



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

MANUELA MARAGNO DO ALMO

**Produção dos anticorpos recombinantes anti-TNF e anti-CD3 na bactéria
Zymomonas mobilis para o tratamento de colite experimental em
camundongos**

Brasília – DF

2023

MANUELA MARAGNO DO ALMO

**Produção dos anticorpos recombinantes anti-TNF e anti-CD3 na bactéria
Zymomonas mobilis para o tratamento de colite experimental em
camundongos**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde na Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Patologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Brasília – DF

2023

Dedico esse trabalho à minha família, por todo o amor.

Com todo o amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, especialmente à mamãe, vovó e Pedro, pelo amor, suporte e paciência sem fim nesse processo transforma(dor). Ao Marciano pelo carinho, companheirismo, apoio, tira-dúvidas e presença desmedida. Obrigada por tanto!

Aos meus orientadores Marcelo e Andrea pelo acolhimento há uma década no laboratório, pelas oportunidades, aprendizados, carinho, ensinamentos, paciência e por serem profissionais inspiradores. À Professora Lídia, sempre disposta a ajudar e esclarecer minhas dúvidas infinitas sobre *Zymomonas*!

Minhas amigas-irmãs Taynah, Jéssica, Bruna, Marina, Amanda e Isa, obrigada por tudo! Clênia e Luiza, sem o carinho, amor, motivação e alegria que vocês trazem para minha vida esse processo seria muito mais difícil. Belzinha minha mentora, inspiração, amiga especial, não tenho palavras... obrigada sempre!

Aos meus queridos companheiros de projeto, experimentos, alegrias e desespero: Syl, Vítor e Mari, foi uma aventura trabalhar com vocês!

Aos meus queridos colegas do Laboratório de Imunologia Molecular: Renatinho, Luiz, Amanda, Ronny, Renato, Pietra, Dayane, Ana e Lucas, pelos momentos divertidos e descontraídos, por toda ajuda, pelas várias doses de café e risadas que tornaram a rotina mais leve e alegre.

A todos vocês, meus sentimentos mais sinceros de gratidão, carinho e afeto!

“Nós, para os outros, apenas criamos pontos de partida.”

Simone de Beauvoir

RESUMO

A colite ulcerativa e a doença de Crohn fazem parte do grupo de doenças inflamatórias intestinais, caracterizadas pela inflamação do trato gastrointestinal (TGI). Ainda não há cura para essas doenças e os tratamentos disponíveis visam a diminuição dos sintomas e contenção do avanço das doenças. Uma das abordagens clínicas eficientes é o uso de inibidores de TNF como o anticorpo recombinante Infliximab (Remicade®). No entanto, a imunoterapia com anticorpos monoclonais ainda apresenta alto custo e toxicidade intrínseca, sugerindo a necessidade de alternativas menos tóxicas e mais acessíveis. Esse trabalho investigou a utilização da bactéria gram-negativa *Zymomonas mobilis* como veículo potencial para expressão dos anticorpos recombinantes anti-TNF e anti-CD3 no TGI de camundongos para reduzir os efeitos da colite ulcerativa induzida por DSS. Para isso, foram construídos três vetores de expressão de *Z. mobilis* contendo os genes que codificam para as regiões variáveis do mAb infliximab no formato de cadeia única (scFv), e do anticorpo murino anti-CD3 145-2c11, nos formatos scFv e FvFc. Com o tratamento realizado foi possível observar que a administração de *Z. mobilis* contendo ou não os plasmídeos de interesse foi efetiva na diminuição da inflamação, indicada pela estabilidade na perda de peso, no índice de atividade da doença e na melhora dos índices histopatológicos. Somado a isso, o tratamento com *Z. mobilis* restaurou a barreira mucosa além de aumentar a expressão dos genes *Muc3* e *Ocln* e potencializar um fenótipo regulador, induzindo genes imunomoduladores como *Tgfb*, *Il5*, *Il10* e *Foxp3* e reduzindo a expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias *Tnf*, *Il6* e *Il17*. A análise do microbioma sugere que a *Z. mobilis* pode alterar a microbiota intestinal, aumentando a abundância de bactérias como a *Akkermansia muciniphila* e diminuindo *Escherichia coli*. Por fim, os dados sugerem que *Z. mobilis* pode aliviar a progressão da doença e ser considerado um possível adjuvante probiótico para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

Palavras-chave: *Zymomonas mobilis*; anti-TNF; anti-CD3; colite induzida por DSS; expressão heteróloga.

ABSTRACT

Ulcerative colitis and Crohn's disease are part of the inflammatory bowel diseases group, characterized by inflammation of the gastrointestinal tract (GIT). There is still no cure for these diseases, and available treatments aim to reduce symptoms and contain the spread of the disease. One of the most efficient clinical approaches is the use of TNF inhibitors, such as the recombinant antibody Infliximab (Remicade®). However, immunotherapy with monoclonal antibodies still presents a high cost and intrinsic toxicity, suggesting the need for less toxic and more accessible alternatives. This work investigated the use of the gram-negative bacterium *Zymomonas mobilis* as a potential vehicle for the expression of recombinant anti-TNF and anti-CD3 antibodies in the GIT of mice to reduce the effects of DSS-induced ulcerative colitis. For this, three *Z. mobilis* expression vectors were constructed containing the genes that code for the variable regions of the infliximab mAb in single chain format (scFv) and the murine anti-CD3 antibody 145-2c11 in the scFv and FvFc formats. With the treatment, it was possible to observe that the administration of *Z. mobilis* containing or not the plasmids of interest was effective in reducing inflammation, as indicated by stability in weight loss, disease activity index and improvement in histopathological indices. In addition, treatment with *Z. mobilis* restored the mucosal barrier in addition to increasing the expression of the *Muc3* and *Ocln* genes, potentiating a regulatory phenotype, inducing immunomodulatory genes such as *Tgfb*, *Il5*, *Il10* and *Foxp3*, and reducing the relative expression of mRNA pro-inflammatory cytokines *Tnf*, *Il6* and *Il17*. Microbiome analysis suggests that *Z. mobilis* can alter the intestinal microbiota, increasing the abundance of bacteria such as *Akkermansia muciniphila* and decreasing *Escherichia coli*. Finally, the data suggest that *Z. mobilis* may alleviate disease progression and be considered a possible probiotic adjuvant for the treatment of inflammatory bowel diseases.

Keywords: *Zymomonas mobilis*; anti-TNF; anti-CD3; DSS-induced colitis; heterologous expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura dos anticorpos e suas diferentes versões	21
Figura 2. Cronograma do experimento <i>in vivo</i> com <i>Z. mobilis</i> anti-TNF scFv.....	46
Figura 3. Cronograma do experimento <i>in vivo</i> com <i>Z. mobilis</i> anti-CD3 OMP scFv....	47
Figura 4. Representação esquemática do vetor de expressão pBR1MR e cassetes gênicos.....	54
Figura 5. Digestão enzimática dos plasmídeos pBR1MR anti-CD3 FvFc, anti-CD3 scFv e anti-TNF scFv transformados em DH5α	56
Figura 6. Digestão enzimática dos plasmídeos pBR1MR anti-CD3 FvFc, anti-CD3 scFv e anti-TNF scFv transformados em JM110.....	57
Figura 7. Amplificação de fragmentos por PCR.....	58
Figura 8. Curva de crescimento e expressão a 30 °C	60
Figura 9. Curva de crescimento e expressão a 37 °C	61
Figura 10. Purificação do anticorpo anti-TNF scFv	63
Figura 11. Representação cromatográfica da purificação por exclusão molecular de proteínas comerciais na concentração de 3 mg/mL.....	64
Figura 12. Representação cromatográfica da purificação por exclusão molecular do anti-TNF scFv	65
Figura 13. Representação das frações pós purificação no Äkta	66
Figura 14. Ensaio de ELISA	67
Figura 15. Expressão do anticorpo anti-CD3 FvFc nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas.....	68
Figura 16. Microscopia confocal da bactéria <i>Z. mobilis</i> transformada com o plasmídeo PBR1MR anti-CD3 FvFc	69
Figura 17. Western blot da cultura de <i>Z. mobilis</i> transformada com o plasmídeo PBR1MR anti-CD3 FvFc	70
Figura 18. <i>Western blot</i> da cultura de <i>Z. mobilis</i> transformada com o plasmídeo PBR1MR anti-CD3 FvFc após protocolo de recuperação dos corpos de inclusão.	71
Figura 19. Expressão do anticorpo anti-CD3 scFv - OMP na fração solúvel e insolúvel do <i>pellet</i> da cultura durante as 96 horas de crescimento.....	72
Figura 20. Representação por <i>western blot</i> da cultura de <i>Z. mobilis</i> transformada com o plasmídeo PBR1MR anti-CD3 scFv – OMP após protocolo de recuperação dos corpos de inclusão.....	73
Figura 21. Microscopia confocal da bactéria <i>Z. mobilis</i> transformada com o plasmídeo PBR1MR anti-CD3 scFv - OMP	74
Figura 22. Administração oral de <i>Z. mobilis</i> e seus efeitos na colite induzida por DSS em camundongos.....	76
Figura 23. Análise do RNA total.....	77
Figura 24. Expressão de genes codificadores de citocinas e fatores de transcrição envolvidos na regulação da resposta inflamatória por análise de PCR em tempo real.....	79
Figura 25. Administração oral de <i>Z. mobilis</i> e seus efeitos na colite induzida por DSS em camundongos.....	80
Figura 26. Análise histopatológica e efeitos de <i>Z. mobilis</i> na mucosa do cólon de camundongos.....	85

Figura 27. Expressão de genes codificadores de citocinas e fatores de transcrição envolvidos na regulação da resposta inflamatória por análise de PCR em tempo real..	87
Figura 28. Análise de diversidade alfa..	89
Figura 29. Análise da diversidade do microbioma.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de primers para PCR de colônia.....	37
Tabela 2. Índice de atividade da Doença (DAI).....	48
Tabela 3. Critérios para análise histopatológica	48
Tabela 4. Sequências dos primers utilizados para PCR em tempo real.....	50

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

1. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS	15
1.1 MICROBIOTA E COLITE ULCERATIVA	16
2. TRATAMENTO DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS	18
2.1 TERAPIA COM ANTICORPOS ANTI-TNF	20
2.2 INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL COM ANTICORPOS ANTI-CD3	22
2.3 PROBIÓTICOS	24
3. A BACTÉRIA <i>Zymomonas mobilis</i>	26
4. MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS PRODUTORES DE BIOFÁRMACOS	27

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS 31

MATERIAIS E MÉTODOS

1. LINHAGENS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	34
2. PREPARAÇÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO	
2.1 POR CHOQUE TÉRMICO (CLORETO DE CÁLCIO - CaCl ₂)	35
2.2 POR ELETROPORAÇÃO	35
2.3 CONFIRMAÇÃO DAS TRANSFORMAÇÕES	36
3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM COLÔNIA	36
4. DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	37
5. ANÁLISE DE FRAGMENTOS DE DNA EM GEL DE AGAROSE	37
6. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DOS ANTICORPOS RECOMBINANTES	38
7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	38
8. WESTERN E DOT-BLOT: IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS	39
9. RECUPERAÇÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO	40
10. PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-TNF scFv	41
11. ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA	41
12. MICROSCOPIA CONFOCAL	42

13. ENSAIO COM AS LINHAGENS RECOMBINANTES DE <i>Z. mobilis</i> ANTI-TNF scFv E <i>Z. mobilis</i> anti-CD3 scFv EM MODELO ANIMAL DE COLITE	
13.1 PREPARO E ADMINISTRAÇÃO DA BACTÉRIA <i>Z. mobilis</i>	43
13.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	44
13.2.1 TESTE IN VIVO COM <i>Z. mobilis</i> ANTI-TNF scFv	45
13.2.2 TESTE IN VIVO COM <i>Z. mobilis</i> ANTI-CD3 OMP scFv	46
13.3 ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA	47
13.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	48
13.5 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E ENSAIOS DE PCR EM TEMPO REAL	49
13.6 MICROBIOMA	51
RESULTADOS	
1. CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO	53
2. CLONAGEM	56
3. CURVAS DE CRESCIMENTO E EXPRESSÃO	58
4. ANTICORPO ANTI-TNF scFv	
4.1. PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-TNF scFv E ELISA	62
5. ANTICORPOS ANTI-CD3	
5.1. ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-CD3 FvFc	67
5.2. ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-CD3 scFv	72
6. ENSAIO EM MODELO ANIMAL DE COLITE	
6.1 BACTÉRIA <i>Z. mobilis</i> TRANSFORMADA COM O PLASMÍDEO PBR1MR ANTI-TNF scFv	75
6.2 BACTÉRIA <i>Z. mobilis</i> TRANSFORMADA COM O PLASMÍDEO PBR1MR ANTI-CD3 scFv - OMP	80
6.2.1 EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES RELACIONADOS COM A REGULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA	85
6.2.2 ALTERAÇÃO NO PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL	88
DISCUSSÃO	94
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	103

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
APÊNDICE	116
ANEXOS	119

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

A colite ulcerativa e a doença de Crohn pertencem ao grupo das doenças inflamatórias intestinais (DII), caracterizadas como desordens idiopáticas que causam inflamações no trato gastrointestinal (TGI). Antes relatadas em sua maioria na América do Norte, Europa e Oceania, as DII atualmente são globais, com crescente incidência na América do Sul, Ásia e África (DA LUZ MOREIRA; DE CAMPOS LOBATO; DE SOUZA, 2019). No Brasil, entre os anos de 2012 e 2020 houve um aumento significativo de casos de colite ulcerativa, enquanto a incidência da doença de Crohn permaneceu estável nesse período (QUARESMA et al., 2022).

A causa dessas doenças ainda não está estabelecida, mas existe uma relação entre a urbanização dos países e a incidência de DII, que afeta a vida dos indivíduos por meio de mudanças alimentares, exposição a patógenos e poluentes, uso de antibióticos, etc. (KAPLAN, 2015). Dessa forma, além de uma provável predisposição genética, a etiologia das DII está relacionada às interações entre fatores ambientais, microbiota e a resposta imune do indivíduo (KAPLAN; NG, 2017).

A doença de Crohn é uma condição crônica, caracterizada por lesões que podem surgir em qualquer parte do TGI e se apresenta com os sintomas de dor abdominal, diarreia, perda de peso, náuseas, febre e sangramento retal (FEUERSTEIN; CHEIFETZ, 2017). Além desses sintomas, pacientes com essa doença possuem maiores chances de desenvolver outras doenças intestinais, como, por exemplo: câncer colorretal, linfoma intestinal e câncer anal (TORRES et al., 2017). O diagnóstico compreende a análise dos sintomas clínicos do paciente somados a exames radiológicos, endoscópicos e laboratoriais.

A colite ulcerativa, diferente da doença de Crohn, acomete especificamente o cólon do paciente, causando uma inflamação nessa mucosa intestinal. Os sintomas podem incluir: fadiga, aumento no número de evacuações, desconforto abdominal, diarreia com sangue e as manifestações extra intestinais podem ser a artrite periférica, colangite esclerosante e pioderma gangrenoso (UNGARO et al., 2017). Assim como na Doença de Crohn, o diagnóstico é realizado por meio da análise da combinação de sintomas, exames endoscópicos e histológicos.

Danos nessa mucosa podem causar a disbiose intestinal (ou vice-versa), ocasionando um desequilíbrio na comunidade microbiana. Assim, há uma redução na diversidade da microbiota, tornando o hospedeiro suscetível à colonização por outros microrganismos, inclusive patogênicos (ANANTHAKRISHNAN et al., 2018). Além disso, a disbiose intestinal também reflete na resposta imune do indivíduo diante de um processo inflamatório.

1.1 MICROBIOTA E COLITE ULCERATIVA

O trato gastrointestinal humano contém cerca de 10-100 trilhões de microrganismos, entre eles, bactérias, fungos e vírus, que compõem a microbiota (THURSBY; JUGE, 2017). As bactérias são os microrganismos encontrados em maior quantidade no TGI saudável e os principais filos são: Actinomycetota, Pseudomonadota, Verrucomicrobiota, Bacillota e Bacteroidota, sendo estes dois últimos, os predominantes (ARUMUGAM et al., 2011).

As bactérias do TGI são fundamentais para a homeostase no hospedeiro, pois estão envolvidas com funções essenciais, como nas respostas relacionadas a nutrição, metabolismo e desempenho do sistema imune (QIU et al., 2022). A microbiota intestinal provê energia à mucosa do hospedeiro através da fermentação de fibras, que resulta na produção dos ácidos graxos de cadeia curta – SCFA (do inglês *short-chain fatty acids*), como acetato, butirato, propionato, entre outros, e por meio da síntese de vitaminas (NISHIDA et al., 2018).

Os SCFA atuam na promoção da integridade, proliferação e diferenciação dos colonócitos, além de estarem envolvidos na secreção de peptídeos antimicrobianos e diferenciação de linfócitos T (DELEU et al., 2021; MARTIN-GALLAUSIAUX et al., 2021). Na presença de alguma DII, como a colite ulcerativa, esses metabólitos são diminuídos, devido à alteração na composição, diversidade e funcionamento da microbiota, mudanças conhecidas como disbiose intestinal (LEE; CHANG, 2021).

A disbiose também causa danos na barreira intestinal, logo, para a promoção da manutenção da homeostase e proteção contra a colonização de patógenos pela microbiota, é necessário a preservação da integridade do epitélio intestinal (RINNINELLA et al., 2019). Assim, há uma separação entre a microbiota e o sistema imune do hospedeiro, que é: física, constituída pelas barreiras epitelial e mucosa, uma separação bioquímica caracterizada pelas enzimas e proteínas antimicrobianas, e por

fim, uma separação imunológica que envolve células imunes associadas ao epitélio e a imunoglobulina A (IgA) (THURSBY; JUGE, 2017).

No cólon, a barreira epitelial/mucosa é composta pelos colonócitos, células Goblet (caliciformes), células endócrinas e algumas células de Paneth, que se mantêm unidas pelas junções intercelulares. As células Goblet, estão presentes em todo o epitélio intestinal e são secretoras de muco, um fluido viscoso formado principalmente pela glicoproteína Mucina 2 (MUC2) (SCHROEDER, 2019). Esse muco se apresenta em duas camadas no cólon intestinal: a primeira mais interna, próxima dos colonócitos e sem a presença de microrganismos; e a segunda, mais externa, com a presença de microrganismos e resquícios da dieta do hospedeiro (ERMUND et al., 2013).

Dada a importância dessa camada, camundongos *knockout* para o gene *Muc2*^{-/-} desenvolvem colite espontaneamente, apresentando ulcerações das células epiteliais e aumento de infiltrado de células inflamatórias devido à proximidade da microbiota com a mucosa intestinal (VAN DER SLUIS et al., 2006). A diminuição ou alteração na camada de muco pode gerar um contato entre as células intestinais e a microbiota, desencadeando processos inflamatórios e contribuindo para o desenvolvimento da colite ulcerativa (VAN DER POST et al., 2019).

Outra função do muco é manter um reservatório de peptídeos antimicrobianos, como lisozimas, defensinas, catelicidinas e lipocalinas, que podem agir na parede ou membrana celular bacteriana, rompendo-as (GUBATAN et al., 2021). Essas moléculas são secretadas principalmente pelas células de Paneth, localizadas em abundância no intestino delgado, nas criptas intestinais, e compõem a barreira bioquímica de proteção contra patógenos e a translocação de bactérias pelo epitélio intestinal (STANGE; SCHROEDER, 2019).

Outra barreira de defesa intestinal é composta por células do sistema imune que se distribuem por toda a mucosa intestinal. Quando ocorre algum dano na barreira epitelial, há um aumento na permeabilidade que possibilita a entrada de antígenos no tecido associado ao epitélio intestinal, conhecido por lâmina própria. A partir disso, células dendríticas e macrófagos reconhecem e monitoram esses microrganismos ou produtos deles, por meio dos seus receptores de reconhecimento de padrões moleculares (CANI, 2018).

Nesse contexto imunológico, os linfócitos T CD4⁺ são uma das principais células que gerenciam a resposta imunológica nas DII, estando presentes em grande quantidade em pacientes acometidos com Doença de Crohn ou Colite Ulcerativa (IMAM et al., 2018). Esses linfócitos se diferenciam no tecido inflamado do TGI de acordo com as citocinas e fatores de transcrição presentes no meio celular, podendo assumir os subtipos Th1, Th2, Th17 e T regulatórios.

Os linfócitos intraepiteliais – IEL (do inglês, *intraepithelial lymphocytes*), são compostos em sua maioria pelas células T $\gamma\delta$ (*gamma delta*) e células linfóides inatas – ILC (do inglês, *innate lymphocyte cell*), e distribuem-se ao longo do epitélio intestinal (CHEROUTRE; LAMBOLEZ; MUCIDA, 2011). As células T $\gamma\delta$ desempenham um papel importante na homeostase intestinal, contribuindo na reparação da barreira epitelial e na secreção de citocinas envolvidas com a indução da tolerância oral (KANG; KIM; LEE, 2023; KÜHL et al., 2003).

As células ILC compartilham similaridades funcionais com os subtipos de linfócitos T (PETERSON; ARTIS, 2014). No entanto, não apresentam receptores específicos de reconhecimento de antígenos, como os linfócitos T e B, pois sua ativação e expansão ocorre através de receptores de citocinas, que são liberadas em resposta a algum dano tecidual. Atuam na resposta imune, na regulação da homeostase tecidual e na resposta a inflamação (PANDA; COLONNA, 2019).

Um outro componente do sistema imune de extrema importância no processo inflamatório das DII, é a imunoglobulina IgA, que se localiza nas mucosas e é responsável por se ligar aos microrganismos patogênicos e evitar o contato deles com o epitélio intestinal (FRIEDRICH; POHIN; POWRIE, 2019).

A patogênese das doenças inflamatórias intestinais depende da interrelação entre diversos componentes do intestino, como a microbiota, as células que compõem a barreira epitelial e as células do sistema imunológico. O entendimento da doença, das vias e células envolvidas no processo inflamatório, pode elucidar questões importantes para o desenvolvimento de terapias específicas e eficientes para a Colite Ulcerativa e Doença de Crohn.

2. TRATAMENTO DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

O entendimento e a caracterização das células e citocinas envolvidas nos processos de inflamação intestinal que levam à ocorrência das DII, possibilitaram o

desenvolvimento de diversas terapias para o tratamento dessas comorbidades. Algumas terapias ainda estão em fase de teste, enquanto outras já estão disponíveis para uso, e podem ser divididas em duas categorias de ação: o bloqueio da sinalização de citocinas pró-inflamatórias e a estimulação de vias anti-inflamatórias (FRIEDRICH; POHIN; POWRIE, 2019).

Atualmente, as DII não têm cura e os tratamentos visam o controle e a diminuição dos sintomas da doença. As possibilidades de tratamento incluem o uso de corticosteroides, anti-inflamatórios como os aminossalicilatos, imunossupressores como as tiopurinas e metrotexato, bem como a administração de agentes biológicos (DANESE; FIOCCHI, 2011). A escolha pelo melhor tratamento depende das condições clínicas do paciente, da localização e estágio da doença.

Dos agentes biológicos, a terapia com anticorpos que inibem a ação da citocina TNF, molécula importante na resposta inflamatória às DII, tem apresentado resultados promissores e por isso, é o tratamento mais utilizado para a Doença de Crohn e Colite Ulcerativa (FRIEDRICH; POHIN; POWRIE, 2019). Nessa terapia pode-se utilizar os anticorpos Infliximab (Remicade®), Adalimumab (Humira®), Certolizumab pegol (Cimzia®) ou Golimumab (Simponi®).

No entanto, alguns pacientes não respondem ao tratamento com os anticorpos anti-TNF e podem ainda apresentar efeitos colaterais, como reações alérgicas, infecção, problemas dermatológicos, artralgia e formação de anticorpos antidrogas (anti-anti-TNF), que neutralizam e aumentam o *clearance* dos anticorpos anti-TNF (STEELAND; LIBERT; VANDENBROUCKE, 2018).

Para esses pacientes, faz-se necessária a busca por outras possibilidades de tratamento. E nesse sentido, os anticorpos monoclonais Ustekinumab (STELARA®) e Vedolizumab (Entyvio®), e a molécula Tofacitinib (Xeljanz®), tem apresentado resultados promissores no tratamento das DII (XU; ZHU; GUO, 2022). O anticorpo humano Ustekinumab (STELARA®), se liga a subunidade proteica p40 das citocinas IL-12 e IL-23, envolvidas com a ativação do fator de transcrição STAT4 (do inglês, *signal transducers and activators of transcription*) e indução de uma resposta inflamatória; e com a proliferação das células T do subtipo Th17 no intestino, respectivamente (PARAMSOTHY et al., 2018). Dessa forma, esse anticorpo é capaz

de induzir a remissão em pacientes com colite ulcerativa ou doença de Crohn (SANDS et al., 2019).

Já o anticorpo humanizado Vedolizumab (Entyvio®), se liga na integrina $\alpha_4\beta_7$, expressa nos linfócitos residentes na mucosa, e impede a migração dessas células para a submucosa do TGI, modulando a inflamação (SOLER et al., 2009). As tirosinas quinase da família Janus (JAK1, JAK2 e JAK3) ativam fatores de transcrição do tipo STAT e juntos, formam as vias de sinalização JAK-STAT que regulam diversos mediadores da resposta imune envolvidos com a patogênese das DIIs (D'AMICO et al., 2019). A molécula Tofacitinib (Xeljanz®), inibe as tirosinas quinase JAK1, 2 e 3, diminuindo a produção de citocinas inflamatórias, recuperando a mucosa intestinal e induzindo a remissão da colite ulcerativa (SANDBORN et al., 2017).

2.1 TERAPIA COM ANTICORPOS ANTI-TNF

O Fator de Necrose Tumoral – TNF (do inglês *tumor necrosis factor*) é expresso como uma proteína transmembrana (tmTNF), que quando liberada, passa a assumir a forma solúvel homotrimérica (sTNF) (STEELAND; LIBERT; VANDENBROUCKE, 2018). O TNF é uma citocina pró-inflamatória, produzida por células do sistema imune como macrófagos, células T, células dendríticas, células NK, neutrófilos e por células do tecido adiposo, fibroblastos e células neuronais (GRIFFITHS et al., 2020).

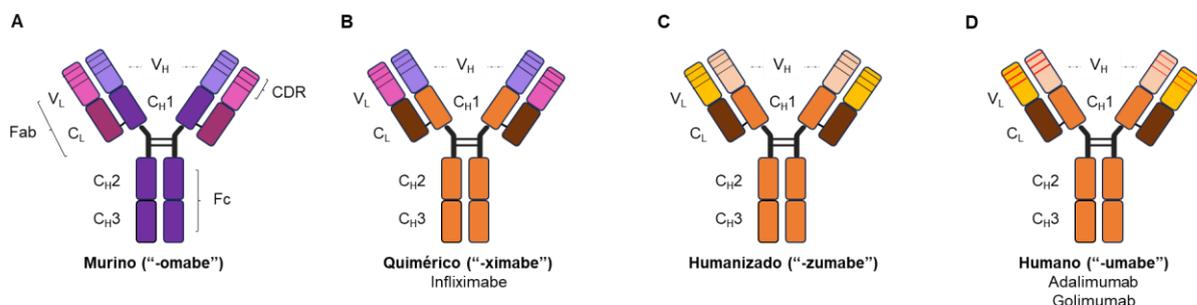
A citocina TNF está envolvida em diversos processos inflamatórios e é uma das primeiras moléculas a aparecer nos sítios de inflamação. Nas doenças inflamatórias intestinais, o TNF é capaz de causar necrose das células de Paneth, dano tecidual, neoangiogênese, além de ativar macrófagos para produzir mais citocinas inflamatórias (NEURATH, 2017). Nesse contexto, por assumir um dos papéis centrais na inflamação, o TNF se torna um alvo ideal para ter os seus efeitos neutralizados a partir de imunoterapias.

O Infliximab (Remicade®), primeiro anticorpo monoclonal anti-TNF descrito, foi aprovado inicialmente para o tratamento de pacientes com artrite reumatóide (ELLIOTT et al., 1993). Ensaio paralelos com o Infliximab (Remicade®) foram realizados para o tratamento da Doença de Crohn, que culminou, em 1998, com a aprovação do uso desse anticorpo pela agência federal americana FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) para uso clínico nessa DII (REMICADE, 1998; TARGAN et al., 1997).

Esse anticorpo monoclonal quimérico do tipo IgG1 (Infliximab (Remicade®)) é capaz de se ligar às formas solúvel e transmembrana do TNF α humano, com alta especificidade e afinidade (TARGAN et al., 1997). O anticorpo quimérico apresenta apenas as regiões variáveis (Fv) murinas e o restante de sua constituição é humana (STEELAND; LIBERT; VANDENBROUCKE, 2018) (Figura 1).

Os anticorpos IgG são formados por duas cadeias polipeptídicas, a leve (L) e a pesada (H) unidas por pontes dissulfeto, e apresentam domínios variáveis (V) e constantes (C) (Figura 1). O anticorpo se liga ao antígeno por meio dos domínios variáveis (Fv) que contém segmentos hipervariáveis conhecidos como regiões determinantes de complementariedade – CDR (do inglês, *complementarity-determining regions*), que determinam a especificidade a antígenos (HARRIS; LARSON; MCPHERSON, 1999). A função efetora do anticorpo, ou seja, o recrutamento de células ou sistema complemento, é realizada pela ligação do fragmento cristalizável (Fc) do anticorpo a receptores específicos presentes nas membranas de células do sistema imune (DANILOVA; AMEMIYA, 2009).

ANTICORPOS INTEIROS



FRAGMENTOS DE ANTICORPOS

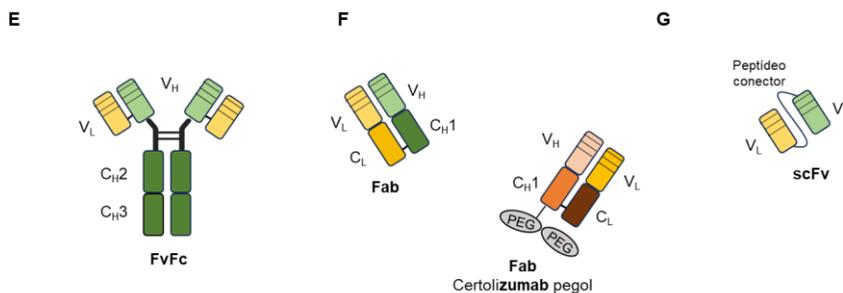


Figura 1. Representação esquemática da estrutura dos anticorpos e suas diferentes versões. O anticorpo é formado pelas regiões Fab e Fc. A região Fab é composta pelas cadeias variáveis leve e pesada, que formam a porção Fv de ligação ao antígeno, e pelas cadeias constantes leve e pesada. **A.** Anticorpo murino possui todas as sequências murinas. **B.** Anticorpo quimérico apresenta as regiões variáveis murinas e o restante humano. **C.** Anticorpo Humanizado apresenta apenas as CDRs murinas. **D.** Anticorpo humano possui todas as sequências humanas. **E.** Fragmento de anticorpo FvFc é

composto pela porção Fc e Fv. **F.** Fragmento de anticorpo formado pela região Fab. **G.** Fragmento de anticorpo scFv é formado pela cadeia simples da porção Fv ligadas por um peptídeo conector.

O anticorpo Infliximab (Remicade®), combinado com imunossuppressores, se mostrou eficiente na manutenção e remissão das DII, bem como na recuperação da mucosa intestinal (NEURATH, 2017). No entanto, por ser um medicamento administrado de forma intravenosa, não se tem um controle do local de ação desse anticorpo, sendo um dos possíveis efeitos colaterais a reativação de tuberculose latente e infecções oportunistas (D'HAENS, 2007).

A partir do Infliximab (Remicade®), outros anticorpos monoclonais anti-TNF para o tratamento de DII começaram a ser desenvolvidos com diferenças na estrutura da molécula e na forma de administração. Os anticorpos adalimumab (Humira®) e golimumab (Simponi®) são humanos e sua aplicação é subcutânea e o certrolizumab (Cimzia®), também de aplicação subcutânea, é um anticorpo no formato Fab' conjugado com polietilenoglicol (PEG), que aumenta sua meia vida (SANDBORN et al., 2007) (Figura 1D e F). Todos esses anticorpos anti-TNF são capazes de se ligar e neutralizar a atividade do TNF, diminuindo a inflamação e promovendo a recuperação da mucosa intestinal (LEVIN; WILDENBERG; VAN DEN BRINK, 2016).

