curva de crescimento a 30°C das linhagens utilizadas no trabalho (Figura 10): *S. boulardii* selvagem (Sb WT), transformada com o vetor vazio (Sb VV) e dois clones transformados com o vetor de expressão do anticorpo anti-TNF (Sb TNF5 e Sb TNF10). Não houve uma diferença entre o crescimento das linhagens, que chegaram a fase estacionária em uma OD<sub>600</sub> de 36-39, sugerindo assim que a produção da proteína não interfere no metabolismo e crescimento da levedura.

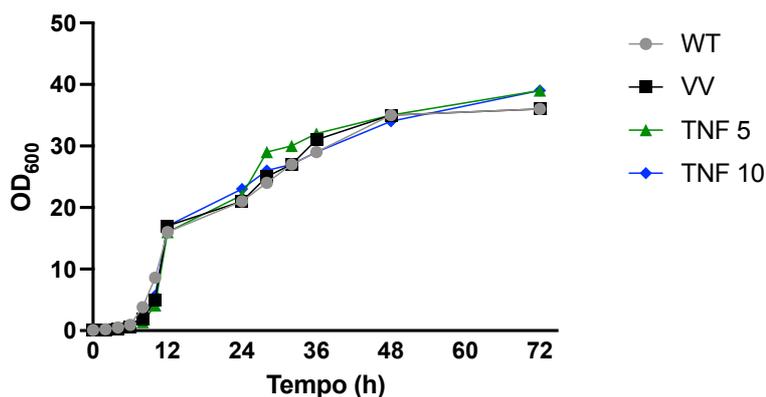


Figura 10 - Curva de crescimento das diferentes linhagens de *S. boulardii*. O cultivo foi feito em meio YPD e incubado a 30°C sob agitação de 200 rpm por 72 horas. (Círculo cinza) Sb WT; (Quadrado preto) Sb VV; (Triângulo verde) Sb TNF5; (Losango azul) Sb TNF10.

## 5.4. Produção do scFv Anti-TNF

### 5.4.1. Produção a 30°C e 37°C

Após a confirmação da transformação da levedura com o vetor vazio e o vetor de expressão do anti-TNF, foi feita a produção do anticorpo em meio YPD. Como há relatos na literatura da produção de proteínas heterólogas pela *S. boulardii* a temperatura de 30°C e 37°C (HUDSON *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2020) foi feita a produção nas duas temperaturas com a finalidade de testar qual a melhor condição para a expressão do scFv. Inicialmente foram testados dois clones transformantes (Sb TNF5 e Sb TNF10) a fim de descobrir se havia diferença de produção entre eles. A Sb VV foi usada como controle negativo da expressão. Aliquotas de 50 mL do cultivo foram coletadas com 24, 48 e 72 horas de crescimento, o sobrenadante foi concentrado até 100 µL de acordo com o item 4.9.4.

O Dot Blot das amostras do sobrenadante concentrado mostra uma melhor expressão da proteína a 30°C (Figura 11A), além de uma diferença na expressão entre os clones SbTNF5 e SbTNF10. Essa diferença pode ocorrer devido a quantidade de plasmídeos internalizados na hora do choque, onde um clone pode internalizar mais cópias do plasmídeo e assim expressar mais proteínas, HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2005 relataram que pode ocorrer a internalização de até 70 cópias de plasmídeo por célula. A secreção de proteínas por *Saccharomyces boulardii* foi demonstrada por LI *et al.*, 2020, onde os autores fazem a produção da sua proteína a 37°C, mas nesse trabalho foi demonstrado a melhor secreção pela levedura a 30°C. Em vista disso,

durante todo o trabalho foi utilizado o clone SbTNF10 por ser o melhor produtor e todas as produções foram feitas a 30°C com o objetivo de conseguir a melhor produção do anticorpo.

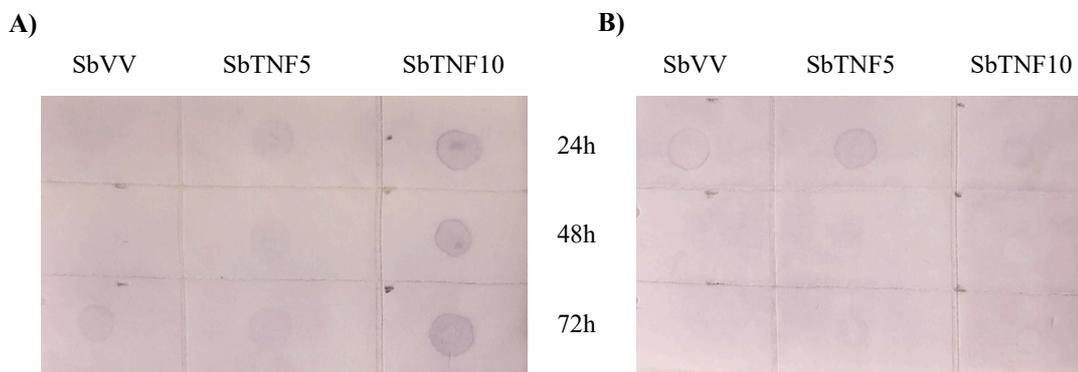


Figura 11 – Comparação da produção e secreção do scFv anti-TNF em diferentes temperaturas. Dot Blot dos sobrenadantes de cultura concentrados dos clones Sb TNF5 e Sb TNF10 cultivados a 30°C (A) e 37°C (B), alíquotas foram coletadas nos tempos de 24h (primeira fileira), 48h (segunda fileira) e 72h (última fileira). O Sobrenadante de cultura da SbVV foi utilizado como controle negativo. Os cultivos foram feitos em meio YPD e incubados a 200 rpm.

#### 5.4.2. Compartimentalização do anticorpo recombinante

Após a definição da temperatura ótima para o crescimento e expressão, foi feita a produção em meio YPD a 30°C, 200 rpm por 72 horas. Alíquotas de 100 mL do sobrenadante de cultura foram coletadas e centrifugadas a cada 24 horas, e o sedimento celular e o sobrenadante foram separados e preparados de acordo com os itens 4.9.3 e 4.9.4 respectivamente. As alíquotas de 100 mL do sobrenadante foram concentradas até o volume de 100 µL. A análise por Western Blot (Figura 12) mostra que a levedura está produzindo a proteína em todos os tempos de cultivo. O Western Blot da Figura 12A mostra que o anticorpo se encontra no sobrenadante em todos os tempos de cultivo, mas o Western Blot da fração solúvel intracelular (Figura 12B) mostra uma quantidade do scFv ficando dentro da célula. Assim, nessas condições de cultivo a *S. boulardii* não está secretando bem a proteína. Além disso, o tamanho esperado do anticorpo é de 22 kDa, no Western observa-se uma banda maior. Conclui-se então que a proteína não está perdendo o peptídeo sinal pois o tamanho esperado nesse caso é de 33 kDa. Já há relatos da produção e secreção de IL-10 (HUDSON *et al.*, 2014) e Leucocina C (LI *et al.*, 2020) pela *S. boulardii*, mas aqui é demonstrado pela primeira vez a expressão e secreção de um anticorpo por essa levedura. LI *et al.*, 2020 propõe a utilização da *S. boulardii* como um veículo de entrega de substâncias ao TGI, e com o êxito dessa expressão,

há a possibilidade de aplicação da *S. boulardii* geneticamente modificada como um veículo para a produção e distribuição de anticorpos neutralizantes no TGI com finalidade terapêutica.

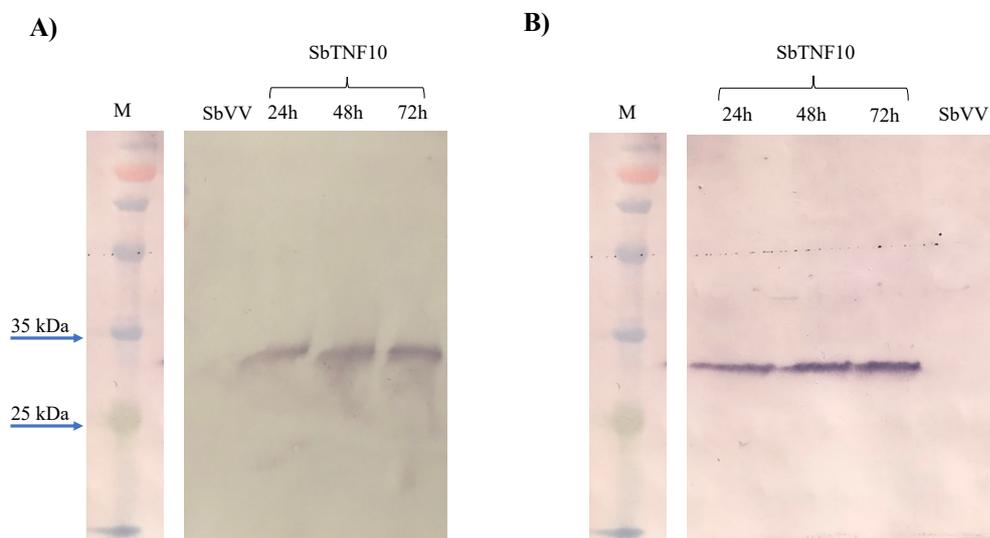


Figura 12 - Imunodeteção do scFv anti-TNF em diferentes extratos celulares. Produção do anticorpo pela *S. boulardii* em meio YPD a 30°C. A levedura transformada com o vetor vazio foi usada como controle negativo. (A) Western Blot dos sobrenadantes de cultura concentrados da Sb VV e Sb TNF10 com 24, 48 e 72 horas de crescimento. (B) Western Blot da fração solúvel intracelular da Sb VV e Sb TNF10 com 24, 48 e 72 horas de crescimento. (M) Marcador molecular prestained.

