



Universidade de Brasília

Instituto de Biologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Vitor Guimarães Olinto

Expressão heteróloga de fragmentos de anticorpos ancorados à parede
de *Saccharomyces boulardii*



Universidade de Brasília

Instituto de Biologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Vitor Guimarães Olinto

Expressão heteróloga de fragmentos de anticorpos ancorados à parede
de *Saccharomyces boulardii*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Marcelo de Macedo Brígido

Coorientadora: Andréa Queiroz Maranhão

Vitor Guimarães Olinto

Expressão heteróloga de fragmentos de anticorpos ancorados à parede
de *Saccharomyces boulardii*

Trabalho desenvolvido no laboratório
de Imunologia Molecular da
Universidade de Brasília, sob a
orientação da Prof. Dr. Marcelo de
Macedo Brígido.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcelo de Macedo Brígido	Presidente da banca
Dr. João Ricardo Moreira de Almeida	Membro titular
Dra. Lidia Maria Pepe de Moraes	Membro titular
Dra. Juliana Franco Almeida	Membro suplente

“Os benefícios da ciência não são para os cientistas, e sim para humanidade”

Louis Pasteur

Agradecimentos

Aos meus pais por todo o apoio, incentivo e força para continuar.

Ao Time Colite, Mariana, Manuela e Sylvia não só por todas as horas de convívio no laboratório e biotério mas também pela amizade.

A todos os membros do Laboratório de Imunologia Molecular da UNB, em especial ao Renato Kaylan e seu infinito conhecimento sobre biologia molecular e a disposição em ensinar.

A Karen do Laboratório de Microscopia e Microanálise da UNB por todos os anos de companheirismo na pesquisa científica e pelo direcionamento e auxílio nas análises de Imunodeteção por imagem.

Aos meus professores orientadores Marcelo e Andrea pela compreensão, paciência, confiança e todos os ensinamentos para dentro e fora do laboratório.

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

Por fim, a todos os animais de laboratório eutanasiados para o exercício e avanço da ciência.

Resumo

A Colite Ulcerativa se destaca como uma das doenças inflamatórias intestinais (DII) de caráter crônico onde a inflamação pode se estender do reto até o cólon. Atualmente não existe cura para a colite e os tratamentos são focados em melhorar a qualidade de vida dos pacientes reduzindo sintomas. Tratamentos que utilizam anticorpos monoclonais se mostram mais eficientes em pacientes acometidos do que tratamentos focados em Ácido Aminossalicílico combinado com Corticosteroides. Porém, o custo de produção e purificação de anticorpos monoclonais é alto, o que dificulta a distribuição deste tipo de medicamento de forma ampla a população. Probióticos além de serem capazes de auxiliar no restauro da microbiota normal saudável, também tem mostrado significativo avanço na expressão de proteínas recombinantes. A levedura *Saccharomyces boulardii* tem aplicação probiótica, sendo utilizada para auxiliar no tratamento de doenças intestinais. Foi proposto nesse trabalho utilizá-la como modelo de entrega de terapias orais na forma de anticorpos.

O uso de um anticorpo anti-CD3 por via oral pode, em tese, produzir resposta local anti-inflamatória para o tratamento de Colite Ulcerativa. Para testar a produção de molécula, tipo anticorpo, fragmento variável de cadeia única (scFv) em *S. boulardii*, Construiu-se um vetor de expressão contendo a sequência para um scFv anti-CD3, fusionado ao gene SED1, proteína nativa de parede celular. A expressão do scFv recombinante associado a parede da levedura foi confirmada por Imunodeteção na fração celular insolúvel. A linhagem recombinante de *S. boulardii* produtora de scFv anti-CD3 foi administrada via oral em camundongos com colite induzida por dextrana sulfato de sódio. Os resultados demonstraram melhora no índice de atividade da doença e mudança positiva no perfil da microbiota fecal quando comparado ao grupo que não recebeu tratamento.

Palavras-chave: scFv; anti-CD3; Colite Ulcerativa; DSS; Microbiota Fecal; SED1; *Saccharomyces boulardii*.

Abstract

Ulcerative Colitis stands out as one of the chronic inflammatory bowel diseases in which inflammation can extend from the end of the rectum all the way to the colon. Currently there is no cure for colitis and treatments focus on improving life quality of patients by reducing symptoms, treatments using monoclonal antibodies are more efficient in affected patients than treatments focused on Aminosalicylic acid combined with Corticosteroids. The cost of producing and purifying monoclonal antibodies is high, which makes it difficult to distribute it widely to the population. Probiotics in addition to being able to assist in the restoration of normal healthy microbiome have also shown significant progress in the expression of recombinant proteins, *Saccharomyces boulardii* is a probiotic yeast used to assist in the treatment of intestinal diseases and can be adapted for the delivery of therapies oral. Using *S. boulardii* as a delivery vehicle for anti-CD3 antibodies can generate a local anti-inflammatory response assisting on the treatment of Ulcerative Colitis. To test the production of antibody fragments in *S. boulardii*, we produced an expression vector containing an anti-CD3 scFv fused to the SED1 gene, a native cell wall protein. The expression of the scFv associated with the fungal wall was evaluated by Immunodetection focusing on the insoluble cell fraction showing the presence of the recombinant protein. The transforming strain *S. boulardii* producing anti-CD3 scFv were administered orally in mice with colitis induced by dextran sodium sulfate, showing improvement in the disease activity index and a positive change in the fecal microbiome profile when compared to the group that did not receive treatment.

Keywords: scFv; anti-CD3; Ulcerative Colitis; DSS; Fecal Microbiome; SED1; *Saccharomyces boulardii*.

Sumário

Agradecimentos	5
Resumo	6
Abstract	7
Lista de Figuras	11
Lista de Tabelas	12
Lista de abreviaturas e símbolos	12
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Trato Gastrointestinal.....	14
1.2 Microbiota Intestinal	15
1.3 Probióticos	16
1.4 Terapias com Probióticos.....	16
1.5 Probióticos geneticamente modificados	17
1.6 <i>Saccharomyces boulardii</i>	18
1.7 Mecanismo de ação da <i>Saccharomyces boulardii</i>	19
1.8 Expressão Heteróloga em <i>S. boulardii</i>	19
1.9 Inflamação Intestinal	20
1.10 Receptores de Membrana.....	22
1.11 Anticorpos monoclonais	23
1.12 Terapias com Anticorpos Monoclonais	24
2 Justificativa	25

3	Objetivos	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos Específicos.....	28
4	Materiais e Métodos.....	29
4.1	Linhagens de microrganismos e condições de cultivo	29
4.2	Plasmídeos.....	30
4.3	Curva de Crescimento	31
4.4	Digestão enzimática.....	31
4.5	Eletroforese em Gel de Agarose.....	31
4.6	Transformação em levedura <i>S. boulardii</i> por eletroporação.....	32
4.7	PCR de Colônia	33
4.8	Produção de scFv Anti-CD3 associado a parede	34
4.9	Preparo de amostra para análise de proteína	34
4.10	Gel Desnaturante de Poliacrilamida.....	35
4.11	Coloração de Coomassie Blue.....	36
4.12	Imunodeteção por Western Blot.....	36
4.13	Marcação para Imunodeteção.....	37
4.14	Experimento <i>in vivo</i>	37
4.15	Preparo das doses	38
4.16	Grupos do Experimento.....	38
4.17	Indução da colite experimental e Eutanásia.....	39
4.18	Índice de Atividade da Doença (DAI)	40

4.19	Extração de DNA Fecal	41
4.20	Analises Histopatológicas	41
5	Resultados e Discussão	43
5.1	A levedura <i>Saccharomyces boulardii</i>	43
5.2	O vetor de expressão.....	43
5.3	Confirmação de plasmídeo e Transformação na <i>S. boulardii</i>	45
5.4	Curvas de Crescimento	47
5.5	Produção e Imunodeteção de Proteína Recombinante	50
5.6	Testes <i>in vivo</i>	55
5.7	Histologia	60
5.8	Análises de Microbioma	61
6	Conclusão	67
7	Perspectivas	68
8	REFERÊNCIAS	69

Lista de Figuras

Figura 1.....	40
Figura 2.....	45
Figura 3.....	46
Figura 4.....	47
Figura 5.....	49
Figura 6.....	51
Figura 7.....	52
Figura 8.....	53
Figura 9.....	54
Figura 10.....	57
Figura 11.....	57
Figura 12.....	59
Figura 13.....	60
Figura 14.....	61
Figura 15.....	64
Figura 16.....	65

Lista de Tabelas

Tabela 1	Erro! Indicador não definido.
Tabela 2	33
Tabela 3	39
Tabela 4	40
Tabela 5	42
Tabela 6	48

Lista de abreviaturas e símbolos

ABCD - Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn

AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta

APC - Célula Apresentadora de Antígeno

CDR - Regiões Determinantes de Complementariedade (CDR)

CU - Colite Ulcerativa

DC - Doença de Crohn

DII - Doenças Inflatórias Intestinais

DSS - Dextran Sulfato de Sódio

FACS - Separador Celular Ativado por Fluorescência

FDA - Food and Drug Administration

HAMA - Human Anti-Mouse Antibody

HIF - Fatores Induzidos por Hipóxia (HIF)

Ig - Imunoglobulina

ISAPP - International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics

MAPK - Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

NF- κ B - Fator nuclear Kappa B

OD600 - Densidade Ótica a 600nm

OKT3 - Anticorpo Monoclonal Anti-CD3 Muromab

PPAR γ - Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma Gama

TCR - Receptor de Linfócito T

TGI - Trato Gastrointestinal

TLR - Receptor do Tipo Toll

Treg - Células T Regulatórias

YPD - Meio de Cultura *Yeast Peptone Dextrose*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Trato Gastrointestinal

Compreende na parte superior: boca, esôfago, estômago, duodeno, jejuno e íleo. Cólon, reto e ânus fazem parte da porção inferior, sendo, juntamente com a musculatura lisa adjacente, responsáveis pelo processo coordenado de peristaltismo, digestão, absorção de nutrientes além do processo de excreção.

O Trato Gastrointestinal (TGI) é marcado pela sua composição em camadas incluindo a mucosa interna, submucosa, musculatura lisa e a camada cerosa externa, todas trabalhando em conjunto para o funcionamento do processo digestivo. O TGI contribui também para detecção e sinalização com neurônios entéricos (do intestino) e extrínsecos (de regiões fora do TGI) de componentes presentes no lúmen (Elia et al., 2015). O processo digestivo resulta em solutos e materiais particulados que vão ser absorvidos pelo processo de permeabilidade celular dos enterócitos, ou vias extracelulares como o trânsito de moléculas pela região das junções oclusas, que em indivíduos saudáveis se desfazem e se remontam de maneira coordenada em prol da absorção de nutrientes.

O epitélio intestinal desempenha papel de proteção fundamental entre o que está contido no lúmen e as camadas internas do tecido. Essa capacidade de barreira é reforçada na porção inferior do TGI, pela camada de muco produzida por células especializadas em produzir matriz extracelular. A camada de muco é formada de mucinas, uma família de proteínas altamente glicosiladas, que se encontram aderidas de forma transmembranar aos enterócitos, e de forma livre formando muco gelatinoso, o glicocálice. O muco formado no cólon acolhe bactérias comensais, entretanto pode sofrer degradação por microrganismos patogênicos e ser transpassado. Nesses cenários os enterócitos ficam susceptíveis ao encontro com patógenos e suas toxinas, podendo desencadear uma resposta imune, processos que levem a produção insuficiente ou aberrante de muco sendo fatores determinantes em patologias do TGI (Johansson et al., 2013).

1.2 Microbiota Intestinal

Uma grande variedade de microrganismos coloniza o TGI humano, sendo esses adquiridos a partir do momento do nascimento e sendo modulados durante o percurso da vida. Existe ampla variação entre indivíduos de acordo com fatores ambientais como hábitos alimentares, assepsia dos ambientes de vivência, incidência de doenças, uso de remédios e muitos outros. Estes microrganismos constituem parte integral do corpo humano e desempenham funções imunológicas, metabólicas, estruturais e neurológicas, sendo denominada de microbiota normal (Adak & Khan, 2019).

A forma de nascimento e a alimentação de recém nascidos também são fatores chave na construção da microbiota e no desenvolvimento do sistema imune, sendo o aleitamento materno reconhecido pela capacidade de transferir microrganismos da microbiota materna para a criança (Pannaraj et al., 2017).

Em indivíduos saudáveis a microbiota facilita o processo digestivo através da secreção de enzimas que agem em diversos substratos polissacarídicos adquiridos na alimentação. Estes são convertidos em Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC), moléculas passíveis de absorção no intestino grosso. Os AGCC são relacionados com uma proteção a inflamações e contra o desenvolvimento de câncer colorretal (Bishehsari et al., 2018). Eventos que causam desequilíbrio na microbiota normal de um indivíduo estão relacionados com aumento da susceptibilidade a inflamação do TGI (Gebrayel et al., 2022). Dessa forma, Desvios na normalidade da microbiota normal estão relacionados com patologias inflamatórias do intestino.

O papel regulador da microbiota apresenta um amplo campo de estudo para a saúde humana, permitindo explorar a formulação de terapias direcionadas ao tratamento e prevenção de doenças. A fim de investigar a composição e função da microbiota intestinal surgem estudos comparativos da população microbiana entre indivíduos. Dentro da família de estudos 'Ômicos' como: genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica, a microbiômica surge como termo utilizado para se referir ao estudo genético de uma população

diversa de microrganismos particulares a um sistema, como o TGI (Leeds University, 2022).

Essa área de estudo utiliza diversas ferramentas como o sequenciamento de amostras amplificadas a partir da região 16S dos ribossomos e análises transcriptômicas de uma amostra particular para construir dados sobre uma população e de forma comparativa dentro de meta-análises procurar relações de função, fisiologia e diversidade. (Heintz-Buschart & Wilmes, 2018). Estas análises buscam relacionar a saúde humana e a microbiota, tendo papel fundamental em desvendar a interação dos microrganismos contidos no TGI e o sistema imune (Shi et al., 2017).

1.3 Probióticos

De acordo com a ISAPP (do inglês *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*) o termo probiótico significa “microrganismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere benefícios à saúde do hospedeiro.” A associação comenta ainda que apesar de diversos alimentos possuírem a presença de microrganismos vivos, apenas cepas caracterizadas e com efeito científico demonstrado na saúde devem ser chamados de probióticos. Comidas fermentadas não possuem caracterização dos microrganismos vivos, além de não atenderem aos requerimentos de comprovação científica de benefícios à saúde, não podendo ser considerados probióticos (Hill et al., 2014).

1.4 Terapias com Probióticos

Diversos microrganismos são considerados probióticos sendo *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces* os principais gêneros estudados. Dentro destes gêneros diversas espécies são amplamente reconhecidas pela capacidade de aliviar sintomas diarreicos, causados por infecções ou uso de antibióticos, aumento da remissão de colite ulcerativa e reduzir a incidência de necrose em enterocolite (Collinson et al., 2020; C. Wang et al., 2019; Wilkins & Sequoia, 2017). O papel exercido pelos probióticos é de ocupar o epitélio gastrointestinal que estiver com microbiota negativamente afetada. Primeiramente auxiliando em reestabelecer a microbiota normal, impedindo a fixação de bactérias patogênicas pela competição por nicho,

liberando agentes antimicrobianos e interagindo com células do sistema imune presentes no intestino levando a um estado anti-inflamatório induzido (Kazemi et al., 2020).

A capacidade de probióticos em aliviar sintomas de doenças fora do TGI é explorado por diversos grupos de pesquisa, como no auxílio do tratamento da depressão, no desenvolvimento psiquiátrico e cognitivo, porém o uso fora do contexto do TGI não é reconhecido como absoluto pela comunidade médica e científica (Chahwan et al., 2019; Mörkl et al., 2020; Rianda et al., 2019).

1.5 Probióticos geneticamente modificados

Em conjunto com os benefícios que probióticos trazem para a saúde humana, o avanço nos processos de engenharia genética e expressão heteróloga abriram as portas para uma potente ferramenta de desenvolvimento de terapias biológicas baseadas em probióticos geneticamente modificados (Bermúdez-Humarán & Langella, 2017).

Expressão heteróloga é o processo da engenharia genética que visa modular microrganismos. A intenção é de adicionar informação genética para expressar uma molécula de interesse em um organismo que não produziria esta molécula em condições selvagens. As aplicações biotecnológicas da expressão heteróloga são diversas e variam dentro dos eixos de necessidade do mercado, tendo recebido grande atenção na prospecção e desenvolvimento de biofármacos e componentes de cultivo agrícola.

O sistema de entrega de moléculas biologicamente ativas por meio de probióticos já é muito explorada, principalmente em bactérias do ácido láctico que além de utilizadas por longa data na indústria farmacêutica e alimentícia, se mostram na pesquisa como uma ferramenta eficiente na entrega de proteínas de caráter terapêutico a tecidos da mucosa (Bermúdez-Humarán, 2009).

Ensaio *in vivo* demonstraram eficácia do uso de *Lactobacillus casei* expressando interleucina-10 (IL-10) recombinante em tratar efeitos de colite ulcerativa, induzida por Dextran Sulfato de Sódio (DSS), em camundongos. O

caráter anti-inflamatório induzido alcançado, se deu pelo aumento na expressão de IL-10 e TGF β , diminuindo a capacidade de expressão de para NF- κ B aliviando assim a expressão de outros fatores relacionados a inflamação (Qiu et al., 2013).

Diferentes ensaios com *Lactococcus lactis* também produzindo IL-10 e anti-TNF- α demonstram resultados positivos em reduzir os sintomas relacionados a colite ulcerativa em camundongos (Kaye et al., 1994; Vandenbroucke et al., 2010). Assim como *Bifidobacterium longum* expressando α -MSH também foi capaz de prevenir o estabelecimento de inflamação intestinal em camundongos (Wei et al., 2016).

1.6 *Saccharomyces boulardii*

A levedura *Saccharomyces boulardii* (*Sb*) é um microrganismo probiótico, amplamente utilizado na indústria farmacêutica sob nome comercial FLORATIL®. A *Sb* foi identificada pela primeira vez 1942 pelo microbiologista Henry Boulard que indicou que populações nativas da Indochina utilizavam as cascas da lichia, repositório natural de onde a levedura foi isolada, para tratar distúrbios digestivos (Altmann, 2018).