O objetivo dessas terapias é proporcionar qualidade de vida para os pacientes, minimizar a ocorrência de efeitos colaterais e induzir a remissão da doença. Embora nenhum desses fármacos seja curativo, eles revolucionaram a forma de tratamento para as DII e ainda são as melhores opções de terapia para essas doenças.

2.2 INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL COM ANTICORPOS ANTI-CD3

A tolerância oral se refere ao processo de tolerância a agentes externos (microrganismos e antígenos provenientes da dieta). É uma forma de tolerância periférica que acontece nas mucosas, e no TGI, no qual o sistema imune é conhecido por tecido linfoide associado ao intestino – GALT (do inglês, *gut-associated lymphoid tissue*) (FARIA; WEINER, 2005).

As células regulatórias (Treg) induzidas na tolerância oral, tem a capacidade de produzir citocinas anti-inflamatórias de extrema importância, como IL-10 e TGFβ (FARIA; WEINER, 2005). Camundongos deficientes nos genes que codificam essas citocinas, são incapazes de suprimir a resposta inflamatória e desenvolvem uma

inflamação intestinal crônica, devido a presença de células Treg não funcionais (NEURATH, 2014).

A intenção de estimular o funcionamento desse mecanismo natural de tolerância que ocorre por meio das células T regulatórias, tão importantes nas doenças inflamatórias intestinais, é o de ajudar a restaurar o equilíbrio dos tecidos inflamados. Além de possibilitar a diminuição do uso de medicamentos que podem não ser tão eficientes e ainda causarem alguns efeitos colaterais ao paciente (HIMMEL et al., 2012).

A molécula CD3 é um antígeno de superfície específico de linfócitos T e compõe o complexo do TCR, o receptor de superfície dessas células (do inglês, *T cell receptor*) (RUDOLPH; STANFIELD; WILSON, 2006). O OKT3 (Orthoclone OKT3, muromonab-CD3) foi o primeiro anticorpo monoclonal anti-CD3 aprovado para uso clínico em humanos, indicado para terapia de rejeição a transplantes. De uma forma geral, esse anticorpo diminui a severidade da maioria dos episódios de rejeição (COSIMI et al., 1981). No entanto, por ser um anticorpo monoclonal murino, o OKT3 causa uma resposta imunogênica no paciente, caracterizada pela presença de anticorpos humanos anti-murinos (HAMA, do inglês, *Human Anti-Mouse Antibody*) (KIMBALL et al., 1995) (Figura 1A).

A partir do OKT3, outros anticorpos monoclonais anti-CD3 de aplicação intravenosa, foram desenvolvidos com alterações em sua estrutura visando uma melhor resposta do hospedeiro com menos efeitos colaterais. Os anticorpos humanizados anti-CD3 oteelixumab e teplizumab (Tzielid®) apresentaram resultados promissores em testes clínicos para o tratamento de diabetes do tipo I. O anticorpo oteelixumab ainda está em testes para definição da melhor dose para os pacientes (KEYMEULEN et al., 2005). Já o teplizumab (Tzielid®) foi aprovado para uso clínico pela FDA em 2023 (HEROLD et al., 2002; KAPLON et al., 2023)

No que tange às DII, o anticorpo monoclonal anti-CD3 humanizado visilizumab (Nuvion) foi utilizado via endovenosa, em testes clínicos para o tratamento de colite ulcerativa (PLEVY et al., 2007). No entanto, sua produção foi suspensa devido a altos índices de efeitos colaterais nos pacientes, como infecções, tempestade de citocinas, distúrbios cardíacos e vasculares, além de uma ineficácia no tratamento da doença (SANDBORN et al., 2010).

Ensaio clínicos iniciais em pacientes com doença de Crohn, com o anticorpo humano anti-CD3 foralumab (TZLS-401), administrado por via endovenosa, apresentaram resultados seguros, mas ainda preliminares (VAN DER WOUDE et al., 2010). Em 2022, a empresa Tiziana Life Sciences responsável pela fabricação desse anticorpo, anunciou novos ensaios clínicos com a utilização de cápsulas orais de foralumab (TZLS-401) para tratamento da Doença de Crohn. Esse anticorpo também foi administrado por via nasal em pacientes acometidos com COVID-19 e além de ter sido bem tolerado, apresentou diminuição de citocinas inflamatórias e uma melhora nos infiltrados pulmonares (MOREIRA et al., 2021, 2023)

Nesse contexto, terapias com a administração oral de anticorpos monoclonais anti-CD3 surgem como uma nova possibilidade de indução da resposta imune anti-inflamatória *in vivo*. Essa nova abordagem de terapia se diverge da clássica administração endovenosa, pois por não entrarem na corrente sanguínea, esses anticorpos não induzem secreções exageradas de citocinas, e agem localmente no intestino induzindo a diferenciação de linfócitos T regulatórios (WEINER et al., 2011).

Estudos em diferentes modelos murinos demonstraram que a terapia oral com anticorpos anti-CD3 é importante para a melhora da inflamação, com redução de citocinas inflamatórias e aumento das células T regulatórias, que agem de forma dependente das citocinas IL-10 e TGF β (FORSTER et al., 2012; WU et al., 2009).

Atualmente, as imunoterapias buscam os melhores efeitos com a menor toxicidade possível para o hospedeiro. E nesse sentido, a tolerância oral representa uma forma viável de suprimir a inflamação pela indução de células T regulatórias. Os estudos com anticorpos anti-CD3 administrados oralmente ainda são poucos, o que torna ainda mais importante a necessidade de se investigar e aprofundar os conhecimentos e experimentos acerca dessas moléculas tão promissoras.

2.3 PROBIÓTICOS

Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades suficientes, podem prover benefícios para o hospedeiro, como: alteração da microbiota, redução da inflamação, inibição de patógenos etc. (MACK, 2011).

No contexto das doenças inflamatórias intestinais, os probióticos podem ser utilizados para ajudarem a restaurar a barreira epitelial/mucosa promovendo o aumento da espessura do muco e das proteínas que compõem as junções

intercelulares (HALLORAN; UNDERWOOD, 2019). Também podem aumentar a resposta anti-inflamatória por alterações em receptores e vias de sinalização, como a do NFκB, além de regular imunoglobulinas, defensinas e bacteriocinas no lúmen intestinal (FEDORAK, 2008; SHEN et al., 2018).

Bactérias lácticas como as do gênero *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*, bem como as bactérias *Bacillus*, *Escherichia*, *Propionibacterium* e a levedura *Saccharomyces*, são os probióticos mais estudados e utilizados atualmente (AZAD et al., 2018). As bactérias lácticas são microrganismos bastante utilizados em modelos de produção heteróloga e entrega de proteínas terapêuticas, uma vez que são bactérias comensais do TGI humano (BEHNSEN et al., 2013).

Ensaio clínico foram realizados para avaliar a eficácia de probióticos no tratamento da colite ulcerativa. O primeiro deles utilizou a cepa não patogênica *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor, Ardeypharm) que foi eficiente em induzir e manter a remissão da doença em pacientes por determinado período (MATTHES et al., 2010). Além disso, a administração da *E. coli* Nissle também foi comparada com o uso do medicamento aminossalicilato mesalazina, um dos principais tratamentos para DII. Observou-se que os efeitos obtidos com o uso dessa bactéria foram tão efetivos quanto o uso do medicamento em termos de manutenção da remissão da colite ulcerativa (KRUIS et al., 1997; REMBACKEN et al., 1999).

Outro ensaio clínico relevante utilizou o probiótico VSL#3 (Pharmaceuticals, Inc.) que combina uma mistura de oito bactérias, sendo elas *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Esse tratamento se mostrou seguro e eficiente na indução da remissão da doença por um determinado período nos pacientes testados (BIBILONI et al., 2005; SOOD et al., 2009; TURSI et al., 2010).

Novos microrganismos têm sido testados para avaliar seus efeitos nas DII, alguns deles são *Akkermansia muciniphila*, *Christensenella minuta*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium butyricum*, cepas sem toxicidade de *Bacteroides fragilis* e *Anaerobutyricum soehngenii* (ALDARS-GARCÍA; CHAPARRO; GISBERT, 2021; ŠTOFILOVÁ et al., 2022).

Com o aumento dos índices de DII, a procura por alternativas aos medicamentos utilizados tradicionalmente também cresce. Os probióticos surgem nesse contexto como uma possibilidade de tratamento para essas doenças. No entanto, ainda são poucos os microrganismos estudados para esse fim, possibilitando a busca por novos candidatos a probióticos que possam apresentar características importantes para o controle ou diminuição das DII.

3. A BACTÉRIA *Zymomonas mobilis*

A *Zymomonas mobilis* é uma bactéria gram-negativa, anaeróbica facultativa e isolada por Barker & Hillier em 1911, quando estudavam a 'doença da cidra', uma bebida produzida pela fermentação do suco de maçã (SWINGS; GENETICS, 1977). Também é conhecida por seu aspecto etnológico como agente fermentador de bebidas de consumo comunitário, como a Pulque, bebida tradicional no México e feita a partir da fermentação do agave (CORREA-ASCENCIO et al., 2014). A *Z. mobilis* apresenta o status GRAS (do inglês, *General Recognized as Safe*), que assegura seu uso no desenvolvimento de produtos destinados ao consumo humano (YANG et al., 2016).

Muito estudada na área bioquímica pela produção de metabólitos como etanol, sorbitol, ácido succínico, levana, lactato entre outros, atualmente a *Z. mobilis* tem conquistado interesse também na área de biocombustíveis sendo desenvolvidas estratégias para a melhoria da produção usando esse microrganismo como plataforma industrial inovadora (YANG et al., 2016). O sucesso do seu emprego para a produção de etanol está associado a via Entner-Doudoroff, na qual a glicose é convertida em piruvato e esse, por sua vez, em etanol pelas enzimas piruvato decarboxilase e álcool desidrogenase (KALNENIEKS; PAPPAS; BETTENBROCK, 2020; ROGERS et al., 1982).

No Brasil, Gonçalves de Lima iniciou a pesquisa com *Z. mobilis* em 1952, quando trouxe do México a cepa AG11. Em 1970 esse pesquisador isolou as linhagens CP1, CP2, CP3 e CP4 de amostras de caldo de cana-de-açúcar ligeiramente fermentadas e a linhagem conhecida como CP4 foi mundialmente distribuída (DE MORAIS et al., 1993).

Além das suas funções biotecnológicas, *Z. mobilis* tem se destacado no contexto de aplicações terapêuticas, quando médicos na cidade de Recife usaram a *Z. mobilis*

AG11 e CP1, para tratar pacientes com distúrbios intestinais, principalmente colite crônica (DE MORAIS et al., 1993). O seu potencial probiótico também foi explorado por Gonçalves de Lima e colaboradores no Laboratório de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), quando *Z. mobilis* da linhagem CP4 foi administrada em ratos Wistar saudáveis (DE AZERÊDO et al., 2010).

Além da função probiótica, *Z. mobilis* foi descrita por possuir ação antitumoral por meio do oligossacarídeo levana, em casos de sarcoma e carcinoma (CALAZANS et al., 2000), e conferiu uma proteção contra o parasita *Schistosoma mansoni* (DE FÁTIMA MACEDO SANTOS et al., 2004).

Essa bactéria também está relacionada com a sobrevivência de camundongos com sepse, induzindo ações imunomodulatórias, como o aumento de citocinas e migração de neutrófilos, bem como a diminuição da apoptose de linfócitos no baço e manutenção da atividade da barreira intestinal contra patógenos (CAMPOS et al., 2013).

Somado aos resultados obtidos com o uso terapêutico dessa bactéria, a *Z. mobilis* apresenta uma genética que começa ser bastante conhecida, sendo alvo de distintos projetos para a produção heteróloga de proteínas recombinantes de alto valor agregado, se mostrando como um promissor vetor de expressão (EINSFELDT et al., 2016). Essas características conferem a essa bactéria nuances únicas e ainda não exploradas para a expressão de biofármacos de uso oral em humanos.

4. MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS PRODUTORES DE BIOFÁRMACOS

Em 1982, a FDA aprovou o primeiro produto biossintético de insulina humana, o Humulin, produzido na bactéria *Escherichia coli* (GOEDEL et al., 1979). Desde então, o sistema de expressão em procariotos passou a ser bastante utilizado para a produção de proteínas recombinantes devido ao rápido crescimento desses microrganismos, uma genética que passou a ser conhecida e manipulável e à capacidade de atingir uma alta densidade celular em pouco tempo (SPADIUT et al., 2014).

A utilização da bactéria *E. coli* como plataforma para produção de biofármacos já rendeu, desde 2018, 36 produtos aprovados pela FDA (WALSH; WALSH, 2022). Como por exemplo, o fragmento do anticorpo anti-TNF Certolizumab pegol (Cimzia®), utilizado no tratamento da Doença de Crohn e artrite reumatóide (SANDBORN et al.,

2007); um nanobody humanizado bivalente Caplacizumab (Cablivi®) cujo alvo é o fator de von Willebrand, para o tratamento da doença sanguínea Púrpura Trombocitopênica Trombótica adquirida (SCULLY et al., 2019); ou até mesmo enzimas recombinantes como a protease Imlifidase (Idefirix®) que inativa IgG prevenindo a rejeição a transplantes renais (HUANG et al., 2022).

Os microrganismos também foram testados como agentes de entrega de transgenes ou de biofármacos diretamente no local de alvo farmacológico. Nesse sentido, o TGI é um modelo de pesquisa muito adequado por ser naturalmente colonizado por uma microbiota residente, e de ser resiliente a passagem de microrganismos normalmente presentes na dieta do hospedeiro.

Atualmente, as bactérias lácticas representam grande parte dos estudos envolvendo probióticos recombinantes em DII. Essas bactérias, muito utilizadas na indústria alimentícia, formam ácido láctico a partir da fermentação de carboidratos e alguns dos seus gêneros são: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* (WYSZYŃSKA et al., 2015).

Linhagens recombinantes de bactérias lácticas com vetores que expressavam no meio extracelular proteínas do tipo Hsp65 (do inglês, *heat shock protein*) (GOMES-SANTOS et al., 2017), e citocinas como IL-4 e IL-10 (SOUZA et al., 2016; ZURITA-TURK et al., 2014), foram aplicadas no modelo de colite experimental induzida por DSS ou TNBS. De forma geral, *Lactococcus lactis* portador desses plasmídeos foi eficiente em diminuir a inflamação intestinal ocasionada pela indução química da colite ulcerativa.

Um estudo realizado no Laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB), utilizou a bactéria gram-positiva *L. lactis* como um veículo de entrega de um vetor de expressão contendo a sequência codificadora para o anticorpo anti-TNF, para os enterócitos de camundongos com colite induzida experimentalmente (CHIABAI et al., 2019). A partir da análise de marcadores inflamatórios e histopatológicos, foi possível observar efeitos benéficos da administração dessa bactéria, que induziu uma melhora da doença nos camundongos testados.

Com o crescente conhecimento acerca da importância da microbiota e sua relação com as DII, há uma busca por alternativas de microrganismos que possam

ser utilizados como tratamento. Nesse contexto, a bactéria *Z. mobilis* surge como um microrganismo com potencial terapêutico para se tornar um hospedeiro para produção de biofármacos.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

JUSTIFICATIVA

Atualmente, não há tratamento disponível no mercado para as doenças inflamatórias intestinais (DII), com capacidade de cura. Somado a isso, as terapias disponíveis, como por exemplo o medicamento Infliximab (Remicade®), possuem um alto custo para os pacientes, além de ocasionar efeitos colaterais ou ainda, perda de eficiência ao longo do tempo.

Nesse contexto de DII, a microbiota e a mucosa intestinal surgem como fatores importantes na modulação dessas doenças, principalmente devido ao seu papel na tolerância imunológica. Essa comunidade de microrganismos que compõem a microbiota, tem sido estudada para que se possa compreender os seus mecanismos e a partir disso, utilizá-los para produção local de biofármacos, que atuem a nível de mucosa, diretamente na modulação do sistema imune.

Com base nestes estudos, surgiu a necessidade de se desenvolver tratamentos que sejam mais acessíveis, toleráveis pelos pacientes e que consigam manter sua eficiência a longo prazo. Assim, o presente trabalho propõe uma nova estratégia biotecnológica para o tratamento da colite ulcerativa experimental induzida por DSS em camundongos, utilizando a bactéria *Zymomonas mobilis* como veículo para a expressão dos anticorpos anti-TNF e anti-CD3 na mucosa intestinal inflamada desses animais.

Desta forma, propõe-se que a utilização da bactéria *Z. mobilis* para a entrega local dos anticorpos na mucosa intestinal possa modular o aspecto inflamatório local e a evolução da doença no modelo de colite experimental. Associado a isso, com a utilização de microrganismos comensais para a entrega desses anticorpos, espera-se que ocorra a diminuição dos efeitos sistêmicos e toxicidade. Podendo resultar em uma nova opção de tratamento a ser oferecida aos pacientes acometidos com DII, desta forma propondo uma mudança de paradigma nas imunoterapias.

OBJETIVOS

Elaborar um arcabouço metodológico para produção de anticorpos anti-TNF e anti-CD3 pela bactéria *Zymomonas mobilis*, e testar seu efeito no modelo murino de colite ulcerativa experimental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- . Desenho e síntese de genes correspondentes aos anticorpos monoclonais recombinantes: anti-TNF scFv, anti-CD3 FvFc e anti-CD3 scFv;
- . Preparação de vetores para expressão heteróloga;
- . Avaliação da bactéria *Zymomonas mobilis* como hospedeiro para a expressão dos anticorpos monoclonais recombinantes;
- . Avaliação da *Z. mobilis* como probiótico no modelo de colite experimental
- . Avaliação dos efeitos da administração oral da *Z. mobilis* contendo os vetores para a expressão dos anticorpos anti-TNF scFv e do anti-CD3 scFv no modelo de colite ulcerativa experimental induzida por DSS;

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. LINHAGENS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

1.1 *Escherichia coli*

As linhagens de *E. coli* DH5 α e JM110 foram cultivadas em meio Luria-Bertani – LB (peptona de caseína 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,0) e, quando necessário, o meio foi suplementado com 20 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Seu crescimento foi realizado em *shaker*, sob agitação de 150-200 rpm a 37 °C durante a noite. Para semeaduras em meio sólido, foi utilizado o meio LB ágar (1,5% p/v) e as placas de cultura foram incubadas em estufa a 37 °C durante a noite.

- **DH5 α** : F- /endA1 hsdR17(rk- mk+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nalr) relA1 D(lacIZYA-argF)U169 deoR (F80dlacD(lacZ)M15).
- **JM110**: rpsL (Strr) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIq Z Δ M15]

1.2 *Zymomonas mobilis*

As linhagens de *Zymomonas mobilis* foram cultivadas em meio RM (glicose 2%, extrato de levedura 1%, NH₄SO₄ 0,1%, MgSO₄ 0,1%, KH₂PO₄ 0,2%) e, quando necessário, o meio foi suplementado com 100 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Seu crescimento foi realizado em *shaker*, sob agitação de 100 rpm a 30 °C durante a noite. Para semeaduras em meio sólido foi utilizado o meio RM ágar (1,5% p/v), e quando necessário, o meio foi suplementado com 100 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol. As placas de cultura foram incubadas em estufa a 30 °C durante a noite.

- ***Zymomonas mobilis***: ZM4 – ATCC 31821

2. PREPARAÇÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO

2.1 POR CHOQUE TÉRMICO (CLORETO DE CÁLCIO - CaCl₂) - Adaptado de SAMBROOK et al., 2001

Para a preparação do pré-inóculo, colônias isoladas de cada linhagem de *E. coli* (DH5 α e JM110) foram semeadas em 5 mL de meio LB e incubadas a 37 °C durante

a noite sob agitação a 250 rpm. Em seguida, 1 mL desse pré-inóculo foi adicionado a 100 mL de meio LB e incubado a 37 °C e 250 rpm até atingir uma densidade óptica (OD_{600}) de 0,2 a 0,3. As células foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 10 mL de $CaCl_2$ (100 mM) estéril e gelado. Em seguida, as células foram submetidas a uma nova centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 1 mL de $CaCl_2$ gelado e incubado em banho de gelo-água por pelo menos 1 hora.

Uma alíquota de célula termo competente previamente preparada foi incubada com 100-500 ng do DNA plasmidial de interesse em banho de gelo-água por 30 minutos. Após este período, as células foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 3 minutos e incubadas novamente no gelo. Posteriormente, foram adicionados 900 μ L de meio LB às células submetidas ao choque térmico, que foram incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação de 250rpm. Em seguida, as células foram semeadas em placas contendo meio LB-ágar, suplementadas com o antibiótico cloranfenicol (100 μ g/mL) e incubadas a 37 °C durante a noite.

2.2 POR ELETROPORAÇÃO

Uma colônia isolada de *Zymomonas mobilis* – ZM4 foi inoculada em 5 mL de meio RM (pré-inóculo), sem antibiótico e incubada a 30 °C durante a noite sob agitação a 100 rpm. Em seguida, 1 mL desse pré-inóculo foi adicionado a 50 mL de meio RM, incubado a 30 °C sob agitação de 100 rpm até atingir uma OD_{600} de 0,3 a 0,4. As células foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 10 mL de glicerol 10% (v/v) gelado.

Em seguida, as células foram submetidas a uma nova centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado com glicerol 10%. As células eletrocompetentes foram aliqüotadas em 100 μ L para cada amostra a ser transformada. Para o choque elétrico, as células foram incubadas com 2 μ g do DNA plasmidial de interesse por 30 minutos no gelo e em seguida submetidas ao choque em cubetas de eletroporação de 0,2 cm (BioRad, Hercules, CA, EUA) nas seguintes condições: 200 ohms, 25 μ F e 2,5 kV no eletroporador Gene Pulser Xcell (BioRad, Hercules, CA, EUA). Imediatamente após o choque elétrico, as células foram

recuperadas com 1 mL de meio RM e incubadas a 30 °C, sob agitação de 100 rpm durante a noite. Posteriormente, as células foram semeadas em placas contendo meio RM-ágar com o antibiótico cloranfenicol (100 µg/mL) e incubadas na estufa a 30 °C.

2.3 CONFIRMAÇÃO DAS TRANSFORMAÇÕES

A extração do DNA plasmidial das células DH5α foi realizada em pequena escala com o kit QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha) e das células JM110 em média escala com o kit QIAprep Spin Midiprep (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. A confirmação da transformação por eletroporação em *Z. mobilis* foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) de colônia.

3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM COLÔNIA

Após o crescimento das colônias de *Z. mobilis* em placas com meio RM-ágar suplementado com o antibiótico cloranfenicol (100 µg/mL) e incubadas na estufa a 30°C, foram selecionadas 15 delas para a realização da PCR. Essas colônias foram retiradas da placa com auxílio de ponteiras, que foram colocadas e lavadas em *eppendorfs* contendo 10 µl de água. O restante do material presente nessas ponteiras, foi semeado em uma nova placa com identificação das colônias (placa de *grid*) e incubada em estufa a 30 °C para crescimento. Os *eppendorfs* contendo a suspensão das colônias bacterianas, foram fervidos a 100 °C por 10 minutos e um volume de 1µl dessa suspensão foi utilizado para as reações de PCR.

Os sistemas de PCR foram montados para um volume final de 25 µl, com os seguintes componentes: 1 µl das colônias bacterianas fervidas em água; 0,2 µM de cada *primer* (Tabela 1); 0,2 mM da solução de dNTPs; tampão de PCR para uma concentração final de 1x; e Taq DNA Polimerase 1U (Taq High Fidelity POL 106M – Cellco, São Carlos, SP, Brasil). Os ciclos de amplificação foram realizados no termociclador Veriti (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA). A amplificação foi executada por 35 ciclos onde o DNA foi desnaturado a 95 °C por 30 segundos, anelado a 60 °C por 30 segundos e alongado a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos.

Tabela 1. Sequência de *primers* para PCR de colônia

ALVO	PRIMERS	TAMANHO AMPLICON (pb)
pBR1MR ANTI-CD3 FvFc	F: GCCTCTTTGGGTGATCGTGT R: TGGTATAAACCTGCGGGGTC	694 pb
pBR1MR ANTI-CD3 OMP scFv	F: CCATCCTATGGCAGCCGATT R: AGAAGACGGAGACTGGGTCA	838 pb
pBR1MR ANTI-TNF scFv	F: ATTGGGTTTCGTCAGTCTCCG R: AACCATTGGTACGCTGCTGA	426 pb

Os *primers* foram sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies) e diluídos para uma concentração de 100µM em água Mili-Q.

4. DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

A digestão do DNA plasmidial foi realizada para confirmação da transformação dos vetores de interesse (pBR1MR anti-CD3 FvFc, pBR1MR anti-CD3 OMP scFv e pBR1MR anti-TNF scFv). Aproximadamente 1 µg do DNA plasmidial foi incubado com as enzimas de restrição HindIII, BglII e/ou NdeI (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA), com o tampão adequado de acordo com as instruções do fabricante. O sistema foi incubado a 37 °C por aproximadamente 3 horas. Após esse período, as digestões foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

5. ANÁLISE DE FRAGMENTOS DE DNA EM GEL DE AGAROSE

A agarose foi preparada numa concentração de 0,8% em tampão tris-acetato – TAE 1x (Tris Base 40 mM; ácido acético glacial 20 mM; EDTA 10 mM pH 8,0) e corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). As amostras de DNA plasmidial, produtos de amplificação e fragmentos de digestão com enzimas de restrição foram aplicadas com o tampão de amostra azul de bromofenol (Tris 100 mM pH 6.8; azul de bromofenol 0,05%; glicerol 10%) e submetidas à eletroforese, como descrito por (SAMBROOK E RUSSEL, 2001). A visualização do DNA foi realizada com o auxílio de um transluminador E-Gel Imager (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). As amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop One (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

6. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DOS ANTICORPOS RECOMBINANTES

Após a confirmação das transformações, foi preparado um pré-inóculo contendo as colônias portando os plasmídeos de interesse. Dessa forma, uma colônia de cada construção foi inoculada em 5 mL de meio RM com cloranfenicol (100 µg/mL) e crescidas a 30 °C ou 37 °C durante a noite. Em seguida, um volume determinado do pré-inóculo foi adicionado a 50 mL de meio RM, para uma OD₆₀₀ final de 0,2 e incubado a 30 °C ou 37 °C sob agitação (100 rpm) por 96 horas. A cada 24 horas, um dos frascos com os inóculos era retirado do *shaker* e as células coletadas por centrifugação a 5.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante das culturas foi separado e concentrado com o sistema Amicon Stirred Ultrafiltration Cell (Millipore, Burlington, MA, EUA) com uma membrana de ultrafiltração com poro de 10 kDa (Millipore, Burlington, MA, EUA) para um volume final de 200 µL. Uma fração das células centrifugadas foi ressuspensa em tampão PBS 1x (NaCl 150 mM, NaHPO₄ 10 mM, pH 7,4) e posteriormente, analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida.

7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Para a detecção da expressão dos fragmentos dos anticorpos de interesse, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (separador 12% e concentrador 5%) em condições desnaturantes e redutoras (Acrilamida/Bis 19:1, 40%; [Ambion, Austin, TX, EUA]). As amostras foram misturadas com um tampão de amostra (Tris-HCl 100 mM pH 6,8; SDS 2%; β-mercaptoetanol 2%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,05%), fervidas a 100 °C por 10 minutos para desnaturação das proteínas e mantidas no gelo até aplicação no gel. A corrida foi realizada em 100 V, com tampão de corrida (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%). Como marcador de massa molecular, foram utilizados: BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) ou Blueeye Prestained Protein Ladder (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ou PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

Após a corrida o gel foi corado com uma solução corante (azul brilhante de Coomassie G250 0,25%; metanol 30%; ácido acético glacial 7%) por duas horas e descorado com solução descorante (metanol 30%; ácido acético glacial 7%). Ou corado com prata, onde o gel é fixado com 30 mL de uma solução (acetona 50%, 1,5 mL TCA 50% e 25 µL de formaldeído 37%), agitado por 5 minutos e em seguida,

lavado com água MilliQ pelo mesmo tempo. Em seguida, o gel é incubado por 5 minutos com 30 mL de acetona 50%, que é descartada após essa incubação e é adicionado 30 mL de uma solução contendo 100 µL de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 10% em 30 mL de água MilliQ por 1 minuto. Posteriormente, o gel é lavado com água MilliQ por 3 vezes, por 1 minuto e em seguida, incubado com uma solução contendo 800 µL de nitrato de prata (AgNO_3) e 600 µL de formaldeído 37% em 30 mL de água por 8 minutos para coloração do gel. Decorrido esse tempo, o gel é novamente lavado com água MilliQ por 3 vezes de um minuto cada, e revelado com solução contendo 1,2 g carbonato de sódio (Na_2CO_2), 25 µL formaldeído 37% e 25 µL tiosulfato de sódio 10% em 30 mL água MilliQ. O gel foi mantido sob agitação nessa solução até o aparecimento das bandas, seguido do descarte da solução de revelação e adição da solução de parada, que consiste em ácido acético glacial 1% diluído em água. Em seguida, a solução de parada foi descartada e o gel lavado com água.

8. WESTERNE E DOT-BLOT: IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS

Após a corrida eletroforética das proteínas em gel de poliacrilamida, essas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham, Reino Unido) com o auxílio sistema de transferência semi-seco Multiphor II (Amersham, Reino Unido), utilizando tampão de transferência 1X (Tris base 0,58%, Glicina-HCl 0,29%, SDS 0,037%, Metanol 20%, pH 8,3). As condições de transferência foram 150 mA e voltagem máxima de 10 V por aproximadamente 45 minutos. Em seguida, a membrana contendo as proteínas, foi incubada em solução de bloqueio (leite desnatado 5% em PBST - NaCl 150 mM, NaHPO_4 10 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,4) por 1 hora a temperatura ambiente. Passado esse tempo, a membrana foi lavada três vezes com a solução PBST e incubada com anticorpo primário anti-HA produzido em camundongo (Santa Cruz Biotechnology, TX, EUA) na diluição de 1:1000 em PBST por 1 hora, sob agitação a temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, novamente a membrana foi lavada 3 vezes com PBST e incubada por 1 horas sob agitação a temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em bovino e conjugado com a enzima fosfatase alcalina (Santa Cruz Biotechnology, TX, EUA) na diluição de 1:2000. Por fim, a membrana foi lavada 3 vezes com PBST e incubada com tampão da enzima fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl_2 5 mM) à temperatura ambiente por 10 minutos. Para revelar as bandas

protéicas, foi utilizada a solução de substrato da fosfatase alcalina, NBT-BCIP (Roche, Basel, Suíça).

Para a realização da técnica de *dot blot*, 5 µL das amostras de interesse foram pipetadas na membrana de nitrocelulose (Amersham, Reino Unido) que em seguida foi bloqueada, incubada com os anticorpos de interesse para posterior revelação, como descrito anteriormente na técnica de *western blot*.

9. RECUPERAÇÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO – Adaptado de BRIGIDO, 1992

Um clone de *Z. mobilis* transformado com o plasmídeo pBR1MR anti-CD3 scFv ou pBR1MR anti-CD3 FvFc foi crescido em meio RM suplementado com cloranfenicol (100 µg/mL) durante a noite. Decorrido este tempo, foi realizado um inóculo para uma OD₆₀₀ final de 0,2 em 50 mL de meio RM contendo cloranfenicol (100 µg/mL). Após 24 horas de crescimento, a cultura foi centrifugada a 5.000 x g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuscitado com 1/20 do volume inicial da cultura em tampão de protoplasto (20% sacarose; Tris-HCl 30 mM pH 8; EDTA 1 mM). Em seguida, o sedimento foi processado no sonicador no processador ultra-sônico Q700 (QSONICA, Newtown, Connecticut, EUA) em três ciclos com uma amplitude de 50, com pulsos de 15 segundos e intervalos de 1 minuto. Durante todo o processo de sonicação, as células foram mantidas no gelo, para evitar superaquecimento. Em seguida, as células foram centrifugadas a 14.000 x g por 45 minutos a 4 °C para separação da fração solúvel (sobrenadante) da fração insolúvel (sedimento). O sedimento foi ressuscitado em tampão de protoplasto (adicionado de 2 mg/mL de lisozima) e incubado no gelo por 30 minutos. Após esse período foi adicionado MgCl₂ 10 mM; MnCl₂ 1 mM e DNase I 10 µg/mL e o sedimento novamente incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Logo após foram adicionados 2 volumes de tampão detergente (NaCl 0,2 M; 1% ácido deoxicólico; 1% NP-40 (v/v); Tris 20 mM pH 7,5 e EDTA 2 mM) e o sedimento foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida essa mistura foi centrifugada a 8.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento foi lavado 3 vezes (0,5% Triton X-100; EDTA 1 mM) e centrifugado a 7.000 x g por 10 minutos. O sedimento final, de coloração branca, representa os corpos de inclusão que contém a proteína recombinante parcialmente

purificada. Esse sedimento foi ressuspenso em solução contendo guanidina 6M; arginina 0,4 M; EDTA 2 mM e Tris 0,1 M pH 8,4 e analisado em gel de poliacrilamida.

10. PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-TNF scFv

Para a purificação, um clone de *Z. mobilis* transformado com o plasmídeo pBR1MR anti-TNF scFv foi crescido em 5 mL de meio RM suplementado com cloranfenicol (100 µg/mL) durante a noite. Decorrido este tempo, foi realizado um inóculo para uma OD₆₀₀ final de 0,2 em 400 mL de meio RM contendo cloranfenicol (100 µg/mL). Após 24 horas, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante concentrado utilizando o concentrador Amicon Stirred Ultrafiltration Cell (Millipore, Burlington, MA, EUA) com uma membrana de ultrafiltração de 10 kDa (Millipore, Burlington, MA, EUA) para um volume final de 5 mL. Posteriormente esse volume foi concentrado novamente com uma coluna Amicon Ultra 10 kDa (Merck, Darmstadt, Alemanha) para um volume final de aproximadamente 450 µL. Para a purificação do anticorpo anti-TNF scFv recombinante fusionado ao peptídeo HA, foi utilizada a resina Pierce® Anti-HA Agarose (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Para uma melhor purificação das amostras protéicas, foi utilizado o equipamento ÄKTA pure (GE, Boston, NY, EUA), com a coluna para exclusão molecular Superdex 200 10/300 GL (GE, Boston, NY, EUA), que permite a separação de proteínas que apresentam massa molecular entre 10 e 600 kDa. Após as purificações utilizando a resina ou o equipamento ÄKTA, as amostras purificadas foram aplicadas em uma membrana de nitrocelulose para análise utilizando a técnica de *dot blot*.

11. ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA – ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

Após a purificação do sobrenadante da cultura de *Z. mobilis* transformada com o plasmídeo pBR1MR anti-TNF scFv, essas amostras foram utilizadas para o ELISA, juntamente com o sobrenadante não purificado. As amostras foram quantificadas pelo método Bradford.

Os poços da placa ELISA Nunc MaxiSorp de fundo plano com 96 poços (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) foram sensibilizados com 150 µL do anticorpo murino anti-HA na concentração de 1 µg/mL (Santa Cruz Biotechnology, TX, EUA) ou com 150 µL do anticorpo Infliximab (Merck, Darmstadt, Alemanha) na concentração de 1

µg/mL para o controle positivo. A placa foi incubada a 4 °C durante a noite. Em seguida os poços foram lavados três vezes com 200 µL de PBST e bloqueados com 200 µL de BSA 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído em PBST por 1 hora a temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, os poços foram novamente lavados por três vezes com PBST e 150 µL das amostras (100 µg/mL) foram pipetadas nos poços ou, no caso dos controles, 150 µL de PBS. A placa foi incubada a 37 °C por 2 horas. Os poços foram lavados com PBST e o TNF biotilado (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) foi adicionado em diferentes diluições e concentrações: 1:60 (1,66 µg/mL), 1:120 (0,83 µg/mL) e 1:240 (0,41 µg/mL) e a placa foi novamente incubada a 37 °C por 2 horas. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com 200 µL de PBST, seguido da adição em cada poço de 150 µL de Streptavidina conjugada a fosfatase alcalina (KLP, Gauthersburg, MD, EUA) diluída 1:250 em TBS (Tris 25mM; NaCl 150 mM). A placa foi incubada a 37° C por 1 hora. Por fim, os poços foram lavados novamente com PBST, e revelados com a adição de 150 µL do substrato pNPP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído no tampão Pierce™ Diethanolamine Substrate Buffer (1X) (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e incubado por 15 minutos. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, LLC, San Jose, CA, EUA) utilizando o comprimento de onda de 405 nm.

12. MICROSCOPIA CONFOCAL

Para a realização da microscopia confocal foi utilizado o equipamento TCS SP5 X (Leica, Wetzlar, Alemanha) com as amostras; *Z. mobilis wild type*, *Z. mobilis* transformada com os plasmídeos pBR1MR anti-CD3 FvFc e anti-CD3 scFv.

Para esse ensaio, clones de *Z. mobilis wild type* e transformada com os plasmídeos pBR1MR anti-CD3 FvFc e anti-CD3 scFv foram crescidos em meio RM suplementado com cloranfenicol (100 µg/mL) ou não (*Z. mobilis wild type*), durante a noite. Decorrido este tempo, foi realizado um inóculo para uma OD₆₀₀ final de 0,2 em 50 mL de meio RM contendo cloranfenicol (100 µg/mL) ou não. Após atingir uma OD de 4,3 que corresponde a $1,2 \times 10^8$ UFC/mL em 24 horas de crescimento, as culturas foram centrifugadas a 5.000 x g por 15 minutos a 4 °C. Os sedimentos foram lavados 5 vezes com PBS, centrifugados por 5 minutos a 1.500 x g e os sobrenadantes descartados. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e

incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse tempo, 5 novas lavagens com PBS foram realizadas e as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1.500 x g e os sobrenadantes descartados. As células foram permeabilizadas com uma solução de 0,5% Triton X-100; EDTA 1mM em PBS e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Após esse tempo, foram realizadas 5 lavagens com PBS e posteriormente as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1.500 x g, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram ressuspensos em 50 µL de PBS.

As três amostras de *Z. mobilis* foram marcadas com o anticorpo anti-HA conjugado com FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), com DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ou não marcadas. Assim, as células marcadas com o anticorpo anti-HA conjugado com FITC foram incubadas com ele na concentração de 1 µg/mL, por 1 hora a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS e centrifugadas por 5 minutos a 1.500 x g. As células foram marcadas com DAPI por 15 minutos ao abrigo da luz e foram novamente lavadas 3 vezes com PBS e centrifugadas por 5 minutos a 1.500 x g. As lâminas foram preparadas e lidas no microscópio confocal.

13. ENSAIO COM AS LINHAGENS RECOMBINANTES DE *Z. mobilis* ANTI-TNF scFv E *Z. mobilis* ANTI-CD3 scFv EM MODELO ANIMAL DE COLITE

13.1 PREPARO E ADMINISTRAÇÃO DA BACTÉRIA *Z. mobilis*

Para os ensaios *in vivo*, foram preparadas quantidades estabelecidas de microrganismos (doses) que foram administradas aos animais em diferentes momentos. Para o preparo das doses, foi necessário inicialmente estabelecer uma relação entre o número de unidades formadoras de colônias (UFC) e a OD₆₀₀ de crescimento da *Z. mobilis*. Para isso, colônias de *Z. mobilis* anti-TNF scFv, *Z. mobilis* wild type e *Z. mobilis* anti-CD3 OMP scFv foram semeadas em meio RM sem ou com cloranfenicol (100 µg/mL) e mantidas sob agitação de 100 rpm a 30 °C durante a noite. Após o crescimento, foram feitos inóculos para uma OD₆₀₀ de 0,2 em diferentes frascos contendo 50 mL de meio RM em cada um e incubados por 96 horas. A cada 24 horas, foi retirada uma amostra e realizadas diluições em 10 ou 1000 vezes. Um volume de 50 µL foi posteriormente semeado em placas com meio RM ágar sem ou

com cloranfenicol (100 µg/mL) e crescidas a 30 °C por 48 horas. A contagem das colônias foi realizada de forma visual e utilizou-se a seguinte fórmula para o cálculo do número de colônias viáveis: número de colônias x fator de diluição / volume (mL) plaqueado. A quantidade considerada ideal para a produção das doses foi de 5×10^8 – 5×10^9 UFC/mL.

Realizada essa análise inicial, para o preparo das doses, colônias de *Z. mobilis* anti-TNF scFv, *Z. mobilis wild type* e *Z. mobilis* anti-CD3 OMP scFv foram inoculadas em 5 mL meio RM sem ou com cloranfenicol (100 µg/mL) e crescidas sob agitação de 100 rpm a 30 °C durante a noite. Após o crescimento, foram feitos inóculos para uma OD₆₀₀ de 0,2 em diferentes volumes de meio RM de acordo com o que foi observado anteriormente. Estes crescimentos foram monitorados até atingirem as OD₆₀₀ específicas para cada amostra (valores estimados pela contagem de UFC), centrifugados a 5000 x g, 4 °C por 10 minutos, ressuspensos em solução de glicerol 25% estéril e armazenados em freezer -80 °C. Para a administração das doses, as alíquotas estocadas foram descongeladas e centrifugadas a 5000 x g, 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as bactérias foram ressuspensas em 100 µL de salina estéril que foram administradas via intragástrica utilizando a técnica de gavagem. Para controle do número de UFC por dose, foi realizado o plaqueamento das doses em dias alternados nas diluições 10^{-3} e 10^{-5} .

As doses foram preparadas para que cada animal recebesse em cada tratamento um volume de 100 µL de salina com uma concentração de células entre 5×10^8 a 5×10^9 UFC/dia.

13.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais utilizados para o experimento, foram camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com 10 semanas, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, São Paulo, Brasil). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB) com o número de protocolo 78/2018. Todos os procedimentos e manipulações com os animais obedeceram aos Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/ICB-UnB/Brasil). Três semanas antes do início do experimento, os camundongos passaram pelo processo de *co-housing*, no qual uma vez por semana,

os animais foram misturados aleatoriamente nas gaiolas para que todos apresentassem uma microbiota semelhante. Os animais do mesmo grupo experimental foram alojados em gaiola única, em sala com temperatura controlada (25°C), ciclo claro/escuro de 12 horas e acesso *ad libitum* a ração balanceada para roedores proveniente do biotério da UnB e água. O consumo de líquidos foi monitorado e todos os grupos consumiram volumes semelhantes de líquido, equivalente a uma média de ± 5 mL de líquido por camundongo/dia.

13.2.1 TESTE *IN VIVO* COM *Z. mobilis* ANTI-TNF scFV

O experimento *in vivo* com a bactéria *Z. mobilis* transformada com o plasmídeo pBR1MR anti-TNF scFv foi composto por 4 grupos com 4 ou 6 camundongos em cada e teve duração de 15 dias. Os grupos foram divididos da seguinte forma:

- 1) grupo não tratado – controle negativo (**NT**) [n=4]
- 2) grupo controle positivo para colite (**DSS**) [n=4]
- 3) grupo colite experimental mais *Z. mobilis wild type* (**DZWT**) [n=4]
- 4) grupo colite experimental mais *Z. mobilis* anti-TNF scFv (**DZTNF**) [n=6].

Os grupos DZWT e DZTNF receberam 100 μ L de dose de *Z. mobilis* que corresponde a aproximadamente 5×10^9 UFC/dia, uma vez ao dia por gavagem oral, enquanto os grupos NT e DSS foram administrados com 100 μ L de solução salina estéril.

Para indução de colite aguda, *Dextran Sulfate Sodium Salt* – DSS (MP Biomedical, Irvine, CA, EUA) com faixa de peso molecular de 36.000 - 50.000 e concentração inicial de 2% (p/v) foi adicionado à água dos animais dos grupos DSS, DZWT e DZTNF durante os primeiros quatro dias do experimento. No entanto, os animais não apresentaram nenhum dos sinais macroscópicos de colite (perda de peso, alteração na consistência das fezes e sangramento retal), e devido a isso a concentração de DSS foi aumentada para 3% nos 10 dias restantes. A partir do nono dia, os animais receberam por meio de gavagem, 100 μ L de salina (grupos NT e DSS) ou 100 μ L de *Z. mobilis* (DZWT ou DZTNF). No 15º dia todos os animais foram eutanasiados pela administração de uma dose letal dos anestésicos Ketamina (300 mg) e Xilazina (30 mg) (Figura 2). O cólon foi coletado para extração de RNA e mantido em solução de estabilização RNAlater (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

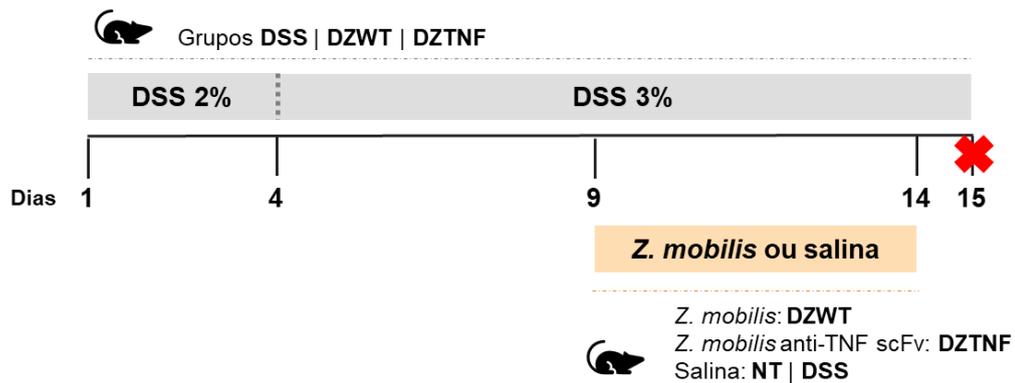


Figura 2. Cronograma do experimento *in vivo* com *Z. mobilis* anti-TNF scFv. Nos dias 1 a 4 os animais dos grupos DSS, DZWT e DZTNF ingeriram água filtrada contendo 2% de DSS. A partir do dia 5 a concentração do DSS foi aumentada para 3% para os mesmos grupos. No dia 9 iniciou-se a gavagem nos animais, onde os grupos NT e DSS receberam salina e os grupos DZWT e DZTNF receberam doses de diferentes amostras de *Z. mobilis*. No dia 15 todos os animais foram eutanasiados (representado pelo X em vermelho).

13.2.2 TESTE *IN VIVO* COM *Z. mobilis* ANTI-CD3 scFv

O experimento *in vivo* com a bactéria *Z. mobilis* transformada com o plasmídeo pBR1MR anti-CD3 scFv foi composto por 6 grupos com 6 ou 8 camundongos em cada e durou 10 dias. Os grupos foram divididos da seguinte forma:

- 1) grupo não tratado – controle negativo (**NT**) [n=6]
- 2) grupo controle positivo para colite (**DSS**) [n=6]
- 3) grupo experimental *Z. mobilis wild type* (**ZWT**) [n=6]
- 4) grupo experimental *Z. mobilis* anti-CD3 scFv OMP (**ZOMP**) [n=6]
- 5) grupo colite experimental mais *Z. mobilis wild type* (**DZWT**) [n=6]
- 6) grupo colite experimental mais *Z. mobilis* anti-CD3 scFv OMP (**DZOMP**) [n=8]

Os grupos ZWT, ZOMP, DZWT e DZOMP receberam uma dose de 100 µL de *Z. mobilis* que corresponde a aproximadamente 5×10^9 UFC/dia, uma vez ao dia por gavagem oral, enquanto os grupos NT e DSS foram administrados com 100 µL de solução salina estéril.

A colite aguda foi induzida com o DSS (MP Biomedical, Irvine, CA, EUA) na faixa de peso molecular de 36.000 - 50.000 e concentração 3% (p/v), adicionado à água dos animais dos grupos DSS, DZWT e DZOMP durante os primeiros cinco dias do experimento seguido de ingestão de água sem DSS. Os grupos NT, ZWT e ZOMP consumiram água sem DSS durante todo o período (Figura 3).

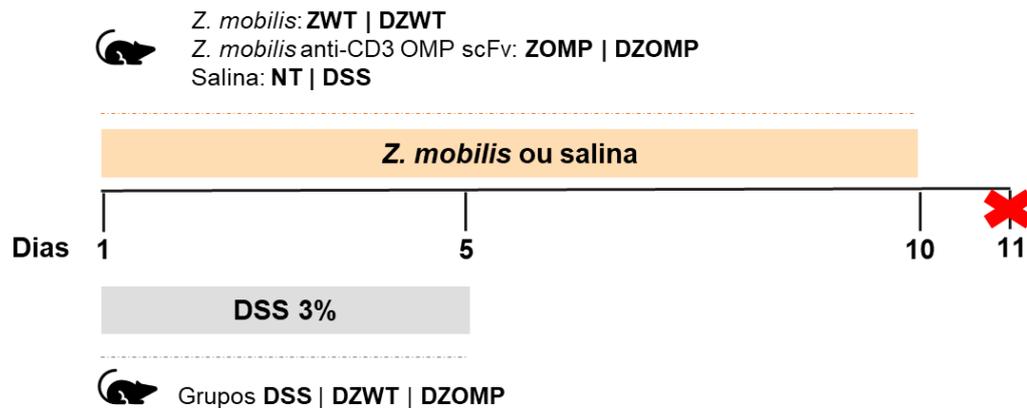


Figura 3. Cronograma do experimento *in vivo* com *Z. mobilis* anti-CD3 scFv OMP. Nos dias 1 a 5 os animais dos grupos DSS, DZWT e DZOMP ingeriram água filtrada contendo 3% de DSS. A partir do dia 5 até o dia 10, o DSS foi suspenso. Durante os 10 dias do experimento os grupos NT, DSS, ZWT e ZOMP receberam salina por gavagem e o restante dos grupos receberam doses de diferentes amostras de *Z. mobilis*. No dia 11 todos os animais foram eutanasiados (representado pelo X em vermelho).

O peso dos camundongos foi registrado ao longo do experimento, e foram coletadas amostras fecais nos dias 5 e 10 e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até análise. A eutanásia foi realizada com administração de dose letal dos anestésicos Ketamina (300 mg) e Xilazina (30 mg) no último dia do experimento (dia 11). O cólon foi coletado e dividido em duas partes, uma para extração de RNA (mantida em solução de estabilização RNAlater (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e outra para avaliação histológica (mantida em paraformaldeído 10%).

13.3 ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA

Os parâmetros macroscópicos da colite induzida por DSS foram determinados por meio do índice de atividade da doença (do inglês, *disease activity index* - DAI), como descrito por COOPER et al., 1993. Esse índice estipula valores (*score*) para perda de peso corporal (0, nenhuma; 1, perda de 1–5%; 2, perda de 5–10%; 3, perda de 10–20%; e 4, perda > 20%), consistência das fezes (0, normal; 2, fezes moles e 4, diarreia) e sangramento retal (0, ausente; 2, moderado e 4, grave), como mostra a Tabela 2. Esses valores são somados e divididos por 3 (número de variáveis analisadas). A perda de peso foi definida como a diferença entre o peso inicial e final. A consistência das fezes e o sangramento retal foram determinados por avaliação visual diária dos animais. O peso e comprimento do cólon foram avaliados após a eutanásia dos animais.

Tabela 2. Índice de atividade da Doença (DAI)

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

13.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Amostras de cólon foram coletadas e fixadas em paraformaldeído 10%, embebidas em parafina, e os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (H&E). As análises histológicas foram realizadas considerando alterações morfológicas nos seguintes parâmetros: infiltrado de células inflamatórias em termos de gravidade e extensão; alterações epiteliais, que incluem graus de hiperplasia, perda de células calciformes, criptite, abscesso de cripta e erosão; danos na arquitetura da mucosa, como ulceração, presença de criptas irregulares e perda de criptas (Tabela 3). As pontuações foram atribuídas com adaptações, conforme descrito anteriormente por ERBEN et al., 2014.

Tabela 3. Critérios para análise histopatológica

INFILTRADO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS	SEVERIDADE	SCORE
	Mínimo <10%	1
	Médio 10-25%	2
	Moderado 26-50%	3
	Intenso >51%	4
EXTENSÃO	SCORE	
	Mucosa	1
	Mucosa e submucosa	2
	Mucosa, submucosa e transmural	3
ALTERAÇÕES EPITELIAIS	HIPERPLASIA	SCORE
	Mínimo	1
	Médio	2

	Moderado	3
	Intenso	4
	PERDA DE CÉLULAS GOBLET	SCORE
	Mínimo	1
	Médio	2
	Moderado	3
	Intenso	4
	CRIPTITE	SCORE
		2
	ABSCESSO DE CRIPTA	SCORE
		3-5
	EROSÃO	SCORE
		1-4
ARQUITETURA DA MUCOSA	ULCERAÇÃO	SCORE
		3-5
	CRIPTAS IRREGULARES	SCORE
		4
	PERDA DE CRIPTAS	SCORE
		4

13.5 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E ENSAIOS DE PCR EM TEMPO REAL

A fração do cólon intestinal que foi preservada em solução estabilizante de RNA, RNAlater (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), foi transferida para um tubo contendo o reagente QIAzol (QIAGEN, Hilden, Alemanha) e macerados no equipamento TissueLyser LT (QIAGEN, Hilden, Alemanha) para rompimento do tecido. A extração do RNA total das amostras foi realizada com o kit RNeasy® Protect Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo as orientações do fabricante. Para eliminar uma possível contaminação com DNA genômico das amostras de RNA, utilizou-se a enzima TURBO™ DNase (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). As quantificações das amostras de RNA foram realizadas em espectrofotômetro

Nanodrop One (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Para a produção do cDNA das amostras do cólon foi utilizado aproximadamente 1 µg de RNA total, com o kit RT² First Strand Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha) ou SuperScript™ III (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), seguindo as instruções determinadas pelo fabricante.

Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados em duplicata, utilizando o kit LightCycler® RNA Master SYBR Green I (Roche, Basel, Suíça) no equipamento ABI Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA). A expressão relativa de mRNA foi normalizada a partir da expressão do gene endógeno Beta-2-Microglobulina (*B2m*), e o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi utilizado para calcular os níveis de transcrição. Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Sequências dos primers utilizados para PCR em tempo real

Gene	Sequência	Gene	Sequência
<i>B2m</i>	F: TGCTATCCAGAAAACCCCTCA R: TTTCAATGTGAGGCGGGTGG	<i>Il23</i>	F: CAGCTCTCTCGGAATCTCTGC R: GATCCTTTGCAAGCAGAAGCTGG
<i>Muc3</i>	F: CGTGGTCAACTGCGAGAATGG R: CGGCTCTATCTCTACGCTCTC	<i>Stat6</i>	F: GGATTCAGATTTGGAAGCGGC R: AATTTCCACCAGGCTTTTCACAC
<i>Ocln</i>	F: ATGACATGTATGGCGGAGAG R: ATAGCCTCTGTCCCAAGCAA	<i>Foxp3</i>	F: ACTCGCATGTTTCGCCTACTT R: AGGGATTGGAGCACTTGTTG
<i>Il6</i>	F: GCCTTCTTGGGACTGATGCT R: TGCCATTGCACAACCTTTTTCT	<i>Il10</i>	F: GGTTGCCAAGCCTTATCGGA R: GAGAAATCGATGACAGCGCC
<i>Tnf</i>	F: GTAGCCCACGTCGTAGCAAA R: ACAAGGTACAACCCATCGGC	<i>Tgfb</i>	F: CTGACGTCACTGGAGTTGTACGG R: GGTTTCATGTCATGGATGGTGC
<i>Rorc</i>	F: TGCAAGACTCATCGACAAGG R: AGGGGATTCAACATCAGTGC	<i>Il5</i>	F: CTCTGTTGACAAGCAATGAGACG R: TCTTCAGTATGTCTAGCCCCTG
<i>Il1b</i>	F: TGCCACCTTTTGACAGTGATG R: TGTGCTGCTGCGAGATTTGA	<i>Stat5</i>	F: CACTCCTGTACTTGGTTCGTCA R: CCAGGTCAAACCTCGCCATCT
<i>Il22</i>	F: GCTCAGCTCCTGTACATCA R: CAGTTCCCAATCGCCTTGA	<i>Stat3</i>	F: CTGCCCCGTACCTGAAGAC R: AACGTGAGCGACTCAAACCTG
<i>Ifng</i>	F: AAGTTTGAGGTCAACAACCCAC R: AATCTCTTCCCCACCCCGAA	<i>Nos2</i>	F: GGTGAAGGGACTGAGCTGTT R: ACGTTCTCCGTTCTCTTGCGAG
<i>Gata3</i>	F: TTTACCCTCCGGCTTCATCCTCCT R: TGCACCTGATACTTGAGGCACTCT	<i>Maf</i>	F: GGATGGCTTCAGAACTGGCA R: AACATATTCCATGGCCAGGG
<i>Il17</i>	F: TTTAACTCCCTTGCGCAAAA R: CTTTCCCTCCGCATTGACAC		

Os dados são expressos como média ± erro padrão da média. Todas as análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism versão 6.0 (La Jolla, CA, EUA) utilizando o teste de Mann-Whitney. Os valores *p* da PCR em tempo real foram calculados com base no teste *t de Student* usando o software RT² Profiler PCR Array

Data Analysis (Qiagen, Hilden, Alemanha) e foram considerados significativos quando $<0,05$.

13.6 MICROBIOMA

Durante o segundo experimento *in vivo* foram coletadas fezes nos dias 5 e 10 de todos os animais para verificar a ocorrência de alterações no perfil da diversidade microbiana dos grupos e não apenas individualmente. Para isso foi realizado um *pool* com essas amostras de cada grupo nos dias estabelecidos. O DNA bacteriano total do *pool* de fezes foi extraído com o kit de isolamento de DNA de fezes GenElute™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A região V3-V4 do gene do RNA ribossômico 16S foi sequenciada gerando *paired-end raw reads* de 250 pb usando a plataforma HiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA) da empresa GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brasil).

As *paired-end reads* foram mescladas usando a ferramenta computacional FLASH (V1.2.7) (MAGOČ; SALZBERG, 2011). A filtragem de qualidade nas *tags* brutas foi realizada para obter *tags* limpas de alta qualidade de acordo com a plataforma QIIME (V1.7.0) (BOKULICH et al., 2013; CAPORASO et al., 2010). As *tags* foram comparadas com o banco de dados de referência SILVA 138 usando o algoritmo UCHIME para detectar e remover sequências quimeras (EDGAR et al., 2011; HAAS et al., 2011; QUAST et al., 2013). As *tags* efetivas foram finalmente obtidas e a análise das sequências foi realizada pelo *software* Uparse (EDGAR, 2013). Sequências com similaridade $\geq 97\%$ foram atribuídas às mesmas OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais). Para obter a relação filogenética de todas as sequências representativas das OTUs, foi utilizado o *software* MUSCLE (V3.8.31) (EDGAR, 2004). A riqueza e equabilidade de espécies (diversidade alfa) foram medidas usando os índices Chao1 e Shannon, e a diversidade beta foi calculada com a plataforma QIIME. O mapa de calor foi plotado usando SRPLOT (www.bioinformatics.com.cn/en) e o PCA *plot* (www.statskingdom.com/pca-calculator.html). Os dados brutos de sequenciamento foram carregados no banco de dados NCBI Sequence Read Archive (SRA) sob o número BioProject PRJNA997586.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO

Três vetores de expressão foram construídos a partir do vetor pBR1MR (RUBINI, dados não publicados), adaptado dos vetores da série pBBR1MCS (KOVACH et al., 1995) que contém as regiões do promotor e terminador do gene piruvato descarboxilase (PDC) da bactéria *Zymomonas mobilis* e o gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol (CmR). Todas as construções possuem o cassete gênico fusionado a um peptídeo (YPYDVPDYAS) derivado da hemoaglutinina (HA-Tag) do Influenza vírus, inserida *downstream* à sequência dos anticorpos, para ser utilizada em ensaios de imunodeteção das proteínas recombinantes.

Os vetores pBR1MR anti-TNF scFv e pBR1MR anti-CD3 FvFc possuem um peptídeo sinal de fosfatase alcalina (phoD) nativo de *Z. mobilis* (WU et al., 2014) para a secreção desses anticorpos no meio extracelular. Todos os fragmentos foram sintetizados e ligados ao vetor pBR1MR pela empresa Genone (Rio de Janeiro, RJ).

Para a construção do gene sintético do anticorpo anti-TNF, no formato de fragmento variável de cadeia única (scFv), foi utilizada a sequência da porção variável do anticorpo comercial Remicade® (Infliximab). O vetor pBR1MR anti-TNF scFv possui um tamanho de 6.281pb e a porção a ser expressa corresponde ao gene que codifica o anticorpo anti-TNF (878pb), posicionado entre as enzimas de restrição HindIII e BglIII. *Primers* foram sintetizados (Tabela 1) para confirmação da clonagem do gene no vetor, pela amplificação de um fragmento de 386pb que corresponde à parte intermediária do gene (Figura 4). A proteína produzida pelo gene anti-TNF scFv corresponde a aproximadamente 25,57 kDa.

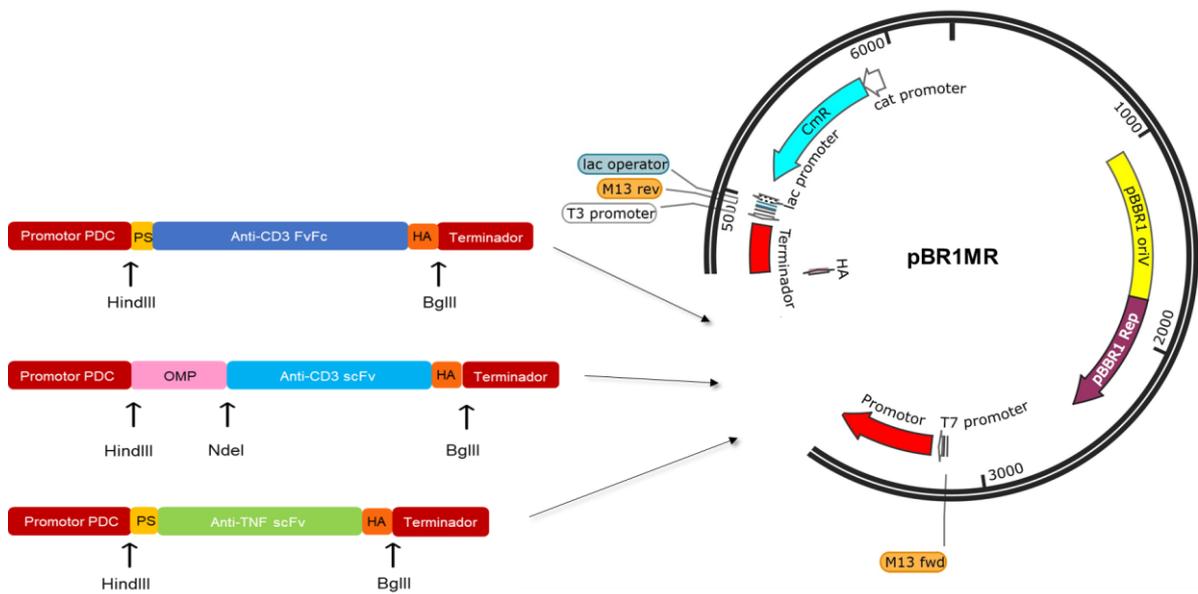


Figura 4. Representação esquemática do vetor de expressão pBR1MR e cassetes gênicos. Regiões correspondentes aos cassetes de expressão formados pelas regiões do promotor e terminador do gene PDC (vermelho), peptídeo sinal do gene phoD (amarelo), gene anti-CD3 FvFc (azul escuro), gene anti-CD3 scFv (azul claro), OMP (rosa), gene anti-TNF scFv (verde), sequência codificadora de um peptídeo derivado da hemoaglutinina (HA) do Influenza vírus (alaranjado) e os sítios de restrição para as enzimas HindIII, NdeI e BglIII indicados pelas setas.

Para o anticorpo anti-CD3 FvFc foi utilizado como molde a porção variável e o Fc da sequência do anticorpo monoclonal murino 145-2c11. Os domínios proteicos foram fusionados *in silico* considerando uma adaptação de códons para expressão em *Zymomonas mobilis* (ZM4). O vetor pBR1MR anti-CD3 FvFc possui um tamanho de 6.962pb e a porção a ser expressa corresponde ao anticorpo anti-CD3 no formato FvFc (1.559pb), posicionado entre as enzimas de restrição HindIII e BglIII. *Primers* foram sintetizados (Tabela 1) para a confirmação da clonagem do gene no vetor e a sequência a ser amplificada corresponde a um fragmento de 654pb (Figura 4). A proteína produzida pelo gene anti-CD3 FvFc corresponde a 49,53 kDa.