#### 5.4.3. Produção nas condições ideais de crescimento da levedura.

Como foi observado um aumento significativo da OD<sub>600</sub> no crescimento em Erlenmeyer aletado com suplementação de glicose a cada 24 horas, a levedura foi cultivada de acordo com o item 4.1.1, para testar se haveria um aumento na produção da proteína devido ao maior número de células, e se nas condições ótimas de crescimento ela secretaria melhor o anticorpo. O sobrenadante de cultura foi coletado e centrifugado a cada 24 horas, e o sedimento celular e o sobrenadante foram separados. As alíquotas de 100 mL do sobrenadante foram concentradas até o volume de 100 µL. O Western Blot dos sobrenadantes concentrados (Figura 13A) mostra um perfil de dupla banda sugerindo que houve o processamento da proteína para a secreção. O Western Blot da fração solúvel intracelular (Figura 13B) mostra novamente uma quantidade do scFv ficando na fração solúvel intracelular, não sendo secretado para o meio de cultura. Percebe-se nessas condições de cultivo uma menor produção do anticorpo quando comparado ao crescimento em Erlenmeyer normal (Figura 12). Desse modo, as condições ideais de cultivo da *S. boulardii* não são as condições ideais de expressão do scFv anti-TNF, e um maior número de células não levou a uma maior quantidade do anticorpo.

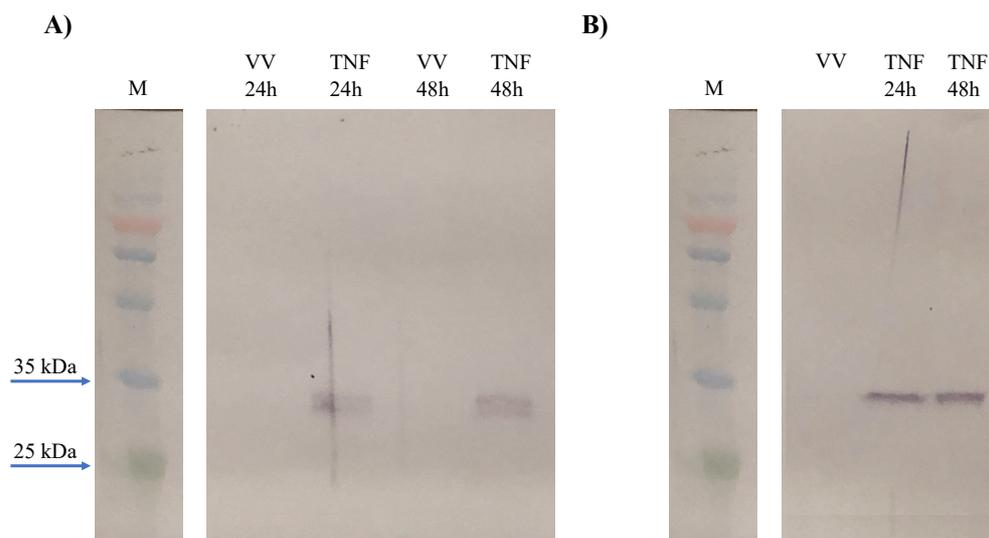


Figura 13 – Produção do scFv anti-TNF nas condições ótimas de cultivo da levedura. Produção do scFv em Erlenmeyer aletado com meio YPD e suplementação de 1% de glicose a cada 24 horas. (A) Western Blot dos sobrenadantes de cultura concentrados da Sb VV e Sb TNF com 24 e 48 horas de crescimento. (B) Western Blot da fração solúvel intracelular da Sb VV e Sb TNF com 24 e 48 horas de crescimento. (M) Marcador molecular prestained.

#### 5.4.4. Produção em Meio YNB

Tentando melhorar a expressão e secreção do scFv, foi testado a produção da proteína em meio YNB. Como a cultura nesse meio alcança  $OD_{600}$  mais baixas (por volta de 12,0), foi adicionado o antibiótico Geneticina na concentração de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para tentar estimular a produção. Alíquotas de 100 mL da cultura da Sb TNF5 e Sb TNF10 foram coletadas com 24 e 48 horas de crescimento. O pellet e o sobrenadante foram separados e este último foi concentrado até o volume de 100  $\mu\text{L}$ .

O Western Blot do sobrenadante concentrado (Figura 14A) mostra um aumento da produção do anticorpo, além de uma grande melhora na secreção deste para o sobrenadante de cultura, pois o Western Blot das amostras da fração solúvel intracelular (Figura 14B) mostra uma quantidade muito baixa da proteína. Esses resultados estão em desacordo com o que HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2005 relataram: *S. cerevisiae* quando cultivada em meio rico teve níveis 24 vezes mais elevados da proteína heteróloga xilanase quando comparado a cultivo em meio definido. Em contrapartida, HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2005 demonstraram que a *P. pastoris* tem a secreção de proteínas facilitada em o meio definido, mostrando o mesmo comportamento que a *S. boulardii*.

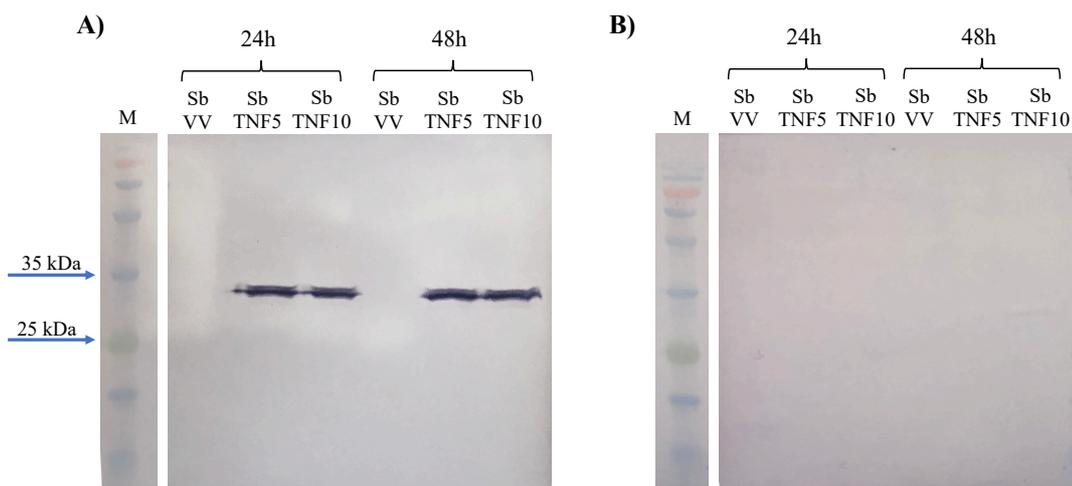


Figura 14 – Produção do fragmento scFv anti-TNF em meio definido. Produção do scFv em meio YNB 0,67% (sem aminoácidos) a 30°C de dois clones: Sb TNF5 e Sb TNF10. A Sb VV foi utilizada como controle negativo. (A) Western Blot dos sobrenadantes concentrados coletados com 24 h e 48 h de crescimento; (B) Western Blot da fração solúvel intracelular dos cultivos com 24 h e 48 h de crescimento. (M) marcador molecular prestained.

### 5.5. Purificação do scFv

Para fazer o teste de ligação do anticorpo ao antígeno com melhor eficiência, foi feita a purificação do anticorpo por Cromatografia de Exclusão Molecular, que faz a separação das proteínas por tamanho. As frações foram coletadas manualmente acompanhando a variação da absorbância pela UV<sub>280</sub>, e posteriormente as frações coletadas foram submetidas a análise por Western Blot para detectar em qual fração a proteína se encontrava. Ao total foram coletadas 16 frações. Os dados das frações 9 a 16 não apresentaram imunodeteção para o anticorpo scFv anti-TNF, e não estão apresentados aqui.

No Western Blot (Figura 15A) o anticorpo foi detectado nas primeiras frações coletadas, ou seja, as proteínas que saíram no primeiro pico de absorbância (Figura 15C). Pelo gel corado com prata (Figura 15B) nota-se outras proteínas presentes na amostra, o que sugere que o scFv está agregado a proteínas do meio de cultura. A calibração da coluna com a proteína padrão Blue Dextran 2000 permite a determinação do “volume vazio” da coluna, ou seja, proteínas que passam por fora dos poros da coluna por serem muito grandes. O anti-TNF se encontra no primeiro pico (seta preta), que comparado com o padrão molecular, saiu no volume vazio da coluna, sugerindo a agregação a outras proteínas com dimensões supramoleculares.