Uma revisão de literatura realizada em 2010 compilou dados apontando que a *S. boulardii* é eficiente em aliviar condições de diarreia associada ao uso de antibióticos e diarreia infecciosa (McFarland, 2010). Além disso a *Sb* tem se mostrado eficiente em aliviar sintomas relacionados a colite ulcerativa em modelo animal através da diminuição da expressão de IL-1 β e também promovendo aumento de diversidade na microbiota, melhorando o quadro de disbiose promovida pela colite experimental (Rodríguez-Nogales et al., 2018). Em teste clínico a *Sb* foi utilizada em uma terapia combinada com antibióticos, demonstrando capacidade de diminuir a duração e a severidade da diarreia causada no tratamento da infecção por *Helicobacter pylori* (Y. Zhao et al., 2021). No contexto da colite ulcerativa em humanos, os tratamentos com *Sb* também auxiliaram no processo de remissão clínica de pacientes acometidos, reforçando a sugestão de seu uso terapêutico (Guslandi et al., 2003).

1.7 Mecanismos de ação da *Saccharomyces boulardii*

Diversos mecanismos são explorados como fatores ativos na ação clínica da *Sb*. Estudos em camundongos ressaltam o papel da levedura em inibir a produção de fatores induzidos por hipóxia (HIF) na região gastrointestinal. O aumento da expressão destes estão relacionados a angiogênese e sobrevivência celular, parâmetros que quando desbalanceados contribuem para o desenvolvimento da inflamação e podem corroborar crescimento tumoral (Czerucka & Rampal, 2019).

A *S. boulardii* atua na manutenção da barreira epitelial, ocupando nichos depletados criando uma barreira física. Além disso *Sb* também sequestra toxinas circulantes, expressa proteases capazes de degradar toxinas bacterianas e é capaz também de expressar proteínas que bloqueiam os receptores de enterócitos para sinalização de NF- κ B e MAPK. Estes são fatores de transcrição que promovem a expressão de interleucina-8 (IL-8), que media resposta imune celular, e no contexto da inflamação favorecem um status pró-inflamatório. A *Sb* também induz enterócitos a expressarem ocludinas e e-caderinas, proteínas constituintes na formação de complexos proteicos das junções oclusas intercelulares (Czerucka & Rampal, 2019; Zhou et al., 2018).

Estudos apontam também a capacidade da *Sb* em aumentar expressão de IL-10, que no contexto do TGI atua diminuindo a permeabilidade intestinal e estimulando células T regulatórias (Treg), aumentando a secreção de Imunoglobulina A (IgA) induzindo um perfil anti-inflamatório (Generoso et al., 2011; Kelesidis & Pothoulakis, 2012).

1.8 Expressão Heteróloga em *S. boulardii*

A levedura *Saccharomyces boulardii* apresenta grande potencial para expressão recombinante de proteínas heterólogas, tal qual membros do mesmo gênero como a *Saccharomyces cerevisiae*. Ainda, a *Sb* apresenta o benefício de poder ser utilizada como veículo para entrega de biofármacos ao TGI uma vez que essa é capaz de sobreviver a passagem pelo estômago e continuar viável

ao chegar na porção inferior do TGI (Li et al., 2021). As leveduras por se tratarem de microrganismos eucarióticos são capazes de realizar modificações pós-traducionais podendo expressar moléculas mais complexas em relação a expressão em procariotos.

Cepas selvagens da *Sb* já demonstram robusta capacidade de expressão proteica, e estudos apontam que a construção de cepas auxotróficas podem facilitar o processo de seleção clonal e expressão, não dependente de antibióticos (Hudson et al., 2014). Proteínas recombinantes diversas já foram expressas de forma secretória, intracelular e aderente a membrana, sendo a ancoragem pela proteína de membrana SED1 amplamente utilizada (Hudson et al., 2014; Jin et al., 2021; Liu et al., 2016; T. Wang et al., 2014). Dessa forma a *S. boulardii* se destaca não só como uma eficiente fábrica celular, mas também como veículo para entrega de moléculas.

1.9 Inflamação Intestinal

Inflamação intestinal é o termo utilizado para se referir a qualquer tipo de evento de resposta inflamatória intestinal. Dentre diversos distúrbios de caráter leve e moderado se destacam pela severidade quadros de caráter crônico como a Colite Ulcerativa (CU) e a Doença de Crohn (DC).

A DC é definida por ferimentos irregulares na parede do Trato Gastro Intestinal causando inflamação profunda a todas as camadas da parede intestinal, já a Colite é demarcada pela inflamação recorrente e contínua da mucosa e submucosa podendo se estender do reto ao cólon de maneira contínua. O desenvolvimento sintomático é caracterizado pela urgência em evacuar, febre, náuseas, anemia, dores abdominais, sanguinolência nas fezes e quadro diarreico recorrente (Crohns Colitis Foundation, 2023). A incidência mundial de CU tem apresentado crescimento sendo estimada em 23.1 pessoas acometidas a cada 100.000 pessoas todos os anos (Du & Ha, 2020) e de acordo com a Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn (ABCD), que analisou dados do DataSUS, cerca de 200.000 brasileiros são acometidos por doenças inflamatórias intestinais (DII), sendo que 92.000 se enquadram no

contexto de colite, a doença tem a mesma incidência independente do sexo ou etnia tendo o maior número de pacientes com faixa etária de 30 a 40 anos de idade.

A patofisiologia da CU é fortemente marcada pela disfunção em formar a mucosa gastrointestinal, barreira física de mucinas que separa antígenos do lúmen das células imunes do TGI, esse processo em conjunto com a formação de lesões na parede intestinal levam ao aumento da permeabilidade da mucosa para os antígenos do lúmen possibilitando um perfil inflamatório (Du & Ha, 2020).

Investigações sobre fatores que levam ao desenvolvimento da CU ainda não são bem definidos, entretanto a deficiência dos colonócitos em expressar receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), estão implicados na patogênese da doença, uma vez que esse fator nuclear tem papel na regulação da inflamação, controlando moduladores relacionados a expressão de TNF- α (Dubuquoy et al., 2003). Estudos sugerem também que indivíduos acometidos apresentam sensibilidade e ativação aumentada de células dendríticas maduras. No contexto da inflamação intestinal expressam em abundância receptores do tipo Toll (TLR), capazes de reconhecer uma abundância de padrões moleculares associados a patógenos e dano celular, liberando ativação da via de sinalização NF- κ B induzindo cascatas inflamatórias que tem por fim produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL-6, IL-10, IL-12 (Hart et al., 2005).

Além de fatores genéticos, a dieta alimentar se destaca como importante fator no desenvolvimento de sintomas e no caminho para remissão de pacientes. Dietas ricas em fibras auxiliam na saúde da microbiota intestinal, contribuindo no tratamento da doença. Apesar de insumos alimentares como laticínios, colesteróis, sal e açúcar refinado serem reconhecidos pela comunidade médica como agravantes para portadores de doenças inflamatórias intestinais (*National Health Service*, 2023), estudos clínicos em restrições dietéticas não foram capazes de apresentar relação entre desenvolvimento de sintomas ou dificuldade de remissão com dietas livres destes componentes (Keshteli et al., 2019).

A presença de certos microrganismos como *Clostridium difficile* na microbiota também são relatadas como fatores agravantes para o início da patologia (Abt et al., 2016), interação entre a microbiota e o desenvolvimento de DII é amplamente validada (Imhann et al., 2018; Melanie Schirmer, Eric A. Franzosa, Jason Lloyd-Price, Lauren J. McIver et al., 2018).

Não existe cura para a CU, entretanto existem diversos tipos de tratamentos disponíveis com foco em aliviar os sintomas e levar a remissão inflamatória. Os principais tratamentos contam com o uso individual ou combinado de corticosteroides e amino salicílicos. Além do uso de probióticos que demonstram papel na remissão, reestabelecendo a microbiota intestinal e auxiliando no processo anti-inflamatório (Segal et al., 2021). Os tratamentos tentam diminuir o processo inflamatório através da inibição de vias que desencadeiam resposta imune no TGI para evitar o processo cirúrgico de retirada parcial ou total do cólon. Entretanto a capacidade de aliviar sintomas da CU apresentada pelos tratamentos atuais também são responsáveis pelo desenvolvimento de efeitos adversos como dores de cabeça, fadiga, náuseas, erupções cutâneas, insônia e anemia (*National Health Service, 2023*). Portanto, surge a necessidade de desenvolver novas formas de prevenir, tratar e curar pacientes acometidos. A prospecção de biofármacos está em destaque na pesquisa clínica, para atribuir a microrganismos vivos o papel de produzir e entregar medicamentos ao local da inflamação.

1.10 Receptores de Membrana

Células são reclusas do meio externo por membranas celulares, porém não se encontram isoladas e são capazes de reconhecer e comunicar ao meio interno a presença dos mais variados tipos de sinais externos. O processo que facilita a comunicação ocorre pela existência de proteínas transmembranares que possuem domínios externos que reconhecem sinais extracelulares (Yeagle, 2016). Existem diversos tipos de sinais externos que são importantes para a fisiologia humana, no contexto da imunologia se destacam os responsáveis por reconhecer padrões moleculares relacionados a patógenos e marcadores de resposta imunológica, como citocinas e moléculas apresentadoras na membrana de células especializadas.

O receptor de membrana de linfócitos T é um complexo proteico formado por heterodímeros variáveis (porção TCR) associados não covalentemente a dímeros conservados (porção CD3). A porção TCR reconhece peptídeos antigênicos apresentados por células especializadas, a porção CD3 é responsável por transduzir sinais de ativação do linfócito ao núcleo, modulando a atividade da resposta imune celular. Moléculas de TCR podem reconhecer uma infinidade de peptídeos associados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de células apresentadora de antígenos (APC) (Mariuzza et al., 2020). A hipervariabilidade de receptores TCR ocorre pela sua formação que é semelhante a de uma imunoglobulina (Ig). Este possui seis alças de regiões determinantes de complementariedade (CDR), advindas da formação em órgãos linfáticos através do rearranjo de segmentos gênicos *Variável* (V), *Diversidade* (D) e *Junção* (J). O arranjo VDJ resulta em novas sequências de aminoácidos nas regiões de interação do TCR com peptídeos apresentados no MHC (Rossjohn et al., 2015). A capacidade de transduzir sinais através da porção CD3 ocorre pois suas cadeias proteicas possuem imuno-receptores de tirosina, os quais sofrem fosforilação após a ativação pelo TCR desencadeando cascata de sinalização interna relacionada a NF-κB (Samelson, 2002).

1.11 Anticorpos monoclonais

No século XX o pesquisador Paul Ehrlich após diversos apontamentos em sua pesquisa sobre o até então não elucidado sistema complemento, observou a existência de partículas no nosso corpo que interagiam de forma específica a corantes e cunhou o termo “balas mágicas” substâncias que viriam a ser desenvolvidas, e seriam capazes de atacar diretamente agentes causadores de doenças. Quase cem anos depois o primeiro anticorpo monoclonal foi aprovado para uso em humanos, o Muronomab, um anticorpo capaz de se associar especificamente ao complexo CD3, demonstrando efeito clínico em reduzir o caráter de rejeição à transplantes (Zipfel & Skerka, 2022). Anticorpo monoclonal é o nome dado a moléculas de anticorpo que surgem de um mesmo clone de linfócito B, sendo assim todas as moléculas são idênticas, clonais. Os anticorpos monoclonais são biomoléculas ativas baseadas em imunoglobulinas modificadas, que tem efeito específico sobre um determinado alvo. Hoje diversos fármacos deste modelo são utilizados no tratamento de doenças de caráter

inflamatório, autoimune e até mesmo câncer. O anticorpo monoclonal anti-CD3 Muromab (OKT3) foi pioneiro por ser sintetizado através da técnica do hibridoma, combinando sequências gênicas distintas em uma mesma célula para produção de anticorpos sintéticos monoclonais. O processo de purificação e uso destas biomoléculas, entretanto foi retirado do mercado devido aos efeitos adversos relacionados ao uso que acarretavam em tempestade de citocinas devido a natureza da molécula ser de origem murina. O uso das moléculas murinas desencadeou também resposta HAMA (human anti-mouse antibody), contudo o Muromab permitiu maior compreensão dos mecanismos de ação e precauções que deveriam ser tomadas para se otimizar o uso destas moléculas (Sgro, 1995).

1.12 Terapias com Anticorpos Monoclonais

O uso de anticorpos monoclonais conquistou ainda mais espaço na pesquisa clínica com o avanço no processo de humanização, onde as sequências utilizadas na formação da molécula do anticorpo monoclonal são adaptadas para melhor se assemelhar ao arcabouço de anticorpos produzidos naturalmente em humanos, diminuindo o risco de imunogenicidade (Cycles, 1989).

Tratamentos com anticorpos monoclonais que tem como alvo específico o complexo CD3 se destacam: Otelixumab, Teplizumab e Visilizumab; moléculas humanizadas aprovados para uso clínico pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), que demonstraram efeitos positivos em atrasar o início do quadro de diabetes tipo 1 (Herold et al., 2019; Miller & St. Onge, 2011), e também atuam como tratamento para pacientes acometidos por Colite Ulcerativa em estado refratário ao tratamento com esteroides (Ilan et al., 2018; Yu et al., 2008).

Além destes diversos estudos em modelo animais demonstram que o tratamento oral com anticorpos anti-CD3 levam a melhora do quadro de inflamação intestinal enquanto induzem tolerância ao anticorpo, diminuindo o potencial imunogênico (Kuhn & Weiner, 2016).

A capacidade de induzir um perfil anti-inflamatório por parte das moléculas anti-CD3 ocorre pela capacidade destas em se ligarem ao receptor TCR-CD3 e não induzir a cascata sinalizadora de ativação. O processo leva a clivagem ou internalização do complexo TCR, impedindo que o linfócito T seja ativado, mantendo um caráter anérgico. O que resulta na depleção da população de linfócitos TCD3+ (Kuhn & Weiner, 2016). Foi evidenciado também o efeito do tratamento com anti-CD3 em tecido intestinal mononuclear da lamina própria extraído de pacientes acometidos por doenças inflamatórias intestinais, levando a diminuição da expressão de INF- γ , e o aumento da expressão de IL-10 (Vossenkämper et al., 2014). IL-10 desempenha papel fundamental para manutenção da homeostase no processo inflamatório, sendo uma citocina de caráter anti-inflamatório que atua inibindo a capacidade de secreção de citocinas por macrófagos e células dendríticas o que acarreta no impedimento da produção de INF- γ por células Th1 (tipo de resposta celular inflamatória mediada por IL-2) (Fiorentino et al., 1991). Defeitos na expressão e polimorfismos da IL-10 são apontados também como um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais (Engelhardt & Grimbacher, 2014).

2 Justificativa

O número de indivíduos acometidos por doenças inflamatórias intestinais na última década fizeram soar um alarme global (Du & Ha, 2020). Diversos fatores são levados em consideração para este aumento, tais como melhores condições clínicas para diagnóstico. Entretanto existe consenso que o rápido processo de industrialização do século XX e a mudança no perfil de consumo para dietas ocidentalizadas com consumo de produtos ultraprocessados contribuíram para a ampla incidência na população global, haja visto que países em processo de industrialização apresentam aumento da incidência de doenças inflamatórias intestinais na população (Kaplan, 2015). Análises em base de dados para doenças inflamatórias intestinais na população a partir de 1990 elencam por região geográfica a prevalência, a cada 100.000 habitantes, na: Europa (505/100.000), América do Norte (318/100.000), Ásia (106/100.000), Oceania

(97/100.000), América do Sul (44/100.000) e África (19/100.000). Sendo que dados referentes aos continentes Sul-Americano, Asiático e Africano estão subestimados devido à falta de mais informações em base de dados de acesso livre (Ng et al., 2017).

Ainda é preciso salientar que não existe cura para Doença de Crohn e Colite Ulcerativa, tratamentos são focados em aliviar sintomas, promovendo melhora na qualidade de vida dos pacientes, prevenindo o agravamento da patologia que pode levar ao uso permanente de bolsa de colostomia e displasia do tecido afetado e necessidade de intervenção cirúrgica. O uso de ácido aminossalicílico representa a primeira linha de tratamento para casos leves e moderados, a combinação com corticosteroides é recomendada para casos mais severos, estes medicamentos são bem tolerados a longo prazo porém em eventos adversos raros podem levar a insuficiência renal (Lamb et al., 2019). O uso de ácidos aminossalicílicos entretanto não apresenta resolução absoluta uma vez que pacientes podem não ser responsivos ao tratamento, desta forma terapias focadas no uso de anticorpos monoclonais são preferíveis (Segal et al., 2021). Apesar do grande sucesso apresentado por estes biofármacos em induzir remissão clínica do quadro de inflamação intestinal, a rota de administração intravenosa causa efeitos sistêmicos de imunossupressão e abrem espaço para infecções oportunistas além de efeitos adversos relacionados a imunogenicidade (Ford & Peyrin-Biroulet, 2013). Logo a entrega oral de biofármacos apresenta-se como estratégia para desviar dos efeitos imunossupressores sistêmicos, além de ser uma rota capaz de induzir tolerância, evitando reposta contra o agente terapêutico e que pode ser administrada pelo próprio paciente de forma segura (Bermúdez-Humarán & Langella, 2017).

Além do fardo individual apresentado em decorrência de patologias inflamatórias intestinais crônicas a demanda financeira para tratamentos é alta. Só o governo canadense indicou no ano de 2012 que o custo anual dedicado ao tratamento de indivíduos acometidos era de 12 mil dólares por paciente chegando ao acumulado de 2,8 bilhões de dólares (Rocchi et al., 2012). Na Europa, região com maior prevalência mundial de doenças inflamatórias intestinais, o custo anual por paciente chega a 3,5 mil euros entre gastos relacionados a hospitalizações, procedimentos cirúrgicos e aquisição de

medicamentos (M. Zhao et al., 2021). No Brasil os medicamentos aprovados para uso são de alto custo sendo comercializado a partir de R\$ 5.520,00 por dose (Consulta Remédios,2023).

Tratamento com anticorpos anti-CD3 têm demonstrado efeito positivo imediato na resolução de sintomas clínicos, uma vez que impedem a continuidade da injúria tecidual causada em decorrência do processo inflamatório. O tratamento com anti-CD3 se destaca pela capacidade de induzir imunossupressão e desenvolvimento de caráter anérgico da população de células T (Kuhn & Weiner, 2016). Afim de evitar o processo sistêmico de resposta supressora a rota de entrega via oral é preferível, entregando a molécula anti-CD3 diretamente ao tecido inflamado.