Por fim, para a construção do vetor pBR1MR anti-CD3 scFv foi utilizada a porção variável do anticorpo monoclonal murino 145-2c11 fusionado a uma proteína de ancoragem conhecida como OMP (do inglês, *outer membrane protein*) da bactéria *Z. mobilis* (HE; FENG; ZHANG, 2008). O vetor pBR1MR anti-CD3 scFv possui um tamanho de 6.791pb e a porção a ser expressa corresponde ao anticorpo anti-CD3 no formato scFv (785pb), posicionado entre as enzimas de restrição NdeI e BglIII.

Esse vetor possui uma sequência de DNA de 597pb que corresponde a um fragmento do gene que codifica a proteína de ancoragem OMP da bactéria *Z. mobilis*. Esta, quando fusionada a proteína anti-CD3 scFv, deve direcioná-la para o ancoramento na membrana externa da célula. A região do gene correspondente ao anticorpo anti-CD3 scFv somada a região do gene correspondente a OMP, corresponde a 1.382pb. *Primers* foram sintetizados (Tabela 1) para a confirmação da clonagem do gene no vetor, e a sequência a ser amplificada corresponde a um fragmento de 798pb. A proteína produzida pelo gene anti-CD3 scFv, corresponde a aproximadamente 28,9 kDa (Figura 4).

2. CLONAGEM

A bactéria *Zymomonas mobilis* possui um padrão diferencial de metilação que pode interferir no processo de reconhecimento de plasmídeos não nativos. Esse microrganismo apresenta um sistema de defesa ativo de restrição-modificação (R-M) de DNA dos tipos I e IV que degrada DNA exógeno levando a baixas taxas de transformação (ZOU et al., 2012).

Neste sentido, para manter a integridade dos plasmídeos introduzidos na *Z. mobilis*, é necessário retirar o padrão de metilação que foi adicionado por outros hospedeiros utilizados para a propagação dos vetores. Sendo assim, o processo de transformação na *Z. mobilis* é precedido por duas etapas de transformação em outras bactérias gram negativas: DH5 α para a propagação plasmidial e a JM110 para desmetilação do DNA (BRAGA et al., 2021).

Após a transformação por choque térmico na bactéria DH5 α , o DNA plasmidial foi extraído, e a clonagem confirmada por digestão enzimática com as enzimas HindIII, BglII e NdeI. Dois clones de cada transformação foram digeridos para análise (Figura 5). Para o vetor pBR1MR anti-CD3 FvFc, a digestão foi realizada com as enzimas HindIII e BglII, que liberaram um fragmento de 1.559pb correspondente à sequência codificadora do anticorpo anti-CD3 FvFc.

Para o vetor pBR1MR anti-CD3 scFv, foram realizadas duas digestões distintas. A primeira com as enzimas HindIII e BglII, para a liberação de um fragmento de 1.382pb correspondente à sequência codificadora do anticorpo anti-CD3 scFv somado à sequência da OMP; e a segunda digestão foi realizada com as enzimas HindIII e NdeI, que liberaram a sequência correspondente à OMP, com o tamanho de 597pb.

Para o vetor pBR1MR anti-TNF scFv, a digestão foi realizada com as enzimas HindIII e BglII, que liberaram um fragmento de 878pb correspondente à sequência codificadora do anticorpo anti-TNF scFv.

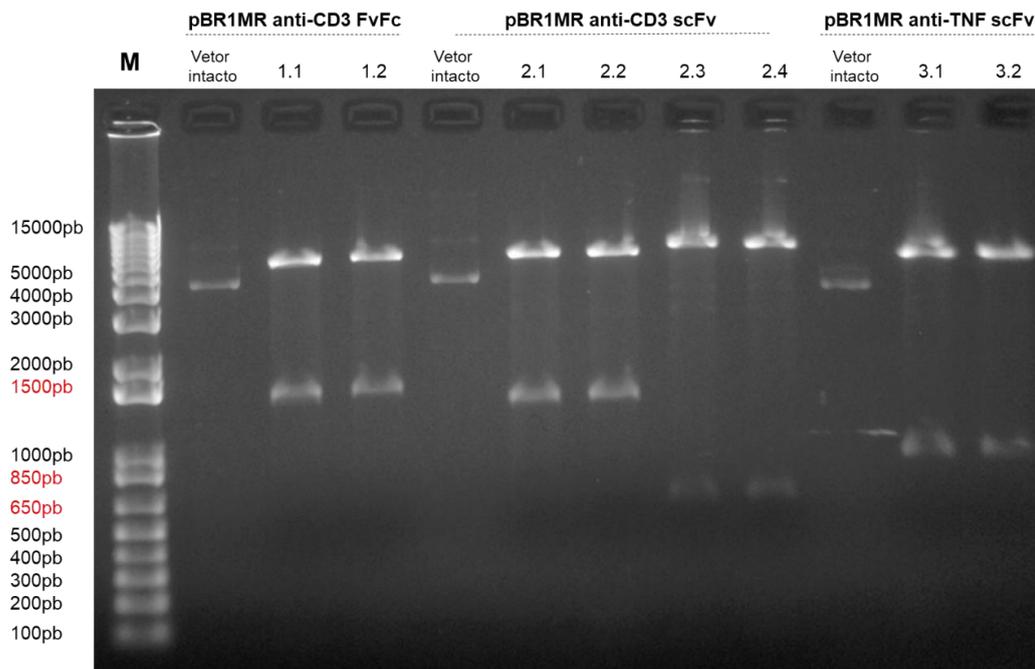


Figura 5. Digestão enzimática dos plasmídeos pBR1MR anti-CD3 FvFc, anti-CD3 scFv e anti-TNF scFv transformados em DH5α. Os fragmentos digeridos foram analisados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,3 µg/mL). Amostra vetor pBR1MP anti-CD3 FvFc intacto; amostras **1.1** e **1.2**: clones digeridos com as enzimas HindIII e BglII. Amostra vetor pBR1MP anti-CD3 scFv intacto; amostras **2.1** e **2.2**: clones digeridos com as enzimas HindIII e BglII; amostras **2.3** e **2.4**: clones digeridos com as enzimas HindIII e NdeI. Amostra vetor pBR1MP anti-TNF scFv intacto; amostras **3.1** e **3.2**: clones digeridos com as enzimas HindIII e BglII. **M**: Marcador de massa molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Após a confirmação inicial do perfil de restrição enzimático, os plasmídeos foram transformados na bactéria JM110, para a remoção do padrão de metilação adicionado pela bactéria DH5α uma vez que a JM110 é deficiente nas metilases Dam e Dcm. Esse passo é necessário para a transformação e manutenção da integridade do plasmídeo em *Z. mobilis*, uma vez que esta bactéria restringe plasmídeos com padrões distintos de metilação (Figura 6).

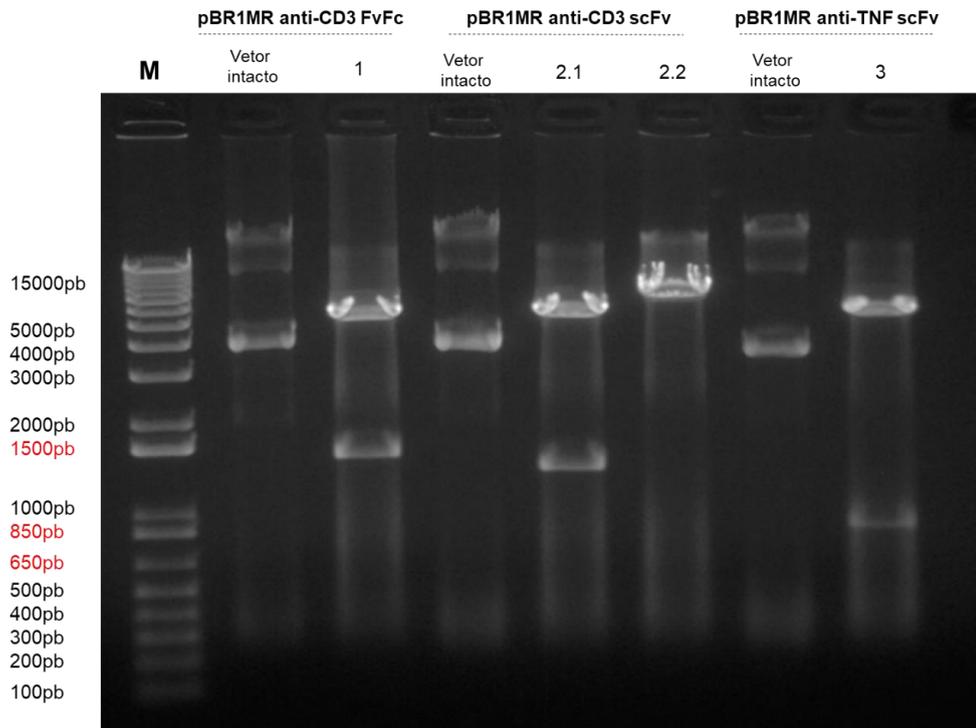


Figura 6. Digestão enzimática dos plasmídeos pBR1MR anti-CD3 FvFc, anti-CD3 scFv e anti-TNF scFv transformados em JM110. Os fragmentos digeridos foram analisados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,3 µg/mL). Amostra vetor pBR1MP anti-CD3 FvFc intacto; amostra **1**: clone digerido com as enzimas HindIII e BglII. Amostra vetor pBR1MP anti-CD3 scFv intacto; amostra **2.1**: clone digerido com as enzimas HindIII e BglII; amostra **2.2**: clone digeridos com as enzimas HindIII e NdeI. Amostra vetor pBR1MP anti-TNF scFv intacto; amostra **3**: clone digerido com as enzimas HindIII e BglII. **M**: Marcador de massa molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

A partir da confirmação do perfil de restrição após a passagem em JM110, foi realizada a transformação dos plasmídeos por eletroporação em *Zymomonas mobilis*. Para a confirmação da transformação em *Z. mobilis*, foi realizada uma PCR com *primers* específicos (Tabela 1) para os genes de interesse: anti-CD3 FvFc (654pb), anti-CD3 scFv (798pb) e anti-TNF scFv (386pb) (Figura 7).

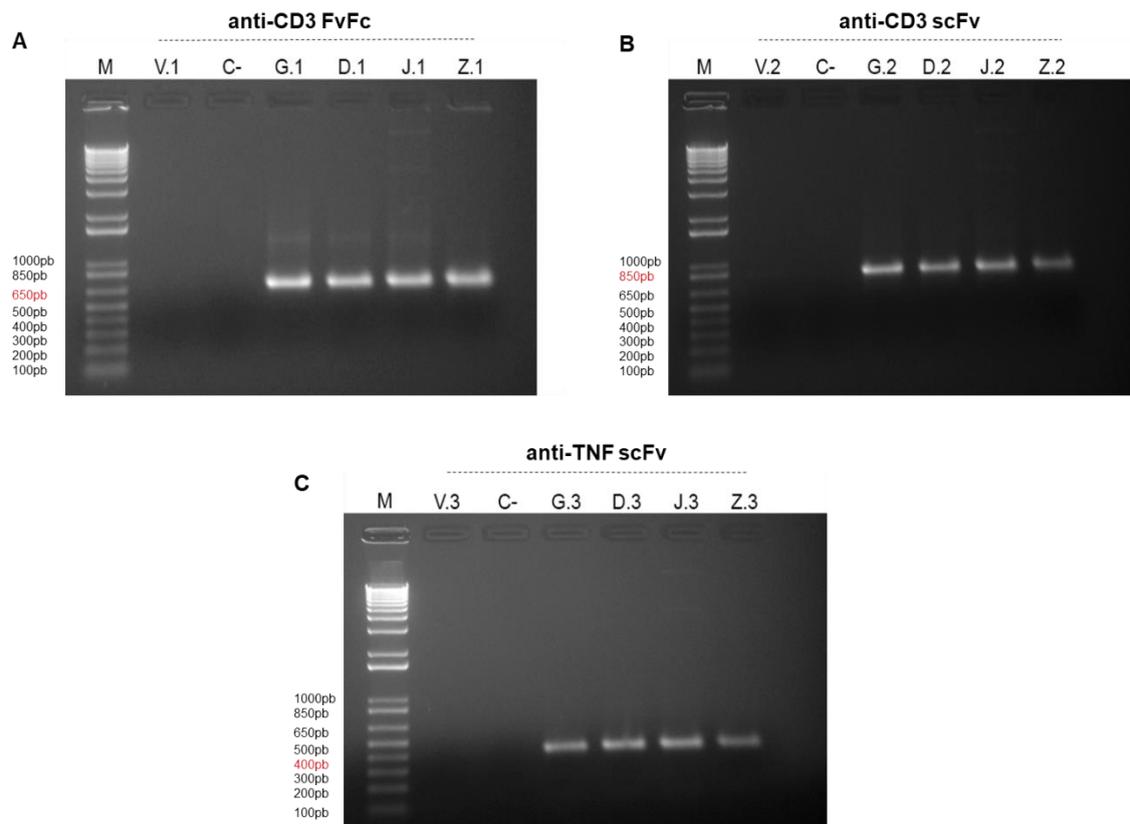


Figura 7. Amplificação de fragmentos por PCR. Os amplicons foram analisados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,3 µg/mL). **A:** Amostras transformadas com o vetor pBR1MR anti-CD3 FvFc e fragmentos amplificados com *primers* específicos para a região do gene. Tamanho do amplicon: 654pb. **B:** Amostras transformadas com o vetor pBR1MR anti-CD3 scFv e fragmentos amplificados com *primers* específicos para a região do gene. Tamanho do amplicon: 798pb. **C:** Amostras transformadas com o vetor pBR1MR anti-TNF scFv e fragmentos amplificados com *primers* específicos para a região do gene. Tamanho do amplicon: 386pb. **M:** Marcador de massa molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen). **V:** representa o vetor vazio de *Zymomonas mobilis*, **C:** controle negativo (sem DNA), **G:** genes sintéticos, **D:** transformações em DH5α, **J:** transformações em JM110 e **Z:** transformações em *Zymomonas mobilis*.

Como a *Z. mobilis* possui quatro plasmídeos nativos (pZM32, pZM33, pZM36 e pZM39) (YANG et al., 2018), a extração do DNA plasmidial não apresentaria apenas os plasmídeos de interesse e sim uma mistura dos plasmídeos naturais e dos transformados. Assim, a digestão enzimática originaria um perfil de restrição complexo, não sendo possível avaliar e confirmar a clonagem dos plasmídeos de interesse e por este motivo, foi utilizada a técnica de PCR.

3. CURVAS DE CRESCIMENTO E EXPRESSÃO

Confirmada a inserção dos plasmídeos em *Zymomonas mobilis*, o passo seguinte foi verificar a capacidade desses transformantes para a produção e secreção no meio de cultivo dos anticorpos de interesse. Dos clones avaliados como positivos,

um de cada construção foi selecionado para dar continuidade aos experimentos. Para isso, foi realizado o crescimento desses clones em meio RM por 96 horas e amostras foram coletadas a cada 24 horas. A partir da coleta dessas amostras, a OD₆₀₀ foi medida e produzida uma curva de crescimento para determinar a fase exponencial e o melhor tempo de produção das proteínas de interesse.

Foram testadas as temperaturas de 30 °C, temperatura ótima de crescimento da *Z. mobilis* e 37 °C, para verificar se haveria alguma modificação no perfil de expressão das proteínas no TGI dos camundongos para os ensaios *in vivo*. Além da temperatura, também foi testado o crescimento na presença e ausência do antibiótico cloranfenicol. Como controle foi utilizada a *Z. mobilis* transformada com o vetor vazio.

A Figura 8A representa a curva de crescimento dos clones positivos de *Z. mobilis* transformados com os diferentes plasmídeos sem e com a suplementação do antibiótico cloranfenicol (100 µg/mL). Pela análise dos dados, foi possível observar uma flutuação nos valores obtidos pela OD₆₀₀ durante as 96 horas de incubação, que atingiu seu ápice em todas as amostras em 72 horas, independente da adição do antibiótico.

Além da curva de crescimento, também foi realizada uma curva de expressão das proteínas crescidas a 30 °C, em meio RM suplementado com o antibiótico cloranfenicol (100 µg/mL). Amostras foram coletadas a cada 24 horas (Figura 8B). Para a detecção das proteínas de interesse por *western blot*, as culturas foram centrifugadas e o sobrenadante das amostras *Z. mobilis* anti-CD3 FvFc e anti-TNF scFv foram utilizados, já que apresentam um peptídeo sinal que direciona a secreção dessas proteínas para o meio de cultivo. Para a análise da amostra *Z. mobilis* anti-CD3 scFv foi utilizado o *pellet* do crescimento pós centrifugação, uma vez que esse anticorpo apresenta uma proteína de ancoramento direcionada para a membrana da bactéria e não de endereçamento para o meio de cultivo.

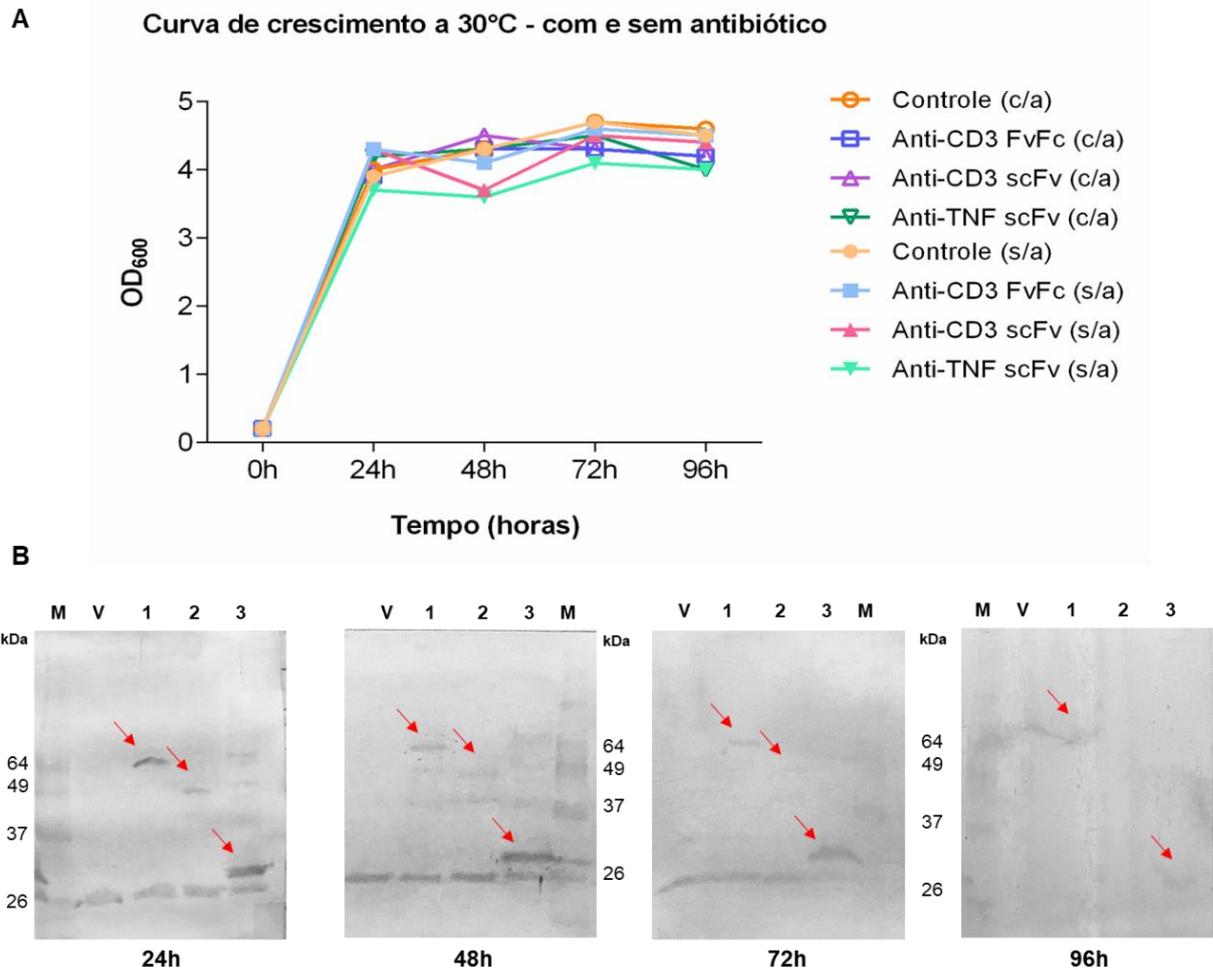


Figura 8. Curva de crescimento e expressão a 30 °C. **A:** Gráfico representativo da curva de crescimento da *Z. mobilis* a 30 °C na presença do antibiótico cloranfenicol - 100 µg/mL (c/a) ou ausência (s/a), relacionando o tempo de crescimento em horas com a OD₆₀₀. **B.** *Westerns blot* representativos da expressão dos anticorpos no sobrenadante de cultura e pellet nos diferentes tempos. As setas vermelhas apontam para as bandas correspondentes ao tamanho estimado dos anticorpos. **V:** *Z. mobilis* transformada com o vetor vazio; **1:** anti-CD3 FvFc (49,53 kDa), **2:** anti-CD3 scFv (gene 28,9 kDa + 21 kDa OMP: 50 kDa); **3:** anti-TNF scFv (25,57 kDa). **M:** Marcador BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder Plus (Invitrogen).

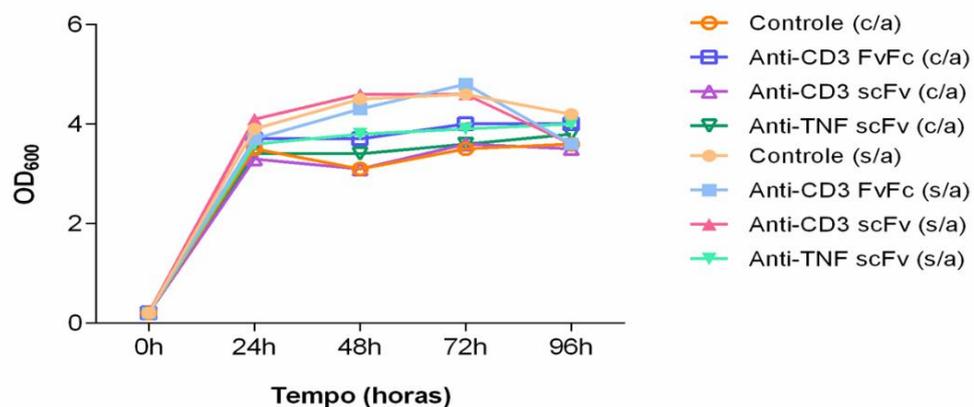
Somado à análise da cinética de crescimento, foi avaliado o perfil de produção de proteínas pela técnica de *western blot*. Pela análise dos dados obtidos, observou-se que a maior produção ocorreu nas primeiras 24 horas de incubação, quando se visualiza bandas mais definidas sugestiva das proteínas de interesse expressas no sobrenadante para os clones anti-CD3 FvFc e anti-TNF scFv e no *pellet*, para o clone anti-CD3 scFv. A partir de 72 horas há uma diminuição na expressão proteica de todos os clones e em 96 horas, a detecção dessas proteínas é mínima (Figura 8B).

Confirmado o crescimento e expressão das proteínas no sobrenadante e pellet a 30 °C, a etapa seguinte consistiu na avaliação da produção dos anticorpos a 37 °C,

visto que é a temperatura corporal aproximada dos camundongos (35 °C a 37 °C), para os testes *in vivo*. Para isso, os clones contendo os plasmídeos transformados anteriormente foram crescidos a 37 °C por 96 horas em meio RM sem ou com a suplementação do antibiótico cloranfenicol (100 µg/mL) (Figura 9A).

Pela análise da curva de crescimento a 37 °C, observa-se que independente da suplementação com o antibiótico, o pico de crescimento foi em 72 horas, assim como observado nos crescimentos a 30 °C. A produção e expressão das proteínas das amostras crescidas a 37 °C com a suplementação do antibiótico cloranfenicol (100 µg/mL) foi avaliada por um período de 96 horas conforme descrito anteriormente (Figura 9B).

A Curva de crescimento a 37°C - com e sem antibiótico



B

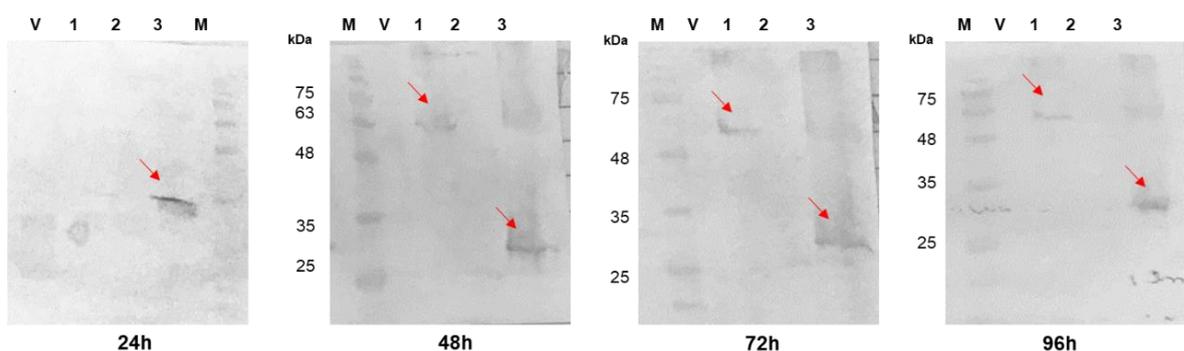


Figura 9. Curva de crescimento e expressão a 37 °C. A: Gráfico representativo da curva de crescimento da *Z. mobilis* a 37 °C na presença do antibiótico cloranfenicol - 100 µg/mL (c/a) e ausência (s/a), relacionando o tempo de crescimento em horas com a OD₆₀₀. **B.** *Westerns blot* representativos a expressão dos anticorpos no sobrenadante de cultura e pellet nos diferentes tempos. As setas vermelhas apontam para as bandas correspondentes ao tamanho estimado dos anticorpos. **V:** *Z. mobilis* transformada com o vetor vazio; **1:** anti-CD3 FvFc (49,53 kDa), **2:** anti-CD3 scFv (gene 28,9 kDa + 21 kDa OMP: 50 kDa); **3:** anti-TNF scFv (25,57 kDa). **M:** Marcador BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder Plus (Invitrogen).

Com a avaliação dos dados relativos à expressão das proteínas de interesse, foi possível constatar que a proteína anti-TNF scFv iniciou sua expressão nas primeiras 24 horas de cultivo, perdurando até o final do experimento em 96 horas (Figura 9B). Já a expressão da proteína anti-CD3 FvFc ocorreu a partir de 48 horas do início da cultura celular.

O vetor anti-CD3 scFv, foi desenhado para que a proteína produzida por ele se ligasse à membrana da célula por intermédio da OMP. Desta forma, nos testes que utilizam este vetor, o surgimento desse anticorpo no meio de cultivo não é esperado.

Contraopondo os achados entre os cultivos de 30 °C e 37 °C, foi possível identificar esta proteína no *pellet* do meio de cultivo crescido a 30 °C, mas não a 37 °C. Pelo teste de imunodeteção (*western blot*), verificou-se a existência de uma proteína com o tamanho aproximado de 49 kDa, que corresponde ao tamanho do anticorpo somado a OMP, apenas nos crescimentos a 30 °C.

4. ANTICORPO ANTI-TNF scFv

4.1. PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-TNF scFv E ELISA

Com o intuito de avaliar a ligação do anticorpo anti-TNF ao antígeno de interesse, a citocina TNF, foi realizada a purificação desse anticorpo. Para isso, a purificação do anticorpo anti-TNF scFv recombinante que está ligado ao peptídeo HA foi realizada utilizando a resina Pierce® Anti-HA Agarose (Thermo Scientific) e o produto da purificação foi analisado pela técnica de *western blot*, para verificar a eficiência da purificação destas moléculas (Figura 10).

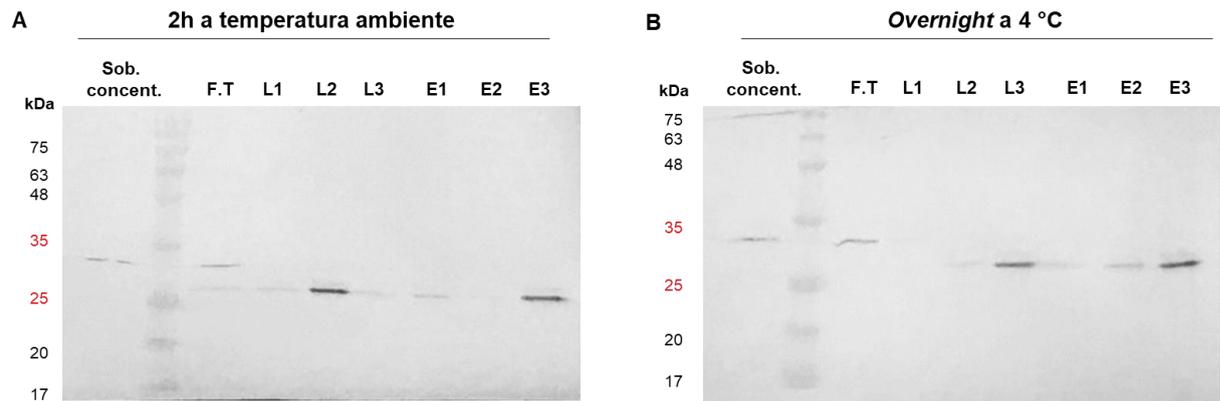


Figura 10. Purificação do anticorpo anti-TNF scFv. **A:** *Western blot* da purificação realizada por 2 horas a temperatura ambiente. **B:** *Western blot* da purificação realizada durante a noite a 4°C. **Sob.c:** amostra do sobrenadante concentrado sem purificar; **F.T:** Flow through; **L1:** primeira lavagem; **L2:** segunda lavagem; **L3:** terceira lavagem; **E1:** primeira eluição; **E2:** segunda eluição; **E3:** terceira eluição. **M:** marcador BLUeye Prestained Protein Ladder (Sigma-Aldrich).

O gene para a produção do anticorpo anti-TNF scFv corresponde a 878pb e, quando ligada ao peptídeo sinal, produz uma proteína com uma massa de 31 kDa. Considerando o modelo de secreção baseado em peptídeo sinal, o tamanho esperado para a proteína secretada (após a clivagem do peptídeo sinal) seria de 25,57 kDa. Pela análise dos resultados obtidos, foi encontrada uma proteína com o perfil esperado de massa molecular de aproximadamente 26 kDa, após o processo de purificação e análise por *western blot*.

Em análises anteriores quando utilizado o sobrenadante concentrado, mas não purificado dos crescimentos celulares, foi possível visualizar bandas com tamanho de aproximadamente 31 kDa, diferente do esperado, que corresponde a proteína somada ao peptídeo sinal não clivado. Esse fato pode sugerir que uma fração das células poderia ter se rompido em cultura, até mesmo durante o processo de centrifugação contaminando o sobrenadante do meio de cultivo.

Visando uma melhor purificação das amostras proteicas, foi utilizado o equipamento ÄKTA pure (GE), com a coluna para exclusão molecular Superdex 200 10/300 GL (GE), que permite a separação de proteínas com massa entre 10 e 600 kDa. Inicialmente a coluna foi calibrada com as proteínas RNase A (13,7 kDa), BSA (66,5 kDa) e Infliximabe (149 kDa), que apresentam pesos moleculares e concentração conhecidas (3 mg/mL). Essas amostras foram utilizadas a fim de avaliar o seu comportamento nesse sistema e definir qual o volume esperado para proteínas com massa de aproximadamente 26 kDa, que corresponde ao anticorpo anti-TNF

scFv de interesse. A Figura 11 representa o cromatograma gerado pela detecção dessas proteínas.