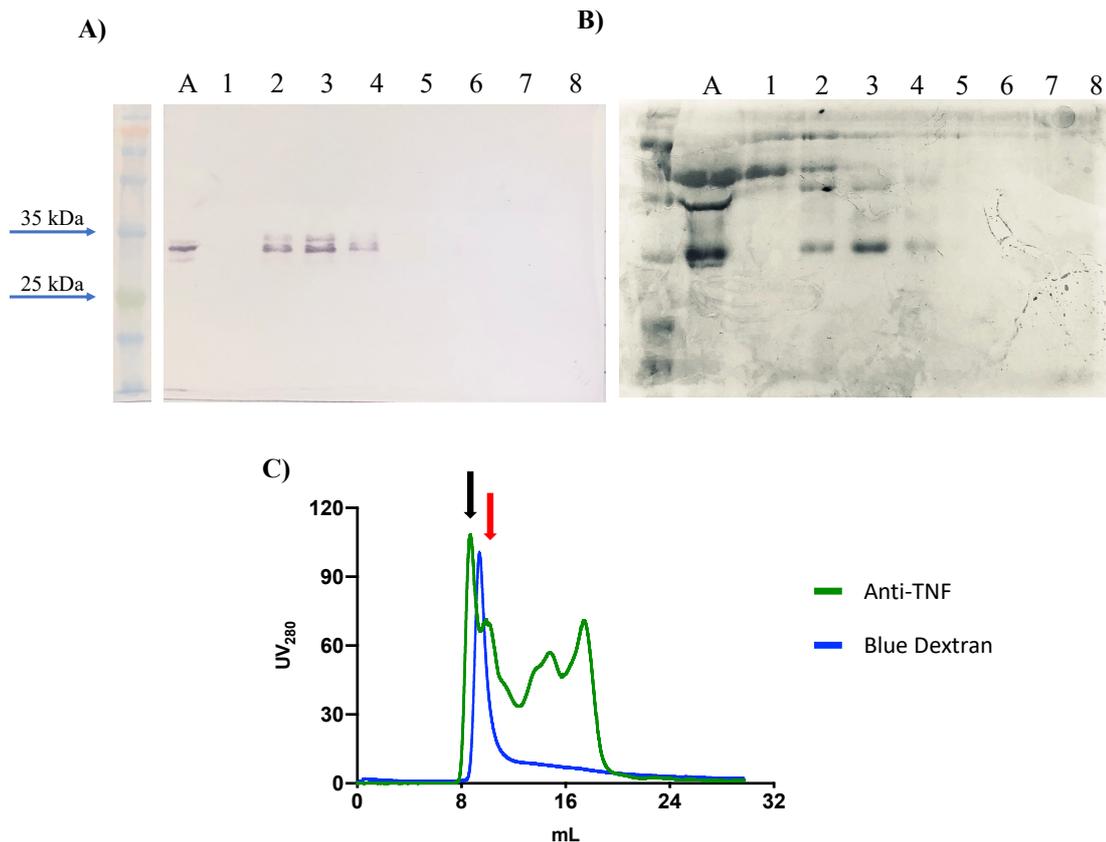


Figura 15 - Purificação do anticorpo anti-TNF por Cromatografia de Exclusão Molecular. (A) Western Blot e (B) gel corado com prata das frações coletadas pós purificação (A - Proteína antes da purificação; 1 ao 8 - frações coletadas); (C) Gráfico dos picos de absorção a 280nm do sobrenadante concentrado (verde) e da proteína de calibração Blue Dextran (azul); (seta preta) pico de absorbância referente as frações 1-4; (seta vermelha) pico de absorbância referente as frações 5-8.

Os anticorpos scFv muitas vezes sofrem de limitações como instabilidade e agregação, e a causa desses problemas permanece pouco conhecida (TU *et al.*, 2016). Como essa agregação pode afetar a capacidade de ligação do anticorpo, foram feitas várias tentativas de desagregação. Inicialmente foi feita a adição de um detergente fraco (Tween 20, que ajuda na solubilização da proteína) no tampão do Akta, pois a proteína é lavada com esse tampão e fica diluída nele durante toda a purificação. Foi adicionado 0,1% de Tween 20, e essa mesma adição seguida de incubação do sobrenadante a 37°C por 20 minutos, mas não houve a desagregação das proteínas. Em seguida foi feita a adição de 10% de Glicerol ao tampão, mas apesar dos relatos do Glicerol ser um solvente que estabiliza proteínas e previne a agregação (VAGENENDE; YAP; TROUT, 2009), nesse caso não houve melhora nos resultados.

Depois disso foram adicionados reagentes durante a concentração do sobrenadante para evitar a agregação. Foi adicionado Arginina 0,4M (que estabiliza as proteínas durante o armazenamento e faz a supressão da agregação de proteínas segundo TSUMOTO *et al.*, 2004)

ou 10% de Glicerol, mas ambos reagentes não fizeram efeito. Em seguida foi adicionado 40% de Glicerol ao sobrenadante já concentrado, mas as proteínas continuaram agregadas. Então foi feito o crescimento em meio YNB adicionado de 10 ou 20% de Glicerol, mas as culturas cresceram muito pouco e o anticorpo continuou agregando a proteínas do meio.

O ponto isoelétrico (pI) de uma proteína é o pH onde a proteína se torna neutra, e esta propriedade depende da composição de aminoácidos da proteína. Em torno do pI a carga líquida de peptídeos e proteínas se aproxima de zero, e agregados tendem a se formar (ZHU *et al.*, 2005). Como o pI do scFv anti-TNF é 4,73 e o pH do meio YNB é 5,5 o crescimento foi feito ajustando o pH do meio para ficar ácido (3,5), neutro (6,5) e básico (8,0), para verificar se isso estaria influenciando na agregação. Durante a concentração dessas amostras também foi adicionado 10% de Glicerol, mas novamente a proteína continuou agregada. Por último foi feito o crescimento em meio rico YPD para verificar se a composição do meio estava causando a agregação. Após a concentração do meio foi adicionado Glicerol 40%, mas novamente o scFv continuou agregado.

## 5.6. ELISA

Apesar de não ter conseguido uma purificação total devido a agregação do anticorpo a outras proteínas, as amostras ficaram mais limpas após a purificação, então foi feito o teste de ligação do anticorpo ao TNF por ELISA. Foram utilizadas alíquotas obtidas da cromatografia de exclusão molecular e o TNF humano biotilinado, conforme descrito no item 4.11. Inicialmente foi feita a quantificação da proteína pelo método de Bradford. Após a purificação, a fração utilizada para o ELISA tinha 692,8 µg/mL de proteína total. Nas etapas de ligação do scFv e do TNF a placa foi incubada por 2 horas para aumentar a eficiência da ligação. O scFv se ligou com ótima eficiência ao TNF humano (Figura 16), em níveis comparáveis ao anticorpo comercial Infliximabe (que foi usado como controle positivo da reação), mostrando que mesmo agregado a outras proteínas o anticorpo continua tendo atividade biológica.

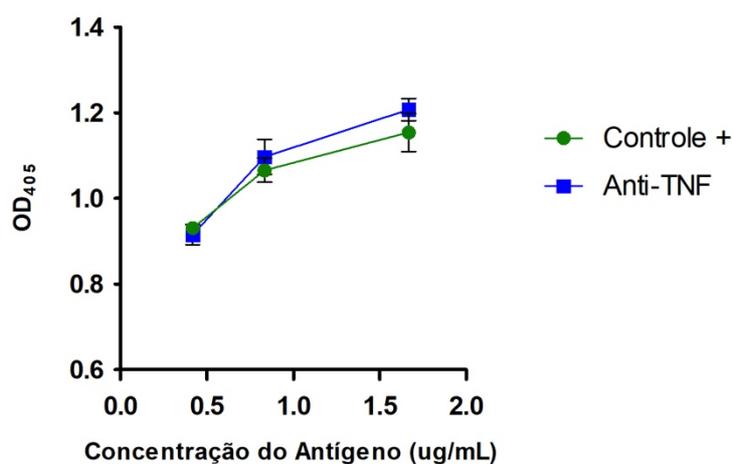


Figura 16 – Avaliação da atividade biológica do scFv anti-TNF. ELISA de ligação do scFv anti-TNF ao TNF humano. A reação foi incubada ao abrigo da luz por 10 minutos. O antígeno foi diluído em três concentrações (0,417 mg/mL, 0,834 mg/mL e 1,667 mg/mL). (Quadrado azul) Sobrenadante “purificado” do scFv anti-TNF; (Círculo verde) Infliximabe, controle positivo da reação.

### 5.7. Experimento *in vivo*

Antes de iniciar o experimento com os animais, foi testado o tempo de permanência da *Saccharomyces boulardii* no TGI dos camundongos, para definição da administração das doses. Foi feita uma única gavagem oral com  $1 \times 10^9$  células da Sb VV nos camundongos, e posteriormente a coleta das fezes em diversos horários, seguida de PCR de colônia de acordo com o item 4.8. A eletroforese da PCR de colônia se encontra na Figura 17 A e B, confirmando que as colônias crescidas na presença do antibiótico das fezes dos animais gavados, eram de fato a *S. boulardii* (bandas amplificadas), e as colônias crescidas das fezes dos animais controle, nas placas sem antibiótico, não eram a levedura (sem amplificação).

Após a contagem das UFCs das placas com meio seletivo, o tempo necessário para a eliminação total da *S. boulardii* do intestino dos camundongos foi determinada (Figura 19C). Após 48 horas não foi mais encontrado a levedura nas fezes dos camundongos, e após 24 horas a quantidade de levedura presente no intestino diminuiu muito. Esses resultados estão de acordo com o que relataram SAMONIS *et al.*, 2011, que a *S. boulardii* administrada por via oral atinge uma alta concentração intestinal rapidamente e mantém um alto nível estável desde que seja ingerida diariamente. Assim que a administração é descontinuada, ela é rapidamente eliminada do intestino e não coloniza permanentemente o TGI de camundongos. Dessa forma, foi decidido administrar as doses diariamente durante o ensaio *in vivo* para manter uma quantidade maior da levedura presente no intestino dos camundongos, e conseqüentemente do anticorpo também.