Neste contexto, a levedura *S. boulardii* pelos diversos efeitos positivos como probiótico na regulação intestinal; além da sua capacidade de expressar proteínas recombinantes, sobreviver a passagem do trato gastrointestinal e ter baixo custo de cultivo demonstra potencial para utilização como veículo de entrega de biofármacos a uma região específica no contexto de doenças inflamatórias intestinais. Assim a *Sb* pode ser utilizada para a construção de uma cepa produtora de anti-CD3 e ser disposta como proposta de tratamento para doenças inflamatórias intestinais crônicas como a Colite Ulcerativa. A proposta farmacológica de tratamento deve evidenciar capacidade em reduzir perfil inflamatório.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver linhagem recombinante de *Saccharomyces boulardii* como protótipo terapêutico para tratamento de colite ulcerativa.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Desenhar o gene para construção do vetor de expressão do fragmento scFv anti-CD3 associado a parede da levedura;
- b) Obter linhagem recombinante da *S. boulardii*;
- c) Analisar a expressão de proteínas recombinantes;
- d) Avaliar o efeito do tratamento de colite experimental em camundongos utilizando a linhagem recombinante;
- e) Investigar a capacidade do tratamento com linhagem recombinante em modular a microbiota intestinal;

4 Materiais e Métodos

4.1 Linhagens de microrganismos e condições de cultivo

A bactéria *Escherichia coli* da linhagem XL10 Gold foi semeada em placas de petri contendo meio sólido Luria-Bertani (LB) ágar, de composição: Peptona de Caseína 1%, Extrato de Levedura 0.5%, Cloreto de Sódio 1%, Ágar Bacteriológico 1.4%, pH ajustado para 7.2. Após autoclavado, o meio foi ainda suplementado com Tetraciclina na concentração final de 50µg/mL. As placas foram incubadas por 16 horas em estufa com temperatura controlada a 37°C. A partir de colônias isoladas da cultura em meio sólido a bactéria foi cultivada em Erlenmeyer contendo meio LB líquido (LB em adição de Agar). Os frascos do tipo Erlenmeyer foram incubados a 37°C sob agitação constante de 300rpm pelo período de 16 horas. Para seleção de clones transformantes o meio LB foi suplementado também do antibiótico Ampicilina, marca de seleção utilizada, na concentração final de 150µg/mL.

A levedura *Saccharomyces boulardii* 17 liofilizada foi isolada de sachês de FLORATIL®, os quais foram diluídos em água destilada autoclavada no volume de 200 mL segundo recomendações de consumo indicadas na embalagem. O conteúdo da diluição foi então estriado em placas de Petri contendo meio rico YPD (Extrato de Levedura 1%, Peptona de Caseína 2%, Ágar Bacteriológico 1.4% e Glicose 2%, pH ajustado para 7) e incubadas por 48 horas em estufa com temperatura controlada a 30 °C. A partir de colônias isoladas da cultura em meio sólido a levedura foi cultivada em Erlenmeyer contendo meio YPD líquido (Extrato de Levedura 1%, Peptona de Caseína 2% e Glicose 2%, pH ajustado para 7). Os frascos do tipo Erlenmeyer foram incubados a 30 °C sob agitação constante de 200 rpm pelo período de até 72 horas. Para seleção de clones transformantes o meio YPD foi suplementado também com antibiótico Geneticina, marca de seleção utilizada, na concentração final de 400 µg/mL. As linhagens cultivadas no projeto e suas especificações estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Nomes das linhagens recombinantes utilizadas neste trabalho

Nome da linhagem	Descrição
<i>Sb WT</i>	<i>S. boulardii</i> selvagem
<i>Sb V0</i>	<i>S. boulardii</i> transformada com pYC230
<i>Sb CD3</i>	<i>S. boulardii</i> transformada com pYCCD3

4.2 Plasmídeos

Neste trabalho foi utilizado o plasmídeo YCCD3 (9.2kb), construção derivada do plasmídeo YC230 (7.7 kb) (REIS, 2012) adicionada do fragmento 2C11-SED1 (1.5 kb) sequência referente ao peptídeos sinal SUC2, fragmento de anticorpo scFv anti-CD3, proteína de ancoragem a parede SED1 e epítomos HA e FLAG para marcação. A sequência 2C11-SED1, correspondente a sequência gênica do anti-CD3, foi clonado ao plasmídeo YC230 entre os sítios Bam HI e Eco RI (1491 – 3042) resultando no vetor de expressão nomeado neste projeto de YCCD3. Este possui ainda marca de seleção para Ampicilina em procariotos e G418R em eucariotos, origem de replicação para procariotos (ori) e eucariotos (2 μ ori), este plasmídeo teve seus códons preferenciais desenhados para *S. boulardii*. O vetor sintético foi construído pela GeneScript. O iniciadores de PCR utilizados para a confirmação de identidade estão listados na tabela 2.

4.3 Curva de Crescimento

Colônias isoladas de Sb WT, Sb V0 e Sb CD3 em meio YPD ágar foram separadamente inoculadas em 5 mL de meio líquido e crescidas overnight a 30°C sob agitação de 200 rpm a fim de cultivar um pré-inoculo. A partir desta cultura às 06 horas da manhã foi realizado um inoculo em meio YPD, crescido sob as mesmas condições, que teve a Densidade Ótica a 600nm (OD 600) medida a cada duas horas até 20 horas da noite, às 18 horas um novo inoculo foi feito e crescido overnight tendo o início da medição de sua OD600 às 06 horas da manhã do dia seguinte para assim adquirir mais pontos para curva de crescimento, no segundo dia ambos os inóculos tiveram suas OD600 medidas a cada 2 horas. Ambos os inóculos seguiram em cultivo até completarem 72 h, tendo a OD 600 medida de 24 em 24 horas após alcançarem a marca de 48 h.

4.4 Digestão enzimática

Para confirmar a identidade dos plasmídeos pYC230 e pYCCD3 foram utilizadas a endonuclease PstI (NEB, Ipswich, MA, EUA), que realiza corte único no plasmídeo, linearizando o vetor em respectivamente 6238 pb e 9238 pb. Para reação foram utilizadas 250 ng de DNA plasmidial intacto, 1 µL de endonuclease, 4 µL do buffer provido pelo fabricante, o volume final foi ajustado para 40 µL com água Milli-Q. A reação foi incubada a 37°C por 4 horas, em seguida 10 µL foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.5 Eletroforese em Gel de Agarose

Amostras de DNA tiveram o perfil de peso molecular analisado por eletroforese em gel de agarose. Para a confecção do gel foi utilizado tampão TAE 1X (Tris Base 40mM, Ácido Acético Glacial 20mM, EDTA 10mM pH 8,0), 1% de agarose referente ao volume total (p/v) e Brometo de Etídio para concentração final de 0.5 µg/mL. Foi adicionada solução tamponante ao material em análise (Azul de bromofenol 0.25%, Sacarose 40%). A eletroforese foi realizada sob corrente de 20 a 70 volts.

4.6 Transformação da levedura *S. boulardii* por eletroporação

O protocolo de transformação em levedura foi adaptado do trabalho de Azevêdo *et al.* 2021 e Douradinha *et al.* 2016. Durante o protocolo todas as etapas de centrifugação seguiram os parâmetros de 3000g, 4°C por 10 minutos.

Uma colônia isolada de levedura crescida em meio YPD ágar foi utilizada para inocular 5mL de YPD líquido suplementado com 2% de glicose e crescido overnight a 30°C sob 200rpm de agitação. Após o crescimento 500mL de meio YPD suplementado com 2% de glicose foi inoculado com a cultura controle para uma OD600 inicial de 0.3 e incubada nas mesmas condições até atingir OD600 de 1.6.

Ao atingir a densidade ótica desejada as células foram coletadas por centrifugação e o sobrenadante foi descartado, o pellet então foi lavado com 50mL de água gelada destilada e autoclavada por três vezes, centrifugando entre cada lavagem. Após estas lavagens as células foram ressuspensas em 20mL de tampão de incubação gelado (Acetato de Lítio 0.1M e Dithiothreitol 10mM) que foi preparado na hora do uso a partir de soluções estoque estéreis. A suspensão de células foi então incubada por 30 minutos na estufa a 30°C. Após o período de incubação células foram centrifugadas e posteriormente suspensas em 50mL de tampão de eletroporação gelado (Sorbitol 1M Cloreto de Cálcio 1mM), foram novamente centrifugadas e suspensas em 5mL de tampão de eletroporação. Imediatamente 400µL da suspensão de células foi adicionado de 5µg de DNA plasmidial e 10µg de DNA carreador (DNA de esperma de Arenque). Essa reação foi reservada no gelo por 5 minutos e prontamente eletroporada em cubeta de 2mm com pulso de 2.5kV, capacitância 25µF e resistência de 200Ω no eletroporador GenePulser Xcell™ Electroporation System (Bio- RAD, Hercules, CA, EUA).

Após o choque as células foram recuperadas lavando as cubetas com 8mL de uma mistura 1:1 YPD e Sorbitol 1M, alocando a suspensão em tubos estéreis e incubando estes a 30°C sob agitação constante de 100rpm por 1 hora. Utilizar 100µL para semear placas de petri estéreis contendo mistura de meio YPD e

sorbitol 1:1 e o fator de seleção adequado (G418R). As placas devem ser cultivadas por 2 dias até o surgimento de colônias.

4.7 PCR de Colônia

Todas as colônias que cresceram no meio seletivo após a transformação foram repicadas em novas placas de Petri para garantir a propagação dos clones, tendo as colônias originais retiradas do meio com auxílio de uma ponteira, foram diluídos em 20µL de água Milli-Q e fervidos por 15 minutos, para a reação de PCR foi utilizado 2µL desse material. Para completar a reação foi adicionado 5µL de 10 X PCR Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 4µL de dNTPs (10mM), 3µL de MgCl₂ (50mM), 1,25µL de cada iniciador (10µM), 0,5µL da enzima Taq DNA Polimerase recombinante (5U/µL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e água Milli-Q para um volume final de 50µL. 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 10µL de cada reação foi submetida a eletroforese em gel de agarose. Iniciadores específicos para as sequencias do G418R e do fragmento scFv anti-CD3 foram desenhados e apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Iniciadores de PCR

Alvo da amplificação		Sequência de iniciadores	T _m	Amplicon resultante
G418R	F	5'TCGGTTTCCCTCCTTCTTGAA3'	55°	1650pb
	R	5'GTGGATGTTGTTTCGAGAGTAGG	C	
		3'		

Anti-CD3	F	5'CCAACAAAAGCCAGGTAAGG3'	55°	260pb
			C	
	R	5'CGTCGTCGTCCTTGTAGTCA3'		

4.8 Produção de scFv Anti-CD3 associado a parede celular

Uma colônia isolada em meio YPD Ágar suplementado com 400 µg/mL de Geneticina (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) foi inoculada em 5mL de meio YPD suplementado de Geneticina e 1% de Glicose sendo incubado a 200rpm, 30°C overnight. Após o crescimento adequado a partir do pré-inóculo, 100 mL de meio YPD em um frasco de cultura tipo Erlenmeyer de volume 1L foram inoculados para uma OD600 de 0,1 sendo incubado a 200rpm 30°C por períodos de tempo de até 72 horas. A cultura celular foi sedimentada por centrifugação a 3000 g.

4.9 Preparo de amostra para análise proteica

Método de quebra física

Pellet celular foi adicionado de PBS e congelado a -20°C e prontamente descongelado em banho de água fervente e então congelado novamente, este processo foi repetido 3 vezes para rompimento das células. Em seguida o material celular foi adicionado de glass beads 0.2mm e vortexado por 15 minutos. As células foram centrifugadas a 9,000 rpm por 20 minutos e a fase aquosa (fração solúvel intracelular) foi coletada assim como a fração insolúvel.

Método de quebra Enzimática

Pellet celular foi suspenso em água deionizada e autoclavada. A suspensão foi adicionada da solução fosfato de potássio garantindo uma mistura 1:2 com concentração final de 67 mM, pH 7.5. Por fim foi adicionada a enzima Liticase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 500 unidades para cada mL. A preparação foi incubada a 25°C até que todo o material suspenso na solução formasse um pellet de degradação uniforme. As células foram centrifugadas a 9,000 rpm por

20 minutos e a fase aquosa (fração solúvel intracelular) foi coletada assim como a fração insolúvel.

Para análise em gel desnaturante de poliacrilamida – SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) amostras foram adicionadas 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.

4.10 Gel Desnaturante de Poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi feito na espessura de 1 mm sendo a porção separadora preparada a 12% (3 mL de acrilamida/ bisacrilamida (29:1); 2,5 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 100 μ L de SDS 10%; 4 μ L de TEMED; 100 μ L 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 feita a porção concentradora do a 5% (468,8 μ L de acrilamida/ bisacrilamida (29:1); 472,5 μ L de Tris-HCl 1M pH 6,8; 37,5 μ L de SDS 10%; 3,75 μ L de TEMED; 37,5 μ L de APS 10% e água destilada para um final de 3,8 mL), sendo adicionado acima do gel separador e imediatamente colocado o pente para a polimerização e formação dos poços. Após polimerização o pente foi removido, poços foram lavados com água destilada e as amostras fervidas foram aplicadas aos poços.

Após a preparação o gel 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 foram aplicados em cada poço com auxílio de uma pipeta. A corrente para a migração das proteínas foi fixada a 100 mA. Ao se confirmar saída total do azul de bromofenol pelo fundo do gel sabe-se que houve uma separação efetiva das proteínas. Após a saída do marcador foi feita a retirada do gel que seguiu para coloração com Coomassie Blue e imunodeteção por Western Blot.

4.11 Coloração com Coomassie Blue

Após finalizada a corrida, a porção do gel concentrador foi descartada e o gel separador foi corado com Solução Corante [Azul Brilhante de Coomassie R-250 0,25% (p/v); Metanol 30% (v/v); Ácido Acético Glacial 7% (v/v)] por pelo menos duas horas sob leve agitação. A Solução Corante foi então 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 que o gel se tornasse claro possibilitando a visualização das bandas de proteína.

4.12 Imunodeteção por Western Blot

Após finalizada a corrida, a porção do gel concentrador foi descartada e o gel separador seguiu para a imunodeteção da proteína Anti-CD3 por Western Blot. Após a eletroforese, foi realizada a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose PROTRAN 0,45 μm (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, EUA). O sistema semisseco 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). Uma corrente constante de 150 mA e 10 V foi mantida por 50 minutos. Em seguida foi feita a checagem da eficiência da transferência conferindo a presença do marcador pré-corado na membrana, e corando a membrana com Vermelho de Ponceau (0,5%??) 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, NaHPO₄ 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 murino 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. A membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBST 0,1%, incubada por 5 minutos na solução APB (NaCl 100 mM; Tris-HCl 100 mM pH 9,5; MgCl₂ 5 mM) preparada 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 em abundância, por fim pode-se analisar a presença de proteínas comparando as bandas ao marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

4.13 Marcação para Imunodeteção

Células crescidas pelo tempo necessário foram coletadas por centrifugação 3000g, 4°C, 20 minutos e então lavadas por três vezes em PBS, sendo repetida a centrifugação entre cada uma das lavagens. As células suspensas então eram adicionadas de 1 µL de anticorpo anti HA-FITC [1.0 mg/mL] (clone HA-7 murino; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e incubadas por 1 hora temperatura ambiente, após este período a suspensão de células foi lavada por 5 vezes em PBS e estavam prontas para uso imediato para análise de Imunodeteção por citometria onde se adquiriam 100 mil eventos e microscopia de fluorescência onde 1×10^6 células eram suspensas em 10 mL de PBS e aplicadas ao fundo de placas de 24 poços. Para controle negativo da emissão de fluorescência células da linhagem *Sb* CD3 não eram marcadas com o anticorpo anti HA-FITC.

4.14 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 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.

4.15 Preparo das doses

Um pré-inóculo foi cultivado a partir de uma colônia isolada de *Sb* WT, *Sb* V0 e *Sb* CD3 em 5 mL de meio YPD e se necessário 400 µg/mL de Geneticina (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), sendo incubados a 200 rpm, 30°C overnight. Com o devido crescimento dos pré-inóculos, foram feitos os inóculos em 100 mL de meio YPD, ao atingirem a OD 10 cada cultura foi centrifugada 3000 x *g* a 4°C por 10 minutos, e ressuspendida em 500 µL de meio YPD. Foi adicionado 500 µL de glicerol 50% estéril para estocagem a -80°C.

Um mL de cada cultura foi diluído de 10⁻⁶ a 10⁻⁸ e plaqueado com perlas de vidro em meio YPD Ágar e incubadas a 30°C. Após 48 horas foi feita a contagem de UFC, para verificar a quantidade de células viveis.

Para a administração das doses, as células estocadas foram descongeladas e centrifugadas a 3.000 x *g* por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. As células foram suspensas em solução salina estéril para um volume final de 100 µL contendo 1 x 10⁹ células.

4.16 Grupos do Experimento

Os camundongos foram separados em oito grupos como apresentado na Tabela 3. O grupo NT representa o controle negativo da doença, os camundongos não receberam DSS (Dextran Sulfato de Sódio) (MPBiomedicals, CA, EUA) e são considerados saudáveis. O grupo DSS representa o controle

positivo da doença onde os camundongos recebem DSS para induzir a doença, porém sem tratamento. Os demais grupos NT são controles do tratamento onde camundongos saudáveis recebem os tratamentos *Sb* WT, *Sb* V0 e *Sb* CD3. Os demais grupos DSS representam os tratamentos *Sb* WT, *Sb* V0 e *Sb* CD3 para avaliar a capacidade da levedura selvagem, vetor vazio e transformante para expressão de anti-CD3 em tratar os sintomas da colite experimental.