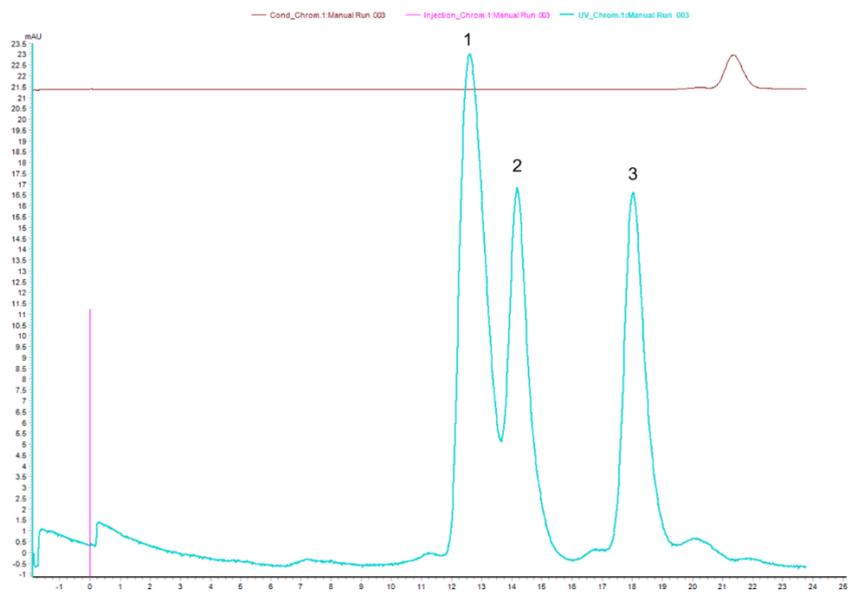


Figura 11. Representação cromatográfica da purificação por exclusão molecular de proteínas comerciais na concentração de 3 mg/mL. 1: Infliximabe (149 kDa) aparece entre as frações de 12 e 13,5 mL; 2: BSA (66,5 kDa) tem seu pico entre 14 e 15ml; 3: RNase A (13,7 kDa) aparece entre as frações de 17 e 19mL.

A partir dessa análise, foi possível observar um padrão de picos para as amostras testadas. Com isso, determinou-se que o volume de coleta esperado para o anticorpo anti-TNF scFv seria entre 15 e 17 mL, pois esse apresenta um tamanho de aproximadamente 26 kDa. Para a obtenção dessa proteína, um clone de *Z. mobilis* transformado com o vetor pBR1MR anti-TNF scFv, foi inoculado em 200 mL de meio de cultivo RM suplementado com antibiótico cloranfenicol (100 µg/mL) e crescido por 24 horas a 30 °C.

Decorrido esse tempo, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante concentrado utilizando o sistema Amicon Stirred Ultrafiltration Cell (Millipore) para um volume final de 100 µL. Esse volume foi utilizado para o processo de purificação no equipamento ÄKTA pure (GE), com a coluna para exclusão molecular Superdex 200 10/300 GL (GE), seguido de análise por *dot blot* (Figura 12).

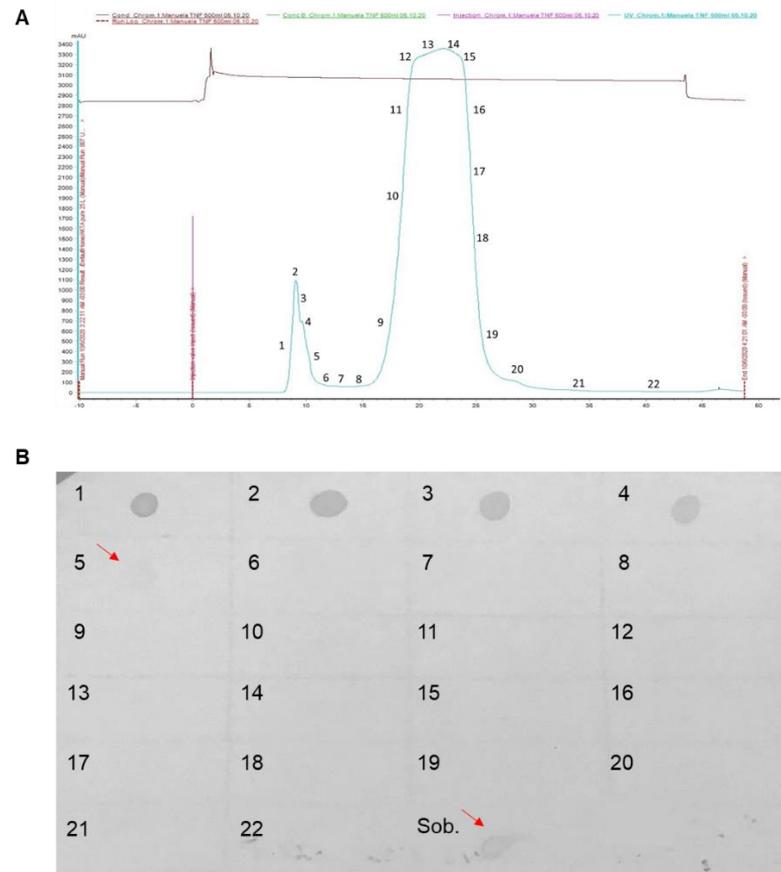


Figura 12. Representação cromatográfica da purificação por exclusão molecular do anti-TNF scFv. A: Cromatograma de purificação do anticorpo anti-TNF scFv pelo equipamento ÄKTA pure; os números correspondem às frações coletadas para análise. **B:** *Dot Blot* das 22 frações coletadas na purificação, **Sob.** Sobrenadante concentrado.

A partir da análise das frações em *dot blot*, observou-se que o anticorpo anti-TNF scFv foi eluído juntamente com as primeiras frações coletadas (1-5 mL) e não na fração esperada entre 15 e 17 mL, como indicou o teste com as proteínas comerciais. Esse fato sugere uma possível agregação desse anticorpo com outras proteínas de maior peso molecular também presentes no sobrenadante.

A agregação do anticorpo com outras proteínas pode afetar sua capacidade de ligação ao antígeno e por isso, algumas estratégias foram utilizadas para a otimização dos cultivos e preparação das amostras para a purificação. O pH do meio de crescimento foi ajustado para 4 ou 8; foi realizado crescimento em meio mínimo enriquecido ou não com aminoácidos; adição de diferentes concentrações de glicerol no sobrenadante concentrado, que também foi filtrado em diferentes centricons (Amicon) com membranas de corte para diferentes pesos moleculares (100, 50 e 30 kDa) a fim de separar os agregados proteicos.

Da mesma forma, para diminuir ou evitar os agregados proteicos, o processo de purificação dessa proteína foi otimizado. Entre as estratégias testadas, a que se mostrou mais promissora foi a adição de glicerol 20% no sobrenadante já concentrado associado a uma incubação a 4 °C por 48 horas antes de ser submetido a purificação como já descrito anteriormente. Com isso, foi observada a fração correspondente ao anticorpo próximo ao ponto ideal de coleta da amostra, sugerindo uma diminuição da agregação desta proteína.

A Figura 13 apresenta os resultados das frações pós purificação que foram previamente incubadas a 4 °C por 24 ou 48 horas, com 20, 25 ou 40% de glicerol.

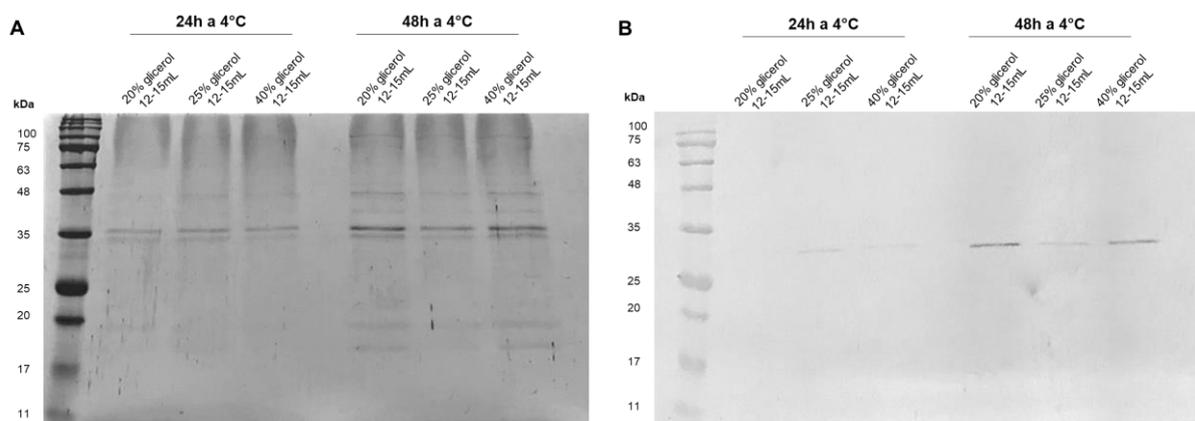


Figura 13. Representação das frações pós purificação no Äkta. Amostras coletadas das frações 12-15 mL, cujo pré-tratamento foi a incubação a 4 °C por 24 ou 48 horas, com 20, 25 ou 40% de glicerol. **A:** Gel de poliacrilamida corado com prata; **B:** *Western blot*. **Marcador:** BLUeye Prestained Protein Ladder (Sigma-Aldrich).

Embora a agregação não tenha sido resolvida em sua totalidade, a adição de glicerol 20% somado à incubação por 48 horas a 4 °C, permitiu uma melhor qualidade e pureza na obtenção da amostra após a exclusão molecular no equipamento ÄKTA pure (GE).

Depois de purificada, as amostras foram utilizadas no ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*). O sobrenadante pré purificação e as frações pós purificação foram quantificados pelo método Bradford. A Figura 14 apresenta o resultado desse ensaio de imunoabsorção.

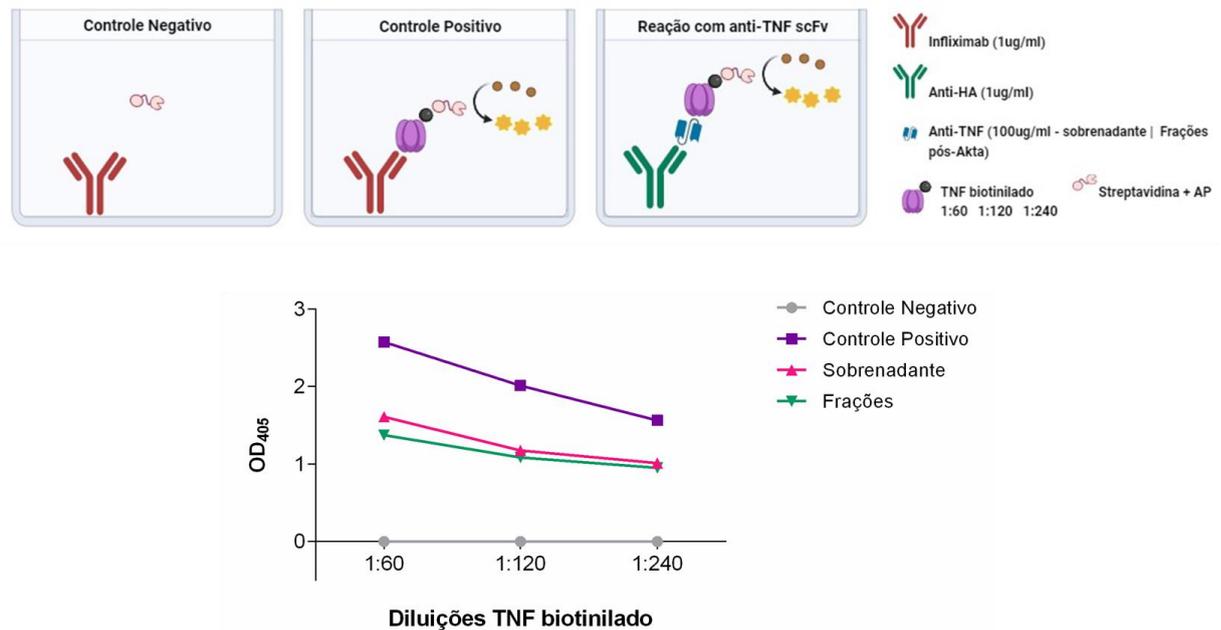


Figura 14. Ensaio de ELISA. A: Representação da metodologia realizada. B: Ensaio de imunoabsorção enzimática com o sobrenadante concentrado não purificado (rosa), frações coletadas pós purificação (verde), controle positivo Infliximabe (roxo) e controle negativo – PBS (cinza).

O anti-TNF scFv, tanto do sobrenadante pré purificação quanto das frações pós purificação, apresentou uma menor ligação ao TNF biotilado, quando comparado ao Infliximab. Esse fato pode ser devido à agregação, uma vez que o sobrenadante sem purificação que apresenta uma maior concentração de impurezas, ligou ao TNF biotilado de forma semelhante às frações pós purificação no Äkta, que teoricamente, são amostras mais puras e menos concentradas de anticorpo. Além disso, a purificação é por exclusão molecular e não por afinidade, o que não garante uma proporção maior da proteína de interesse anti-TNF scFv em relação a outras que possuam o mesmo peso molecular.

Ainda que a ligação do anti-TNF scFv ao antígeno tenha sido reduzida, avaliou-se o perfil de ação desse anticorpo e da bactéria *Z. mobilis* em camundongos, no modelo experimental de colite induzida por DSS.

5. ANTICORPOS ANTI-CD3

5.1. ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-CD3 FvFc

O vetor pBR1MR anti-CD3 FvFc cuja porção a ser expressa corresponde ao anticorpo anti-CD3 no formato FvFc, foi transformado na bactéria *Z. mobilis*, como já mostrado anteriormente. A proteína produzida pelo gene anti-CD3 FvFc corresponde

a 49,53 kDa. Por estar ligada ao peptídeo sinal (phoD) nativo de *Z. mobilis*, espera-se sua secreção para o sobrenadante de cultura.

Para se determinar o melhor tempo de produção e expressão do clone contendo o gene anti-CD3 FvFc, foi crescida uma cultura celular por 96 horas. A cada 24 horas, foi retirada uma alíquota da cultura que foi centrifugada, o sobrenadante reservado e o *pellet* sonificado e posteriormente centrifugado, para separar as frações solúvel e insolúvel. Essas amostras foram aplicadas em dois géis de poliácridamida que foi corado com prata e utilizado para transferência em membrana de nitrocelulose para realização do *western blot* (Figura 15A e B).

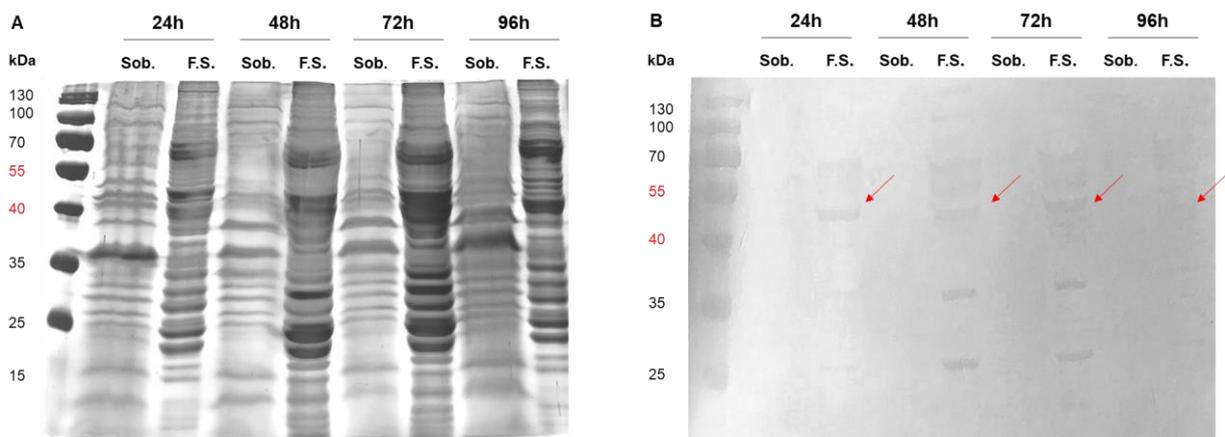


Figura 15. Expressão do anticorpo anti-CD3 FvFc nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. A: Gel de poliácridamida corado com prata representando as proteínas presentes no sobrenadante de cultura (Sob.) e nas frações solúveis (F.S.) obtidas após centrifugação do *pellet* sonificado. **B:** *Western Blot*. **Sob:** sobrenadante da cultura; **F.S:** fração solúvel. **Marcador:** PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Pela análise dos dados apresentados na Figura 15, foi possível observar a presença do anti-CD3 FvFc nas frações solúveis, mas não no sobrenadante, em todos os tempos testados, sugerindo que esse anticorpo não está sendo secretado para o meio de cultivo, sendo mantido no interior ou retido no periplasma da bactéria. Entre as bandas detectadas, as indicadas com setas vermelhas apresentam mobilidade relativa compatível com a massa molecular predita de 49,53 kDa para a proteína recombinante madura. Bandas menores que aparecem principalmente nas amostras de 48 e 72h podem representar produtos de degradação ou mesmo de iniciação espúria.

Para confirmar a presença do anti-CD3 FvFc no periplasma da *Z. mobilis*, foi realizada uma microscopia confocal (Leica) a partir do crescimento celular por 24

horas de um clone portando o cassete anti-CD3 FvFc. Para o experimento de microscopia, foi utilizado aproximadamente 1×10^8 UFC/mL; essas células foram fixadas com paraformaldeído 4%, permeabilizadas com 0,5% Triton X-100 / EDTA 1mM e incubadas com DAPI e anti-HA FITC. A Figura 16 apresenta os resultados obtidos com essa microscopia.

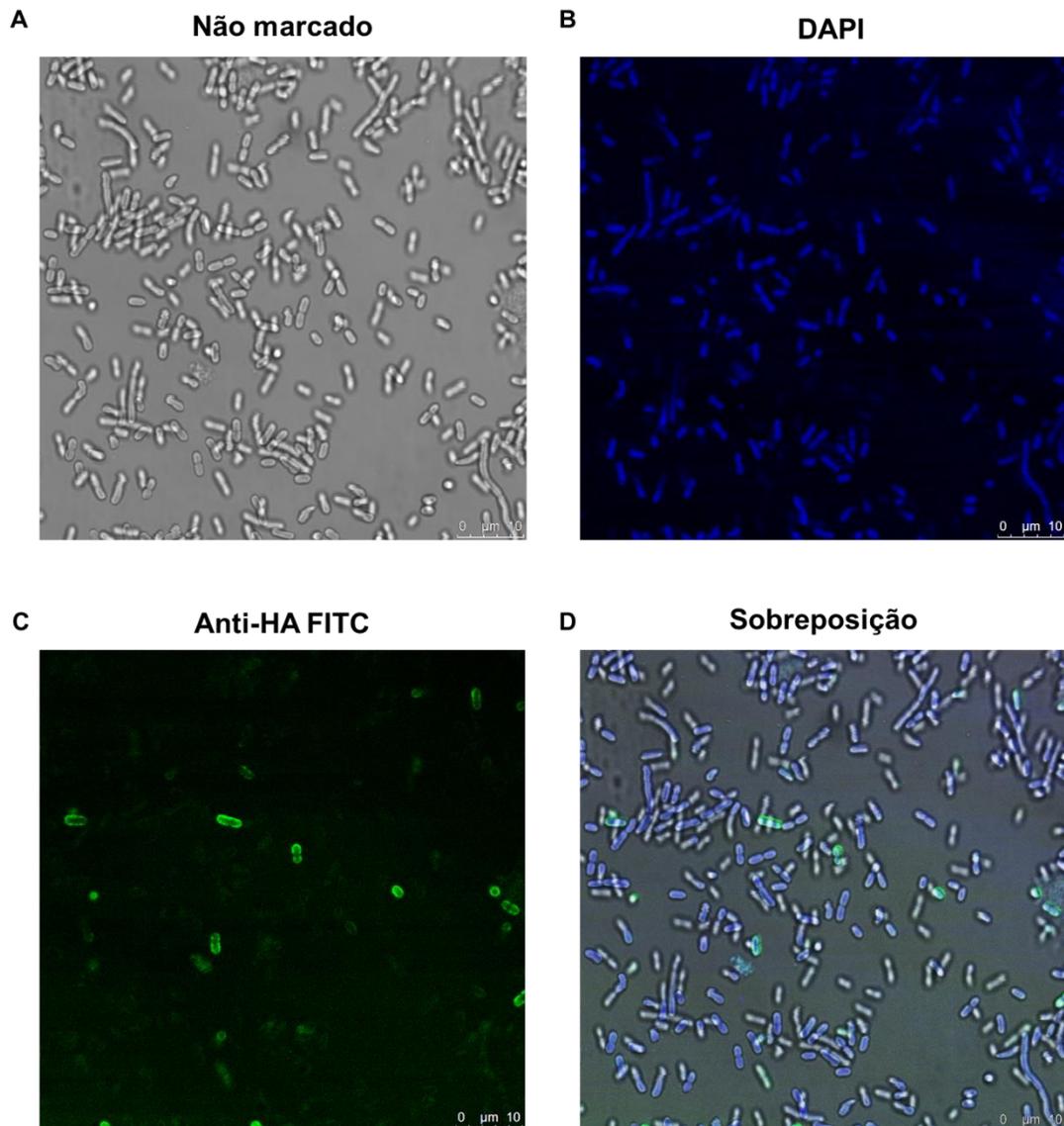


Figura 16. Microscopia confocal da bactéria *Z. mobilis* transformada com o plasmídeo PBR1MR anti-CD3 FvFc. A. Bactéria não marcada. **B.** Bactéria marcada com o fluoróforo DAPI. **C.** Bactéria marcada com o anticorpo anti-HA conjugado com o fluoróforo FITC. **D.** Sobreposição das imagens A, B e C.

O resultado da microscopia confocal apresentado na Figura 16, corrobora com os dados obtidos no *western blot* apresentado na Figura 15, que evidencia uma banda com tamanho compatível com o do peptídeo maduro, normalmente produzido durante

o transporte para o periplasma. Assim, esse experimento sugere que o fragmento de anticorpo anti-CD3 FvFc pode ser corretamente processado e translocado para o espaço periplasmático na bactéria *Z. mobilis*. Reconhece-se assim a capacidade da bactéria *Z. mobilis* de produzir anticorpos recombinantes, porém, o sistema ainda precisa ser otimizado para melhorar a eficiência da produção desses anticorpos no periplasma bacteriano.

Constatada essa baixa secreção no sobrenadante do anti-CD3 FvFc, suspeitou-se que a *Z. mobilis* poderia estar produzindo mais proteína recombinante que a sua capacidade de exportá-la para o meio de cultivo. Possivelmente, isso ocorre pela ação do promotor *pdc*, que é conhecido por apresentar alta atividade transcricional, e a expressão dessas proteínas excede a habilidade da bactéria de gerir modificações pós traducionais e o correto dobramento dessas moléculas, sobrecarregando a maquinaria proteica. Como é sabido em outras bactérias gram negativas, como a *Escherichia coli*, é comum que proteínas recombinantes formem agregados insolúveis no citoplasma da bactéria, conhecido como corpo de inclusão.

Para averiguar a possibilidade de formação de corpos de inclusão na *Z. mobilis*, característica não descrita na literatura sobre essa bactéria, foi realizado um *western blot* com as seguintes amostras: sobrenadante da cultura, fração solúvel do *pellet* pós sonicação e *pellet* pós sonicação de amostras crescidas durante 24 e 48 horas. A Figura 17 representa o resultado desses crescimentos por *western blot*.

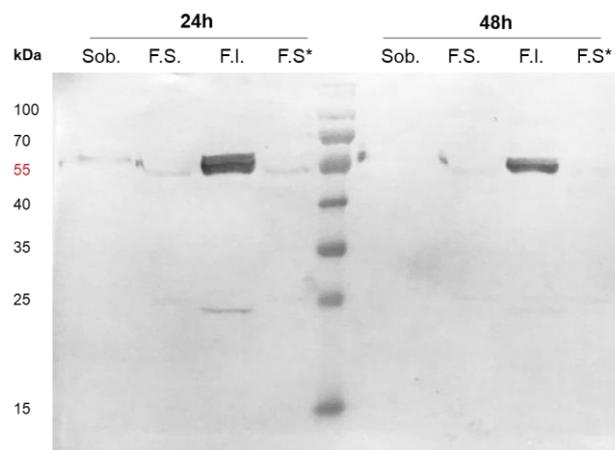


Figura 17. Western blot da cultura de *Z. mobilis* transformada com o plasmídeo PBR1MR anti-CD3 FvFc. Cultura crescida por 24 e 48 horas com as amostras: **Sob**: sobrenadante da cultura; **F.S**: fração solúvel do *pellet* pós sonicação; **F.I**: *pellet* pós sonicação; **F.S*** fração solúvel do *pellet* pós sonicação com tampão de amostra sem beta-mercaptoetanol. **Marcador**: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

A partir desse experimento foi possível observar a presença do anticorpo anti-CD3 com o tamanho aproximado de 55 kDa (massa molecular predita com peptídeo sinal) na fração insolúvel, ou seja, no *pellet* que passou pelo processo de sonicação e posterior centrifugação para separação da fração solúvel, sugerindo que essa proteína pode estar contida em corpos de inclusão no citoplasma da *Z. mobilis*.

Para confirmar a localização dessa proteína, foi realizado um protocolo de recuperação de corpos de inclusão (adaptado de BRIGIDO, 1992), que consiste na sonicação do *pellet* da cultura, seguido de diversas lavagens com tampões e detergentes, para por fim, ressuspender em tampão o sedimento remanescente, que representa os corpos de inclusão e contém a proteína recombinante parcialmente purificada. A Figura 18 representa o resultado desse tratamento.

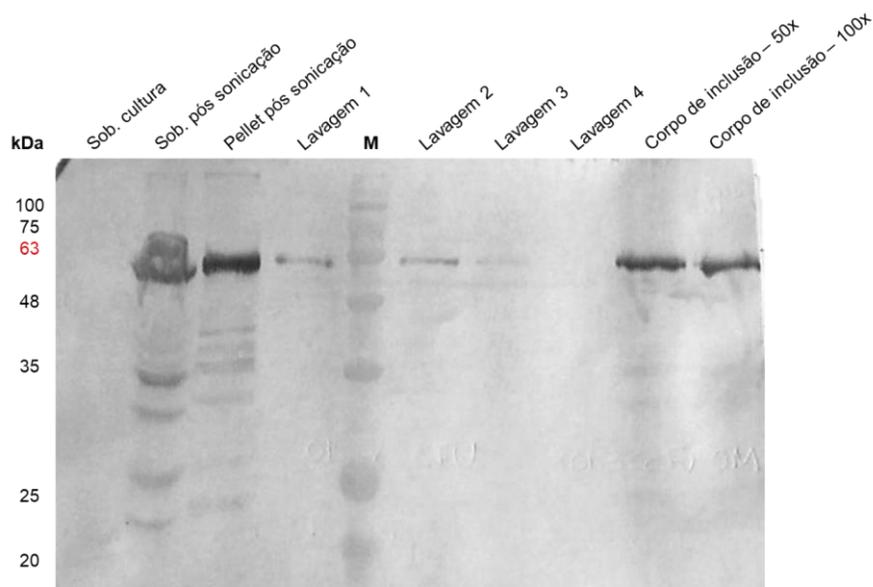


Figura 18. Western blot da cultura de *Z. mobilis* transformada com o plasmídeo PBR1MR anti-CD3 FvFc após protocolo de recuperação dos corpos de inclusão. Na figura estão representadas as amostras: sobrenadante da cultura (Sob. cultura); sobrenadante pós sonicação (Sob. pós sonicação); *pellet* pós sonicação; lavagens do *pellet* (1, 2, 3 e 4) e corpos de inclusão ressuspensos em tampão contendo guanidina (6M), arginina (0,4M), EDTA (2mM) e Tris (0,1M pH 8,4) e diluídos 50 ou 100 vezes para aplicação no gel de poliácridamida. **Marcador:** BLUeye Prestained Protein Ladder (Sigma-Aldrich).

Após a execução desse protocolo, foi possível observar a presença do anticorpo anti-CD3 FvFc no que se sugere ser os corpos de inclusão. Dessa forma, compreende-se a dificuldade da *Z. mobilis* para secreção desse anticorpo no sobrenadante. Existem algumas estratégias que podem ser empregadas para diminuir a formação desses agregados proteicos insolúveis, como por exemplo a diminuição

da temperatura de crescimento da cultura, bem como a utilização de outros promotores que apresentem uma atividade transcricional mais baixa, para guiar a produção desta proteína.

5.2. ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-CD3 scFv

O vetor pBR1MR anti-CD3 scFv possui um tamanho de 6.791pb e a porção a ser expressa corresponde ao anticorpo anti-CD3 no formato scFv (785pb). Esse vetor possui uma sequência de DNA que corresponde a um fragmento do gene que produz a proteína de ancoragem OMP da bactéria *Z. mobilis* (HE; FENG; ZHANG, 2008). Essa, quando fusionada a proteína anti-CD3 scFv, a direciona para o ancoramento na membrana da célula e juntas, correspondem a 49,33 kDa.

Um clone da *Z. mobilis* transformado com o plasmídeo pBR1MR anti-CD3 scFv foi cultivado por 96 horas, e amostras foram coletadas a cada 24 horas para avaliar a localização da expressão do fragmento de anticorpo recombinante. A Figura 19 representa o resultado da obtenção das frações solúveis e insolúveis do *pellet* das culturas após sonicação e centrifugação, analisadas em gel de poliacrilamida e *western blot*.

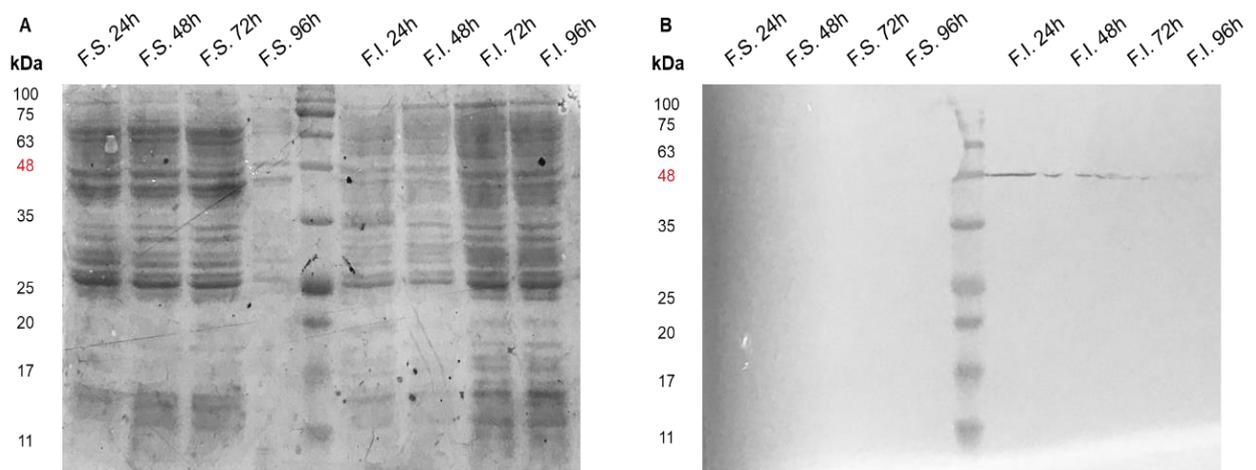


Figura 19. Expressão do anticorpo anti-CD3 scFv - OMP na fração solúvel e insolúvel do *pellet* da cultura durante as 96 horas de crescimento. A: Gel de poliacrilamida corado com azul de Coomassie. **B:** *Western blot*. **F.S.** Fração solúvel do *pellet* pós sonicação; **F.I.** Fração insolúvel do *pellet* pós sonicação. **Marcador:** BLUeye Prestained Protein Ladder (Sigma-Aldrich).

Após a sonicação e posterior centrifugação do *pellet*, foi possível observar a presença do anti-CD3 scFv – OMP apenas nas frações correspondentes às frações insolúveis do *pellet*, que decaí sua expressão ao longo do tempo. A presença do

anticorpo nessa região sugere que ele possa estar se ligando na membrana externa, como esperado. No entanto, existe a possibilidade de formação de corpos de inclusão pela *Z. mobilis*, e por isso, foi realizado o protocolo de recuperação desses corpos de inclusão, como mostra a Figura 20.