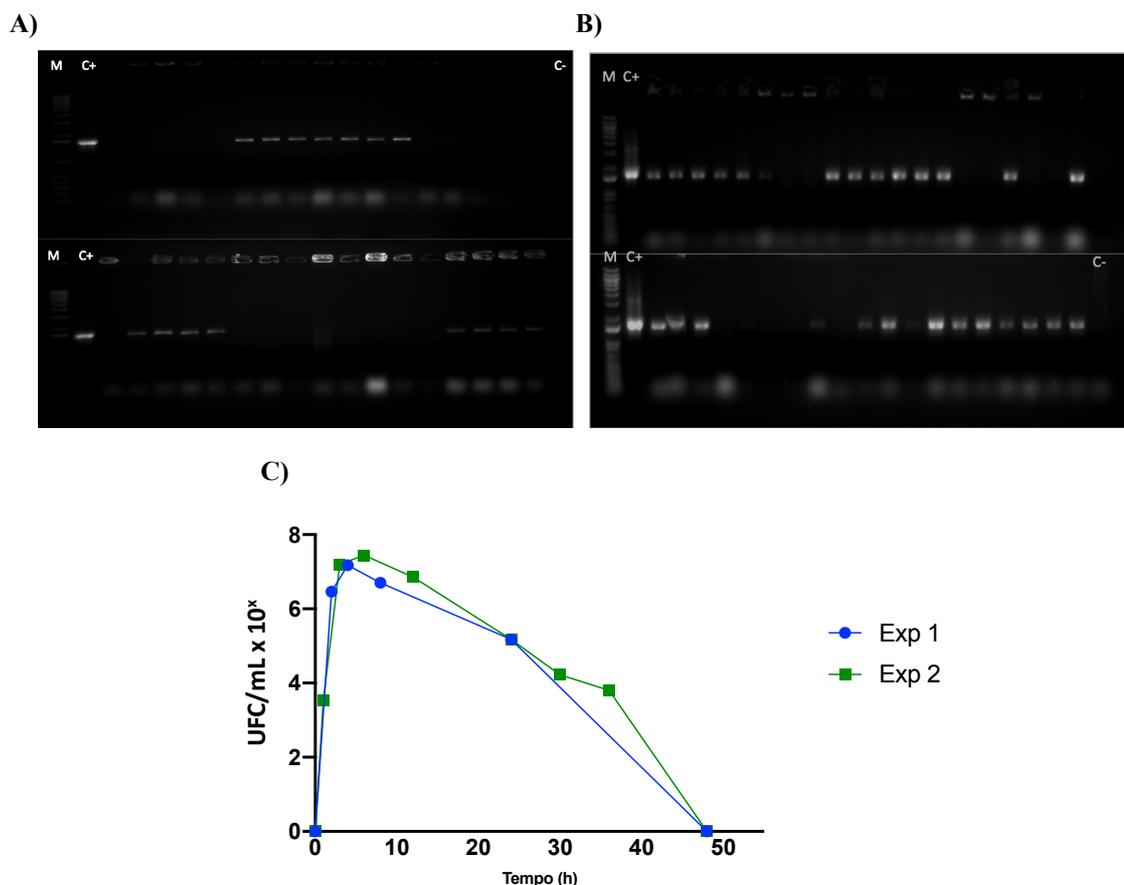


Figura 17 - Tempo de permanência da *Saccharomyces boulardii* no TGI de camundongos C57Black. (A) PCR de colônia das fezes dos animais gavados com a Sb VV do experimento 1; (B) PCR de colônia das fezes dos animais gavados com a Sb VV do experimento 2; (C) Contagem de UFC das placas com meio seletivo das fezes dos animais gavados com a levedura ao longo do tempo.

O ensaio *in vivo* foi um experimento piloto com 22 animais divididos em 5 grupos, 4 destes que eram controles: O NT grupo saudável; o DSS controle positivo da doença; o Sb WT e Sb VV controles internos do tratamento (animais receberam a levedura selvagem e transformada com o vetor vazio respectivamente); e o grupo que recebeu o tratamento com a levedura produtora do scFv neutralizante de TNF (Sb TNF). Dois animais foram a óbito durante o experimento um no grupo Sb WT e outro no Sb VV.

Inicialmente a indução da Colite experimental foi feita com DSS 2% diluído na água, e após 3 dias de indução sem notar nenhum sinal macroscópico da doença, foi aumentada a concentração do DSS para 3% a partir do quarto dia, e mantida até o final do experimento.

No dia da eutanásia foram medidos os parâmetros macroscópicos para o cálculo do DAI (Figura 18A) e o comprimento do cólon (Figura 18B). Não houve diferença significativa no

comprimento do colón entre os grupos. Todos os grupos que receberam DSS foram significativamente diferentes do grupo controle (NT) pelo cálculo do DAI, e o grupo tratado com a levedura produtora do anticorpo teve uma diferença significativa do grupo doente que não recebeu tratamento algum (DSS). Esses resultados são contraditórios aos efeitos da *S. boulardii* na Colite já demonstrados por DONG *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019; ZANELLO *et al.*, 2009, pois não houve uma melhora da doença no grupo gavado com a Sb WT, mas isso pode ter ocorrido pelo aumento do tempo de administração do DSS e uso deste fora do prazo de validade. A diferença significativa do grupo doente (DSS) para o grupo que recebeu a levedura produtora do anticorpo sugere que a neutralização do TNF ajudou a diminuir os sintomas da doença, e esta de acordo com demonstraram CHIABAI *et al.*, 2019, onde o scFv produzido por um vetor de expressão entregue por *L. lactis* a mucosa levou a neutralização do TNF e melhorou a Colite em camundongos.

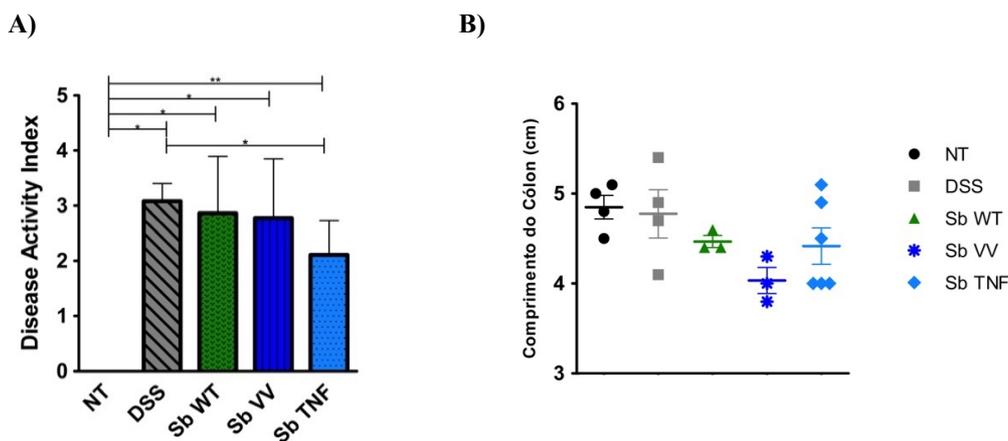


Figura 18 - Parâmetros macroscópicos da Colite no dia da eutanásia. (A) DAI dos grupos calculado de acordo com a tabela 5; (B) Comprimento do colón dos animais por grupo. (NT) Grupo controle negativo da doença; (DSS) Grupo controle positivo da doença; (Sb WT) Grupo tratado com a *S. boulardii* selvagem; (Sb VV) Grupo tratado com a *S. boulardii* transformada com o vetor vazio; (Sb TNF) Grupo tratado com a *S. boulardii* produtora do anti-TNF. A análise estatística foi feita pelo teste Mann-Whitney. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

Ao longo do experimento o peso dos animais foi medido diariamente (Figura 21 E). Todos os animais que receberam o DSS tiveram perda de peso corporal que se iniciou no quinto dia e se manteve até o final do experimento. A partir do 10º dia (Figuras 19 C e D) notamos uma diferença significativa entre o peso corporal dos grupos que receberam DSS comparado ao grupo controle, que se manteve até o último dia.