Tabela 3 – Grupos de camundongos do experimento *in vivo*. Animais foram alocados em 4 grupos saudáveis e 4 grupos doentes

Grupos	Nº de animais	Tratamento
NT	6	Salina 0.9%
NT <i>Sb</i> WT	6	<i>Sb</i> WT
NT <i>Sb</i> V0	6	<i>Sb</i> V0
NT <i>Sb</i> CD3	6	<i>Sb</i> CD3
DSS	6	DSS 3% + Salina 0.9%
DSS <i>Sb</i> WT	6	DSS 3% + <i>Sb</i> WT
DSS <i>Sb</i> V0	6	DSS 3% + <i>Sb</i> V0
DSS <i>Sb</i> CD3	6	DSS 3% + <i>Sb</i> CD3

4.17 Indução da colite experimental e Eutanásia

Para indução da doença, os animais receberam DSS 3% (p/v) (MPBiomedicals, CA, EUA) diluído na água de beber, *ad libitum*, durante os primeiros 5 dias do experimento (Park et al., 2015). A quantidade de água

ingerida por grupo foi monitorada diariamente, com uma média de consumo de 9 mL/dia/grupo. O cronograma do experimento se encontra na Figura 1. A indução da doença ocorreu durante os 5 primeiros dias. Ao par que os camundongos começaram a receber o DSS também foi iniciado o tratamento dos animais com a gavagem oral da levedura ou solução salina 0,9% como descrito na Tabela 3. No 11º dia ocorreu a eutanásia dos camundongos que foram sacrificados por overdose de anestésico (Ketamina e Xilazina). Ao longo do experimento foram acompanhados os parâmetros macroscópicos da doença (peso, consistência fecal e sanguinolência retal), no dia da eutanásia foram coletados o cólon e o lavado intestinal, os linfonodos mesentéricos e sangue de todos os animais. Nos dias 1, 5 e 10 foram coletadas amostras fecais de todos camundongos.

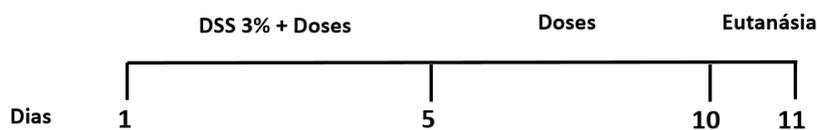


Figura 1 – cronograma do experimento *in vivo*.

4.18 Índice de Atividade da Doença (DAI)

Parâmetros macroscópicos da doença foram medidos utilizando o Disease Activity Index (DAI). Índice que determina scores baseado em sangramento retal, consistência das fezes e porcentagem de perda de peso (diferença entre o peso inicial e final), a Tabela 4 apresenta as pontuações da escala de avaliação.

Tabela 4 – Escores de pontuação para cálculo do Índice de Atividade da Doença (DAI).

Score	Perda de peso (%)	Consistência das fezes	Sangramento Retal
0	Nenhuma	Normal 0	Ausente 0

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

4.19 Extração de DNA Fecal

Para análise de microbioma fecal dos camundongos fezes foram coletadas de todos os indivíduos durante o experimento *in vivo* durante os dias 0, 5 e 10. Para extração de material genético para sequenciamento foi utilizado o kit GenElute™ Stool DNA Isolation (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As fezes de cada grupo foram misturadas formando um conjunto de amostra de cada população. O DNA total foi extraído a partir de 200 mg do material fecal para subsequente amplificação da região 16S por PCR, possibilitando sequenciamento gênico e montagem do perfil da população do microbioma. O trabalho de sequenciamento foi terceirizado para empresa GenOne Biotech, soluções em biotecnologia.

4.20 Análises Histopatológicas

Amostras do cólon intestinal foram coletadas e fixadas em formalina 10% (pH 7.0), embebidas em parafina, e após corte dos cubos de parafina, seções histológicas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E). Uma análise histológica semiquantitativa das mudanças histológicas na mucosa, submucosa e estrato muscular foram conduzidos e pontuados como ausente (-), leve (+), moderado (++) e severo (+++). As análises seguiram parâmetros base do desenvolvimento da Colite experimental em camundongos induzida por DSS apresentados por CHASSAING, 2015. Parâmetros pontuados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros para pontuação de mudanças histológicas.

	Úlcer a	Necro se da cripta	Inflamação			Fibrose		
			Linfocitocít ica	Neutrófil os	Eosinófil os			
Mucosa	-/+	-/+	-/+/+/+/+			X		
Submuco sa	X	X				-	/+/+/+/+	++
Muscular	X	X						

5 Resultados e Discussão

5.1 A levedura *Saccharomyces boulardii*

Neste trabalho foi utilizada a linhagem *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745, isolada a partir de um sachê de FLORATIL®. Esta é utilizada de longa data para tratamento de alívio dos sintomas relacionados a diarreia infecciosa como apresentado por MCFARLAND, 2010 e apresentou sucesso em aliviar os sintomas relacionados ao desenvolvimento da colite ulcerativa experimental como demonstrado no trabalho de RODRÍGUEZ-NOGALES, 2018. A capacidade probiótica da *S. boulardii* se alinha com a proposta deste trabalho de desenvolver uma linhagem recombinante de levedura capaz de expressar um fragmento de anticorpo de caráter anti-inflamatório aderido à parede celular. Neste trabalho a *S. boulardii* foi cultivada em meio de cultura rico (YPD) a temperatura de 30°C que foi reportada como mais eficiente por ALTMANN, 2018 e testado no trabalho de AZÊVEDO, 2021.

5.2 O vetor de expressão

Ancorar anticorpos na superfície de microrganismos depende de um processo intracelular de marcação endereçando à parede, a etapa de investigação para se encontrar a proteína de ancoragem ideal é laborioso, entretanto a levedura *S. boulardii* já possui diversos sistemas descritos capazes de ancorar proteínas recombinantes na parede com alta eficiência (T. Wang et al., 2014). O sistema SED1 recebeu destaque por utilizar a rota de endereçamento da SED1, uma proteína que é abundantemente expressa e que apresenta maior eficiência e saturação de proteínas na parede celular, podendo ser expresso através de um único vetor (Bamba et al., 2018).

Para construir o vetor de expressão para o fragmento de anticorpo anti-CD3 foi utilizado o arcabouço do vetor pYC230 próprio para expressão recombinante em leveduras (Figura 1A), mantendo promotor e terminador de transcrição do gene PGK de *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank ID: 850370).

a construção do vetor de expressão pYCCD3 (Figura 1B) se deu então através da clonagem do cassete gênico (Figura 1C) contendo: peptídeo sinal PS (comum da própria levedura responsável por marcar SED1 para ancoragem), epitopo HA para imunodeteção, sequência referente ao fragmento de anticorpo scFv anti-CD3, epitopo Flag, região linker GS2 para promover maior flexibilidade da molécula fusionado a proteína de ancoragem SED1. O vetor pYC230 possui duas origens de replicação, uma para amplificação em bactéria e outra para perpetuação clonal em leveduras. duas marcas de seleção também estão presentes pelo mesmo motivo, sendo elas AmpR (ampicilina) e G418R (geneticina) para bactéria e levedura respectivamente. Para todas as sequencias foram utilizados os códons preferenciais de *S. cerevisiae*.

Poucas são as opções de agente de seleção para a levedura *Sb* recombinante. G418R se ressaltou por ter sido amplamente testado e demonstrar capacidade de impedir o crescimento de leveduras do gênero *Saccharomyces*, mesmo em baixas concentrações (Astromskas & Cohn, 2007). Como testado por Azevêdo, 2021, G418R tem efeito fungistático em concentrações superiores a 75 µg/mL e menores que 400 µg/mL e efeito fungicida em concentrações superiores a 400 µg/mL na cultura de *S. boulardii*, sendo a concentração fungicida utilizada neste trabalho para seleção clonal.

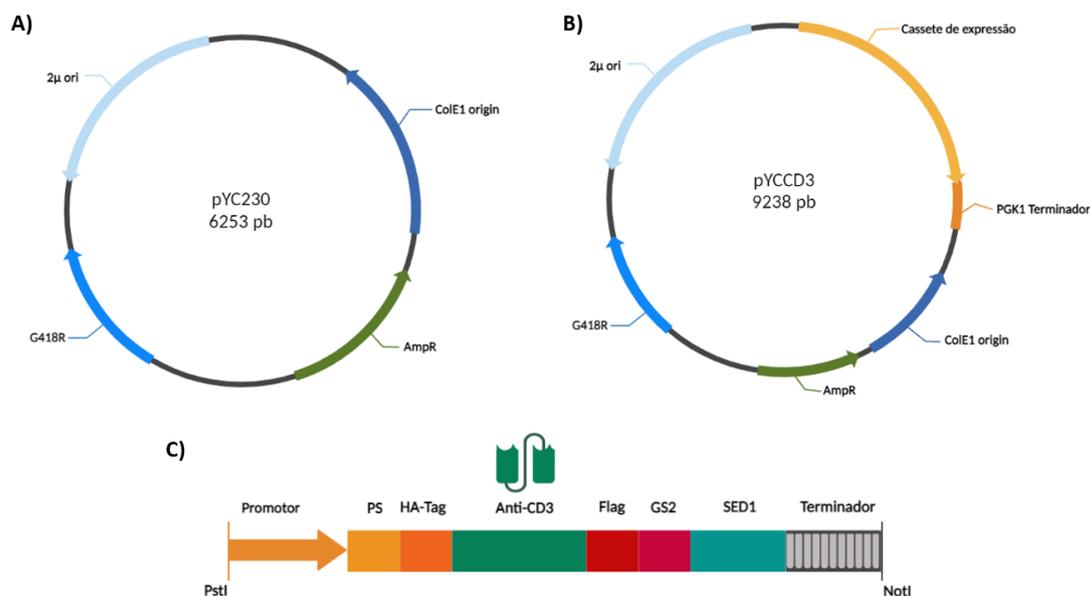


Figura 2 – Representação esquemática dos plasmídeos. (A) pYC230 vetor vazio V0; (B) pYCCD3 vetor de expressão scFv anti-CD3 associado a parede; (C) Cassete de expressão representando as sequências: promotor PGK, peptídeo sinal SUC2, tag de HA, gene do scFv anti-CD3, epítipo Flag, linker GS2, região carboxi terminal da proteína de ancoragem SED1 e terminador de transcrição.

5.3 Confirmação de plasmídeo e Transformação na *S. boulardii*

O vetor de expressão pYCCD3 foi transformado em *E. coli* XL10Gold e extraído por maxi preparação utilizando kit QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Para confirmação do plasmídeo este foi submetido a ação de endonuclease de corte único, afim de linearizar o plasmídeo para então ser observado por eletroforese em gel de agarose confirmando o tamanho com o auxílio de marcador de peso molecular (Figura 2A).

Foi realizada a transformação de acordo como descrito no tópico transformação em levedura *S. boulardii* (seção 4.6). Colônias transformantes crescidas em meio YPD Ágar suplementado com o fator de seleção G418R tiveram a confirmação da presença do transgene através de PCR de colônia utilizando iniciadores específicos para a região da sequência codificadora do fragmento de anticorpo (Figura 2B). Além disso, colônias crescidas nas placas seletivas foram repicadas em uma nova placa para propagar as linhagens transformantes. Clones que apresentam amplificação durante o processo de

PCR de colônia estão relacionados com a presença do plasmídeo de interesse, dessa forma apenas clones com amplificação foram utilizados.

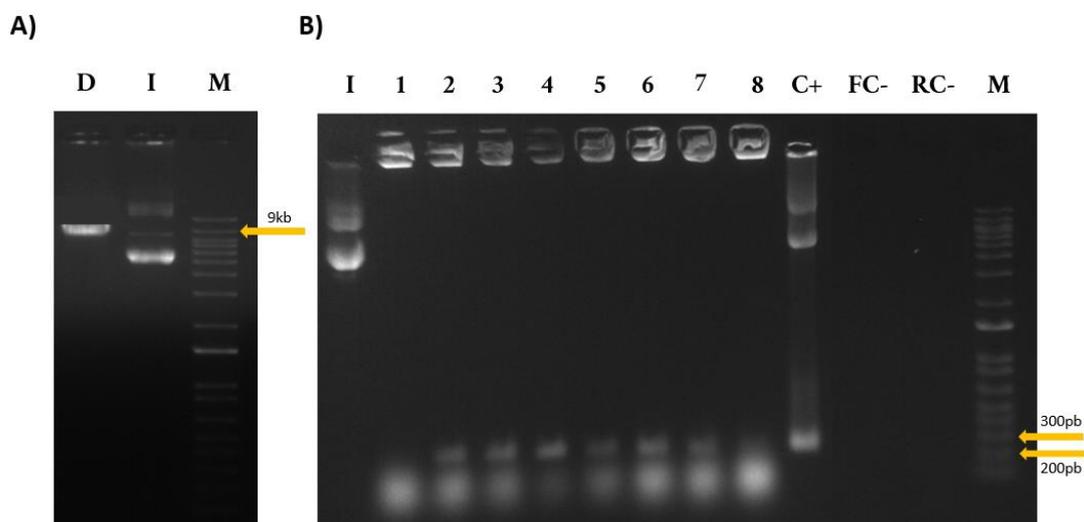


Figura 3 - Análise de amostras de DNA separadas por eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo. (A) Identidade do vetor de expressão pYCCD3, Canaleta D digerido com PstI; Canaleta I Intacto. (B) Amostras de amplicons obtidos a partir da PCR de colônias transformantes *Sb* CD3 utilizando iniciadores para a sequência do gene codificador para anti-CD3 (1-8). Canaleta M marcador 1kb Plus Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); (FC-) Controle negativo da reação iniciador forward; (RC-) Controle negativo da reação iniciador reverse.

Para garantir um controle com o vetor vazio (*Sb* V0) para próximas etapas do projeto, *S. boulardii* foi transformada com vetor pYC230, destituído da sequência codificadora para o fragmento de anticorpo (Figura 4A). Colônias transformadas com pYC230 foram selecionadas em meio YPD Ágar suplementado com fator de seleção G418R. Clones transformantes foram submetidas a PCR de colônia, utilizando iniciadores específicos para a região codificadora da sequência referente ao gene de resistência G418R (Figura 3B). Colônias crescidas nas placas seletivas foram repicadas em uma nova placa para propagar as linhagens transformantes.

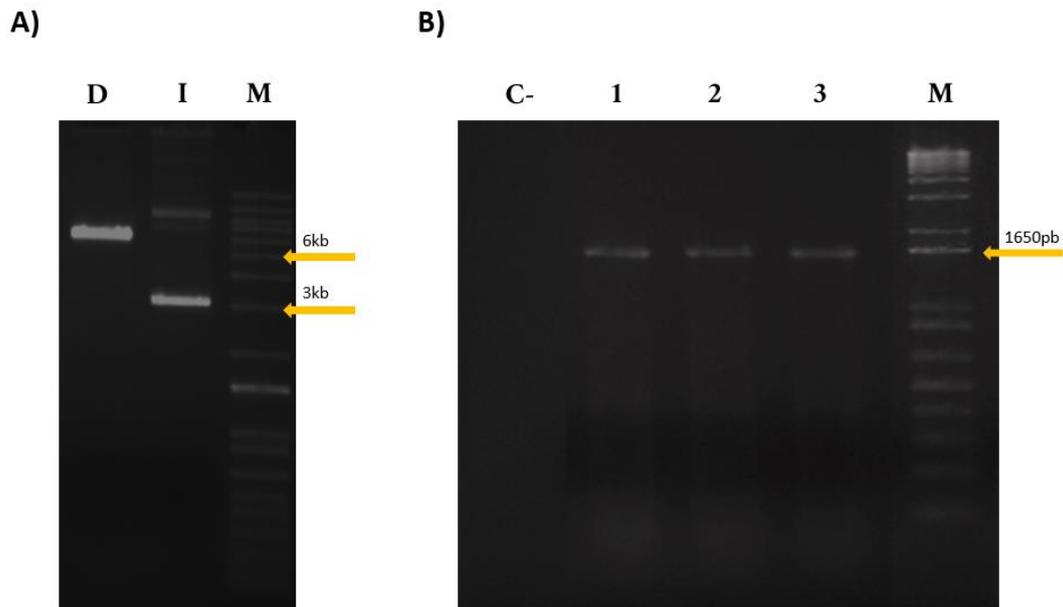


Figura 4 - Análise de amostras de DNA separadas por eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo. (A) Identidade do vetor de expressão pYC230, Canaleta D digerido com PstI; Canaleta I Intacto. (B) Amostras de amplicons obtidos a partir da PCR de colônias transformantes SB V0 utilizando iniciadores para a sequência do gene codificador a resistência G418R (1-3). Canaleta M marcador 1kb Plus Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); (C-) Controle negativo da reação.

5.4 Curvas de Crescimento

Para avaliar e padronizar o processo de crescimento clonal das linhagens de levedura realizou-se o acompanhamento do cultivo de tais linhagens aferindo a Densidade Óptica a 600nm. Afim de garantir o maior número de pontos aferidos para a curva de crescimento sem demandar permanência de 24 horas corridas no laboratório o cronograma listado na Tabela 3 foi seguido, a área sombreada representa momentos em que a OD600 foi medida. Cada uma das três linhagens de levedura (*Sb Wt*, *Sb V0*, *Sb CD3*) tiveram dois inóculos cultivados com tempo 0 de cultivo em horários diferentes possibilitando adquirir a OD600 para as primeiras 24 horas de crescimento. O inóculo foi crescido por 72 horas entretanto após a marca de 24 horas de crescimento a conferência foi realizada apenas uma vez por dia.

Tabela 6 - Descrição do horário referente a medida de OD600

Horário da aferência	Horas Cultivo de					
	1º dia Inoculo I	2º dia Inoculo I	3º dia Inoculo I	1º dia Inoculo II	2º dia Inoculo II	3º dia Inoculo II
06:00	0	24	48		12	
08:00	2	26			14	
10:00	4	28			16	
12:00	6	30			18	
14:00	8	32			20	
16:00	10	34			22	
18:00	12	36		0	24	48
20:00	14	28		2	26	
22:00	16	30		4	28	

Valores referentes a OD600 de cada uma das linhagens de levedura foram anotados e plotados em gráficos separadamente (Figura 5 A, B) e em conjunto (Figura 5 C), pontos de sobreposição tiveram a média aritmética representada.