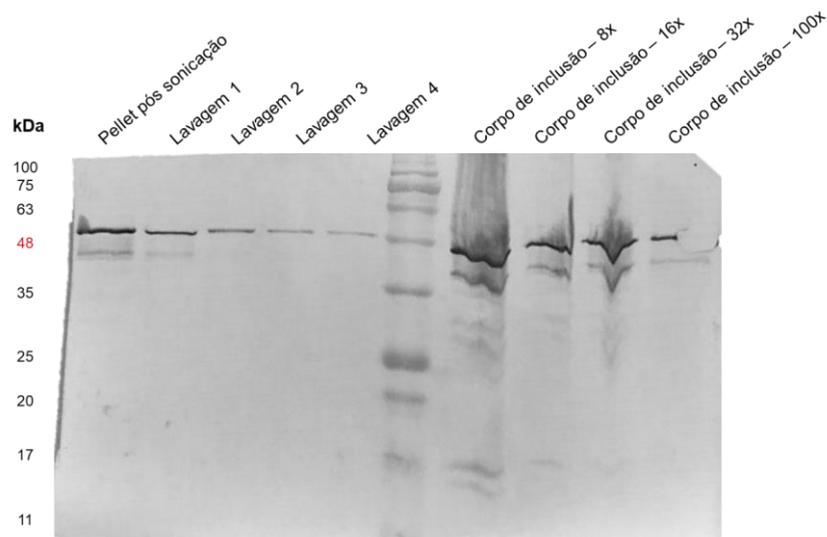


Figura 20. Representação por *western blot* da cultura de *Z. mobilis* transformada com o plasmídeo PBR1MR anti-CD3 scFv - OMP após protocolo de recuperação dos corpos de inclusão. Na membrana estão representadas as amostras: *pellet* pós sonicação; lavagens do *pellet*; e corpos de inclusão ressuspensos em tampão contendo guanidina (6M), arginina (0,4M), EDTA (2mM) e Tris (0,1M pH 8,4) e diluídos 8, 16, 32 ou 100 vezes para aplicação no gel de poliacrilamida. **Marcador:** BLUeye Prestained Protein Ladder (Sigma-Aldrich).

Novamente nota-se a presença do fragmento de anticorpo anti-CD3 scFv - OMP no que se sugere que sejam os corpos de inclusão contidos no citoplasma da *Z. mobilis*. Para visualizar se a bactéria está sendo capaz de produzir e expressar na membrana externa esse anticorpo de interesse, foi realizada uma microscopia confocal, conforme descrito anteriormente e como mostra a Figura 21.

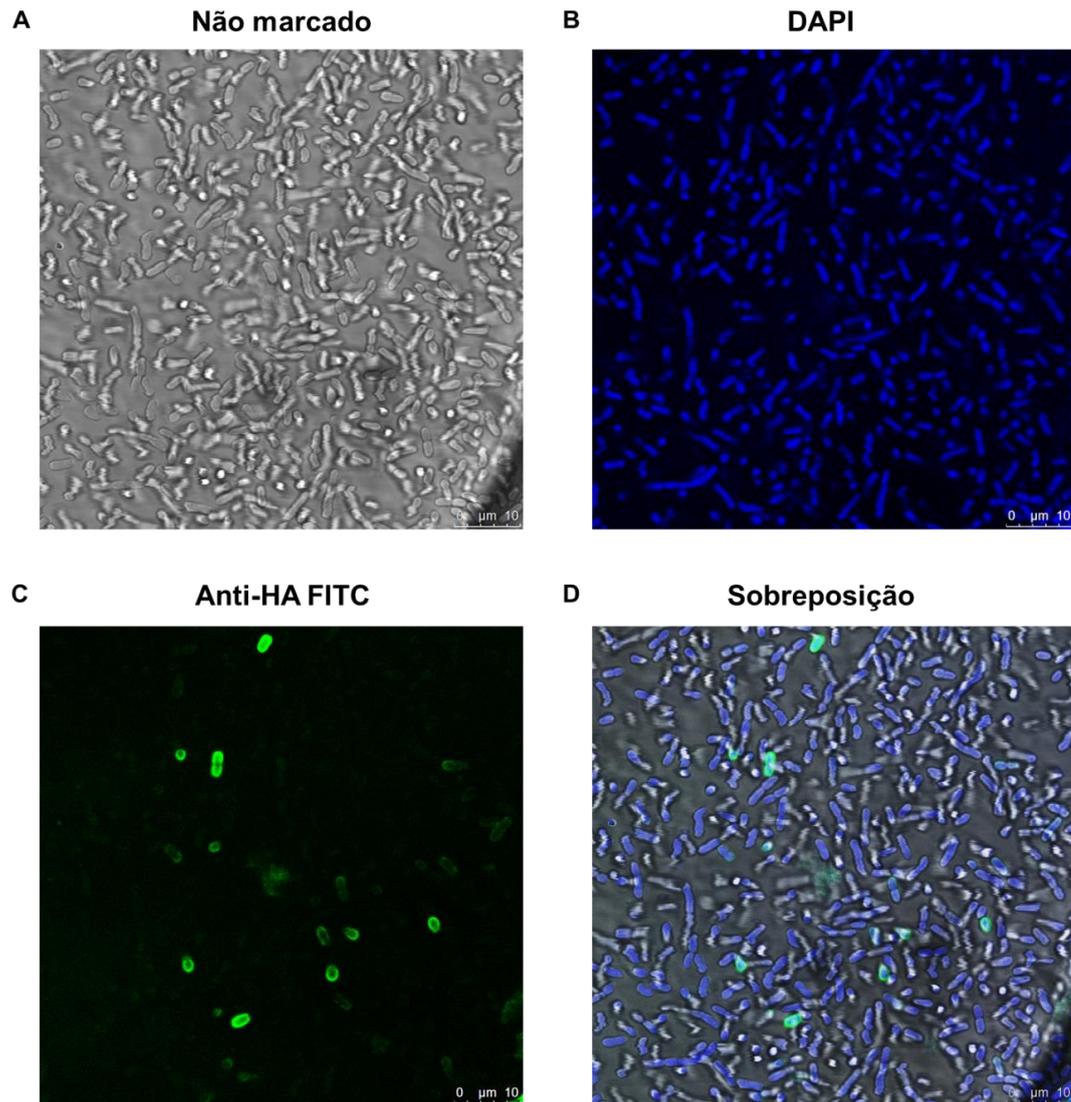


Figura 21. Microscopia confocal da bactéria *Z. mobilis* transformada com o plasmídeo PBR1MR anti-CD3 scFv - OMP. A. Bactéria não marcada. **B.** Bactéria marcada com o fluoróforo DAPI. **C.** Bactéria marcada com o anticorpo anti-HA conjugado com fluoróforo FITC. **D.** Sobreposição das imagens A, B e C.

Esses dados sugerem a presença do anticorpo na membrana externa da bactéria, uma vez que, embora a célula tenha sido permeabilizada, a membrana externa não é danificada totalmente. Além disso, dados anteriores não mostraram a presença desse anticorpo na fração solúvel, que corresponde ao espaço periplasmático dessa bactéria. Sendo assim, é possível sugerir que, apesar de estar expresso em pouca quantidade de células, a *Z. mobilis* conseguiu por meio da OMP, ancorar o anti-CD3 scFv na membrana externa.

De posse desses dados, a *Z. mobilis* transformada com o plasmídeo PBR1MR anti-CD3 scFv – OMP, foi utilizada em um novo ensaio em modelo animal de colite.

6. ENSAIO EM MODELO ANIMAL DE COLITE

Os dados anteriores mostraram que a bactéria *Z. mobilis* transformada com os plasmídeos de interesse: pBR1MR anti-CD3 FvFc, pBR1MR anti-CD3 scFv e pBR1MR anti-TNF scFv, é capaz de produzir esses anticorpos e expressá-los no sobrenadante ou *pellet*, no caso do anti-CD3 scFv. A partir disso, foram testadas diferentes condições de crescimento e foi determinado o melhor tempo de expressão dos anticorpos recombinantes. De posse desses dados, para os testes iniciais *in vivo*, foi escolhido o anticorpo anti-TNF scFv.

6.1 BACTÉRIA *Z. mobilis* TRANSFORMADA COM O PLASMÍDEO pBR1MR ANTI-TNF scFv

Os efeitos da ingestão de *Z. mobilis* foram avaliados por meio do modelo de colite aguda induzida quimicamente com o reagente DSS (do inglês, *Dextran Sulfate Sodium*) na concentração de 3%. Esse protocolo é utilizado em modelos experimentais de DIIs por causar danos clínicos e histopatológicos na mucosa intestinal de camundongos, semelhantes aos danos que ocorrem em humanos acometidos com a Colite Ulcerativa (PERŠE; CERAR, 2012).

Diariamente os animais foram avaliados de acordo com o índice de atividade da doença (do inglês, *disease activity index* - DAI) que é um método de quantificação dos parâmetros macroscópicos da colite induzida por DSS, que são a perda de peso, consistência das fezes e sangramento retal. Quanto maior este índice, mais intensos são os sintomas macroscópicos e conseqüentemente, mais doentes estão os animais. A perda de peso foi definida como a diferença entre o peso inicial e final. A consistência das fezes e o sangramento retal foram avaliados diariamente por meio da observação dos animais (Figura 22).

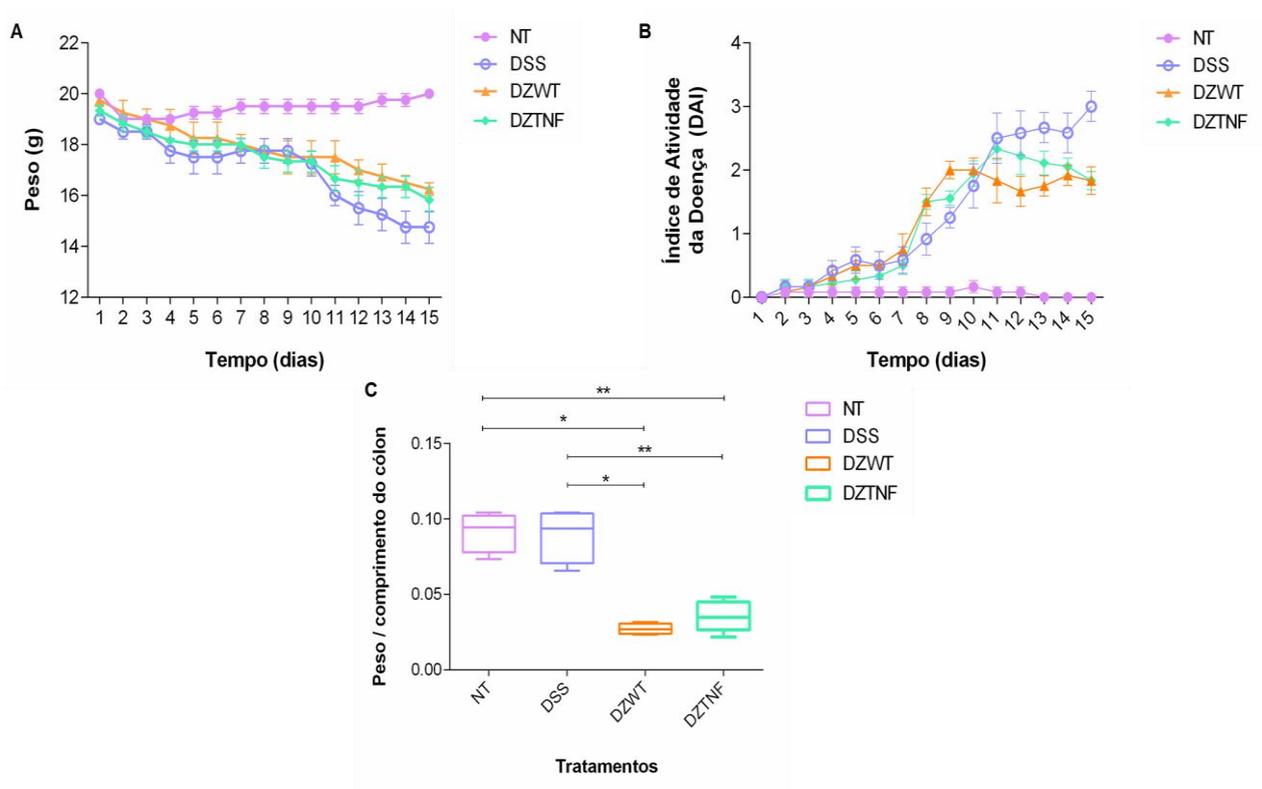


Figura 22. Administração oral de *Z. mobilis* e seus efeitos na colite induzida por DSS em camundongos. **A:** Peso mensurado durante os quinze dias de experimento. Os dados são apresentados como média \pm SEM. **B:** O Índice de Atividade da Doença (DAI) foi calculado durante todo o período experimental. Os dados são apresentados como média \pm SEM. **C:** Relação peso/comprimento do cólon (cm) após eutanásia. Os dados são mostrados como mediana e DP. As análises estatísticas para as variáveis peso e DAI foram realizadas por meio dos testes *one-way* ANOVA com teste de Tukey (Apêndice A e B) e teste de Mann-Whitney para a variável peso/comprimento do cólon, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Esses dados apresentam uma diminuição gradativa do peso dos animais pertencentes aos grupos que receberam DSS, quando comparados com o grupo controle (NT). Esse declínio se acentua a partir do dia 5, quando a concentração do DSS foi aumentada de 2 para 3%. O tratamento com *Z. mobilis* (DZWT e DZTNF) não alterou o processo de perda de peso dos animais (Figura 22A).

O grupo DSS apresentou o maior DAI durante o experimento, com uma curva ascendente de atividade da doença até o último dia do experimento. Os grupos DZWT e DZTNF também apresentaram DAI altos, e após o nono dia mostraram uma moderada estabilidade possivelmente devido a ingestão da *Z. mobilis* (Figura 22B).

A inflamação intestinal também pode ser avaliada por outros parâmetros, como o tamanho e peso do cólon (CHO et al., 2015; DEGUCHI et al., 2006). Esses parâmetros estão associados com o encurtamento e a diminuição do peso deste

órgão: quanto menores e mais leves, maior é a razão entre esses critérios e com isso, maior é o processo inflamatório instalado, sempre tendo como referência os indivíduos não tratados (AMAMOU et al., 2021; LO SASSO et al., 2020).

Utilizando estes parâmetros de avaliação, foi possível constatar que a razão peso e comprimento do cólon foi significativamente diferente nos grupos que receberam *Z. mobilis* - DZWT ($p < 0,05$) e DZTNF ($p < 0,01$) (Figura 22C).

Após a eutanásia dos animais, o cólon intestinal foi coletado, pesado, medido e utilizado para os testes de PCR em tempo real. A integridade do RNA extraído das amostras do cólon foi verificada por eletroforese em gel de agarose (*RNAse Free*), onde observou-se a presença das subunidades 28S e 18S que são referências quanto a qualidade do RNA extraído (Figura 23).

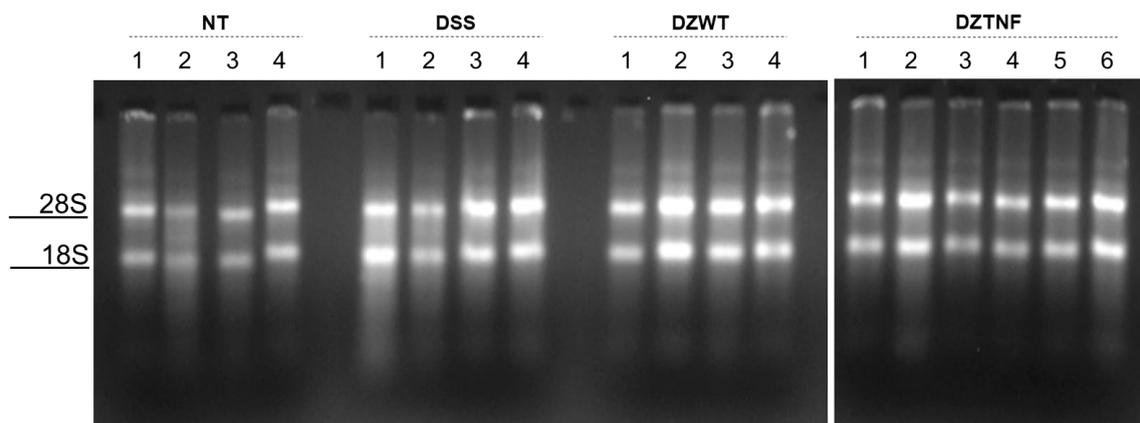


Figura 23. Análise do RNA total. O RNA total extraído do cólon dos camundongos submetidos ou não à indução da colite foi analisado por eletroforese em gel de agarose *RNAse free* 1,2%. NT: grupo não tratado; DSS: grupo que recebeu DSS; DZWT: *Z. mobilis wild type*; e DZTNF: *Z. mobilis anti-TNF scFv*.

Genes que desempenham um papel fundamental na mediação da resposta imune em doenças inflamatórias foram analisados para avaliar o impacto do tratamento com *Z. mobilis* e do anticorpo anti-TNF scFv na modulação da resposta imune. A expressão desses genes foi avaliada por PCR em tempo real com mRNA do cólon dos animais dos grupos NT, DSS, DZWT e DZTNF.

Mucina 3 (*Muc3*) e Ocludina (*Ocln*) são marcadores moleculares relacionados com a produção de muco pelas células Goblet e à integridade das junções intercelulares nos colonócitos, respectivamente. Sua expressão reflete uma restauração tecidual. O tratamento com DSS parece prejudicar a expressão de *Muc3*, porém, o tratamento com *Z. mobilis wild type* e *Z. mobilis anti-TNF scFv* aumenta a expressão desse gene (Figura 24A).

Já a expressão de *Ocln* não parece ter sido afetada após o tratamento com DSS, visto que sua expressão foi semelhante ao grupo NT. Porém, a presença da *Z. mobilis wild type* induziu a expressão desse gene significativamente (Figura 24B).

O tratamento com DSS aumentou significativamente a expressão de genes relacionados a citocinas inflamatórias como *Il6* e *Il17*, e sem significância estatística *Tnfa*, *Il1b*, *Il22* que foi minimizada com a administração de *Z. mobilis wild type* ou transformada com o plasmídeo anti-TNF scFv (Figura 24C-G). A exceção foi a expressão da citocina IL-23 que teve um aumento significativo grupo DZWT em relação aos outros grupos analisados (Figura 24H)

Os grupos DZWT e DZTNF apresentaram um aumento significativo na expressão do fator de transcrição Foxp3 e das citocinas IL-10 e TGFB em relação ao grupo controle NT (Figura 24I-K). A expressão da citocina IL-5 e do fator de transcrição STAT5 não foi alterada com os tratamentos nos grupos analisados (Figura 24L e M). Outros marcadores moleculares como STAT3, Nos2 e Maf foram testados, mas não apresentaram relevância estatística (Figura 24N-P).

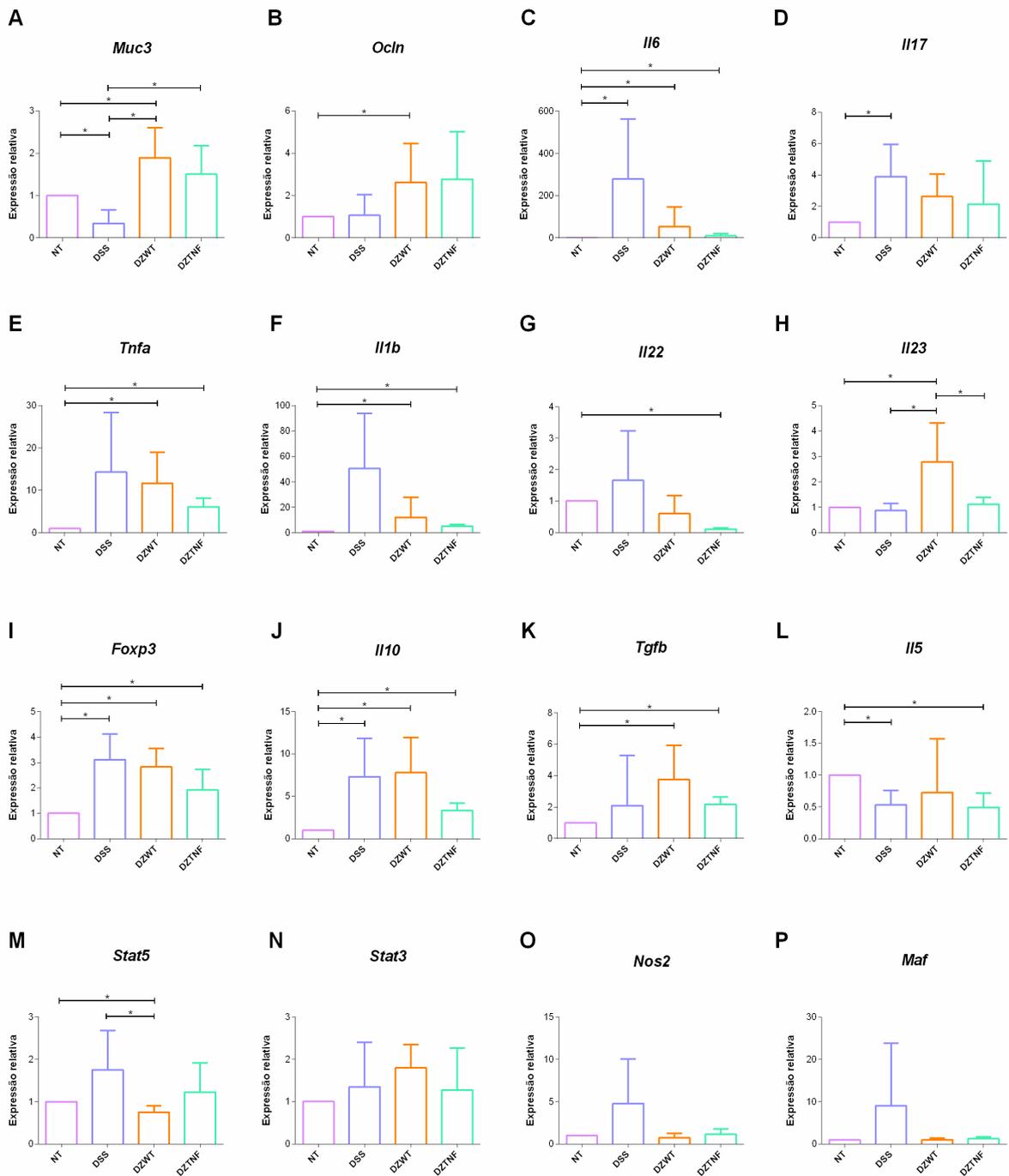


Figura 24. Expressão de genes codificadores de citocinas e fatores de transcrição envolvidos na regulação da resposta inflamatória por análise de PCR em tempo real. Expressão gênica relativa: **A. *Muc3***; **B. *Ocln***; **C. *Il6***; **D. *Il17***; **E. *Tnfa***; **F. *Il1b***; **G. *Il22***; **H. *Il23***; **I. *Foxp3***; **J. *Il10***; **K. *Il5***; **L. *Tgfb***; **M. *Stat5***; **N. *Stat3***; **O. *Nos2***; **P. *Maf***. Os resultados são apresentados como a expressão relativa (*fold change*) comparados às amostras não tratadas (NT). O gene endógeno utilizado como controle para normalização dos dados foi o *B2m*. Os dados são mostrados como média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

6.2 BACTÉRIA *Z. mobilis* TRANSFORMADA COM O PLASMÍDEO pBR1MR ANTI-CD3 scFv – OMP

O segundo experimento *in vivo* apresenta algumas diferenças em relação ao primeiro realizado com o anticorpo anti-TNF. Dessa vez, o número de camundongos por grupo passou de 4 para 6 e no grupo anti-CD3 scFv – OMP, de 6 para 8. Foi adotada uma estratégia de administração das doses durante todo o período do experimento e foi estabelecida a concentração de 3% de DSS nos primeiros cinco dias (Figura 3).

Os animais foram gavados com 100 μ L de salina (grupos NT e DSS) ou com 100 μ L de *Z. mobilis* (ZWT, DZWT, ZOMP, DZOMP – $\sim 5 \times 10^9$ UFC/dia) durante os 10 dias de experimento. No 11^o dia todos os animais foram eutanasiados. Os animais foram avaliados diariamente quanto ao peso, consistência das fezes e grau de sangramento retal. A Figura 25 representa o peso em gramas de todos os grupos, o índice de atividade da doença e a razão entre o peso e o comprimento do cólon após eutanásia dos animais.

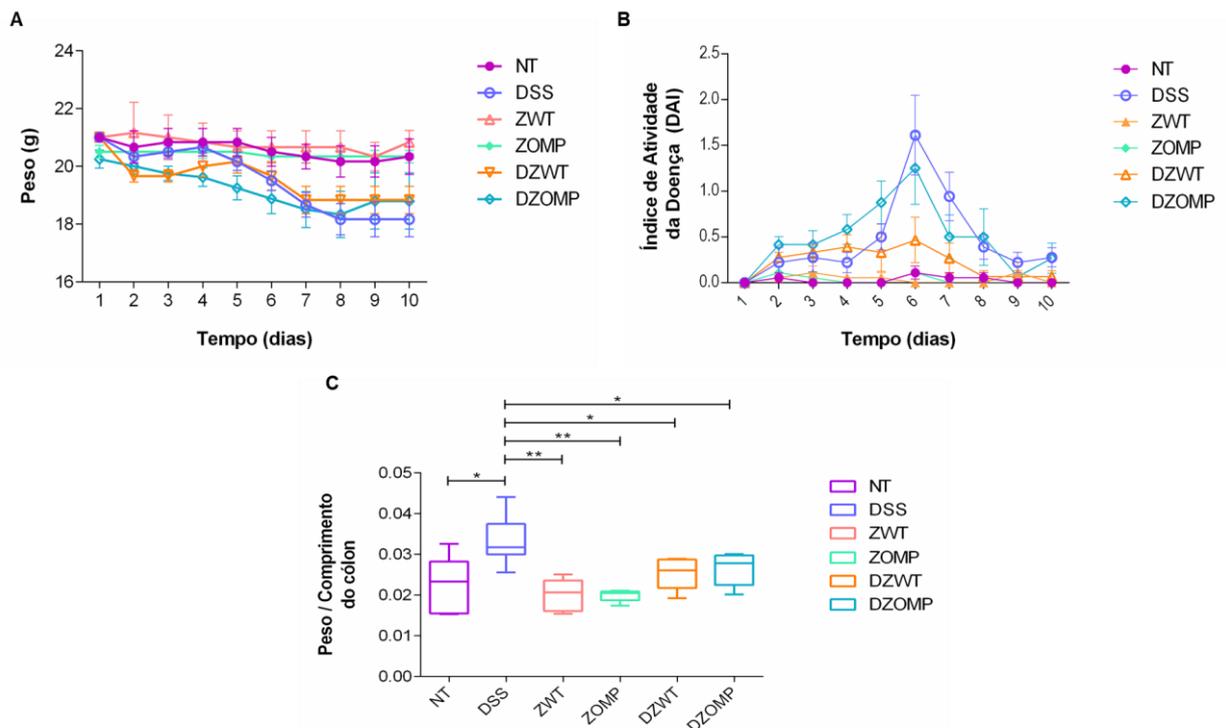


Figura 25. Administração oral de *Z. mobilis* e seus efeitos na colite induzida por DSS em camundongos. A: Peso mensurado durante os quinze dias de experimento. Os dados são apresentados como média \pm SEM. **B:** O Índice de Atividade da Doença (DAI) foi calculado durante todo o período experimental. Os dados são apresentados como média \pm SEM. **C:** Relação peso/comprimento

do cólon (cm) após eutanásia. Os dados são mostrados como mediana e DP. As análises estatísticas para as variáveis peso e DAI foram realizadas por meio dos testes *one-way* ANOVA com teste de Tukey (Apêndice C) e teste de Mann-Whitney para a variável peso/comprimento do cólon, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Esses dados demonstram uma queda gradativa do peso dos animais, principalmente os pertencentes aos grupos DSS no decorrer do experimento. Os animais dos grupos NT, ZWT e ZOMP mantiveram seu peso estável durante todo o experimento. A partir do sétimo dia, dois dias após a suspensão do DSS, os grupos DZWT e DZOMP apresentaram uma estabilidade nesse parâmetro, diferente do grupo DSS que continuou com uma gradativa perda de peso (Figura 25A).

Com exceção dos grupos que não receberam DSS (NT, ZWT e ZOMP), todos os outros (DSS, DZWT e DZOMP) apresentaram alteração no índice de atividade da doença (DAI). O grupo DSS apresentou o maior DAI durante o experimento, seguido dos grupos DZOMP e DZWT. Após a suspensão da administração do DSS, esses grupos apresentaram um declínio do DAI, a partir do sexto dia (Figura 25B, Apêndice C).

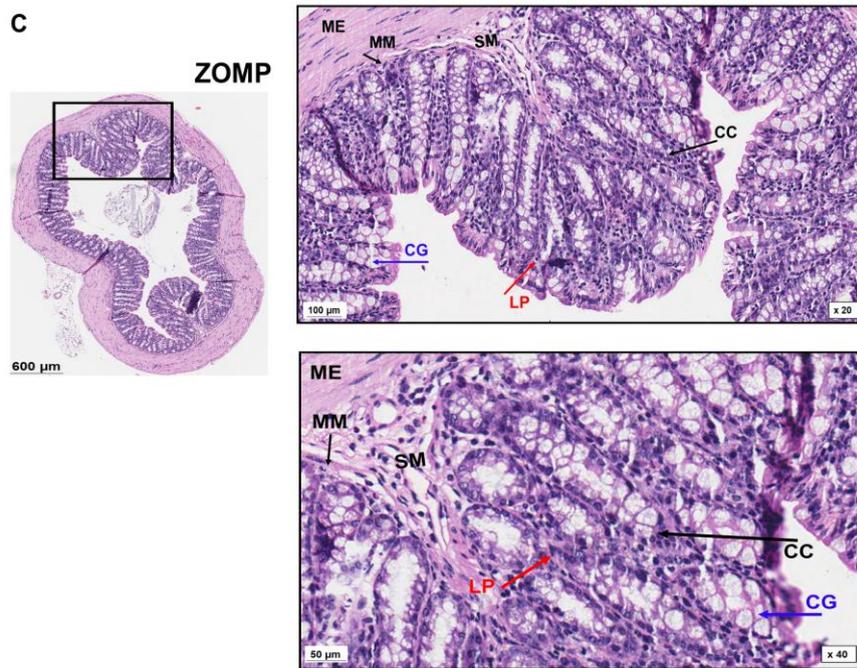
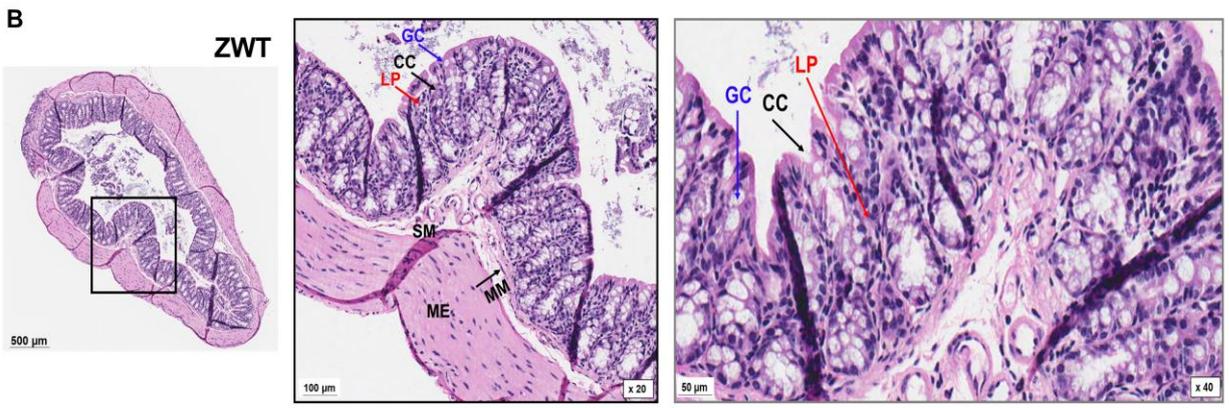
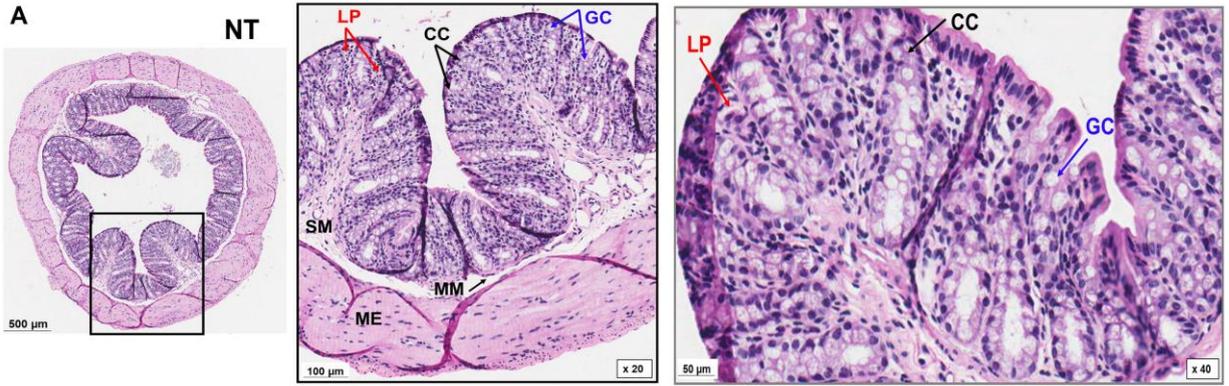
A Figura 25C apresenta os dados da razão entre o peso e comprimento do cólon intestinal dos animais, sendo possível observar que os grupos apresentaram diferença estatística principalmente entre o grupo que recebeu apenas DSS e os grupos que receberam DSS e *Z. mobilis*.