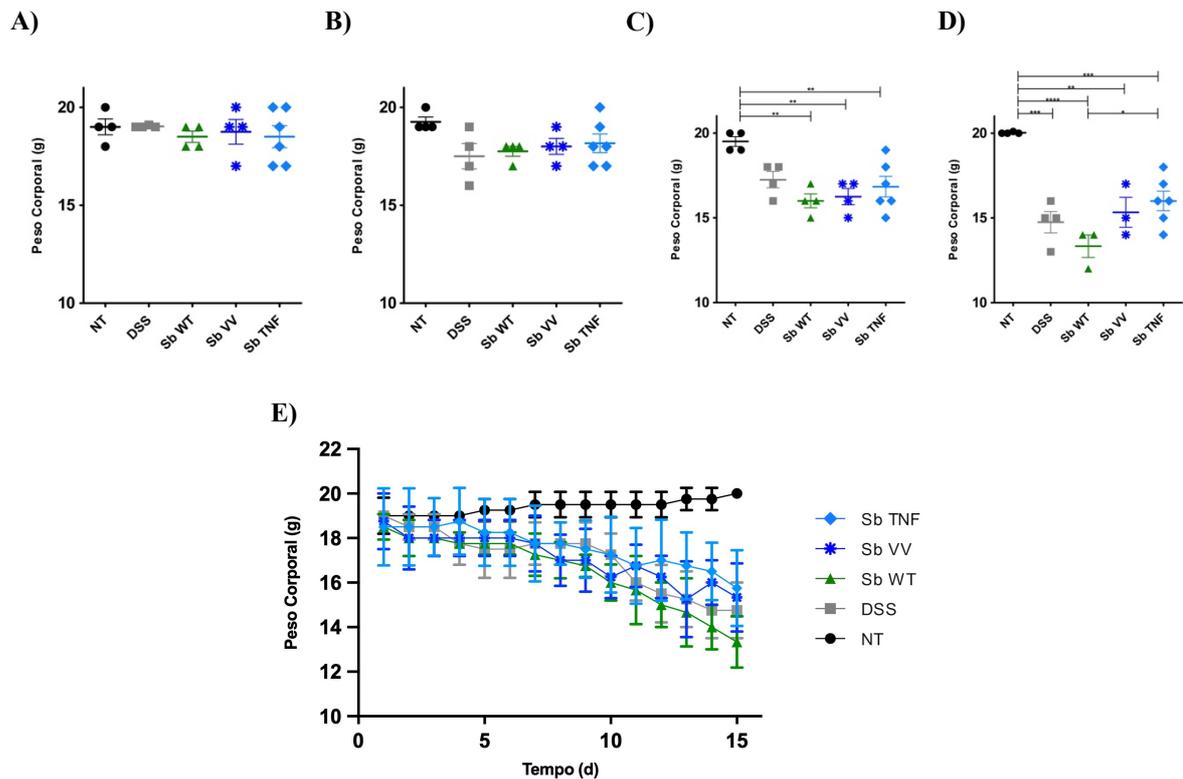


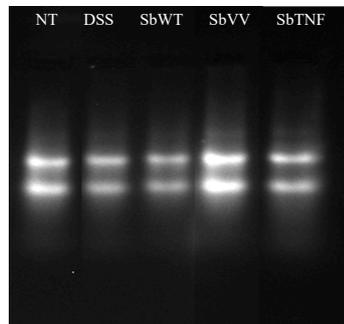
Figura 19 - Efeito do tratamento com *S. boulardii* no peso corporal dos grupos. (A) Peso no primeiro dia de experimento; (B) Peso no quinto dia de experimento; (C) Peso no decimo dia de experimento; (D) Peso no dia da eutanásia; (E) Média diária do peso corporal dos grupos durante todos os dias do experimento *in vivo*. (NT) Grupo controle negativo da doença; (DSS) Grupo controle positivo da doença; (Sb WT) Grupo tratado com a *S. boulardii* selvagem; (Sb VV) Grupo tratado com a *S. boulardii* transformada com o vetor vazio; (Sb TNF) Grupo tratado com a *S. boulardii* produtora do anti-TNF. A análise estatística foi feita por ordinary one-way ANOVA. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001; \*\*\*\* p < 0.0001.

Após a coleta do cólon no dia da eutanásia, foi feita a extração do RNA total. A eletroforese do gel de agarose para visualização das duas subunidades do RNA ribossômico (18S e 28S) se encontra na Figura 20A, o RNA de um animal de cada grupo foi aplicado no gel para análise da qualidade do material. Em seguida a partir desse RNA foi feito o cDNA de cada amostra e a qPCR para análise de expressão de diversos genes (as sequências dos iniciadores utilizados estão listadas na Tabela 6).

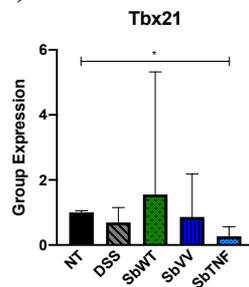
Foram desenhados primers para avaliar a expressão dos principais fatores de transcrição e citocinas envolvidos com a diferenciação de linfócitos T em seus subtipos Th1, Th2, Th17 e Treg, que exercem um papel fundamental no desenvolvimento das DIIs. Os genes Tbx21, Stat-1, C-MAF e IFN $\gamma$  estão relacionados com a diferenciação para Th1. Já os genes de GATA3, Stat-6 e IL-5 direcionam a resposta para o subtipo Th2. A diferenciação para o subtipo Th17 é

dirigida principalmente pelos genes RORc, C-MAF, Stat3, IL-17a, IL-22 e IL-6. Para a análise da diferenciação para Treg foram avaliados os genes FoxP3, TGFβ e IL-10. Os genes de Arg1 e NOS2 estão relacionados ao reparo tecidual e em pacientes com DIIs os níveis de Arg1 são diminuídos em relação a NOS2. Também foram avaliadas as citocinas pro-inflamatórias IL-1β, TNF e IL-23, além do gene MUC3 que está relacionado a expressão de Mucina 3 no cólon em resposta a citocinas inflamatórias. (COBURN *et al.*, 2016; NEURATH, 2014; PAWLAK; HO; KUCHROO, 2020) Devido ao grande desvio padrão das amostras não houve diferença significativa na expressão dos genes analisados.

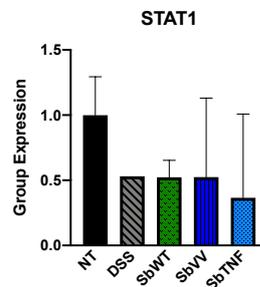
A)



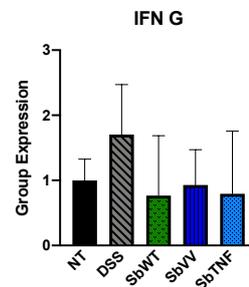
B)



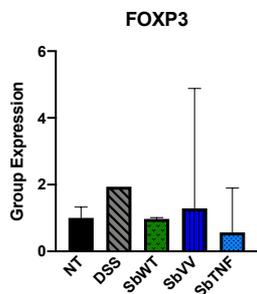
C)



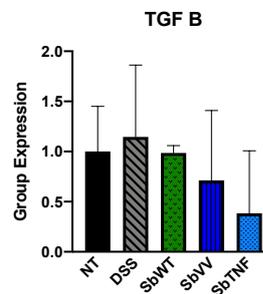
D)



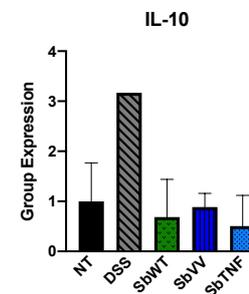
E)



F)



G)



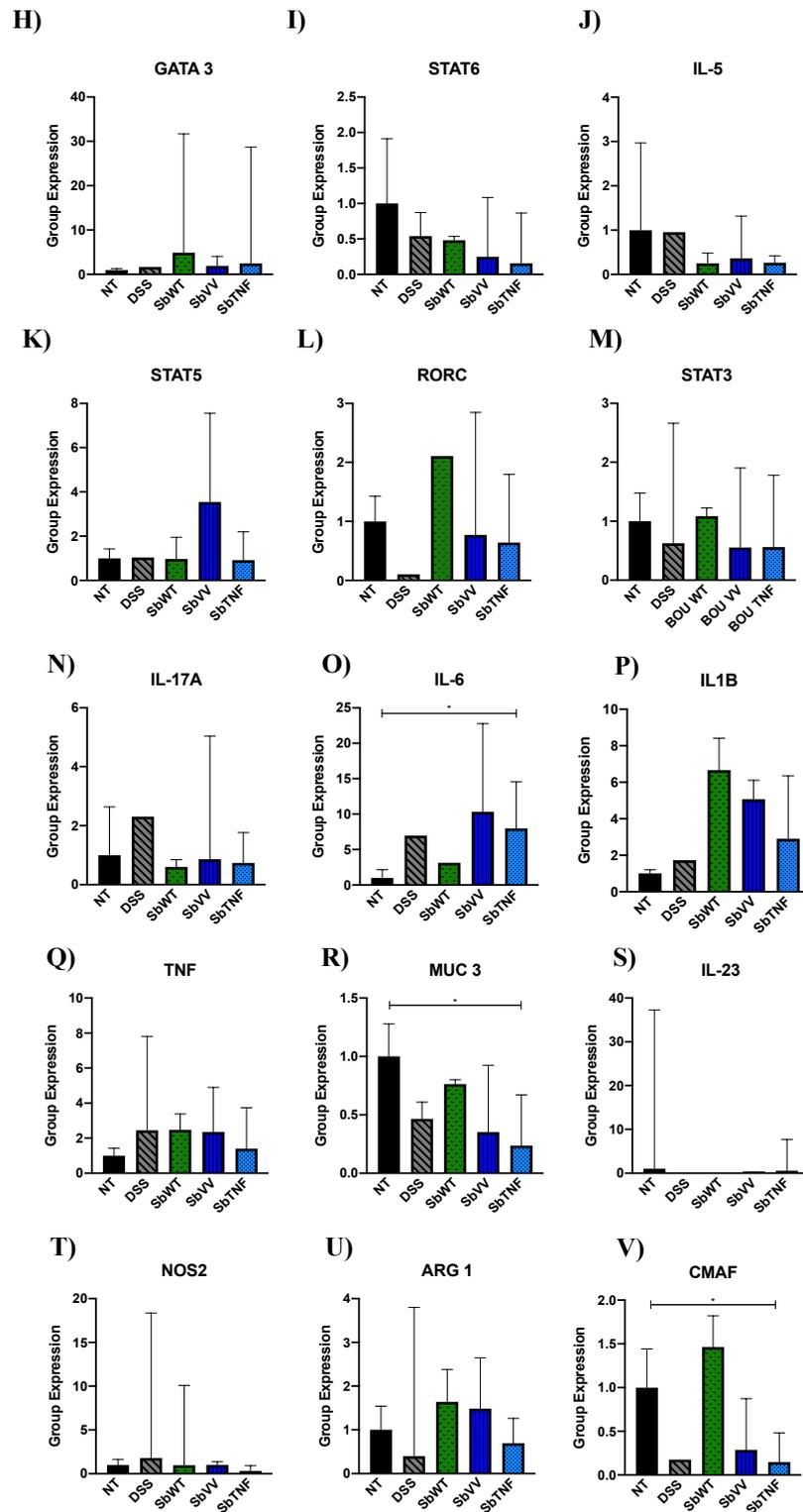
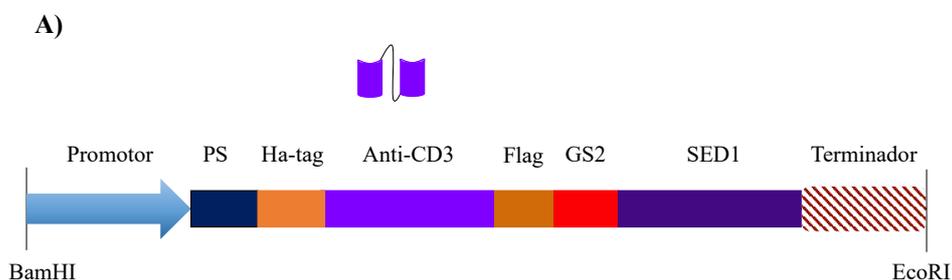