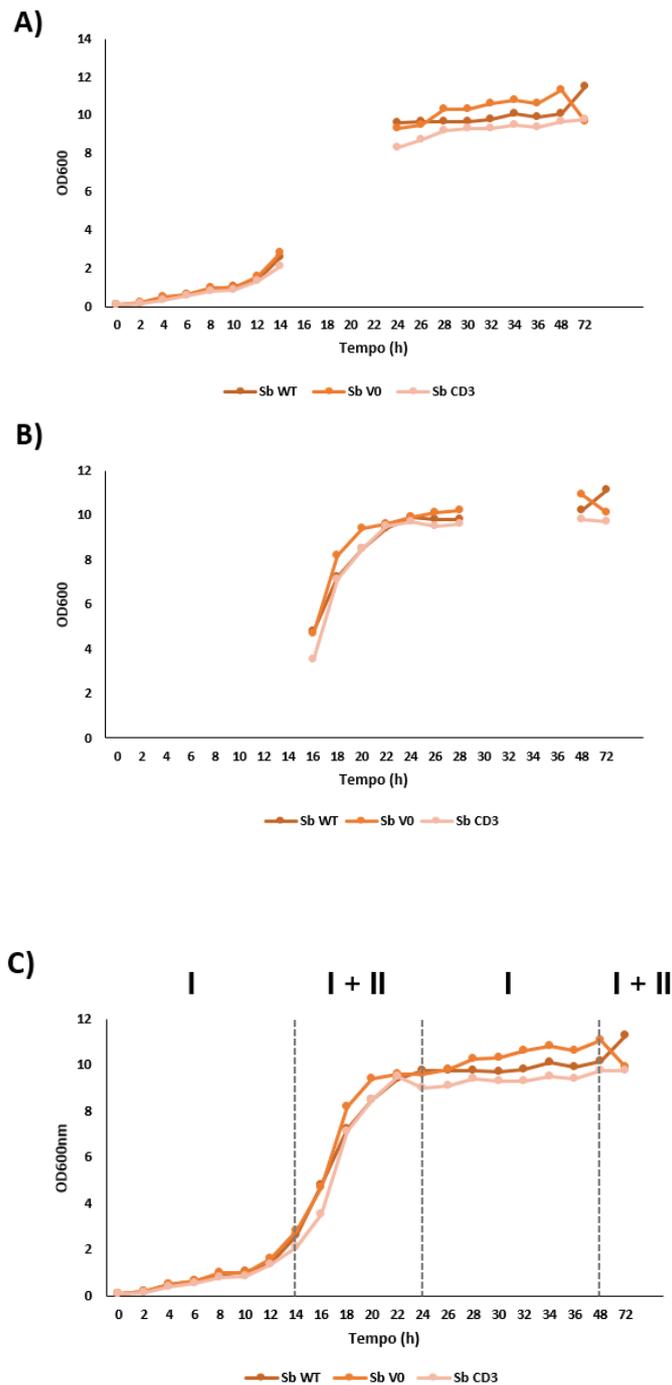


Figura 5 - Curvas de Crescimento das linhagens de *S. boulardii* selvagem e transformantes (Wt marrom, V0 laranja, CD3 rosa). (A) Gráfico dos pontos de crescimento coletados da cultura I. (B) Gráfico dos pontos de crescimento coletados da cultura II. (C) Gráfico dos pontos de crescimento coletados da cultura I e II apresentados no mesmo gráfico, pontos de sobreposição entre as culturas tiveram suas médias calculadas e o valor resultante foi plotado na figura.

Após identificar que o processo de transformação não afetou o crescimento da levedura *S. boulardii*, as mesmas práticas de cultivo foram adotadas para todas as linhagens ao longo do desenvolvimento do projeto.

5.5 Produção e Imunodeteção de Proteína Recombinante

Para avaliar a produção de proteína recombinante, clones das linhagens *Sb* CD3 foram cultivadas em meio YPD adicionado de glicose, cada inoculo de 100 mL foi coletado com 12, 15, 20 horas de cultivo sendo as linhagens *Sb* Wt e *Sb* V0 utilizadas como controle negativo da produção. Tais pontos foram escolhidos por estarem contidos na fase de crescimento exponencial da levedura, momento em que a parede celular não está tão espessa devido a alta replicação (Evans et al., 1994). A parede celular menos espessa auxiliou no processo de detecção da proteína aderida a membrana. Foram realizados testes de detecção com cultivos em tempos superiores a 20 horas, entretanto estes demonstraram detecção da proteína recombinante diminuída. O segmento responsável por ancorar a proteína recombinante a parede, SED1, é naturalmente mais expressa durante a fase estacionária. Após análises de expressão da proteína recombinante concluiu-se que o momento da fase estacionária contribuía para um aumento da saturação de SED1 nativa na parede da levedura o que afetava a capacidade de detecção da proteína recombinante. Os achados corroboram o estudo de Bamba et al., 2017 que mostra que interromper o gene nativo de SED1 em *S. cerevisiae* promove uma melhor expressão de proteína recombinante aderida a membrana.

Amostras adquiridas da cultura de linhagens de levedura foram analisadas por Dot Blot (Figura 6), onde foi detectada a presença da proteína recombinante.

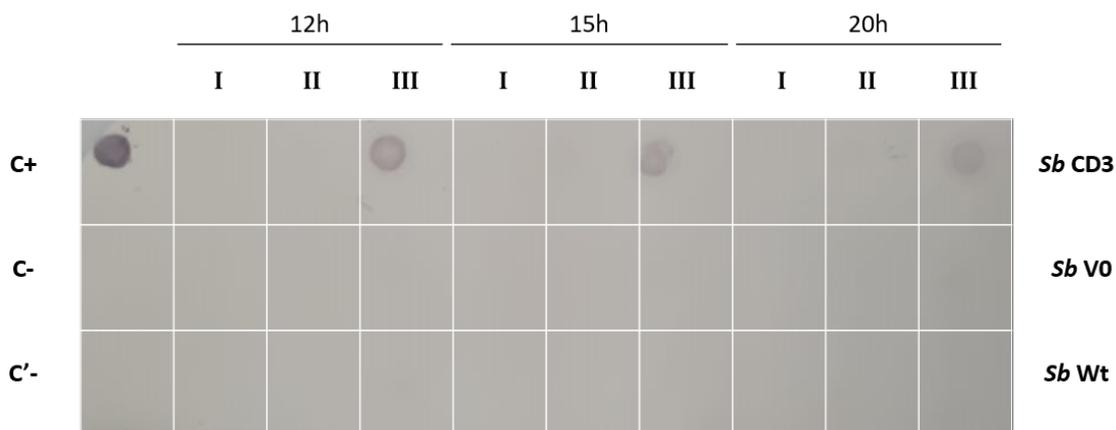


Figura 6 – Dot Blot com amostras de culturas crescidas por 12, 15 e 20 horas de linhagens transformantes *Sb CD3*, *Sb V0* e linhagem selvagem *Sb Wt*. (I) Amostra do Sobrenadante de Cultura; (II) Amostra da Fração Celular suspensa em PBS; (III) Amostra da Fração Celular tratada com glass beads e ciclos de congelamento; (C+) Amostra controle positivo para anticorpo anti-HA; (C-) PBS; (C'-) Meio YPD.

Para avaliar o peso molecular das proteínas recombinantes, amostras cultivadas por 12 horas foram preparadas e analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) e consecutivamente por Western Blot. Três ou mais bandas de proteína positivas para anti-HA foram observadas no Western Blot e tal fato levantou a hipótese da quebra não homogênea das glucanas presentes na parede da levedura, tal qual descrito por (Trudel et al., 1998). Logo uma nova forma de preparar as amostras se mostrou necessária.

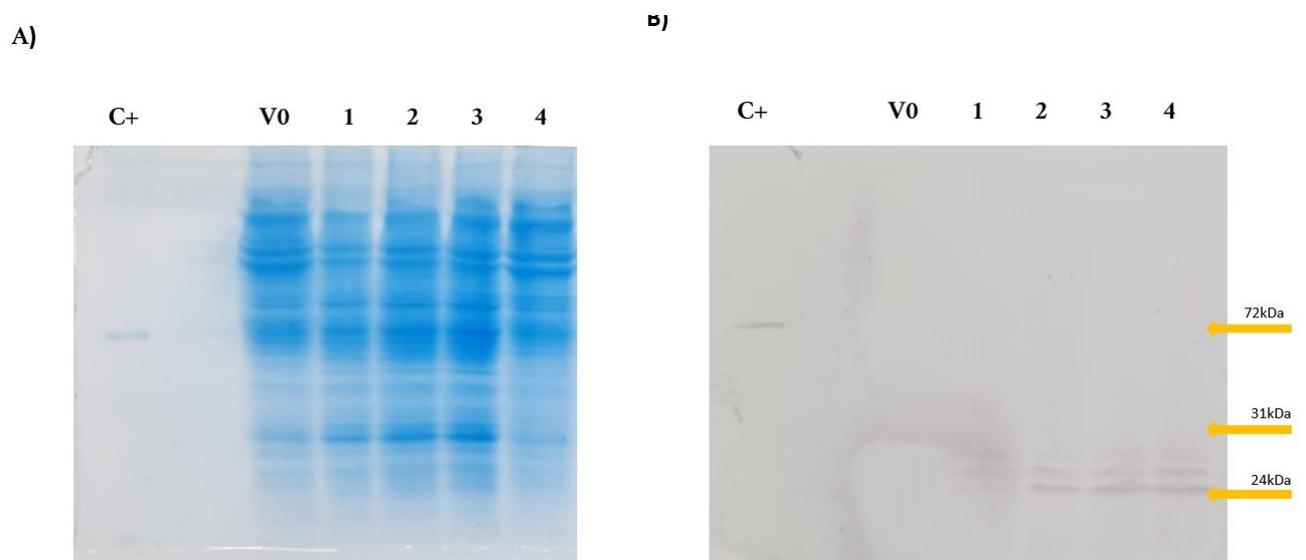


Figura 7 - Análise de amostras de proteína em (A) SDS-PAGE e (B) Western Blot. (C+) Amostra controle positivo para anticorpo anti-HA; (V0) extrato de proteínas de membrana população celular *Sb* V0; (1-4) extrato de proteínas de membrana população celular *Sb* CD3.

O uso de enzimas glucanases é comum para a quebra da parede de leveduras em processos de análise molecular, logo para garantir padronização do processo a enzima Liticase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), uma glucanase comercial, foi utilizada. Em nova análise por Western Blot de amostras com tratamento enzimático foi possível identificar a proteína recombinante com seu tamanho esperado na fração referente a parede celular, apresentando 29kDa em banda única (Figura 8).

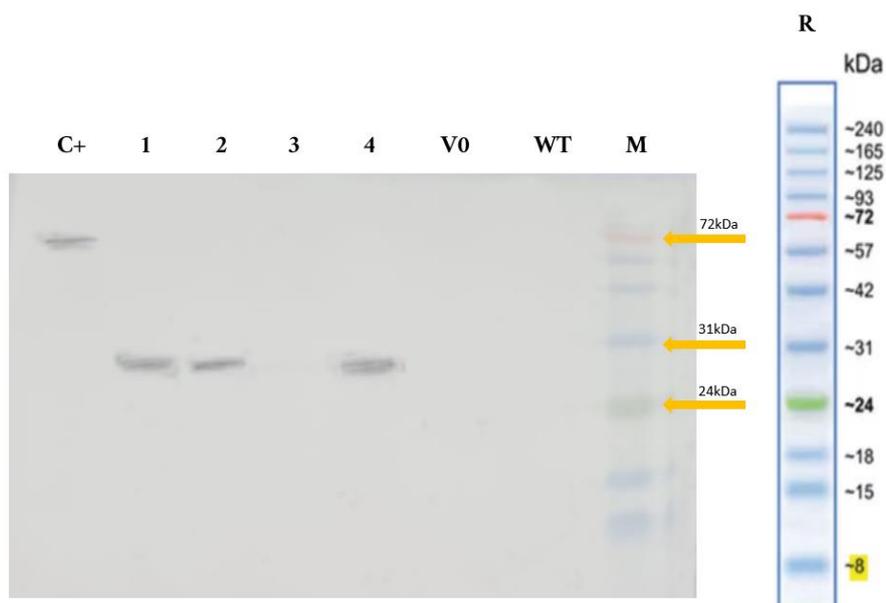


Figura 8 – Imunodeteção do epítipo HA por Western Blot de amostras crescidas por 12h de linhagens transformantes *Sb* CD3, *Sb* V0 e linhagem selvagem *Sb* Wt. Todas as amostras foram submetidas ao tratamento com enzima liticase. (C+) Amostra purificada de proteína 75kDa contendo epítipo HA; (1 – 4) Amostras de clones *Sb* CD3; (V0) Amostra de clone *Sb* V0; (WT) Amostra de clone *Sb* Wt; (M) Marcador Molecular Blueye prestained protein ladder (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); (R) referência do padrão de corrida.

Diversas proteínas já foram expressas na levedura *S. boulardii* incluindo proteínas aderidas a membrana como demonstrado por Bamba et al., 2018; Li et al., 2021. O trabalho de Azevêdo, 2021 foi o primeiro a demonstrar com sucesso a produção de um fragmento de anticorpo secretado pela *Sb*, este projeto busca apresentar um fragmento de anticorpo aderido a parede da levedura *Sb*, avaliando sua capacidade de expressão e potencial uso terapêutico no tratamento de colite ulcerativa experimental.

Uma vez que a proteína está sendo expressa e se encontra na fração referente ao material de superfície da levedura é possível investigar a presença desta em células intactas através da análise de Citometria de Fluxo (FACS) e Microscopia de Fluorescência como já demonstrado efetivamente em proteínas fluorescentes ou marcadas com fluoróforo apresentadas na parede de leveduras do gênero *Saccharomyces* (Fan et al., 2012; Kuroda et al., 2009).

Para tal fim células de *S. boulardii* foram marcadas com anticorpo conjugado anti-HA-FITC e analisadas pelas técnicas de detecção de

fluorescência FACS e Microscopia de Fluorescência. A leitura em FACS resultou em baixa detecção de células positivas na faixa de leitura de FITC-A, cerca de apenas 3% das células dentro da faixa de excitação. A leitura da mesma população de células na microscopia de fluorescência apresentou a mesma população de células marcadas (Figura 9). O baixo resultado de células positivas pode indicar que grande parte da população não foi transformada desde o início, ou indicar que o plasmídeo está sendo perdido durante o curso dos experimentos.

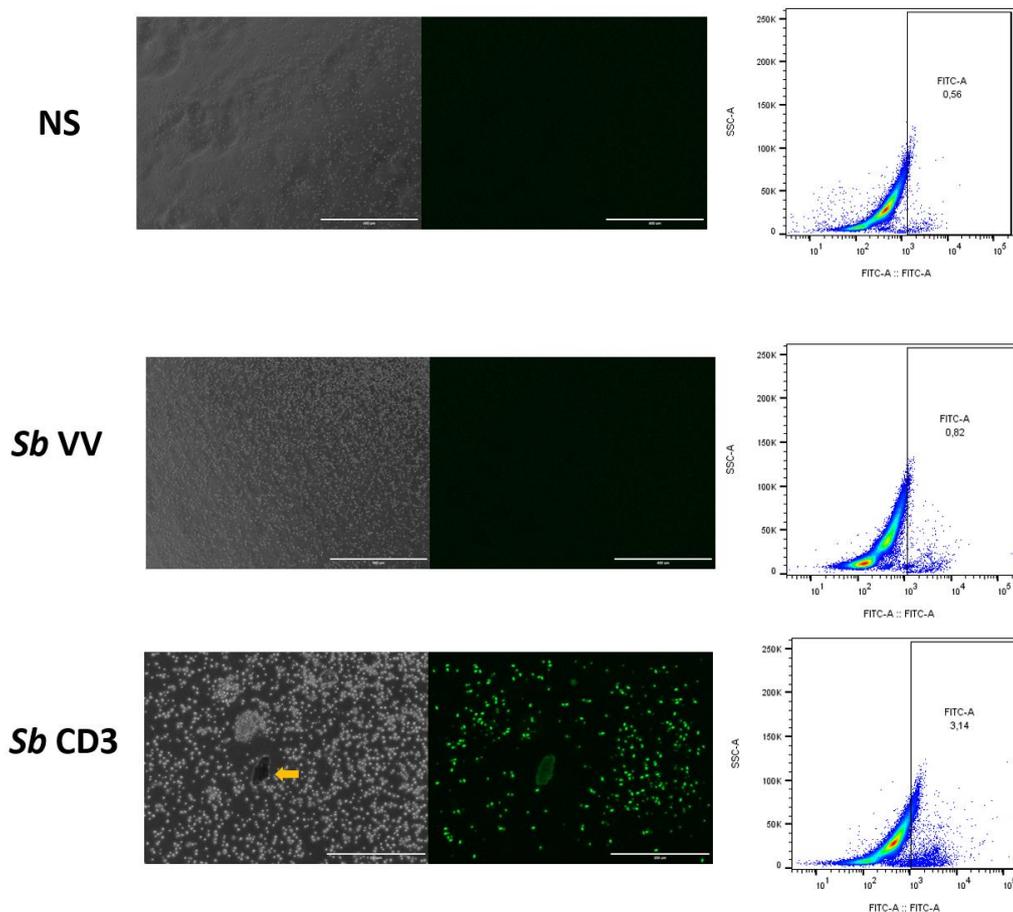


Figura 9 - Detecção de proteínas de membrana com marcação conjugada de anticorpo para epítipo HA-FITC. Leitura em microscópio de fluorescência com faixa de excitação a 495nm e leitura de citometria de fluxo em mesma faixa de excitação de diferentes populações celulares. (NS) controle negativo da imunodeteccção população de células *Sb* CD3 carente de marcação anti-HA-FITC; (*Sb* V0) controle negativo de expressão de proteína de membrana população de células *Sb* V0; (*Sb* CD3) leitura de população de células *Sb* CD3. Seta amarela indica grânulo de precipitado do meio de cultura que não foi adsorvido durante preparo da amostra para leitura em microscopia.

Estudos que utilizam a levedura *S. cerevisiae* apontaram que interromper o gene nativo relacionado a expressão de SED1 resultaram em aumento da eficiência em depositar proteínas recombinantes a parede na fase estacionária de crescimento (Bamba et al., 2018; Kuroda et al., 2009). Em estudos futuros utilizar uma linhagem de *S. boulardii* que tenha o gene nativo de SED1 interrompido pode resultar em melhores resultados de expressão e ancoragem na parede.

5.6 Testes *in vivo*

Apesar da baixa população positiva no teste de citometria, foi possível observar a presença de células ancorando o fragmento de anticorpo marcado através da microscopia de fluorescência. Assim a linhagem de levedura *Sb* CD3 pode apresentar algum impacto para o tratamento *in vivo* de inflamação intestinal no modelo de colite ulcerativa em camundongos.

A *S. boulardii* é uma levedura que apresenta passagem rápida pelo intestino não colonizando a microbiota (Samonis et al., 2011). Essa possui ainda indicação para tratamento da inflamação intestinal tendo seu uso primeiramente reportado como eficiente por Guslandi et al., 2003 para aliviar sintomas da colite ulcerativa. A proposta de atrelar ao probiótico um agente de potencial anti-inflamatório encurtaria a demanda farmacológica do tratamento e seria uma rota menos dispendiosa para produzir um anticorpo monoclonal terapêutico de ação regulatória.