Os dados obtidos com esse experimento, corroboram com os resultados do *in vivo* anterior, no qual os grupos tratados com *Z. mobilis* apresentaram estabilidade no peso, no DAI e uma razão menor do peso/comprimento do cólon em relação ao grupo DSS (Figura 22).

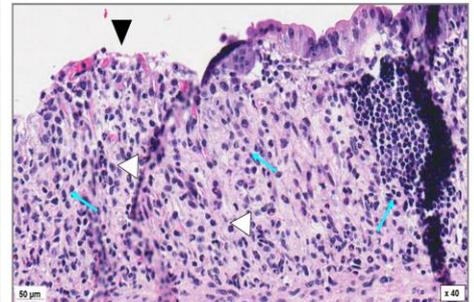
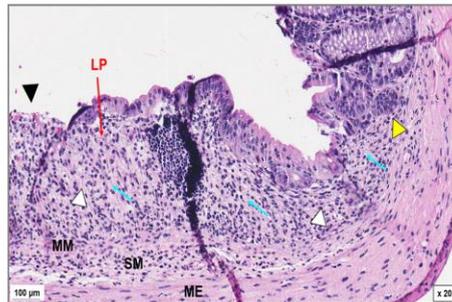
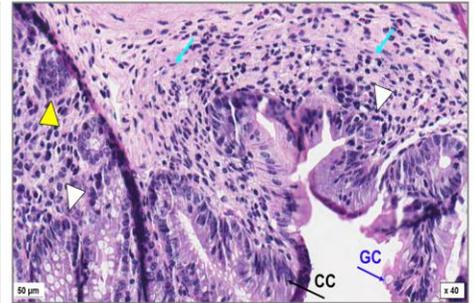
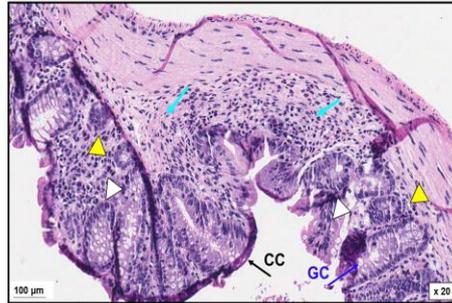
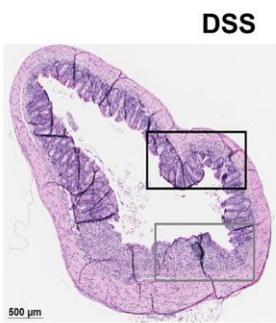
Após a eutanásia dos animais e coleta do cólon intestinal, uma parte desse foi encaminhada para análise histológica e a segunda fração foi utilizada para os testes de PCR em tempo real. As fezes coletadas nos dias 5 e 10 foram misturadas em cada grupo (*pool*) e encaminhadas para realização do microbioma.

A progressão da colite induzida por DSS é marcada pelo aumento da infiltração de células inflamatórias na mucosa do cólon, levando à destruição dos colonócitos e aumentando a atividade inflamatória (LAROUÏ et al., 2012). Para avaliar se o tratamento com *Z. mobilis* poderia aliviar a colite regulando a inflamação e diminuindo os danos à mucosa, foi realizada uma análise histológica do cólon com coloração H&E (ERBEN et al., 2014).

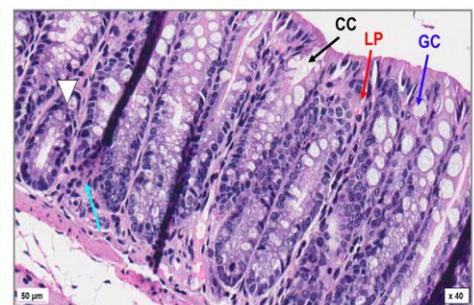
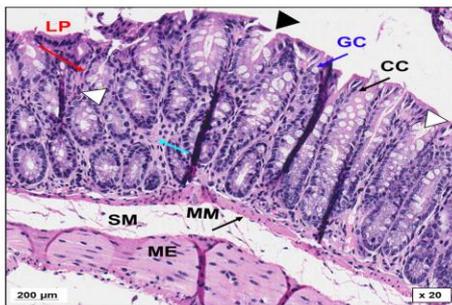
Os grupos que foram gavados por via oral apenas com *Z. mobilis* (ZWT e ZOMP) apresentaram aspecto morfológico semelhante ao grupo saudável (NT) (Figura 26A, B, C). Nos camundongos que receberam DSS e *Z. mobilis* (DZWT e DZOMP), o dano histológico na mucosa foi melhorado, sendo possível observar raros pontos de erosão no epitélio, diminuição de células inflamatórias, criptas regulares com pontos de hiperplasia e aumento das células Goblet (Figura 26E e F). Além disso, o grupo que recebeu apenas DSS apresentou sinais inflamatórios mais severos e uma mucosa globalmente danificada (Figura 26D). O escore histológico é mostrado na Figura 26G e apresenta a relação entre os grupos, evidenciando um alto valor no grupo DSS, que foi sutilmente diminuído nos grupos DZWT e DZOMP.



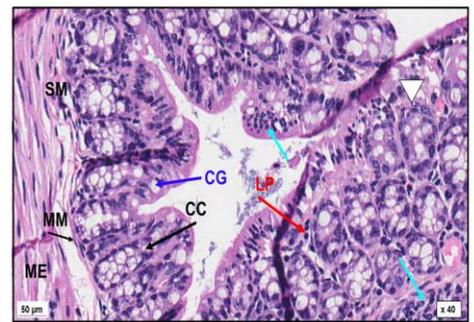
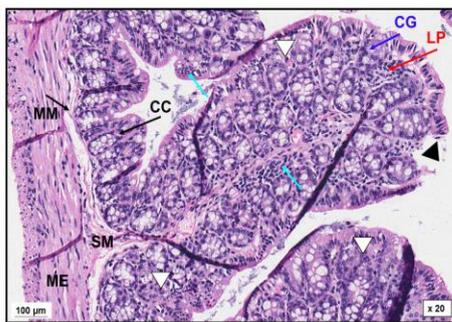
D



E



F



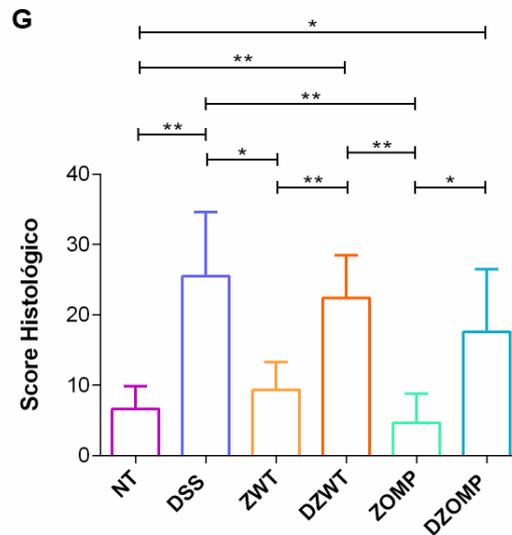


Figura 26. Análise histopatológica e efeitos de *Z. mobilis* na mucosa do cólon de camundongos. Coloração H&E representativa de tecidos do cólon nos grupos **A.** NT; **B.** ZWT; **C.** ZOMP; **D.** DSS; **E.** DZWT; **F.** DZOMP. **LP:** lâmina própria; **GC:** célula Goblet (célula caliciforme); **CC:** criptas do cólon; **MM:** muscularis mucosae; **SM:** submucosa; **ME:** muscular externa; células inflamatórias aumentadas na lâmina própria (seta azul); desordem arquitetônica de cripta/perda de cripta/criptas irregulares/criptas com hiperplasia (ponta de seta branca); erosão (ponta de seta preta); abscesso de cripta (ponta de seta amarela). **G.** Score histológico do tecido colônico. Os dados são mostrados como média e DP. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

6.2.1 EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES RELACIONADOS COM A REGULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Genes que desempenham um papel fundamental na mediação da resposta imune em doenças inflamatórias foram analisados para avaliar o impacto do tratamento com *Z. mobilis* e do anticorpo anti-CD3 scFv na modulação da resposta imune. A expressão desses genes foi analisada por PCR em tempo real utilizando o mRNA extraído do cólon dos animais dos grupos NT, DSS, DZWT e DZOMP.

Os marcadores moleculares Mucina 3 (*Muc3*) e Ocludina (*Ocln*), relacionados com a produção de muco pelas células Goblet e à integridade das junções intercelulares nos colonócitos, apresentaram uma maior expressão nos grupos DZWT e DZOMP quando comparados com o grupo DSS. Essa expressão reflete uma possível restauração tecidual (Figura 27A e B).

O tratamento com DSS aumentou significativamente a expressão de genes relacionados a citocinas inflamatórias como *Il6* e *Tnfa* e aos fatores de transcrição, *Rorc* e *Gata3* (Figura 27C-E e I). Essa expressão foi minimizada com a administração de *Z. mobilis wild type* ou transformada com o plasmídeo anti-CD3 scFv. A expressão

de genes relacionados com outras citocinas inflamatórias como *Il1b*, *Il22* e *Ifng* não apresentaram diferença estatística entre os grupos analisados e o DSS. As exceções foram as citocinas IL-17, IL-23 e o fator de transcrição STAT6 (está relacionado ao desenvolvimento de colite e à ruptura das junções estreitas epiteliais (LIN et al., 2019)) cuja expressão teve um aumento significativo no grupo DZOMP em relação aos demais grupos analisados (Figura 27 J-L).

Os grupos DZWT e DZOMP apresentaram um aumento significativo na expressão dos fatores de transcrição Foxp3 e STAT5, e das citocinas IL10, TGFB e IL-5, associadas a um perfil regulatório, em relação ao grupo controle NT (Figura 27 M-Q). A expressão do fator de transcrição STAT3 não foi significativamente alterada com os tratamentos nos grupos analisados (Figura 27 R). O marcador molecular Nos2 foi testado, mas não apresentou relevância estatística (Figura 27 S).

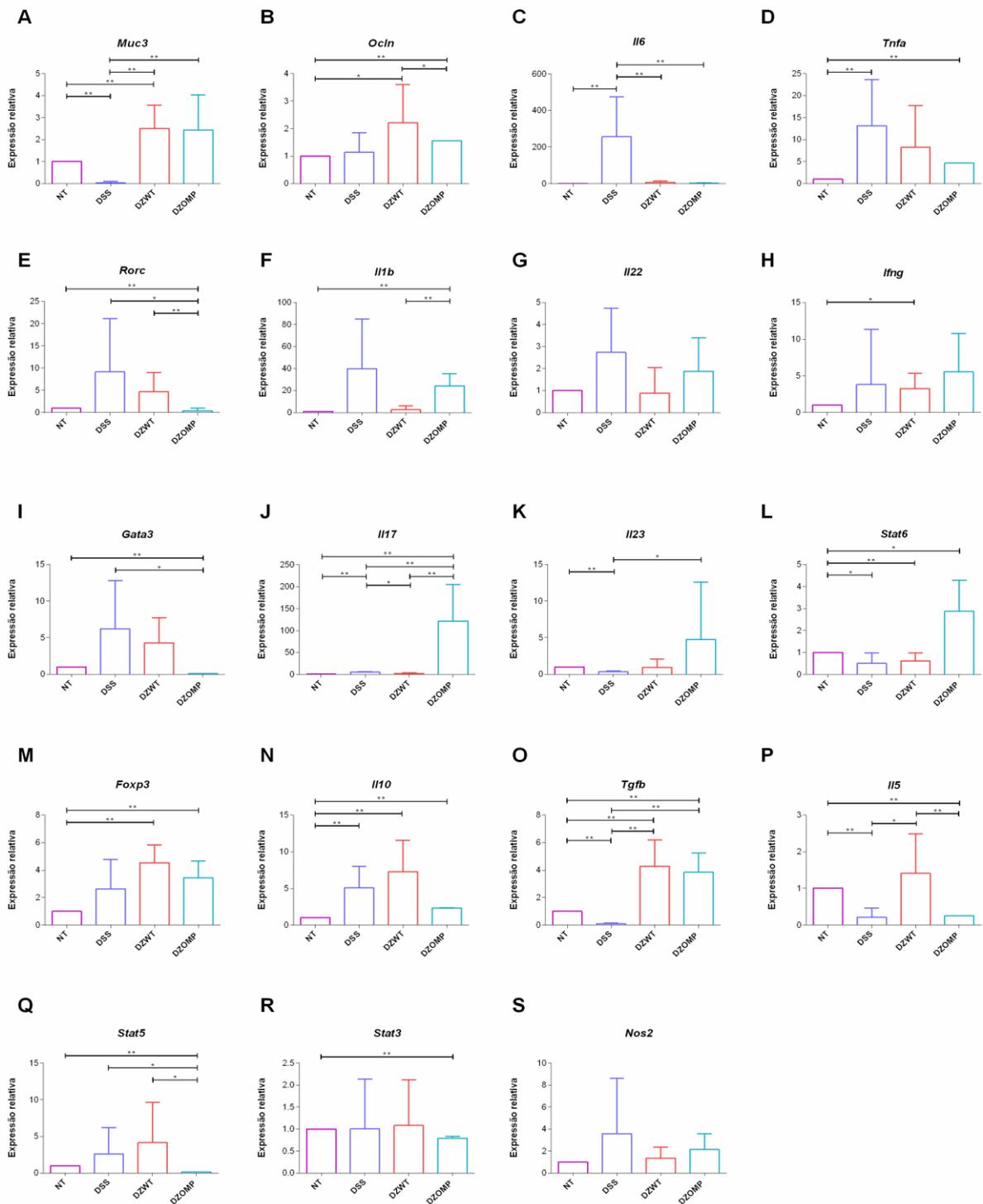


Figura 27. Expressão de genes codificadores de citocinas e fatores de transcrição envolvidos na regulação da resposta inflamatória por análise de PCR em tempo real. Expressão gênica relativa: **A. Muc3**; **B. Ocln**; **C. Il6**; **D. Tnfa**; **E. Rorc**; **F. Il1b**; **G. Il22**; **H. Ifng**; **I. Gata3**; **J. Il17**; **K. Il23**; **L. Stat6**; **M. Foxp3**; **N. Il10**; **O. Tgfb**; **P. Il5**; **Q. Stat5**; **R. Stat3**; **S. Nos2**. Os resultados são apresentados como a expressão relativa (*fold change*) comparados às amostras não tratadas (NT). O gene endógeno utilizado como controle para normalização dos dados foi o B2m. Os dados são mostrados como média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

6.2.2 ALTERAÇÃO NO PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL

Para verificar alterações no perfil da diversidade microbiana nos grupos e não apenas de cada animal individualmente, foi realizado um *pool* com as amostras fecais de cada grupo nos dias estabelecidos (dia 5 e 10). O DNA bacteriano total do *pool* de fezes foi extraído e as regiões V3-V4 do gene 16S rRNA foram sequenciadas para avaliar os efeitos da *Z. mobilis* na microbiota intestinal. Amostras fecais foram coletadas de 6 animais dos grupos NT, DSS, ZWT, ZOMP, DZWT e DZOMP nos dias 5 e 10.

A diversidade alfa é um método analítico para avaliar a complexidade da comunidade em cada amostra através de métricas específicas (WHITTAKER, 1972). Parte desse índice de análise é o número de espécies observadas que no grupo DZWT 10, apresentou menor medida de rarefação, contrapondo o grupo ZWT 10 que apresentou o maior valor e a diversidade filogenética (Figura 28 A e B).

A diversidade da comunidade bacteriana, avaliada pelo índice de Shannon, mostrou um aumento nos grupos ZWT 10 e ZOMP 10 em contraste com aqueles grupos que apresentaram menor diversidade de espécies DZWT 10 e DZOMP 10 (Figura 28 C). Outro índice de análise de diversidade alfa é o Chao1, que avalia a riqueza da comunidade bacteriana. Com base nos dados de sequenciamento, os grupos ZWT 10, ZOMP 5 e 10 e DSS 10 apresentaram índices de rarefação aumentados em relação aos demais grupos (Figura 28 D).

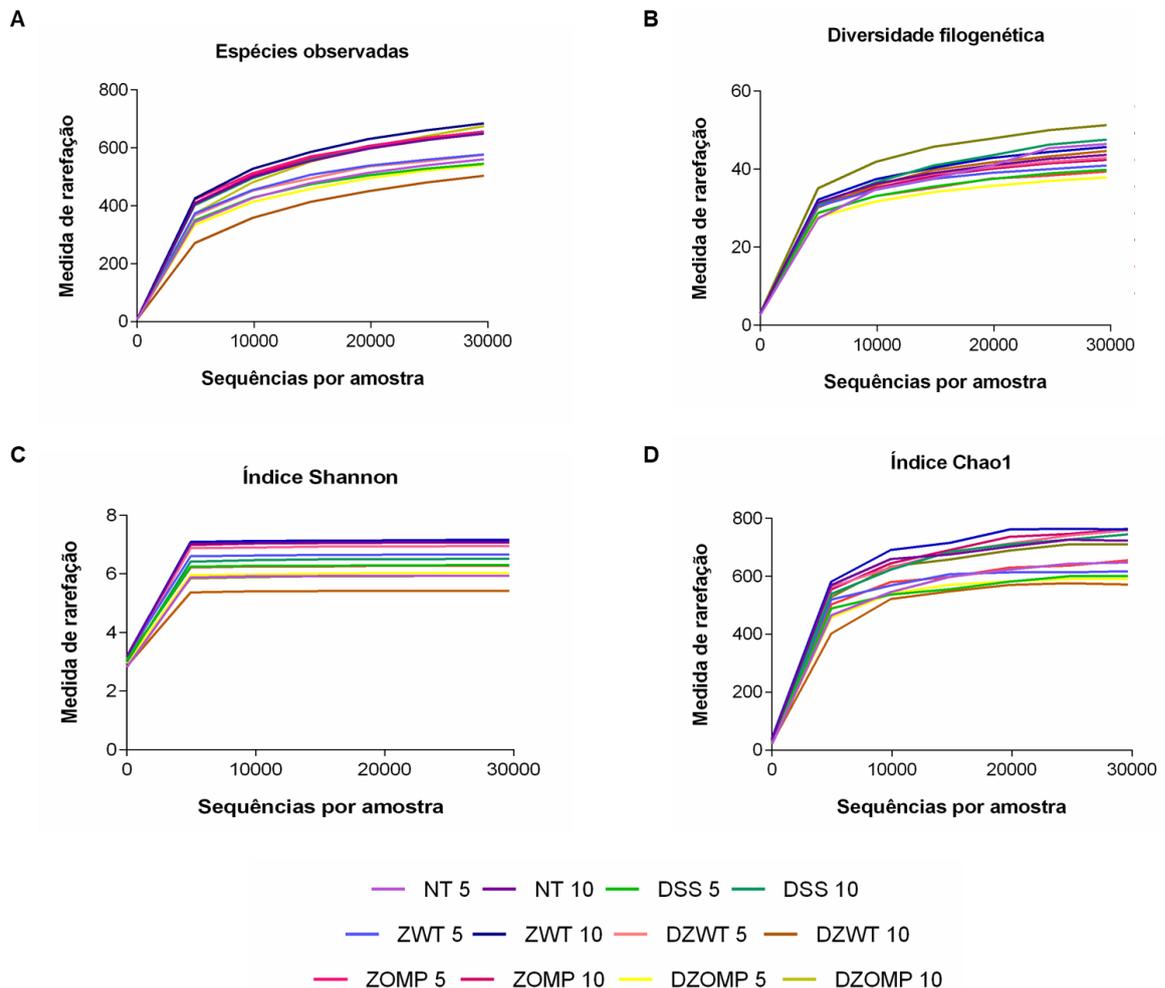


Figura 28. Análise de diversidade alfa. **A.** Espécies observadas; **B.** Diversidade filogenética. **C.** Índice de diversidade de Shannon; **D.** Índice de riqueza Chao1; métricas avaliadas em cada conjunto de amostras nos dias 5 e 10.

Com os dados do microbioma é possível avaliar a composição da comunidade microbiana relativa mais abundante de cada táxon amostral. A Figura 29 A representa os filos mais abundantes em cada amostra nos dias 5 e 10. Pela análise comparativa geral, os filos mais abundantes em todas as amostras durante os dias analisados foram Bacillota e Bacteroidota. Actinomycetota foi mais abundante no DSS no dia 5, bem como Campylobacterota no grupo NT 5. No dia 10 houve aumento de Pseudomonadota nos grupos DSS, DZWT e DZOMP, juntamente com o aumento do filo Verrucomicrobiota. Os filos Cyanobacteriota, Thermodesulfobacteriota, Chloroflexota, Patescibacteria e Deferribacterota permaneceram estáveis durante os dias analisados.

A nível de espécie, para avaliar a relação entre essa distribuição de bactérias na microbiota das amostras controle (NT e DSS) e daquelas que receberam *Z. mobilis* (ZWT, ZOMP, DZWT e DZOMP), foi utilizada uma análise de mapa de calor com as espécies mais abundantes entre todas as amostras. Os resultados foram agrupados pela sua distribuição de abundância em diferentes amostras, pelo método da distância euclidiana (Figura 29B).

O tratamento com DSS está associado à presença dominante das bactérias *Bifidobacterium pseudolongum* no dia 5 (DSS 5), *Escherichia coli* e *Bacteroides sp.* no dia 10 (DSS 10), bem como *Romboutsia ilealis*, em ambos os momentos. Em contraste, o grupo que recebeu DSS mais tratamento com *Z. mobilis* aumentou a abundância relativa da bactéria *Akkermansia muciniphila* no dia 10 (DZWT 10 e DZOMP 10) após um aumento na abundância no grupo ZWT no dia 5. A *Zymomonas mobilis* aparece nos grupos ZWT 5, ZWT 10, DZWT 10 e DZOMP 10 (Figura 29 B).

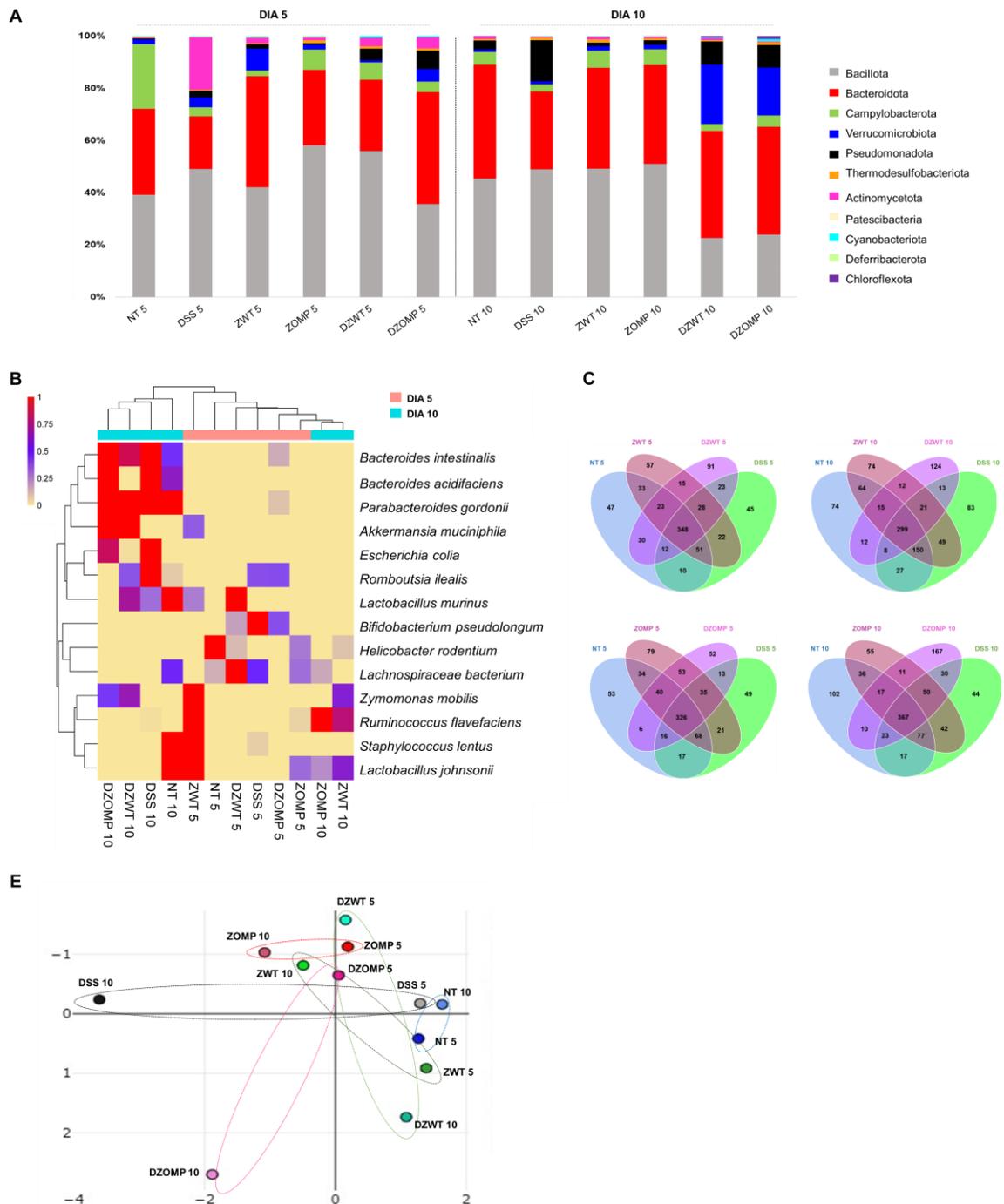


Figura 29. Análise da diversidade do microbioma. A. Histograma de abundância relativa de filos dominantes nos dias 5 e 10. **B.** Mapa de calor das espécies mais abundantes nos grupos NT, DSS, ZWT, ZOMP, DZWT e DZOMP nos dias 5 e 10 de análises. **C e D.** Diagrama de Venn das OTUs distribuídas entre os grupos no dia 5 e no dia 10, das amostras ZWT e ZOMP respectivamente. **E.** Os pontos gráficos do PCA representam diferentes grupos de amostras e seus *clusters*.

De acordo com o resultado da análise de agrupamento de OTUs, um diagrama de Venn foi gerado com as informações comuns e únicas para diferentes amostras nos dias 5 (NT 5, DSS 5, ZWT 5, DZWT 5 e NT 5, DSS 5, ZOMP 5, DZOMP 5) e 10

(NT 10, DSS 10, ZWT 10, DZWT 10 e NT 10, DSS 10, ZOMP 10, DZOMP 10) (Figura 29C e D). É notável a redução das espécies comuns entre algumas amostras e o aumento das OTUs únicas na maioria dos grupos no dia 10. Há também um aumento nas OTUs compartilhadas entre os grupos NT 10 e DSS 10 em relação ao NT 5 e grupos DSS 5 do diagrama com a *Z. mobilis wild type* (Figura 29C), sugerindo uma possível recuperação da homeostase no grupo DSS.

A beta diversidade também foi observada por meio da análise do principal componente (PCA). O grupo controle nos dias 5 e 10 aparecem próximos um do outro, de forma semelhante, observado no grupo que recebeu apenas *Z. mobilis* com o plasmídeo anti-CD3 scFv, ambos agrupados no gráfico. Já os grupos DSS, DZOMP e DZWT não se agrupam, espalhando as amostras do dia 5 e do dia 10 de forma antagônica no gráfico (Figura 29D).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

As doenças inflamatórias intestinais afetam muitos indivíduos, principalmente nos países industrializados e apresentam um aumento significativo no número de casos pelo mundo nas últimas décadas. Embora não haja tratamento específico disponível, o uso de probióticos pode levar a benefícios no controle da doença, como o uso da bactéria *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor, Ardeypharm) que demonstrou induzir a remissão da colite ulcerativa em pacientes e mantê-la por um determinado período (MATTHES et al., 2010; OH et al., 2021). Este efeito também foi comparado com o medicamento aminosalicilato mesalamina, um dos principais tratamentos para UC (KRUIS et al., 1997; REMBACKEN et al., 1999).

Outro ensaio clínico relevante utiliza uma mistura bacteriana VSL#3 (VSL Pharmaceuticals, Inc.) que combina 8 espécies de bactérias dos gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Esse medicamento mostrou-se seguro e eficaz na redução dos sintomas causados pela UC, além de induzir e manter a remissão desta doença por um período nos pacientes testados (BIBILONI et al., 2005; SOOD et al., 2009; TURSI et al., 2010).

Até o momento, vários microrganismos probióticos estão sendo testados em modelos murinos de colite induzida por DSS com o objetivo de aliviar os sintomas causados pela colite ulcerativa. Este protocolo experimental é utilizado como modelo para doenças inflamatórias intestinais humana devido ao dano clínico e histopatológico que o reagente DSS causa na mucosa intestinal de camundongos, semelhante ao dano que ocorre em humanos afetados pela colite ulcerativa (CHASSAING et al., 2014; PERŠE; CERAR, 2012a).

Alguns dos probióticos testados no modelo de colite Induzida por DSS são a *Akkermansia mucinophila* e espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (BIAN et al., 2019; CHEN et al., 2017, 2021; JANG et al., 2018; ZHANG et al., 2021). Neste contexto, a bactéria *Zymomonas mobilis* surge como um possível candidato terapêutico por apresentar características probióticas associadas ao status GRAS e ao seu uso cultural, aliadas a resultados promissores obtidos em trabalhos anteriores (LIU et al., 2022).

Como por exemplo, trabalhos pioneiros com *Z. mobilis* na cidade de Recife (Pernambuco, Brasil), relatam a indicação de meios líquidos preparados com *Z.*

mobilis para tratar pacientes com distúrbios intestinais, principalmente colite crônica (DE MORAIS et al., 1993). Em outro estudo realizado por TALLYNE DE AGUIAR SILVA et al., 2020, foi avaliado o consumo do meio fermentado pela *Z. mobilis* em indivíduos com constipação intestinal e os resultados mostraram uma melhora no trânsito intestinal desses pacientes. Além disso, o uso da *Z. mobilis* como probiótico foi avaliado em ratos Wistar, e observou-se que sua ingestão não ocasionou alterações no peso, no consumo de água e ração, sua presença não foi detectada no sangue, fígado ou baço desses animais e nenhum efeito histológico foi observado. O trabalho conclui que o uso dessa bactéria é seguro e não patogênico (DE AZERÊDO et al., 2010).

A partir do seu uso como probiótico e papel exercido na melhora de sintomas intestinais, a *Z. mobilis* se destaca como um microrganismo viável para ser utilizado como hospedeiro de sistemas de expressão. Nessa bactéria, a expressão de biofármacos de interesse, especialmente anticorpos, ainda não foi descrita na literatura, o que torna mais importante estudos sobre esse microrganismo.

Nesse trabalho, a *Z. mobilis wild type* e transformada com plasmídeos de interesse foi testada em dois experimentos *in vivo*. No primeiro experimento, foi realizado um teste inicial com a administração da *Z. mobilis wild type* e transformada com o plasmídeo anti-TNF scFv em um experimento que teve 15 dias de duração. A concentração utilizada do DSS foi de 2% nos primeiros 4 dias, contudo, os animais não apresentaram sinais físicos de início da doença e essa concentração foi aumentada para 3% durante os 11 dias restantes. A partir dessa alteração na concentração do DSS, os animais perderam peso durante o experimento, principalmente no grupo DSS, que também apresentou aumento no DAI. Contrastando com esses resultados, os grupos que receberam a *Z. mobilis* (DZWT e DZTNF) apresentaram um declínio nestas métricas a partir do dia 10.