Figura 20 - Níveis de expressão do RNA no cólon dos grupos. (A) Eletroforese do gel de agarose do RNA total do cólon de um animal de cada grupo; (B-V) qPCR para análise da expressão dos genes dos fatores de transcrição e citocinas. (NT) Grupo controle negativo da doença; (DSS) Grupo controle positivo da doença; (Sb WT) Grupo tratado com a *S. boulardii* selvagem; (Sb VV) Grupo tratado com a *S. boulardii* transformada com o vetor vazio; (Sb TNF) Grupo tratado com a *S. boulardii* produtora do anti-TNF. A análise estatística foi feita por ordinary one-way ANOVA. \*  $p < 0.05$ .

## 5.8. Construção do plasmídeo de expressão pYCCD3

A apresentação na superfície celular de microrganismos permite que proteínas ou peptídeos específicos sejam exibidos fusionados a domínios de ancoragem. Desde o primeiro desenvolvimento de um sistema de exibição da superfície celular em um bacteriófago, houve um progresso substancial nas tecnologias de exibição da superfície celular, e uma variedade de novos sistemas foi relatada para levedura (WANG *et al.*, 2014). Um desses sistemas é o SED1 desenvolvido em *Saccharomyces cerevisiae*. SED1 é uma proteína abundante de parede celular em fase estacionária, com o domínio de ancoragem glicosilfosfatidilinositol (GPI), e já foi demonstrado que é mais eficiente quando comparado ao sistema de ancoragem de  $\alpha$ -aglutinina (BAMBA *et al.*, 2017).

Para possibilitar a produção do anticorpo ancorado a parede anti-CD3 em *Saccharomyces boulardii*, foi construído o vetor de expressão pYCCD3. Para a sua construção foi sintetizado um gene de fusão que contém o peptídeo sinal SUC2, a sequência do scFv anti-CD3 fusionado a parte carboxi terminal da proteína de ancoragem SED1, o epítipo FLAG para a detecção, GS2 que é um *linker* para dar flexibilidade e deixar a proteína mais funcional e a parte carboxi terminal da proteína de ancoragem. Esse gene (Figura 21A) foi inserido no vetor pYCTNF, que previamente foi digerido para a remoção da sequência do peptídeo sinal e scFv anti-TNF, assim o promotor e terminador de transcrição se manteve o mesmo, resultando no vetor de expressão pYCCD3 (Figura 21B). Por outro lado, o peptídeo sinal foi substituído pelo PS nativo do SED1.



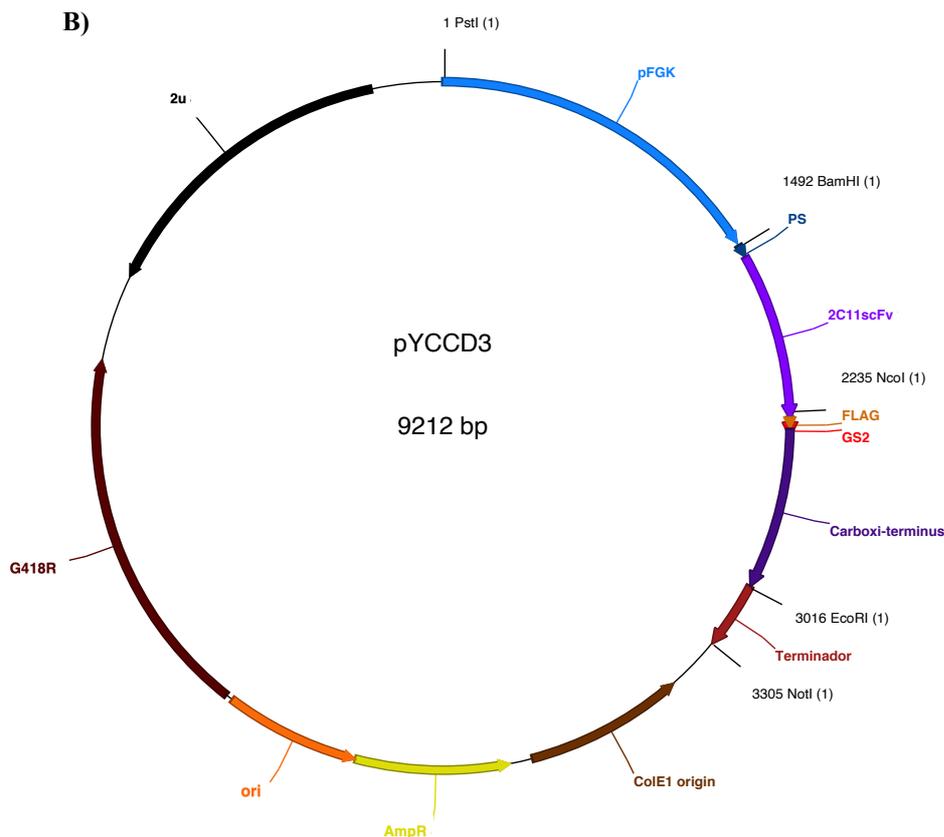


Figura 21 - Representação esquemática do plasmídeo para expressão do scFv anti-CD3. (A) Cassete de expressão do anticorpo com as sequências do promotor PGK, peptídeo sinal SUC2, gene do scFv anti-CD3, FLAG, linker GS2, parte carboxi terminal da proteína de ancoragem SED1 e o terminador de transcrição. (B) Vetor de expressão do scFv anti-CD3 que contém o cassete de expressão e o gene de resistência a Geneticina (G418R).

### 5.9. Confirmação do plasmídeo e Transformação na *S. boulardii*

O vetor de expressão de scFv anti-CD3 foi transformado em *E. coli* XL10Gold e extraído por preparação em escala média com o kit QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Para a confirmação do plasmídeo foi feita uma digestão com a enzima de restrição NcoI, que possui apenas um sítio de clivagem na sequência do vetor, levando assim a sua linearização. A confirmação do tamanho foi feita por eletroforese em gel de agarose, por comparação ao marcador de peso molecular. O gel da digestão está na Figura 22A, onde a banda esperada de 9,2 kb pode ser visualizada.

Após a confirmação do vetor de expressão, a *S. boulardii* foi transformada segundo o item 4.7, e com as colônias transformantes que cresceram em meio seletivo foi feita uma PCR de colônia (segundo o item 4.8) para confirmação da transformação (Figura 22B). Todos os clones testados amplificaram, confirmando a presença do vetor pYCCD3 nos clones

transformantes. Como o clone SbCD3-1 teve a maior amplificação este foi selecionado para testar a produção do anticorpo.

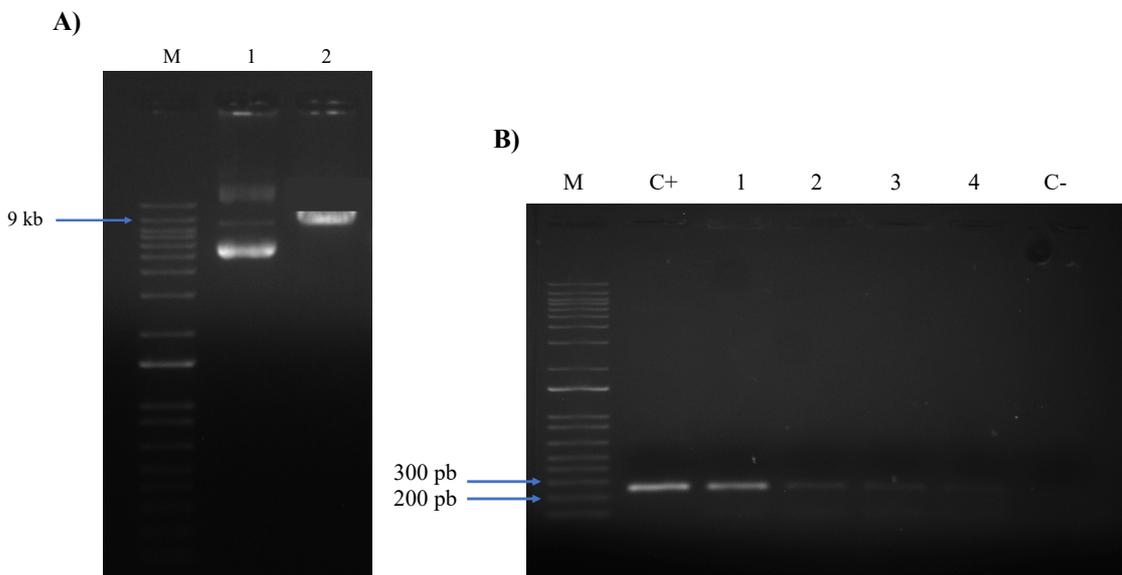


Figura 22 - Confirmação da síntese do vetor de expressão pYCCD3. As amostras foram separadas em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. (A) Perfil de restrição do plasmídeo de expressão do anti-CD3. (M) marcador de peso molecular 1kb plus ladder; (1) pYCCD3 intacto; (2) pYCCD3 digerido com NcoI. (B) PCR de colônia de transformantes da Sb CD3 utilizando os iniciadores para a sequência do gene codificador do anti-CD3. (M) marcador molecular 1Kb plus ladder; (1-4) diferentes transformantes; (C-) controle negativo da reação.