O ensaio *in vivo* foi realizado com 50 animais divididos em 7 grupos com 6 camundongos. Os grupos NT são saudáveis, controle negativo, não existindo apresentação da doença. Os grupos DSS são doentes, controle positivo, desenvolvimento da doença. NT *Sb* Wt, NT *Sb* V0, NT *Sb* CD3 são grupos de camundongos saudáveis que recebiam respectivamente as linhagens *Sb* Wt, *Sb* V0, *Sb* CD3 para controle interno do experimento para avaliar se o tratamento não induz efeitos negativos. Por fim grupos DSS *Sb* Wt, DSS *Sb* V0, foram

grupos de camundongos doentes que recebiam respectivamente as linhagens *Sb Wt*, *Sb V0* para avaliar respectivamente a capacidade da levedura selvagem e levedura transformada com vetor de expressão vazio em atenuar os sintomas da doença. O grupo DSS *Sb CD3* representa a proposta de tratamento deste trabalho onde camundongos doentes recebiam a linhagem *Sb CD3*, com a intenção de promover melhora dos sintomas.

O experimento seguiu o plano de tratamento onde a indução da doença começou de forma concomitante com as doses do tratamento proposto para cada grupo até o momento de inflamação aguda que se dá após 5 dias de indução com 3% de Dextran Sulfato de Sódio (Melgar et al., 2005), nesse momento o agente indutor da doença foi removido da água provida aos camundongos e os tratamentos propostos continuaram sendo promovidos até o dia anterior a eutanásia dos camundongos (Figura 10). Durante todos os dias do experimento foram atestados os parâmetros macroscópicos da doença e no dia da eutanásia foi medido o comprimento do cólon de cada camundongo assim como foram coletadas amostras de sangue e os linfonodos mesentéricos. Todos os grupos apresentaram perda de peso durante o decorrer do experimento tendo esta perda atribuída ao desenvolvimento da doença e também a condição de estresse desenvolvida pela manipulação dos camundongos (Figura 10).

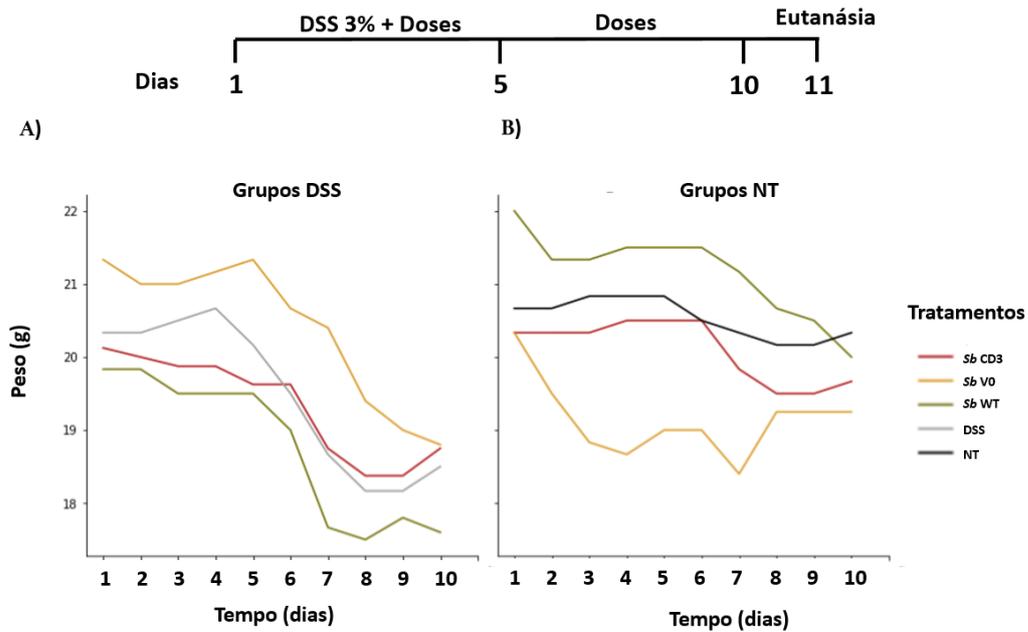


Figura 10 – Cronograma do Experimento *in vivo* e Média normalizada da porcentagem de perda de peso dos grupos de camundongos ao longo dos dias do experimento

A partir dos parâmetros macroscópicos o DAI dos camundongos foi calculado ao longo do experimento e a média de cada grupo ao longo dos dias está apresentada na Figura 11.

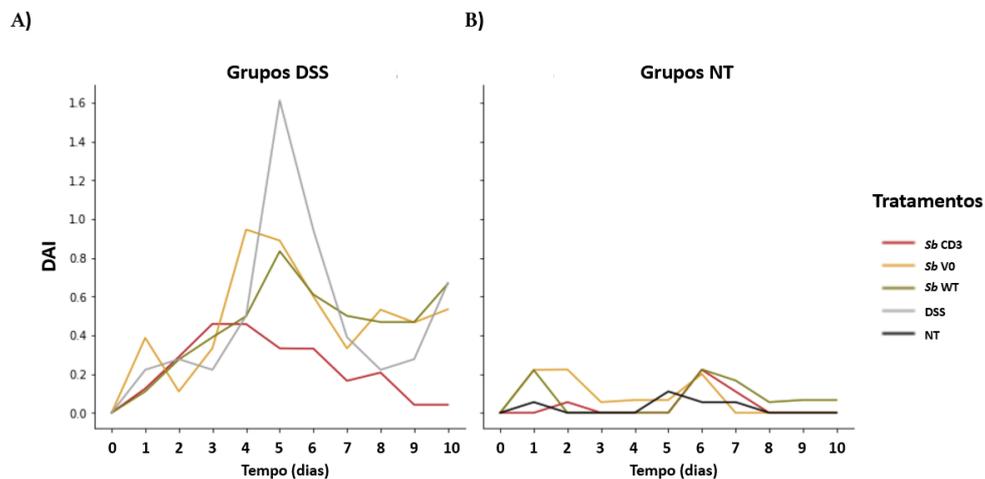


Figura 11 – Média do Índice de Atividade da Doença (DAI) dos grupos de camundongos ao longo do tempo em dias do experimento. (A) Grupos doentes que recebiam DSS. (B) Grupos controle saudáveis.

Através de análises pareadas foi possível encontrar diferenças estatísticas entre grupos, ressaltando que o grupo DSS *Sb* CD3 não apresentou diferença significativa ao grupo NT em nenhum dos dias do experimento (Figura 12 A), ou seja teve índices muito semelhantes aos do grupo saudável. O grupo DSS *Sb* CD3 apresentou DAI significativamente menor que o grupo DSS *Sb* Wt no dia 10 (Figura 12 B), demonstrando que a levedura recombinante obteve melhor resultado em aliviar os sintomas. Além disso o grupo DSS *Sb* CD3 teve o DAI significativamente menor que o grupo DSS nos dias 5 e 10 (Figura 12 C), apontando que nos dias de maior índice da doença o tratamento foi capaz de evitar pior do quadro dos camundongos. Os grupos NT e DSS apenas apresentaram diferença significativa nos dias 5 e 10 (Figura 12 D), assim como esperado pela semelhança entre o perfil desenvolvido pelos grupos NT e DSS *Sb* CD3. O grupo DSS *Sb* Wt teve também o DAI significativamente menor no dia 5 que o grupo DSS ($p < 0.5$) corroborando achados de Wang *et al.*, 2019 que apontam a capacidade da *S. boulardii* Wt de levar a melhora dos sintomas da Colite. Estes achados corroboram a capacidade da linhagem *Sb* CD3 em melhorar os sintomas de colite de forma mais eficiente que a levedura selvagem.

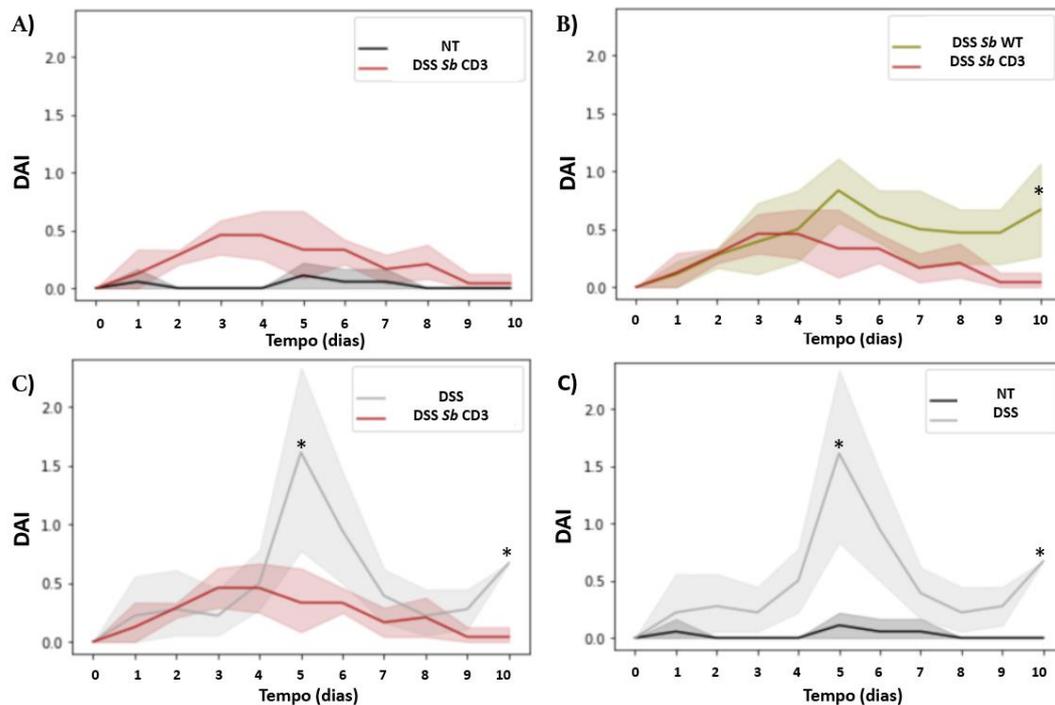


Figura 12 – Análises pareadas das médias do Índice de Atividade da Doença (DAI) dos grupos de camundongos ao longo do tempo em dias do experimento. Análises estatísticas foram feitas pelo teste Mann-Whitney onde * representa $p < 0.05$. Área sombreada representa desvio padrão dos tratamentos.

O desenvolvimento da colite causa inflamação e necrose tecidual marcando encurtamento do cólon o que leva a uma mudança na razão entre peso e comprimento, sendo um aumento desta razão relacionada a severidade da colite (Chassaing et al., 2015; Deguchi et al., 2006; Hu et al., 2021). O grupo DSS teve o maior aumento da razão peso/comprimento do cólon apresentando diferença significativa do grupo NT e do grupo DSS *Sb* CD3, em contraste o grupo DSS *Sb* WT não apresentou diferença significativa para o grupo DSS (Figura 13). A capacidade do tratamento com *Sb* CD3 em evitar os efeitos de encurtamento do cólon corroboram a hipótese que a linhagem transformante deste projeto consegue modular o perfil inflamatório instaurado neste modelo de inflamação e aliviar sintomas.

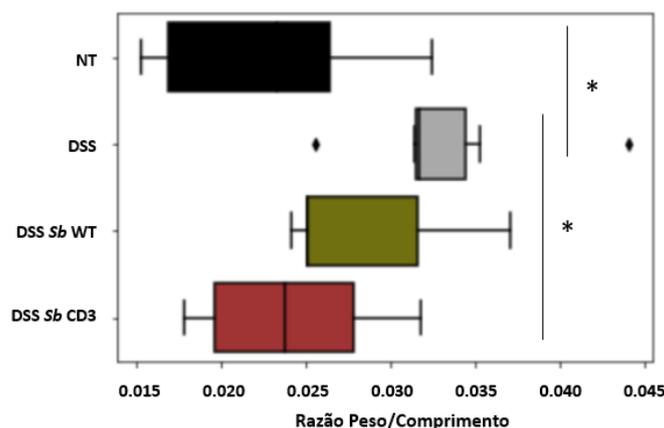


Figura 13 – Razão das médias por grupo de Peso/Comprimento do Cólon. Análises estatísticas foram feitas pelo teste Mann-Whitney onde * representa $p < 0.05$.

5.7 Histologia

O desenvolvimento da colite induzida por DSS é marcado pela perda da camada de mucinas que protegem a mucosa levando a injúria em nível celular do tecido intestinal onde pode ocorrer ulceração da mucosa, necrose da cripta, infiltração da mucosa, submucosa e musculatura adjacente por células mononucleares leucocitárias (Chassaing et al., 2015).

O material intestinal dos camundongos foi preparado e apresentado em lâminas histológicas de corte transversal, onde marcadores de inflamação intestinal foram acessados e categorizados para cálculo do score de dano histológico. A proposta de categorizar o dano histológico em medidas semiquantitativas surge para avaliar processos fisiológicos evidentes para o estudo de doenças inflamatórias intestinais criando um parâmetro para análise de eficiência de tratamentos propostos (Neri et al., 2021).

Neste trabalho o score histológico atribuído ao grupo controle positivo da doença não foi tão elevado quanto o demonstrado por CHASSAING, 2015 onde após 5 dias de indução da doença camundongos já apresentaram níveis avançados de dano histológico. O grupo que recebeu o tratamento com a linhagem *Sb CD3* apresentou o valor médio absoluto dos grupos doentes equiparável ao grupo saudável que recebeu o mesmo tratamento como indicado

na Figura 14. Os dados apresentados são de análises em cluster para cada grupo, logo análises estatísticas não puderam ser aplicadas.

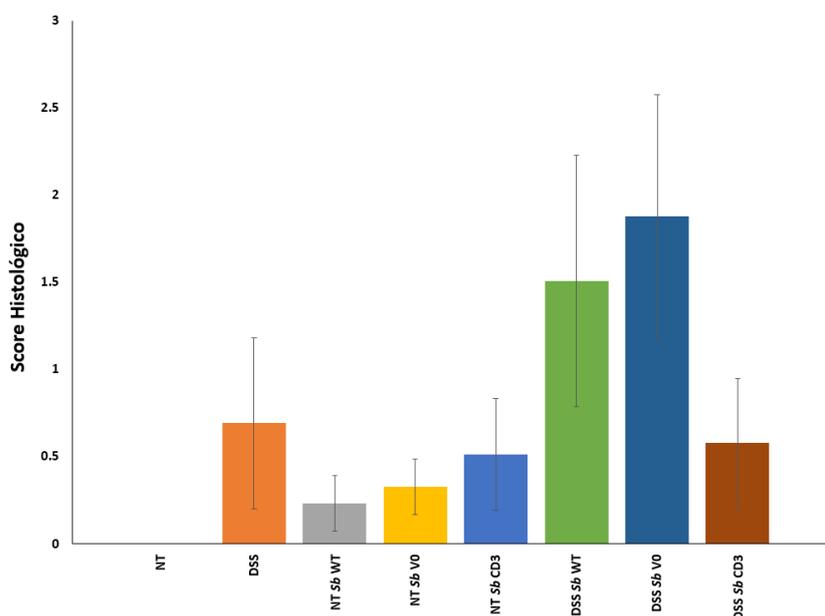


Figura 14 – Médias de Score Histológico por grupo de camundongos. (NT) Grupo saudável; (DSS) grupo doente; (*Sb WT*) Grupo que recebeu *Sb* Selvagem; (*Sb V0*) Grupo que recebeu *Sb* vetor vazio; (*Sb CD3*) Grupo que recebeu *Sb* expressando anti-CD3.

Vale ainda ressaltar que mesmo em pacientes que iniciam tratamentos a par da instauração da doença possuem dificuldade em alcançar remissão (Segal et al., 2021) e ainda assim existe perpetuação de dano histológico em pacientes em remissão. Melhora histológica é um importante marco para tratamento de DII sendo um forte indicador de remissão prologado, porém ainda existe um longo caminho para demarcar a remissão histológica como alvo do tratamento em DII (Christensen, 2022; Rath et al., 2021).

5.8 Análises de Microbioma

O material fecal além de ser composto de rejeitos da alimentação carrega um perfil microbiano próprio. Em indivíduos saudáveis a microbiota intestinal auxilia na digestão provendo ácidos graxos de cadeia curta que podem ser

metabolizados pelos enterócitos auxiliando na construção da camada de muco que protege a mucosa contribuindo para evitar infecções e processos inflamatórios indesejados (Bishehsari et al., 2018).

Diversos grupos de microrganismos são conhecidos por terem efeitos negativos no desenvolvimento de DII e estão associados com o processo de instauração da colite. *C. difficile* está relacionado com a capacidade de induzir colite, agravar sintomas e dificultar o tratamento (Abt et al., 2016; Pabla & Schwartz, 2020).

Em um intestino saudável os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* correspondem a maior parte da população microbiana, em contraste eventos inflamatórios intestinais agudos e crônicos estão em parte relacionados com eventos de disbiose (Zhang & Li, 2014).

Neste estudo foi coletado material fecal dos camundongos ao longo do experimento, durante o dia 0 (antes do tratamento), dia 5 (auge do desenvolvimento da doença) e dia 10 (período de refratário). O material foi utilizado para extração total de DNA fecal, que foi por seguinte amplificado através de PCR com iniciadores relacionados ao segmento 16S ribossomal para construção do perfil de microbioma de cada grupo de camundongos. O perfil microbiano a nível de Filo foi representado na Figura 15 e a nível de gênero na Figura 16.

Devido ao grande output do processo de sequenciamento alguns gêneros foram selecionados para representação final. Foram destacados os 13 gêneros com abundância relativa mais alta, enquanto os outros 500 gêneros identificados foram representados como “outros” devido a baixa presença relativa de cada um deles população microbiana.

Firmicutes e *Bacteroidetes* são encontrados bem representados por todas as amostras, tendo o menor nível encontrado na população DSS *Sb* WT 0 (27%), porém a população foi re-estabelecida ao dia 5 e 10 (48%). O grupo DSS 5, apresentou um aumento acentuado na população do filo *Actinobacteroidota* (20%) em comparação com outros grupos que apresentaram abundância menor que 3%, tal achado está de acordo com o perfil esperado para o grupo doente.

Aumento de *Actinobacteroidota* já foi indicado por piorar o desenvolvimento sintomático da colite em humanos (Alexander et al., 2023).

A família *Muribaculaceae* é pouco explorada na literatura tendo poucos gêneros descritos, entretanto foi apontada como capaz de contribuir para impedir a colonização da mucosa de camundongos por *Clostridium difficile* agente agravante de DII (Pereira et al., 2020). Neste trabalho a família *Muribaculaceae* foi representada tendo a abundância relativa diminuída ao longo do desenvolvimento do experimento em grupos doentes, neste trabalho nenhum grupo apresentou aumento representativo de *C. difficile*.

Em um estudo *in vivo* de colite induzida por DSS foi observado que a família *Lachnospiraceae*_NK4A136 foi reportada como aumentada após tratamento com *S. boulardii* (C. Wang et al., 2019). Neste trabalho foi observado aumento relativo na população total de *Lachnospiraceae*_NK4A136 nos grupos NT Sb VV 5 (13%) e DSS Sb CD3 5 (10%) onde a abundância relativa mais que dobrou entre a avaliação dos dias 0 e 5.

Akkermansia muciniphila é uma bactéria probiótica apontada como capaz de aliviar sintomas da colite experimental induzida por DSS em camundongos (Acute et al., 2021), a abundância relativa foi relatada em média como cerca de 3% com variância de 0,0002, não apresentando aumento representativo com nenhum dos tratamentos.

O gênero *Helicobacter* é associado com diversas enterites sendo *H. pylori* o representante mais conhecido, capaz de agravar quadros de inflamação intestinal podendo estar associado com desenvolvimento de câncer colorretal (Dutzan & Abusleme, 2019). Neste trabalho a abundância relativa deste gênero foi aumentada no grupo NT 5 (24%), NT Sb WT 0 (18%), DSS Sb WT 0 (12%), entretanto todos subvertaram a níveis mais baixos de abundância nos dias seguintes do experimento (<5%).

Bifidobacterium pode produzir bacteriocinas e ácidos orgânicos contra patógenos em caso de invasão da mucosa intestinal, tendo seu aumento na microbiota relacionado com o avanço da CU (Dai et al., 2021), foi observado aumento na população do grupo DSS 5, onde *Bifidobacterium* representou 12%

da abundância microbiana relativa, enquanto todos os outros grupos apresentaram a mesma população representando menos de 1%.

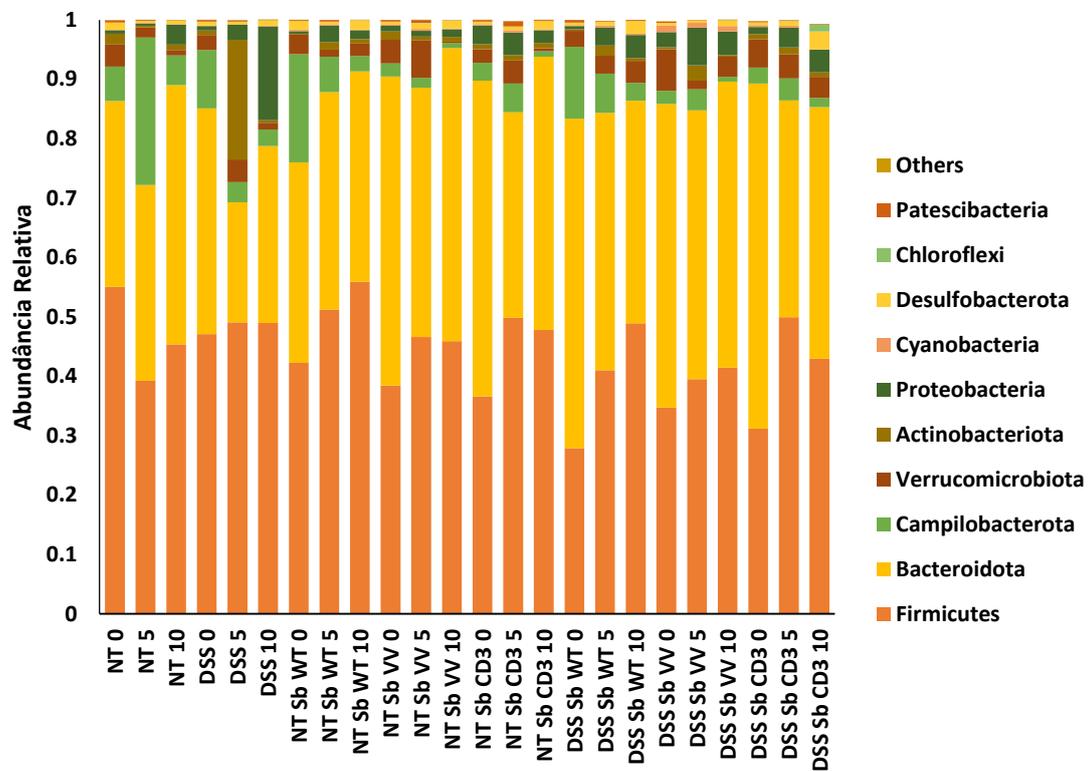


Figura 15 – Abundância Relativa de Filos da microbiota fecal por grupo de tratamento.

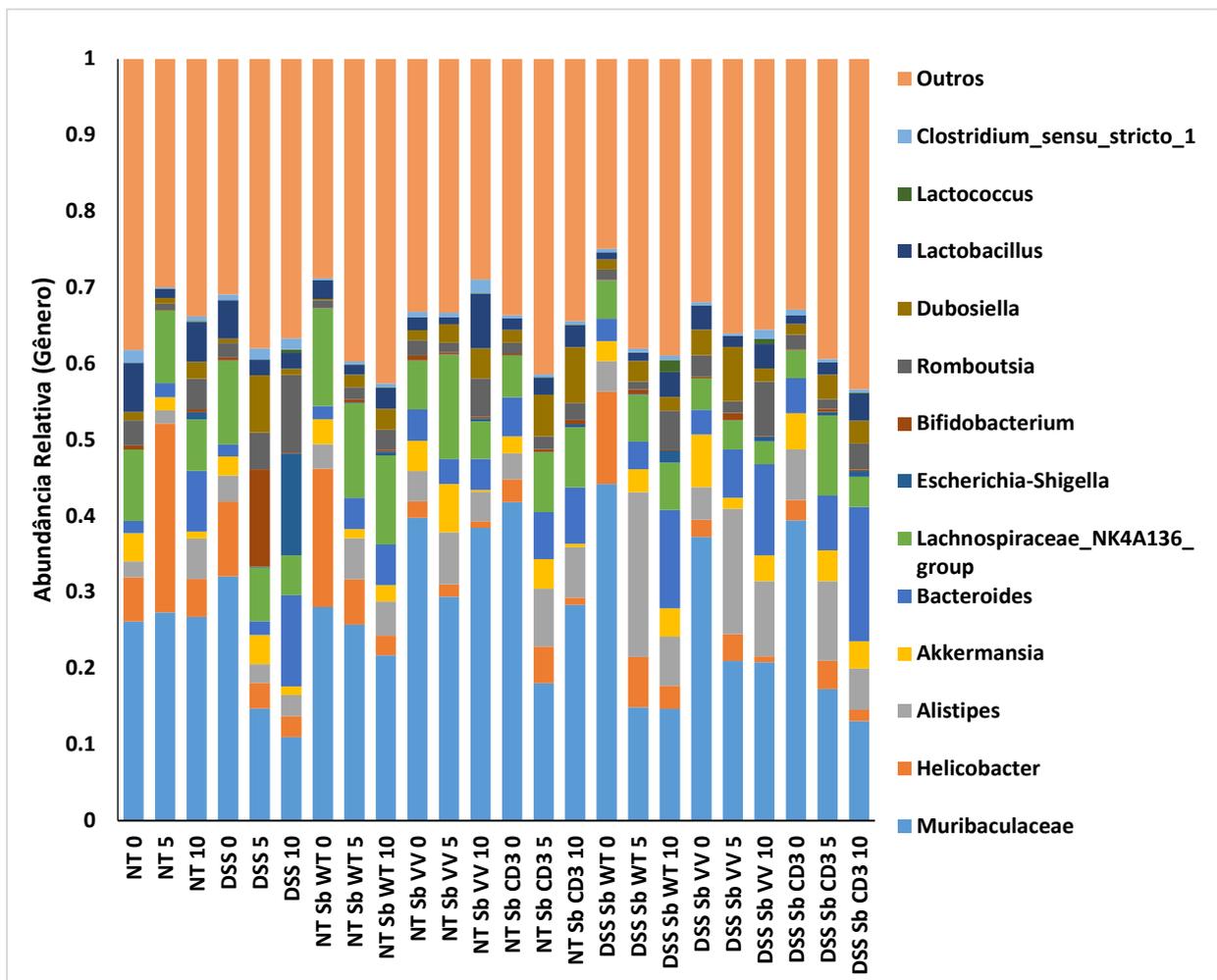


Figura 16 - Abundância Relativa de Gêneros da microbiota fecal por grupo de tratamento.

Análises de abundância comparativa expressadas em gráficos ternários entre os grupos NT, NT *Sb* CD3, NT *Sb* WT, e DSS, DSS *Sb* CD3, DSS *Sb* WT todos para o microbioma do dia 10 (Figura 18) apontam para um aumento da presença de *Escherichia coli* na população do grupo DSS em relação aos grupos controle, o que está alinhado com achados que relacionam esta espécie com disbiose. Em contraparte uma presença mais significativa na população de *Akkermansia muciniphila* foi observada na população DSS *Sb* CD3 em relação aos grupos não tratados, a capacidade da *A. muciniphila* em reduzir inflamação intestinal relacionada ao DSS é relevante (Acute et al., 2021) e o papel do diálogo entre o tratamento com *S. boulardii* e o aumento da *A. muciniphila* deve ser investigado em estudos futuros.

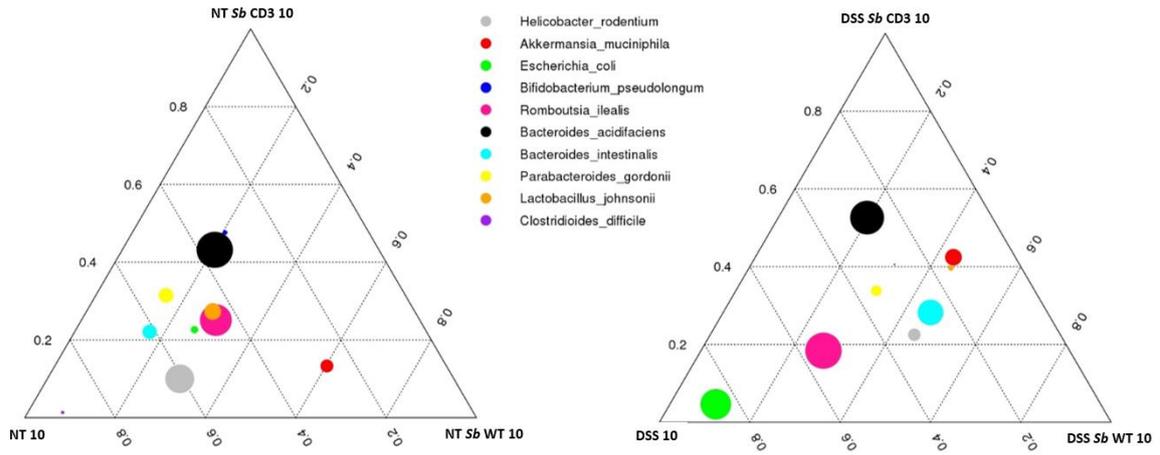


Figura 17 – Gráficos Ternários de comparação da abundância relativa de espécies no microbioma dos grupos: *NT*, *NT Sb CD3*, *NT Sb WT*, e *DSS*, *DSS Sb CD3*, *DSS Sb WT*.

6 Conclusão

Este trabalho é o primeiro a apresentar a construção de uma linhagem recombinante de *Saccharomyces boulardii* apta a expressão na superfície da parede de fragmento de anticorpo anti-CD3 utilizando o sistema SED1.

Clones transformantes foram utilizados com sucesso em ensaios de imunodeteção da proteína recombinante, sendo possível observar a presença destes na superfície celular através de microscopia de fluorescência. Foi observado que a melhor detecção de proteína recombinante se dava com 12 horas de cultivo, início da fase exponencial de crescimento.

O tratamento proposto com a linhagem *Sb* CD3 no modelo de colite induzida por DSS em camundongos se mostrou capaz de reduzir parâmetros macroscópicos da doença em comparação ao do grupo doente sem tratamento. Mesmo com uma baixa quantidade de células positivas para a expressão da molécula anti-CD3 houve diferença significativa na capacidade de aliviar sintomas causados pela doença. A análise do perfil de microbioma do grupo tratamento anti-CD3 também indicou mudanças favoráveis a um perfil saudável de microbiota. Houve aumento de populações bacterianas conhecidas por gerar benefícios a saúde intestinal de pacientes acometidos com doenças inflamatórias intestinais.

7 Perspectivas

Projetos futuros desenvolvidos no laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília devem ter foco em investigar a capacidade de ligação da linhagem *Sb* CD3 aos receptores de membrana de linfócitos T. Além de avaliar a capacidade da linhagem *Sb* CD3 em modular o perfil de citocinas relacionadas ao desenvolvimento do perfil inflamatório. Para garantir uma melhor saturação da proteína recombinante na parede da levedura *Sb* é de interesse expressar o vetor pYCCD3 em uma linhagem de levedura com gene SED1 nativo interrompido para garantir maior saturação da proteína recombinante na superfície da parede. Para avaliar o potencial *in vivo* do tratamento, normalizar a população da microbiota intestinal dos camundongos é indispensável.

8 REFERÊNCIAS

- Abt, M. C., McKenney, P. T., & Pamer, E. G. (2016). Clostridium difficile colitis: Pathogenesis and host defence. *Nature Reviews Microbiology*, 14(10), 609–620. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.108>
- Acute, D. S. S., Activation, N., & Si, J. (2021). Akkermansia muciniphila Alleviates Dextran Sulfate Sodium. *Microbiology Spectrum*, October, 1–13.
- Adak, A., & Khan, M. R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(3), 473–493. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>
- Alexander, M., Ang, Q. Y., Nayak, R. R., Bustion, A. E., Zhang, B., Upadhyay, V., Pollard, K. S., Lynch, S. V., & Turnbaugh, P. J. (2023). HHS Public Access colitis. 30(1), 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.11.001.Human>
- Altmann, M. (2018). The Benefits of Saccharomyces boulardii. *The Yeast Role in Medical Applications*, 3–10. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70591>
- Astromskas, E., & Cohn, M. (2007). Tools and methods for genetic analysis of Saccharomyces castellii. *Yeast*, 24(6), 499–509. <https://doi.org/10.1002/yea.1488>
- Bamba, T., Inokuma, K., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2018). Enhanced cell-surface display of a heterologous protein using SED1 anchoring system in SED1-disrupted Saccharomyces cerevisiae strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(3), 306–310. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.09.013>
- Bermúdez-Humarán, L. G. (2009). Lactococcus lactis as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins. *Human Vaccines*, 5(4), 264–267. <https://doi.org/10.4161/hv.5.4.7553>
- Bermúdez-Humarán, L. G., & Langella, P. (2017). Use of Traditional and Genetically Modified Probiotics in Human Health: What Does the Future Hold? *Microbiology Spectrum*, 5(5), 1–6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.bad-0016-2016>
- Bishehsari, F., Engen, P. A., Preite, N. Z., Tuncil, Y. E., Naqib, A., Shaikh, M., Rossi, M., Wilber, S., Green, S. J., Hamaker, B. R., Khazaie, K., Voigt, R. M., Forsyth, C. B., & Keshavarzian, A. (2018). Dietary fiber treatment corrects the composition of gut microbiota, promotes SCFA production, and suppresses colon carcinogenesis. *Genes*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/genes9020102>
- Chahwan, B., Kwan, S., Isik, A., van Hemert, S., Burke, C., & Roberts, L. (2019). Gut feelings: A randomised, triple-blind, placebo-controlled trial of probiotics for depressive symptoms. *Journal of Affective Disorders*, 253(February), 317–326. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.04.097>
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. (2015). DSS

- Protocol. *Curr Protoc Immunol*, 27(4), 1–19.
<https://doi.org/10.1002/0471142735.im1525s104.Dextran>
- Christensen, B. (2022). Histologic Healing in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology and Hepatology*, 18(8), 466–468.
- Collinson, S., Deans, A., Padua-Zamora, A., Gregorio, G. V., Li, C., Dans, L. F., & Allen, S. J. (2020). Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2020(12).
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD003048.pub4>
- Consulta Remédios, R. (n.d.). *Consulta Remédios*.
<https://consultaremedios.com.br/remicade/bula>
- Crohns Colitis Foundation. (2023). *Crohn Colitis Foundation*.
<https://www.crohnscolitisfoundation.org/what-is-ulcerative-colitis/treatment-options>
- Cycles, S. (1989). Chapter 9 Chapter 9. *Cycle*, 1897(Figure 1), 44–45.
- Czerucka, D., & Rampal, P. (2019). Diversity of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 mechanisms of action against intestinal infections. *World Journal of Gastroenterology*, 25(18), 2188–2203.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i18.2188>
- Dai, Z. F., Ma, X. Y., Yang, R., Wang, H., Xu, D., Yang, J., Guo, X., Meng, S., Xu, R., Li, Y., Xu, Y., Li, K., & Lin, X. (2021). Intestinal flora alterations in patients with ulcerative colitis and their association with inflammation. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(5), 1–12.
<https://doi.org/10.3892/etm.2021.10757>
- Deguchi, Y., Andoh, A., Yagi, Y., Bamba, S., Inatomi, O., Tsujikawa, T., & Fujiyama, Y. (2006). The S1P receptor modulator FTY720 prevents the development of experimental colitis in mice. *Oncology Reports*, 16(4), 699–703. <https://doi.org/10.3892/or.16.4.699>
- DOURADINHA, BRUNO; REIS, VIVIANE CB; ROGERS, MATTHEW B; Fernando Araripe Gonçalves Torres; EVANS, JARED D; MARQUES JR, ERNESTO TA. **Novel insights in genetic transformation of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii***, ISSN: 21655979, 722. 2014
- Du, L., & Ha, C. (2020). Epidemiology and Pathogenesis of Ulcerative Colitis. *Gastroenterology Clinics of North America*, 49(4), 643–654.
<https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.07.005>
- Dubuquoy, L., Å Jansson, E., Deeb, S., Rakotobe, S., Karoui, M., Colombel, J. F., Auwerx, J., Pettersson, S., & Desreumaux, P. (2003). Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 124(5), 1265–1276. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00271-3](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00271-3)
- Dutzan, N., & Abusleme, L. (2019). T Helper 17 Cells as Pathogenic Drivers of Periodontitis. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1197).
https://doi.org/10.1007/978-3-030-28524-1_9
- Elia, I., Schmieder, R., Christen, S., & Fendt, S.-M. (2015). Organ-Specific