### 5.10. Curva de Crescimento

Após a transformação, foi feita a curva de crescimento a 30°C em meio YPD dessa nova linhagem (Figura 23) utilizando a *S. boulardii* selvagem (SbWT) e a transformada com o vetor de expressão do anticorpo (SbCD3-1). Não houve uma diferença entre o crescimento das linhagens, que chegaram a fase estacionária em uma OD<sub>600</sub> de 24-26 após 32 horas de cultivo, assim a produção da proteína não interfere no metabolismo da levedura.

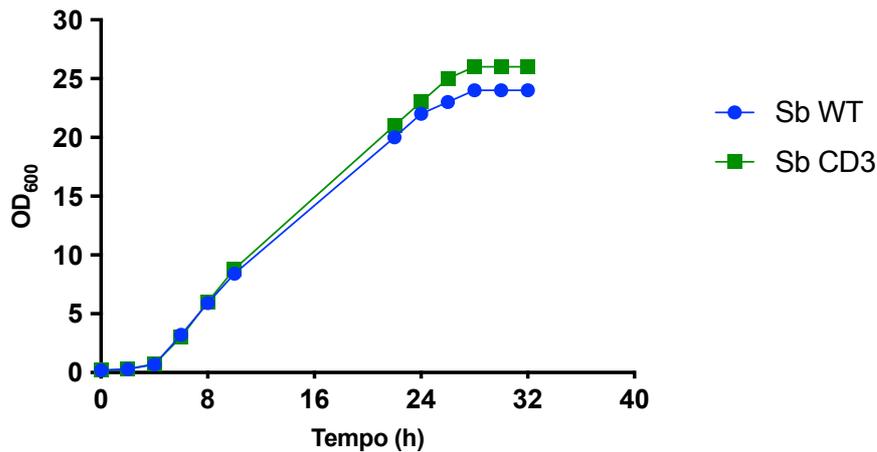


Figura 23 - Curva de crescimento da *Saccharomyces boulardii* transformada com o pYCCD3. O cultivo foi feito em meio YPD a 30°C por 32 horas, a OD<sub>600</sub> foi medida a cada duas horas. (Círculo azul) Sb WT; (Quadrado verde) Sb CD3-1.

### 5.11. Produção em meio YPD

A exibição de proteínas na superfície de levedura é uma ferramenta que tem amplas aplicações biotecnológicas como por exemplo: construção de biocatalisadores de células inteiras, engenharia de proteínas, triagem de biblioteca de proteínas, identificação de interações proteína-proteína e mapeamento de epítomos de proteínas (YANG *et al.*, 2019). Esse sistema de apresentação da proteína na parede seria uma ótima ferramenta para tratamentos por administração oral, pois garante que enquanto houver o microrganismo presente no TGI haverá também a presença a proteína, ao contrário do sistema de secreção onde após a chegada da levedura no TGI ela ainda precisa produzir e secretar o anticorpo.

Como o anti-CD3 é um anticorpo ancorado a parede, foi feito o cultivo em meio YPD a 30°C uma vez que a levedura alcança OD<sub>600</sub> bem mais altas em meio rico, o que poderia levar a maiores quantidades da proteína. Após 24 horas de cultivo, as amostras foram preparadas de acordo com o item 4.14.2, e aplicadas na membrana de nitrocelulose para análise por Dot Blot (Figura 24). No sobrenadante de cultura encontra-se uma quantidade muito pequena da proteína, assim como na fração solúvel intracelular, a maior parte do anticorpo encontra-se na parede celular, então a *S. boulardii* consegue expressar e ancorar corretamente o anti-CD3 na sua parede celular. BAMBA *et al.*, 2017 relataram que a atividade de  $\beta$ -glucosidade produzida em *Aspergillus aculeatus* usando o sistema de ancoragem SED1 foi 8,4 vezes maior do que a observada usando o sistema de exibição de superfície celular de ancoragem  $\alpha$ -aglutinina, e YANG *et al.*, 2019 relataram que SED1 mostrou maior eficiência

de exibição do que o sistema de  $\alpha$ -aglutinina. A apresentação de proteínas na parede celular pela *S. boulardii* já foi demonstrada por WANG *et al.*, 2014, que utilizaram o sistema de  $\alpha$ -aglutinina para expressar a proteína Microneme-2 na superfície da parede celular. Essa é a primeira vez que se demonstra a apresentação de proteínas por *S. boulardii* utilizando o sistema de ancoragem SED1 além de ser o primeiro relato de expressão de um anticorpo ancorado a parede. Essa nova linhagem da *S. boulardii* será utilizada em experimentos *in vivo* posteriormente.

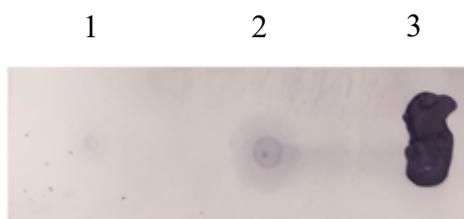


Figura 24 – Imunodeteção do fragmento scFv anti-CD3 em diferentes extratos celulares. Produção do anti-CD3 ancorado a parede celular em meio YPD por 24 horas. (1) Dot Blot do sobrenadante de cultura concentrado; (2) Dot Blot da fração solúvel intracelular; (3) Dot Blot do sedimento celular.

## 6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram construídos dois plasmídeos para a expressão de dois fragmentos scFv de anticorpos (anti-TNF e anti-CD3) pela levedura *Saccharomyces boulardii*. A transformação com os plasmídeos resultou em duas linhagens da levedura produtora dos anticorpos, que pode ser usada como uma nova rota biotecnológica sendo um veículo de entrega desses anticorpos no TGI para tratamento de diversas doenças (como Colite Ulcerativa, Doença de Chron, Diabetes, entre outras), diminuindo o preço de produção e os efeitos colaterais dessas terapias.

A caracterização da *S. boulardii* relata 30°C como a sua temperatura ótima de crescimento, apesar de ser capaz de crescer a 37°C também, sempre sob agitação de 200 rpm. Uma maior aeração na cultura leva a levedura a alcançar maiores densidades óticas, tanto em meio rico quanto em meio definido. A *S. boulardii* é capaz de crescer em uma ampla faixa de pHs, mas é acidófila sendo capaz de crescer em pH de até 2,0, mas seu pH ideal de crescimento é 5,5. A levedura é sensível ao antibiótico Geneticina que pode ter efeito fungistático ou fungicida a depender da concentração utilizada. Além disso a produção de proteínas heterólogas não afeta o seu metabolismo.

A produção e secreção do scFv anti-TNF é o primeiro relato de expressão heteróloga de anticorpo pela *S. boulardii*. Essa produção é aumentada quando a levedura é cultivada a 30°C em comparação a 37°C, e a secreção é melhorada quando a levedura é cultivada em meio definido ao invés de meio rico. Esse anticorpo é capaz de se ligar com afinidade ao seu antígeno mesmo estando agregado a outras proteínas presentes no meio de cultura. Já a expressão do scFv anti-CD3 é o primeiro relato de apresentação de um anticorpo na parede celular pela *S. boulardii*.

A gavagem oral da *S. boulardii* em camundongos não leva a colonização permanente no intestino, após 48 horas a levedura é completamente eliminada não sendo mais encontrada nas fezes dos animais. Ela consegue sobreviver ao tráfego pelo TGI e transitoriamente colonizar o intestino, que é o ideal para um veículo de entrega ao intestino. Quando a *S. boulardii* produtora do anti-TNF foi administrada oralmente para camundongos com colite induzida por DSS houve uma melhora dos parâmetros macroscópicos (DAI) quando comparado ao grupo doente sem tratamento, o que indica o efeito da neutralização do TNF para diminuição da inflamação.

## 7. PERSPECTIVAS

- a) Ensaio de neutralização do scFv anti-TNF;
- b) Repetição do teste *in vivo* da *S. boulardii* produtora do scFv anti-TNF em modelo de Colite;
- c) Ensaio de ligação do scFv anti-CD3 a linfócitos T;
- d) Teste *in vivo* dos efeitos da *S. boulardii* produtora do scFv anti-CD3 em modelo de Colite, Diabetes e/ou doença do enxerto.

## 8. REFERÊNCIAS

- ALTMANN, M. The Benefits of *Saccharomyces boulardii*. In: **The Yeast Role in Medical Applications**. [s.l.: s.n.]. p. 3–10. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/the-yeast-role-in-medical-applications/the-benefits-of-saccharomyces-boulardii> Acesso em 15 dez 2020.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. *et al.* Environmental triggers in IBD: A review of progress and evidence. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 1, p. 39–49, 2018.
- ASTROMSKAS, E.; COHN, M. Tools and methods for genetic analysis of *Saccharomyces castellii*. **Yeast**, v. 24, n. 6, p. 499–509, 2007.
- BAMBA, T. *et al.* Enhanced cell-surface display of a heterologous protein using SED1 anchoring system in SED1-disrupted *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 3, p. 306–310, 2017.
- BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G.; LANGELLA, P. Use of Traditional and Genetically Modified Probiotics in Human Health: What Does the Future Hold? **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 5, p. 363–370, 2017.
- BREEDVELD, F. C. Therapeutic monoclonal antibodies. **The Lancet**, v. 355, n. 9205, p. 735–740, 2000.
- BUENO, V.; PACHECO-SILVA, A. Tolerância oral: uma nova perspectiva no tratamento de doenças autoimunes. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 1, p. 79–85, 1999.
- CHAN, A. C.; CARTER, P. J. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 5, p. 301–316, 2010.
- CHIABAI, M. J. *et al.* Mucosal delivery of *Lactococcus lactis* carrying an anti-TNF scFv expression vector ameliorates experimental colitis in mice. **BMC Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2019.
- COBURN, L. A. *et al.* L-arginine Availability and Metabolism Is Altered in Ulcerative Colitis. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 22, n. 8, p. 1847–1858, 2016.
- COOPER, H. S. *et al.* Clinicopathologic Study of Dextran Sulfate Sodium Experimental Murine Colitis. **Lab Invest**, v. 69, n. 2, p. 238 – 249, 1993.
- DALMASSO, G. *et al.* *Saccharomyces boulardii* Inhibits Inflammatory Bowel Disease by Trapping T Cells in Mesenteric Lymph Nodes. **BMC Microbiology**, v. 131, n. 6, p. 1812–1825, 2006.
- DE OLIVEIRA, C. M. B. *et al.* Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255–265, 2012.

DE-SOUZA, M. T.; BRÍGIDO, M. DE M.; MARANHÃO, A. Q. **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**. 2. ed. Brasília: Editora UnB, 2016.

DONG, J. P. *et al.* Protective effect of *Saccharomyces boulardii* on intestinal mucosal barrier of dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. **Chinese Medical Journal**, v. 132, n. 16, p. 1951–1958, 2019.

DOURADINHA, B. *et al.* Novel insights in genetic transformation of the probiotic yeast *saccharomyces boulardii*. **Bioengineered**, v. 5, n. 1, p. 21 – 29, 2013.

DU, L. *et al.* Research on the characteristics and culture conditions of *Saccharomyces boulardii*. **Advanced Materials Research**, v. 343–344, p. 594–598, 2012.

FORSTER, K. *et al.* An oral CD3-specific antibody suppresses T-cell-induced colitis and alters cytokine responses to T-cell activation in mice. **Gastroenterology**, v. 143, n. 5, p. 1298–1307, 2012.

FRIEDRICH, M.; POHIN, M.; POWRIE, F. Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 992–1006, 2019.

GEREMIA, A. *et al.* Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 1, p. 3–10, 2014.

GRIFFITHS, O. R. *et al.* Inflammatory bowel disease and targeted oral anti-TNF $\alpha$  therapy. In: **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**. [s.l: s.n.]. v. 119 p. 157–198.

GUBERNATOROVA, E. O.; TUMANOV, A. V. Tumor necrosis factor and lymphotoxin in regulation of intestinal inflammation. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, n. 11, p. 1309–1325, 2016.

HAHN-HÄGERDAL, B. *et al.* Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. 31, p. 1–16, 2005.

HARDING, F. A. *et al.* The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: Residual immunogenicity resides in the CDR regions. **mAbs**, v. 2, n. 3, p. 256–265, 2010.

HUDSON, L. E. *et al.* Functional heterologous protein expression by genetically engineered probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–12, 2014.

HUDSON, L. E. *et al.* Transformation of probiotic yeast and their recovery from gastrointestinal immune tissues following oral gavage in mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 108, p. 1–13, 2016.

ISLAM, S. U. Clinical Uses of Probiotics. **Medicine**, v. 95, n. 5, 2016.

JAIRATH, V.; FEAGAN, B. G. Global burden of inflammatory bowel disease. **The Lancet Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, n. 1, p. 2–3, 2020.

JONES, R. G. A.; MARTINO, A. Targeted localized use of therapeutic antibodies: A review of non-systemic, topical and oral applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 506–520, 2015.

KELESIDIS, T.; POTHOUKAKIS, C. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 5, n. 2, p. 111–125, 2012.

KOBAYASHI, T. *et al.* Ulcerative colitis. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 6, n. 74, 2020.

KUHN, C.; WEINER, H. L. Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: From bench to bedside. **Immunotherapy**, v. 8, n. 8, p. 889–906, 2016.

LEVIN, A. D.; WILDENBERG, M. E.; VAN DEN BRINK, G. R. Mechanism of action of anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 10, n. 8, p. 989–997, 2016.

LI, R. *et al.* Heterologous Expression of the *Leuconostoc* Bacteriocin Leucocin C in Probiotic Yeast *Saccharomyces boulardii*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 1, p. 229–237, 2020.

MCFARLAND, L. V. Systematic review and meta-analysis of *saccharomyces boulardii* in adult patients. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 18, p. 2202–2222, 2010.

MOTLEY, M. P.; BANERJEE, K.; FRIES, B. C. Monoclonal Antibody-Based Therapies for Bacterial Infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 32, n. 3, p. 210–216, 2019.

MULLER, J. L. *et al.* Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo air lift e shaker. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 688–693, 2007.

NEURATH, M. F. Current and emerging therapeutic targets for IBD. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 5, p. 269–278, 2017.

NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 329–342, 2014.

PAWLAK, M.; HO, A. W.; KUCHROO, V. K. Cytokines and transcription factors in the differentiation of CD4+ T helper cell subsets and induction of tissue inflammation and autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 67, p. 57–67, 2020.

RAMOS, G. P.; PAPADAKIS, K. A. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 94, n. 1, p. 155–165, 2019.

REMICADE. **Consulta Remédios**, 2020. Disponível em <https://consultaremedios.com.br/remicade/p>. Acesso em 17/12/2020

SAMONIS, G. *et al.* Saccharomyces boulardii and Candida albicans experimental colonization of the murine gut. **Medical Mycology**, v. 49, n. 4, p. 395–399, 2011.

SANCHEZ-MUÑOZ, F.; DOMINGUEZ-LOPEZ, A.; YAMAMOTO-FURUSHO, J. K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 27, p. 4280–4288, 2008.

SINGH, S. *et al.* Monoclonal Antibodies: A review. **Current Clinical Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 85–99, 2018.

SINGS AND SYMPTOMS OF ULCERATIVE COLITIS. **Chrons and Colitis Foundation**, 2020. Disponível em: <https://www.crohnscolitisfoundation.org/what-is-ulcerative-colitis/symptoms>. Acesso em: 17/12/2020.

SRICHARUNRAT, T.; PUMIRAT, P.; LEAUNGWUTIWONG, P. Oral tolerance: recent advances on mechanisms and potential applications. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 36, n. 4, p. 207–216, 2018.

TAYLOR, S. C. *et al.* The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 761–774, 2019.

TREATMENT ULCERATIVE COLITIS. **NHS**, 2019. Disponível em: <https://www.nhs.uk/conditions/ulcerative-colitis/treatment/>. Acesso em: 17/12/2020.

TSUMOTO, K. *et al.* Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 5, p. 1301–1308, 2004.

TU, C. *et al.* A combination of structural and empirical analyses delineates the key contacts mediating stability and affinity increases in an optimized biotherapeutic single-chain Fv (scFv). **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 3, p. 1267–1276, 2016.

UNGARO, R. *et al.* Ulcerative colitis. **The Lancet**, v. 389, n. 10080, p. 1756–1770, 2017.

VAGENENDE, V.; YAP, M. G. S.; TROUT, B. L. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. **Biochemistry**, v. 48, n. 46, p. 11084–11096, 2009.

VOSSenkÄMPER, A. *et al.* A CD3-specific antibody reduces cytokine production and alters phosphoprotein profiles in intestinal tissues from patients with inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 147, n. 1, p. 172–183, 2014.

WANG, C. *et al.* Saccharomyces boulardii alleviates ulcerative colitis carcinogenesis in mice by reducing TNF- $\alpha$  and IL-6 levels and functions and by rebalancing intestinal microbiota. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2019.

WANG, T. *et al.* The establishment of Saccharomyces boulardii surface display system using a single expression vector. **Fungal Genetics and Biology**, v. 64, p. 1–10, 2014.

WILKINS, T.; SEQUOIA, J. Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. **American family physician**, v. 96, n. 3, p. 170–178, 2017.

YANG, X. *et al.* Development of novel surface display platforms for anchoring heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 85, p. 1–10, 2019.

ZANELLO, G. *et al.* *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 11, n. 33, p. 47–58, 2009.

ZHU, K. *et al.* Protein pI shifts due to posttranslational modifications in the separation and characterization of proteins. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 9, p. 2745–2755, 2005.