Cancer Metabolism and Its Potential for Therapy II: Adipokines and the Endocrine Role of Adipose Tissues. *Handbook of Experimental Pharmacology*, January, 251–263. <https://doi.org/10.1007/164>

- Engelhardt, K. R., & Grimbacher, B. (2014). IL-10 in humans: Lessons from the Gut, IL-10/IL-10 receptor deficiencies, and IL-10 polymorphisms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 380, 1–18. https://doi.org/10.1007/978-3-662-43492-5_1
- Evans, D. R. H., Singer, R. A., Johnston, G. C., & Wheals, A. E. (1994). Cell-cycle mutations among the collection of *Saccharomyces cerevisiae* dna mutants. *FEMS Microbiology Letters*, 116(2), 147–153. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06693.x>
- Fan, L. H., Zhang, Z. J., Yu, X. Y., Xue, Y. X., & Tan, T. W. (2012). Self-surface assembly of cellulosomes with two miniscaffoldins on *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic ethanol production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(33), 13260–13265. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209856109>
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M., & O'Garra, A. (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 147(11), 3815–3822. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.147.11.3815>
- Ford, A. C., & Peyrin-Biroulet, L. (2013). Opportunistic infections with anti-tumor necrosis factor- α therapy in inflammatory bowel disease: Meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Gastroenterology*, 108(8), 1268–1276. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.138>
- Gebrayel, P., Nicco, C., Al Khodor, S., Bilinski, J., Caselli, E., Comelli, E. M., Egert, M., Giaroni, C., Karpinski, T. M., Loniewski, I., Mulak, A., Reygnier, J., Samczuk, P., Serino, M., Sikora, M., Terranegra, A., Ufnal, M., Villegier, R., Pichon, C., ... Edeas, M. (2022). Microbiota medicine: towards clinical revolution. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03296-9>
- Generoso, S. V., Viana, M. L., Santos, R. G., Arantes, R. M. E., Martins, F. S., Nicoli, J. R., MacHado, J. A. N., Correia, M. I. T. D., & Cardoso, V. N. (2011). Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. *European Journal of Nutrition*, 50(4), 261–269. <https://doi.org/10.1007/s00394-010-0134-7>
- Guslandi, M., Giollo, P., & Testoni, P. A. (2003). A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15(6), 697–698. <https://doi.org/10.1097/00042737-200306000-00017>
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Larsson, C. U., Gorwa-Grauslund, M., Görgens, J., & van Zyl, W. H. (2005). Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. *Microbial Cell Factories*, 4, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-31>

- Hart, A. L., Al-Hassi, H. O., Rigby, R. J., Bell, S. J., Emmanuel, A. V., Knight, S. C., Kamm, M. A., & Stagg, A. J. (2005). Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, *129*(1), 50–65. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.013>
- Heintz-Buschart, A., & Wilmes, P. (2018). Human Gut Microbiome: Function Matters. *Trends in Microbiology*, *26*(7), 563–574. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.002>
- Herold, K. C., Bundy, B. N., Long, S. A., Bluestone, J. A., DiMeglio, L. A., Dufort, M. J., Gitelman, S. E., Gottlieb, P. A., Krischer, J. P., Linsley, P. S., Marks, J. B., Moore, W., Moran, A., Rodriguez, H., Russell, W. E., Schatz, D., Skyler, J. S., Tsalikian, E., Wherrett, D. K., ... Greenbaum, C. J. (2019). An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for Type 1 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, *381*(7), 603–613. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1902226>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *11*(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hu, J., Huang, H., Che, Y., Ding, C., Zhang, L., Wang, Y., Hao, H., Shen, H., & Cao, L. (2021). Qingchang Huashi Formula attenuates DSS-induced colitis in mice by restoring gut microbiota-metabolism homeostasis and goblet cell function. *Journal of Ethnopharmacology*, *266*, 113394. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113394>
- Hudson, L. E., Fasken, M. B., Mcdermott, C. D., McBride, S. M., Kuiper, E. G., Guiliano, D. B., Corbett, A. H., & Lamb, T. J. (2014). *Functional Heterologous Protein Expression by Genetically Engineered Probiotic Yeast Saccharomyces boulardii*. *PLoS ONE*, *9*(11), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112660>
- Ilan, Y., Shailubhai, K., & Sanyal, A. (2018). Immunotherapy with oral administration of humanized anti-CD3 monoclonal antibody: a novel gut-immune system-based therapy for metaflammation and NASH. *Clinical and Experimental Immunology*, *193*(3), 275–283. <https://doi.org/10.1111/cei.13159>
- Imhann, F., Vila, A. V., Marc Jan Bonder, Jingyuan Fu, D. G., Marijn C. Visschedijk, Lieke M. Spekhorst, Rudi Alberts, Lude Franke, H. M., van Dullemen, Rinze W.F. Ter Steege, Curtis Huttenhower, Gerard Dijkstra, R. J., Xavier, Eleonora A.M. Festen, Cisca Wijmenga, Alexandra Zhernakova, and R., & Weersma, K. (2018). The Interplay of Host Genetics and the Gut Microbiota Underlying the Onset and Clinical Presentation of Inflammatory Bowel Disease. *Gut*. <https://doi.org/doi:10.1136/gutjnl-2016-312135>
- Jin, Y., Yu, S., Liu, J. J., Yun, E. J., Lee, J. W., Jin, Y. S., & Kim, K. H. (2021). Production of neoagarooligosaccharides by probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* engineered as a microbial cell factory. *Microbial Cell Factories*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01644-w>

- Johansson, M. E. V., Sjövall, H., & Hansson, G. C. (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *10*(6), 352–361. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.35>
- Kaplan, G. G. (2015). The global burden of IBD: From 2015 to 2025. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *12*(12), 720–727. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.150>
- Kaye, J., Porcelli, S., Jones, B., Janeway Jr, C. A., Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neiryck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W., & Remaut, E. (1994). 11. C. A Janeway jr. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *76*(August), 104. www.sciencemag.org
- Kazemi, A., Soltani, S., Ghorabi, S., Keshtkar, A., Daneshzad, E., Nasri, F., & Mazloomi, S. M. (2020). Effect of probiotic and synbiotic supplementation on inflammatory markers in health and disease status: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Clinical Nutrition*, *39*(3), 789–819. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.04.004>
- Kelesidis, T., & Pothoulakis, C. (2012). Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, *5*(2), 111–125. <https://doi.org/10.1177/1756283X11428502>
- Keshteli, A. H., Madsen, K. L., & Dieleman, L. A. (2019). Diet in the pathogenesis and management of ulcerative colitis; A review of randomized controlled dietary interventions. *Nutrients*, *11*(7), 1–12. <https://doi.org/10.3390/nu11071498>
- Kuhn, C., & Weiner, H. L. (2016). Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: From bench to bedside. *Immunotherapy*, *8*(8), 889–906. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0049>
- Kuroda, K., Matsui, K., Higuchi, S., Kotaka, A., Sahara, H., Hata, Y., & Ueda, M. (2009). Enhancement of display efficiency in yeast display system by vector engineering and gene disruption. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *82*(4), 713–719. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1808-4>
- Lamb, C. A., Kennedy, N. A., Raine, T., Hendy, P. A., Smith, P. J., Limdi, J. K., Hayee, B., Lomer, M. C. E., Parkes, G. C., Selinger, C., Barrett, K. J., Davies, R. J., Bennett, C., Gittens, S., Dunlop, M. G., Faiz, O., Fraser, A., Garrick, V., Johnston, P. D., ... Hawthorne, A. B. (2019). British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, *68*, s1–s106. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318484>
- Leeds University, M. (2022). *Microbiomics: Leeds Omics*. <https://omics.leeds.ac.uk/data-tech/microbiomics/>
- Li, R., Wan, X., Takala, T. M., & Saris, P. E. J. (2021). *Heterologous Expression of the Leuconostoc Bacteriocin Leucocin C in Probiotic Yeast Saccharomyces boulardii*. 229–237.
- Liu, J., Kong, I., Zhang, G., Jayakody, L. N., Kim, H., Xia, P., & Kwak, S. (2016). *Metabolic Engineering of Probiotic Saccharomyces boulardii*. *82*(8), 2280–

2287. <https://doi.org/10.1128/AEM.00057-16>.Editor

- Mariuzza, R. A., Agnihotri, P., & Orban, J. (2020). The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. *Journal of Biological Chemistry*, 295(4), 914–925. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.009411>
- McFarland, L. V. (2010). Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology*, 16(18), 2202–2222. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i18.2202>
- Melanie Schirmer, Eric A. Franzosa, Jason Lloyd-Price, Lauren J. McIver, R., Schwager, Tiffany W. Poon, Ashwin N. Ananthakrishnan, Elizabeth Andrews³, G., Barron⁴, Kathleen Lake, Mahadev Prasad⁶, Jenny Sauk, Betsy Stevens, R. G., Wilson, Jonathan Braun, Lee A. Denson, Subra Kugathasan, D. P. B. M., & Hera Vlamakis¹, Ramnik J. Xavier, and C. H. (2018). Dynamics of metatranscription in the inflammatory bowel disease gut microbiome. *Nat Microbiol*. <https://doi.org/doi:10.1038/s41564-017-0089-z>
- Melgar, S., Karlsson, A., & Michaëlsson, E. (2005). Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: Correlation between symptoms and inflammation. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288(6 51-6), 1328–1338. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00467.2004>
- Miller, S. A., & St. Onge, E. (2011). Otelixizumab: A novel agent for the prevention of type 1 diabetes mellitus. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11(11), 1525–1532. <https://doi.org/10.1517/14712598.2011.610789>
- Mörkl, S., Butler, M. I., Holl, A., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2020). Probiotics and the Microbiota-Gut-Brain Axis: Focus on Psychiatry. *Current Nutrition Reports*, 9(3), 171–182. <https://doi.org/10.1007/s13668-020-00313-5>
- National Health Service. (2023). <https://www.nhs.uk/conditions/ulcerative-colitis/living-with/>
- Neri, B., Mossa, M., Scucchi, L., Sena, G., Palmieri, G., & Biancone, L. (2021). Histological scores in inflammatory bowel disease. *Journal of Digestive Diseases*, 22(1), 9–22. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12937>
- Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., & Kaplan, G. G. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390(10114), 2769–2778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0)
- Pabla, B. S., & Schwartz, D. A. (2020). Assessing Severity of Disease in Patients with Ulcerative Colitis. *Gastroenterology Clinics of North America*, 49(4), 671–688. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.08.003>
- Pannaraj, P. S., Li, F., Cerini, C., Bender, J. M., Yang, S., Rollie, A., Adisetiyo, H., Zabih, S., Lincez, P. J., Bittinger, K., Bailey, A., Bushman, F. D., Sleasman, J. W., & Aldrovandi, G. M. (2017). Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. *JAMA Pediatrics*, 171(7), 647–654.

<https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.0378>

- Park, Y. H., Kim, N., Shim, Y. K., Choi, Y. J., Nam, R. H., Choi, Y. J., Ham, M. H., Suh, J. H., Lee, S. M., Lee, C. M., Yoon, H., Lee, H. S., & Lee, D. H. (2015). Adequate Dextran Sodium Sulfate-induced Colitis Model in Mice and Effective Outcome Measurement Method. *Journal of Cancer Prevention, 20*(4), 260–267. <https://doi.org/10.15430/jcp.2015.20.4.260>
- Pereira, F. C., Wasmund, K., Cobankovic, I., Jehmlich, N., Herbold, C. W., Lee, K. S., Sziranyi, B., Vesely, C., Decker, T., Stocker, R., Warth, B., von Bergen, M., Wagner, M., & Berry, D. (2020). Rational design of a microbial consortium of mucosal sugar utilizers reduces *Clostridiodes difficile* colonization. *Nature Communications, 11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18928-1>
- Qiu, Z. B., Chen, J., Chen, J. J., Rong, L., Ding, W. Q., Yang, H. J., & Zhong, L. (2013). Effect of recombinant *Lactobacillus casei* expressing interleukin-10 in dextran sulfate sodium-induced colitis mice. *Journal of Digestive Diseases, 14*(2), 76–83. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12006>
- Rath, T., Atreya, R., & Neurath, M. F. (2021). Is histological healing a feasible endpoint in ulcerative colitis? *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology, 15*(6), 665–674. <https://doi.org/10.1080/17474124.2021.1880892>
- REIS, V. C. B. Modificações genéticas em linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação de xilose. **repositorio.unb.br**, 31 jan. 2012.
- Rianda, D., Agustina, R., Setiawan, E. A., & Manikam, N. R. M. (2019). Effect of probiotic supplementation on cognitive function in children and adolescents: A systematic review of randomised trials. *Beneficial Microbes, 10*(8), 873–882. <https://doi.org/10.3920/BM2019.0068>
- Rocchi, A., Benchimol, E. I., Bernstein, C. N., Bitton, A., Feagan, B., Panaccione, R., Glasgow, K. W., Fernandes, A., & Ghosh, S. (2012). Inflammatory bowel disease: A Canadian burden of illness review. *Canadian Journal of Gastroenterology, 26*(11), 811–817. <https://doi.org/10.1155/2012/984575>
- Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Garrido-Mesa, J., Vezza, T., Utrilla, M. P., Chueca, N., García, F., Rodríguez-Cabezas, M. E., & Gálvez, J. (2018). Intestinal anti-inflammatory effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* in DSS-induced colitis in mice: Impact on microRNAs expression and gut microbiota composition. *Journal of Nutritional Biochemistry, 61*, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.08.005>
- Rossjohn, J., Gras, S., Miles, J. J., Turner, S. J., Godfrey, D. I., & McCluskey, J. (2015). T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annual Review of Immunology, 33*(December), 169–200. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112334>
- Samelson, L. E. (2002). Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: The role of adapter proteins. *Annual Review of Immunology, 20*(1), 371–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.092601.111357>

- Samonis, G., Falagas, M. E., Lionakis, S., Ntaoukakis, M., Kofteridis, D. P., Ntalas, I., & Maraki, S. (2011). *Saccharomyces boulardii* and *Candida albicans* experimental colonization of the murine gut. *Medical Mycology*, *49*(4), 395–399. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.533203>
- Segal, J. P., Jean-Frédéric LeBlanc, A., & Hart, A. L. (2021). Ulcerative colitis: An update. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*, *21*(2), 135–139. <https://doi.org/10.7861/CLINMED.2021-0080>
- Sgro, C. (1995). Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. *Toxicology*, *105*(1), 23–29. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(95\)03123-W](https://doi.org/10.1016/0300-483X(95)03123-W)
- Shi, N., Li, N., Duan, X., & Niu, H. (2017). Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Military Medical Research*, *4*(1). <https://doi.org/10.1186/s40779-017-0122-9>
- Trudel, J., Grenier, J., & Asselin, A. (1998). Detection of enzymes active on various β -1,3-glucans after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, *19*(10), 1788–1792. <https://doi.org/10.1002/elps.1150191041>
- Vandenbroucke, K., De Haard, H., Beirnaert, E., Dreier, T., Lauwereys, M., Huyck, L., Van Huysse, J., Demetter, P., Steidler, L., Remaut, E., Cuvelier, C., & Rottiers, P. (2010). Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis. *Mucosal Immunology*, *3*(1), 49–56. <https://doi.org/10.1038/mi.2009.116>
- Vossenkämper, A., Hundsrucker, C., Page, K., Van Maurik, A., Sanders, T. J., Stagg, A. J., Das, L., & MacDonald, T. T. (2014). A CD3-specific antibody reduces cytokine production and alters phosphoprotein profiles in intestinal tissues from patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, *147*(1), 172–183. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.03.049>
- Wang, C., Li, W., Wang, H., Ma, Y., Zhao, X., Zhang, X., Yang, H., Qian, J., & Li, J. (2019). *Saccharomyces boulardii* alleviates ulcerative colitis carcinogenesis in mice by reducing TNF- α and IL-6 levels and functions and by rebalancing intestinal microbiota. *BMC Microbiology*, *19*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1610-8>
- Wang, T., Sun, H., Zhang, J., Liu, Q., Wang, L., Chen, P., Wang, F., Li, H., Xiao, Y., & Zhao, X. (2014). The establishment of *Saccharomyces boulardii* surface display system using a single expression vector. *Fungal Genetics and Biology*, *64*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.11.006>
- Wei, P., Yang, Y., Ding, Q., Li, X., Sun, H., Liu, Z., Huang, J., & Gong, Y. (2016). Oral delivery of bifidobacterium longum expressing α -melanocyte-stimulating hormone to combat ulcerative colitis. *Journal of Medical Microbiology*, *65*(2), 160–168. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000197>
- Wilkins, T., & Sequoia, J. (2017). Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. *American Family Physician*, *96*(3), 170–178.
- Yeagle, P. L. (2016). Membrane Receptors. *The Membranes of Cells*, 401–425. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800047-2.00015-2>

- Yu, Q. T., Saruta, M., & Papadakis, K. A. (2008). Visilizumab induces apoptosis of mucosal T lymphocytes in ulcerative colitis through activation of caspase 3 and 8 dependent pathways. *Clinical Immunology*, 127(3), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.02.009>
- Zhang, Y., & Li, Y. (2014). *Inflammatory bowel disease : Pathogenesis*. 20(1), 91–99. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.91>
- Zhao, M., Gönczi, L., Lakatos, P. L., & Burisch, J. (2021). The Burden of Inflammatory Bowel Disease in Europe in 2020. *Journal of Crohn's and Colitis*, 15(9), 1573–1587. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjab029>
- Zhao, Y., Yang, Y., Aruna, X., Xiao, J., Song, J., Huang, T., Li, S., Kou, J., Huang, L., Ji, D., Xiong, S., Peng, W., Xu, S., & Cheng, B. (2021). Saccharomyces boulardii Combined With Quadruple Therapy for Helicobacter pylori Eradication Decreased the Duration and Severity of Diarrhea: A Multi-Center Prospective Randomized Controlled Trial. *Frontiers in Medicine*, 8(November), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.776955>
- Zhou, H., Zhang, H. J., Guan, L., Zhang, Y. N., Li, Y., & Sun, M. J. (2018). Mechanism and therapeutic effects of Saccharomyces boulardii on experimental colitis in mice. *Molecular Medicine Reports*, 18(6), 5652–5662. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9612>
- Zipfel, P. F., & Skerka, C. (2022). From magic bullets to modern therapeutics: Paul Ehrlich, the German immunobiologist and physician coined the term 'complement.' *Molecular Immunology*, 150(August), 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2022.08.002>