Em relação aos marcadores moleculares, foi possível observar que os grupos que receberam o tratamento com *Z. mobilis* (DZWT e DZTNF) apresentaram uma mudança no perfil de resposta a inflamação, com um aumento significativo na expressão dos genes correspondentes às proteínas Mucina 3 e Ocludina, relacionadas com a integridade da barreira mucosa.

Além desses marcadores observou-se um aumento significativo na expressão da citocina TGF β nos grupos DZWT e DZTNF em relação ao grupo controle NT. Essa citocina é importante por estar envolvida com o controle do crescimento celular, produção de matriz extracelular e na regeneração da mucosa intestinal danificada durante alguma DII (FARIA; WEINER, 2005). Não foi possível observar variações significativas de outros marcadores moleculares, o que pode ser creditado a uma variabilidade entre os pontos experimentais e a alteração no protocolo com aumento do DSS para tentar induzir uma colite expressiva.

Apesar de uma resposta pouco significativa para a maioria dos marcadores, observou-se que os camundongos que receberam *Z. mobilis* apresentaram uma recuperação melhor do que aqueles camundongos que não receberam a bactéria, tanto nos parâmetros macroscópicos como nos marcadores de recuperação do epitélio intestinal, o que sugere que a *Z. mobilis* melhorou o quadro geral dos camundongos. No entanto, a *Z. mobilis* produtora de anti-TNF não mostrou uma melhora adicional à observada para bactéria hospedeira, sugerindo que o anti-TNF recombinante produzido não teve efeito observável no experimento.

Com base nos resultados anteriores do experimento piloto (primeiro teste *in vivo*), algumas modificações foram realizadas para a otimização de um novo protocolo experimental. Optou-se pela substituição do plasmídeo anti-TNF scFv para um segundo experimento com vetor produtor do anticorpo anti-CD3 scFv fusionado a proteína de ancoragem OMP da bactéria *Z. mobilis*. Além disso, optou-se por uma administração da *Z. mobilis* nos grupos DZWT e DZOMP durante todo o período do experimento (10 dias). A concentração utilizada do DSS foi também alterada para 3% e administrada apenas durante metade do experimento (5 dias), seguido de uma fase de recuperação.

O novo protocolo levou de uma forma geral às mesmas observações. Os animais dos grupos DSS, DZWT e DZOMP que beberam água com DSS 3% durante os primeiros cinco dias apresentaram perda de peso gradual, que se estabilizou após o sétimo dia. Os grupos NT, ZWT e ZOMP permaneceram estáveis e muito semelhantes durante o experimento. Curiosamente, o grupo DZWT apresentou resultados de DAI semelhantes aos grupos não tratados, sugerindo que isso foi possível devido ao tratamento unicamente com *Z. mobilis*.

Outro parâmetro avaliado e sugestivo de que o uso de *Z. mobilis* pode aliviar os sintomas causados pelo uso de DSS é a redução significativa na relação peso e comprimento do cólon dos grupos DZWT e DZOMP em relação ao grupo DSS, cujo aumento está relacionado à intensidade do processo inflamatório. Essas avaliações das características macroscópicas analisadas devido à gravidade da colite induzida por DSS sugerem que a progressão da doença e os sintomas foram diminuídos na presença de *Z. mobilis* no trato gastrointestinal de camundongos.

O efeito da administração de DSS no cólon de camundongos é a perda da integridade da barreira das células epiteliais intestinais. Devido a essas lesões, o tecido fica exposto a microrganismos presentes no lúmen intestinal, causando uma resposta inflamatória aguda (EICHELE; KHARBANDA, 2017a; JOHANSSON et al., 2010). Este processo inflamatório causa uma desordem arquitetônica das criptas que pode causar sua perda ou rearranjos irregulares, como hiperplasia; outras alterações histológicas típicas da colite induzida por DSS são um aumento de células inflamatórias na lâmina própria, erosão, ulceração e diminuição de células caliciformes (CHASSAING et al., 2014; PERŠE; CERAR, 2012a).

Todas essas alterações típicas foram encontradas principalmente nas seções colônicas do grupo DSS, e nos grupos DZWT e DZOMP foi observado a presença de células inflamatórias na lâmina própria somado à presença de criptas irregulares. Os grupos NT, ZWT e ZOMP apresentaram um cólon saudável com arquitetura histológica integral. Nos grupos DZWT e DZOMP foi observada melhora na mucosa colônica, como diminuição de células inflamatórias na lâmina própria, criptas recuperando seu aspecto regular e aumento de células Goblet. Apesar de não terem relevância estatística no escore histológico, essas alterações foram percebidas nas amostras de tecidos analisadas.

As mucinas, glicoproteínas que constituem o muco e são produzidas pelas células Goblet, desempenham um papel importante na proteção da barreira da mucosa intestinal. A mucina 3 é expressa no cólon e secretada em resposta a citocinas inflamatórias e está relacionada à fisiopatologia da DII, como na colite ulcerativa (DOROFEYEV et al., 2013; SHEKELS; HO, 2003). No entanto, observamos uma redução nos níveis de mRNA de *Muc3* nos camundongos tratados com DSS, mesmo após cinco dias sem consumo de DSS, indicando uma degradação persistente

da camada de muco, mantendo elevados os níveis de inflamação. Por outro lado, os grupos DZWT e DZOMP apresentaram um aumento significativo na expressão de *Muc3* em comparação ao grupo DSS, sugerindo um processo de restauração da barreira mucosa, possivelmente devido à ingestão de *Z.mobilis*.

Outra proteína estrutural estudada, Ocludina, é um componente das junções intercelulares que promove a integridade estrutural desta barreira (CHELAKKOT; GHIM; RYU, 2018; WANG et al., 2020). A sua expressão está associada à recuperação da mucosa intestinal. Os grupos que receberam DSS e foram tratados com *Z. mobilis* (DZWT e DZOMP) apresentaram aumento significativo do gene *Ocln* em relação ao grupo controle. No grupo DSS esta expressão permaneceu diminuída. Esses dados, reforçam os observados no experimento 1, e corroboram a hipótese de que a presença de *Z. mobilis* poderia restabelecer as funções de integridade do epitélio colônico, melhorando a recomposição tecidual e controlando a inflamação causada pela administração de DSS.

A IL-6 na colite ulcerativa, juntamente com o TNF, medeiam a resposta inflamatória intestinal (FRIEDRICH; POHIN; POWRIE, 2019; GRIVENNIKOV et al., 2009; NEURATH, 2019). A citocina TNF é altamente expressa em pacientes com DII e está relacionada a danos na integridade intestinal da mucosa, necrose das células de Paneth e células Goblet, neoangiogênese e ativação de macrófagos que aumentam a produção de citocinas inflamatórias (GÜNTHER et al., 2011; NEURATH, 2019). Neste contexto, ao assumir um dos papéis centrais na inflamação, o TNF torna-se um alvo ideal para imunoterapias.

Nesse segundo experimento *in vivo*, a expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias *Il6*, *Tnfa*, *Il1b* e do fator de transcrição *Rorc* foram induzidas pelo grupo DSS, e foram significativamente diminuídas nos grupos DZWT e DZOMP, sugerindo que *Z. mobilis* pode aliviar a resposta inflamatória de forma significativa.

O TGF β é uma importante citocina na tolerância mediada por células T, induzindo diferenciação de células T regulatórias (Treg) concomitante à expressão de Foxp3, além de estar envolvida no controle do crescimento celular, produção de matriz extracelular e regeneração da mucosa intestinal (FARIA; WEINER, 2005; WANG; ZHAO; WAN, 2023).

O grupo DSS apresentou uma redução na expressão do gene *Tgfb* enquanto a coadministração de *Z. mobilis* aumentou nos grupos DZWT e DZOMP em comparação com camundongos não tratados. Isto, associado à diminuição de *Il17* (grupo DZWT), pode resultar na diferenciação de células reguladoras em detrimento das Th17, amenizando a resposta inflamatória.

Outra citocina relacionada às células T reguladoras é a IL-10, que pode reduzir a expressão de citocinas inflamatórias como TNF e IL-6. A inativação da IL-10 causa um quadro de colite crônica com aumento de diversas citocinas inflamatórias (FRIEDRICH; POHIN; POWRIE, 2019). Tanto o grupo DSS quanto os grupos DZWT e DZOMP induziram *Il10*, mas a administração de *Z. mobilis* parece potencializar o fenótipo regulatório ao induzir eficientemente uma variedade de genes imunomoduladores que inclui *Tgfb*, *Il5*, *Foxp3* e *Stat5*.

Esses dados sugerem que os grupos que receberam *Z. mobilis* (DZWT e DZOMP) apresentaram alterações no perfil da resposta inflamatória, com aumento de marcadores anti-inflamatórios como IL-10 e o fator de transcrição Foxp3, além de aumento da expressão de genes correspondentes a proteínas relacionadas à integridade da barreira mucosa, como *Muc3* e *Ocln*. Além disso, houve diminuição de citocinas inflamatórias como *Il6*, *Tnfa*, *Il1b* e do fator de transcrição *Rorc*.

A colite ulcerativa também está relacionada à disbiose microbiana intestinal em humanos, com diminuição da diversidade e abundância de microrganismos (LEE; CHANG, 2021; ZHANG et al., 2022). A administração de DSS também altera o padrão de distribuição de táxons microbianos em camundongos (EICHELE; KHARBANDA, 2017b; PERŠE; CERAR, 2012b). Amostras de fezes de cada grupo de camundongos foram agrupadas antes do sequenciamento do gene 16S rRNA e depois usadas para estimar a diversidade do microbioma em nível comunitário, conforme realizado por RAY et al., 2019; RODRÍGUEZ-RUANO et al., 2020.

A análise da composição da comunidade bacteriana revelou que no último dia de administração do DSS (dia 5), houve aumento na abundância relativa do filo Actinomycetota no grupo DSS, com destaque para o aumento da população da espécie *Bifidobacterium pseudolongum*. Esse microrganismo se mostrou importante na redução da gravidade da colite induzida por DSS em camundongos (BIBILONI et al., 2005; TATSUOKA et al., 2023), e pode ter aparecido nesses resultados como

consequência da administração do DSS. O *B. pseudolongum* é utilizado como probiótico e aparece na formulação do VSL#3 (CHENG et al., 2020; SOOD et al., 2009).

Após a interrupção da administração do DSS e decorridos 10 dias do início do experimento (segundo teste *in vivo*) - dia 10, os animais dos grupos DSS, DZWT e DZOMP apresentaram mudança no perfil de distribuição dos filos. Marcadamente um aumento em Pseudomonadota (substituindo Actinomycetota) no grupo DSS com abundância em nível de espécie de *Escherichia coli*, *Bacteroides acidifaciens* e *Romboutsia ilealis*. A presença da *E. coli*, muitas vezes oportunista, está presente tanto em casos de colite ulcerativa em humanos como em modelos murinos e pode agravar a gravidade da doença (CHLOÉ MIRSEPASI-LAURIDSEN et al., 2019; NGUYEN et al., 2015). Este aumento nos filos Actinomycetota no grupo DSS no dia 5 e Pseudomonadota no dia 10 também foi encontrado na colite induzida por modelos murinos com DSS (EICHELE; KHARBANDA, 2017a; PERŠE; CERAR, 2012a), juntamente com o aumento do gênero *Bacteroides*, como *Bacteroides acidifaciens* e *Bacteroides intestinalis* observados no grupo tratado com DSS (BIAN et al., 2019; NGUYEN et al., 2015).

Os grupos DZWT e DZOMP no dia 10 apresentaram uma diminuição do filo Bacillota e aumento do filo Verrucomicrobiota com destaque para a presença da bactéria *Akkermansia muciniphila*. Esta bactéria desempenha um papel na regulação da função da barreira intestinal e está envolvida na resposta imunológica e metabólica do hospedeiro (BIAN et al., 2019). Além disso, *A. muciniphila* pode modular a expressão de genes relacionados à produção de muco, uma vez que utiliza essas glicoproteínas como fonte de energia (ZHENG et al., 2023).

QU et al., 2021 relataram a relação entre *A. muciniphila* e o aumento da expressão do gene *Muc3*, também observado neste trabalho após o tratamento dos camundongos com *Z. mobilis*. Além disso, esse microrganismo está reduzido em pacientes com DII, contrastando com a sua presença marcante em indivíduos saudáveis (NGUYEN et al., 2015; ZHENG et al., 2023). O aumento da abundância de *A. muciniphila* após o consumo de *Z. mobilis* necessita de maiores esclarecimentos devido à limitação estatística deste achado, mas poderia representar um mecanismo para a ação de *Z. mobilis* na colite experimental.

Os resultados observados após a administração da *Z. mobilis wild type* ou da *Z. mobilis* recombinante não diferiram de forma significativa. O que sugere que a presença do transgene codificador do scFv anti-CD3 não apresentou impacto positivo ou negativo no desfecho do experimento. Como mencionado anteriormente, a expressão do scFv pode ter sido insuficiente no sentido de que uma pequena fração das células bacterianas apresentavam o fragmento de anticorpo de forma biologicamente ativa.

Tomados em conjunto, estes dados demonstram, de forma inédita, a capacidade de *Z. mobilis* de conter a progressão da doença no cólon intestinal no modelo murino de colite induzida por DSS, restabelecendo as funções de integridade do epitélio do cólon, alterando benéficamente a microbiota e mostrando alívio significativo da inflamação causada pela administração do DSS.

Para próximos testes, alguns pontos precisam ser reavaliados e ajustados para que os resultados sejam mais consistentes. Como por exemplo, o tempo de tratamento com *Z. mobilis*, bem como a dose de administração dessas bactérias ou ainda, a quantidade de proteína produzida e secretada por essas células, sendo possível uma mudança de promotor para um com menor taxa transcricional, para diminuir a formação de corpos de inclusão e aumentar a quantidade de proteína secretada para o meio.

Apesar das limitações do trabalho, esse é um estudo pioneiro utilizando *Z. mobilis* no modelo murino de colite induzida por DSS. E ainda a utilização inédita dessa bactéria como hospedeiro para a produção dos anticorpos recombinantes anti-TNF e anti-CD3. Esse trabalho abre caminhos para a realização de novos estudos utilizando esse microrganismo promissor para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que a construção dos vetores e transformação em *Zymomonas mobilis*, mostrou que essa bactéria é um organismo viável para a produção dos anticorpos de interesse. No entanto, a produção heteróloga ainda precisa ser melhorada para aumentar o rendimento da obtenção dos fragmentos de anticorpos. Vale ressaltar que este trabalho é pioneiro na utilização da *Z. mobilis* como microrganismo produtor de anticorpos recombinantes, e como veículo de entrega no tratamento de colite ulcerativa experimental em camundongos. Esse trabalho abre portas para utilização desse novo modelo de estudo.

O tratamento com *Z. mobilis wild type* demonstrou ser eficaz na diminuição da inflamação, o que é indicado pela estabilidade na perda de peso, no índice de atividade da doença e na melhoria dos índices histopatológicos. Somado a isso, o tratamento com *Z. mobilis* restaurou a barreira mucosa além de aumentar a expressão dos genes *Muc3* e *Ocln* e potencializar um fenótipo regulador, induzindo genes imunomoduladores como *Tgfb*, *Il5*, *Il10* e *Foxp3* e reduzindo a expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias *Tnf*, *Il6* e *Il17*. A análise do microbioma mostrou que a *Z. mobilis* altera a microbiota intestinal, aumentando a abundância da bactéria *Akkermansia muciniphila* e diminuindo *Escherichia coli*. Por fim, os dados sugerem que *Z. mobilis* pode aliviar a progressão da doença e ser considerado um possível adjuvante probiótico para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

A partir desse trabalho, envolvendo *Z. mobilis*, o Laboratório de Imunologia Molecular da UnB, estabeleceu uma nova vertente em suas pesquisas com a utilização desse microrganismo. Visando otimizar esse modelo experimental, novos vetores foram construídos para melhorar a expressão dos anticorpos de interesse e estão sendo utilizados em novos projetos no laboratório. Um desses vetores utiliza o mecanismo de co-repressão da síntese proteica através da presença do antibiótico tetraciclina, como forma de controlar a expressão gênica e diminuir a possibilidade de formação de corpos de inclusão pela bactéria; outro vetor desenvolvido conta com a proteína de ancoramento Esterase (EST) proveniente da bactéria *Pseudomonas putida*, com o intuito de melhorar a exposição desses anticorpos na parede celular da *Z. mobilis*. Outras modificações que podem ser implementadas estão relacionadas com as condições de crescimento e cultivo da *Z. mobilis*, para a melhora da expressão

das proteínas de interesse, o que pode refletir na concentração da dose utilizada para tratamento da colite ulcerativa experimental, bem como no tempo de tratamento com essa bactéria. Outras alterações podem ser estabelecidas a nível de promotor, para ajustar a expressão dos anticorpos no meio de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDARS-GARCÍA, L.; CHAPARRO, M.; GISBERT, J. P. Systematic Review: The Gut Microbiome and Its Potential Clinical Application in Inflammatory Bowel Disease. **Microorganisms**, v.30, n.9, 2021.
- AMAMOU, A. et al. Dietary salt exacerbates intestinal fibrosis in chronic TNBS colitis via fibroblasts activation. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. et al. Environmental triggers in IBD: A review of progress and evidence. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v.15, 2018.
- ARUMUGAM, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, 2011.
- AZAD, M. A. K. et al. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. **BioMed Research International**, 2018.
- BEHNSEN, J. et al. Probiotics: Properties, examples, and specific applications. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 4, 2013.
- BIAN, X. et al. Administration of *Akkermansia muciniphila* Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.
- BIBILONI, R. et al. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 100, n. 7, 2005.
- BOKULICH, N. A. et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. **Nature Methods**, v. 10, n. 1, 2013.
- BRAGA, A. et al. *Zymomonas mobilis* as an emerging biotechnological chassis for the production of industrially relevant compounds. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 1, 2021.
- BRIGIDO, M. M. **Clonagem e expressão em Escherichia coli da porção variável de dois anticorpos anti-Z-DNA**. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 1992.
- CALAZANS, G. et al. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, n. 4, 2000.
- CAMPOS, I. A. et al. *Zymomonas mobilis* culture protects against sepsis by modulating the inflammatory response, alleviating bacterial burden and suppressing splenocyte apoptosis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1–2, 2013.
- CANI, P. D. Human gut microbiome: Hopes, threats and promises. **Gut**, v.67, n.9, 2018.
- CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v.7, n.5, 2010.
- CHASSAING, B. et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Current Protocols in Immunology**, v.4, n.104, 2014.
- CHELAKKOT, C.; GHIM, J.; RYU, S. H. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. **Experimental and Molecular Medicine**, v.50, 2018.
- CHEN, X. et al. Prevent effects of *Lactobacillus fermentum* HY01 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. **Nutrients**, v. 9, n. 6, 2017.
- CHEN, Z. et al. *Lactobacillus fermentum* ZS40 Ameliorates Inflammation in Mice With Ulcerative Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 2021.

- CHENG, F. S. et al. Probiotic mixture VSL#3: An overview of basic and clinical studies in chronic diseases. **World Journal of Clinical Cases**, v. 8, n. 8, 2020.
- CHEROUTRE, H.; LAMBOLEZ, F.; MUCIDA, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, 2011.
- CHIABAI, M. J. et al. Mucosal delivery of *Lactococcus lactis* carrying an anti-TNF scFv expression vector ameliorates experimental colitis in mice. **BMC Biotechnology**, v. 19, n. 1, 2019.
- CHLOÉ MIRSEPASI-LAURIDSEN, H. et al. *Escherichia coli* Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 32, 2019.
- CHO, J. Y. et al. β -Caryophyllene attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice via modulation of gene expression associated mainly with colon inflammation. **Toxicology Reports**, v. 2, 2015.
- COOPER, H. S. et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. **Laboratory investigation: a journal of technical methods and pathology**, v. 69, n. 2, 1993.
- CORREA-ASCENCIO, M. et al. Pulque production from fermented agave sap as a dietary supplement in Prehispanic Mesoamerica. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 39, 2014.
- COSIMI, A. et al. Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. **Transplantation**, v. 32, 1981.
- DA LUZ MOREIRA, A.; DE CAMPOS LOBATO, L. F.; DE SOUZA, H. S. IBD Epidemiology: What is Going on in the Developing World? Results from 163,000 Patients. **Gastroenterology**, v. 156, n. 6, 2019.
- D'AMICO, F. et al. Tofacitinib in the treatment of ulcerative colitis: efficacy and safety from clinical trials to real-world experience. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v.12, 2019.
- DANESE, S.; FIOCCHI, C. Ulcerative Colitis. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n.18, 2011.
- DANILOVA, N.; AMEMIYA, C. T. Going adaptive: The saga of antibodies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2009.
- DE AZERÊDO, G. A. et al. In vivo assessment of possible probiotic properties of *Zymomonas mobilis* in a Wistar rat model. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 2, 2010.
- DE FÁTIMA MACEDO SANTOS, J. et al. The effect of *Zymomonas mobilis* culture on experimental *Schistosoma mansoni* infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 6, 2004.
- DE MORAIS, J. et al. *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. **Journal of Biotechnology**, v. 31, 1993.
- DEGUCHI, Y. et al. The S1P receptor modulator FTY720 prevents the development of experimental colitis in mice. **Oncology Reports**, v. 16, n. 4, 2006.
- DELEU, S. et al. Short chain fatty acids and its producing organisms: An overlooked therapy for IBD? **EBioMedicine**, 2021.
- D'HAENS, G. Risk and benefits of biologic therapy for inflammatory bowel diseases. **Gut**, v. 56, n. 5, 2007.
- DOROFEYEV, A. E. et al. Mucosal barrier in ulcerative colitis and crohn's disease. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2013, 2013.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, 2004.

- EDGAR, R. C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, 2011.
- EDGAR, R. C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature Methods**, v. 10, n. 10, 2013.
- EICHELE, D. D.; KHARBANDA, K. K. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v.23, n.33, 2017.
- EINSFELDT, K. et al. Recombinant L-Asparaginase from *Zymomonas mobilis*: A potential new antileukemic agent produced in *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 1 2016.
- ELLIOTT, M. J. et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. **Arthritis and Rheumatism**, v.36, n. 12, 1993.
- ERBEN, U. et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 8, 2014.
- ERMUND, A. et al. Mucus properties and goblet cell quantification in mouse, rat and human ileal Peyer's patches. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.
- FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance. **Immunological Reviews**, v. 206, 2005.
- FEDORAK, R. N. Understanding Why Probiotic Therapies Can be Effective in Treating IBD. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, n. 3, 2008.
- FEUERSTEIN, J. D.; CHEIFETZ, A. S. Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 92, n. 7, 2017.
- FORSTER, K. et al. An oral CD3-specific antibody suppresses T-cell-induced colitis and alters cytokine responses to T-cell activation in mice. **Gastroenterology**, v. 143, n. 5, 2012.
- FRIEDRICH, M.; POHIN, M.; POWRIE, F. Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. **Immunity**, v. 50, n. 4, 2019.
- GOEDDEL, D. V et al. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. **Biochemistry**, v. 76, n. 1, 1979.
- GOMES-SANTOS, A. C. et al. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents inflammatory intestinal disease in mice by IL-10- and TLR2-dependent pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.
- GRIFFITHS, O. R. et al. Inflammatory bowel disease and targeted oral anti-TNF α therapy. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 119, 2020.
- GRIVENNIKOV, S. et al. IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. **Cancer Cell**, v. 15, n. 2, 2009.
- GUBATAN, J. et al. Antimicrobial peptides and the gut microbiome in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 43, 2021.
- GÜNTHER, C. et al. Caspase-8 regulates TNF- α -induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. **Nature**, v. 477, n. 7364, 2011.
- HAAS, B. J. et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. **Genome Research**, v. 21, n. 3, 2011.
- HALLORAN, K.; UNDERWOOD, M. A. Probiotic mechanisms of action. **Early Human Development**, v. 135, 2019.

- HARRIS, U. J.; LARSON, S. 8; MCPHERSON, A. Comparison of Intact Antibody Structures and the Implications for Effector Function. **Advances in Immunology**, v. 72, 1999.
- HE, M. X.; FENG, H.; ZHANG, Y. Z. Construction of a novel cell-surface display system for heterologous gene expression in *Escherichia coli* by using an outer membrane protein of *Zymomonas mobilis* as anchor motif. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 12, 2008.
- HEROLD, K. et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 22, 2002.
- HIMMEL, M. E. et al. Regulatory T-cell therapy for inflammatory bowel disease: More questions than answers. **Immunology**, v.136, n. 2, 2012.
- HUANG, E. et al. Imlifidase for the treatment of anti-HLA antibody-mediated processes in kidney transplantation. **American Journal of Transplantation**, 2022.
- IMAM, T. et al. Effector T helper cell subsets in inflammatory bowel diseases. **Frontiers in Immunology**, v.9. 2018.
- JANG, S. E. et al. Simultaneous Amelioration of Colitis and Liver Injury in Mice by *Bifidobacterium longum* LC67 and *Lactobacillus plantarum* LC27. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.
- JOHANSSON, M. E. V. et al. Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, 2010.
- KALNENIEKS, U.; PAPPAS, K. M.; BETTENBROCK, K. *Zymomonas mobilis* metabolism: Novel tools and targets for its rational engineering. **Em: Advances in Microbial Physiology**. v. 77, 2020.
- KANG, I.; KIM, Y.; LEE, H. K. Double-edged sword: $\gamma\delta$ T cells in mucosal homeostasis and disease. **Experimental and Molecular Medicine**, 2023.
- KAPLAN, G. G. The global burden of IBD: From 2015 to 2025. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 12, 2015.
- KAPLAN, G. G.; NG, S. C. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v. 152, n. 2, 2017.
- KAPLON, H. et al. Antibodies to watch in 2023. **mAbs**, v. 15, n. 1, 2023.
- KEYMEULEN, B. et al. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, 2005.
- KIMBALL, J. A. et al. The OKT3 Antibody Response Study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ transplantation. **Transplant Immunology**, v. 3, n. 3, 1995.
- KRUIS, W. et al. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 11, n. 5, 1997.
- KÜHL, A. A. et al. Role of gamma delta T cells in inflammatory bowel disease. **Pathobiology**, 2003.
- KOVACH, M. E. et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **Gene**, v.166, 1995.
- LAROU, H. et al. Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.
- LEE, M.; CHANG, E. B. Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and the Microbiome—Searching the Crime Scene for Clues. **Gastroenterology**, v. 160, n. 2, 2021.

- LEVIN, A. D.; WILDENBERG, M. E.; VAN DEN BRINK, G. R. Mechanism of action of anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v.12, n.6, 2016.
- LIN, Y. et al. Non-hematopoietic STAT6 induces epithelial tight junction dysfunction and promotes intestinal inflammation and tumorigenesis. **Mucosal Immunology**, v. 12, n. 6, 2019.
- LIU, L. et al. The potential use of *Zymomonas mobilis* for the food industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2022.
- LO SASSO, G. et al. The reduction of DSS-induced colitis severity in mice exposed to cigarette smoke is linked to immune modulation and microbial shifts. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.
- MACK, D. R. Probiotics in inflammatory bowel diseases and associated conditions. **Nutrients**, v.3, n.2, 2011.
- MAGOČ, T.; SALZBERG, S. L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 27, n. 21, 2011.
- MARTIN-GALLAUSIAUX, C. et al. Mechanisms and functional importance in the gut. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.80, n.1, 2021.
- MATTHES, H. et al. Clinical trial: Probiotic treatment of acute distal ulcerative colitis with rectally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, 2010.
- MOREIRA, T. G. et al. Nasal Administration of Anti-CD3 Monoclonal Antibody (Foralumab) Reduces Lung Inflammation and Blood Inflammatory Biomarkers in Mild to Moderate COVID-19 Patients: A Pilot Study. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.
- MOREIRA, T. G. et al. Nasal administration of anti-CD3 mAb (Foralumab) downregulates NKG7 and increases TGFB1 and GIMAP7 expression in T cells in subjects with COVID-19. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 120, n. 11, 2023.
- NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v.14, n.5, 2014.
- NEURATH, M. F. Current and emerging therapeutic targets for IBD. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v.14, n.5, 2017.
- NEURATH, M. F. Targeting immune cell circuits and trafficking in inflammatory bowel disease. **Nature Immunology**, v. 20, n. 8, 2019.
- NGUYEN, T. L. A. et al. How informative is the mouse for human gut microbiota research? **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 8, n. 1, 2015.
- NISHIDA, A. et al. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Clinical Journal of Gastroenterology**, v.11, n.1, 2018.
- OH, G. M. et al. Therapeutic Potential of *Escherichia coli* Nissle 1917 in Clinically Remission-attained Ulcerative Colitis Patients: A Hospital-based Cohort Study. **Korean J Gastroenterol**, v. 77, n. 1, 2021.
- PANDA, S. K.; COLONNA, M. Innate lymphoid cells in mucosal immunity. **Frontiers in Immunology**, v.10, 2019.
- PARAMSOTHY, S. et al. The current state of the art for biological therapies and new small molecules in inflammatory bowel disease. **Mucosal Immunology**, v.11, n.6, 2018.
- PERŠE, M.; CERAR, A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: Traps and tricks. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012a.

- PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v.14, n.3, 2014.
- PLEVY, S. et al. A Phase I Study of Visilizumab, a Humanized Anti-CD3 Monoclonal Antibody, in Severe Steroid-Refractory Ulcerative Colitis. **Gastroenterology**, v. 133, n. 5, 2007.
- QIU, P. et al. The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2022.
- QU, S. et al. *Akkermansia muciniphila* Alleviates Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Acute Colitis by NLRP3 Activation. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 2, 2021.
- QUARESMA, A. B. et al. Temporal trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases in the public healthcare system in Brazil: A large population-based study. **Lancet Regional Health Americas**, v. 9, n.13, 2022.
- QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, 2013.
- RAY, K. J. et al. High-throughput sequencing of pooled samples to determine community-level microbiome diversity. **Annals of Epidemiology**, v. 39, 2019.
- REMBACKEN, B. et al. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. **Lancet**, v. 354, 1999.
- REMICADE. **REMICADE (infliximab): lyophilized concentrate for injection, for intravenous use.** Disponível em:
<www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/103772s5359lbl.pdf>.
- RINNINELLA, E. et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, 2019.
- RODRÍGUEZ-RUANO, S. M. et al. Methodological Insight Into Mosquito Microbiome Studies. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020.
- ROGERS, P. L. et al. Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*. **Microbial Reactions**, v.13, 1982.
- RUDOLPH, M. G.; STANFIELD, R. L.; WILSON, I. A. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. **Annual Review of Immunology**, v. 24, 2006.
- SAMBROOK, J; RUSSEL, D. W. Molecular Cloning – a laboratory manual. **Cold Spring Harbor**, Nova York, 3ª edição, 2001.
- SANDBORN, W. J. et al. Certolizumab Pegol for the Treatment of Crohn's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 18, 2017.
- SANDBORN, W. J. et al. Anti-CD3 antibody visilizumab is not effective in patients with intravenous corticosteroid-refractory ulcerative colitis. **Gut**, v. 59, n. 11, 2010.
- SANDBORN, W. J. et al. Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 18, 2017.
- SANDS, B. E. et al. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 13, 2019.
- SCHROEDER, B. O. Fight them or feed them: How the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. **Gastroenterology Report**, v.7, n.1, 2019.
- SCULLY, M. et al. Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 4, 2019.

- SHEKELS, L. L.; HO, S. B. Characterization of the mouse Muc3 membrane bound intestinal mucin 5' coding and promoter regions: Regulation by inflammatory cytokines. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, v. 1627, n. 2–3, 2003.
- SHEN, Z.-H. et al. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 1, 2018.
- SOLER, D. et al. The binding specificity and selective antagonism of vedolizumab, an anti- $\alpha 4\beta 7$ integrin therapeutic antibody in development for inflammatory bowel diseases. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 330, n. 3, 2009.
- SOOD, A. et al. The Probiotic Preparation, VSL#3 Induces Remission in Patients With Mild-to-Moderately Active Ulcerative Colitis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 11, 2009.
- SOUZA, B. M. et al. *Lactococcus lactis* carrying the pValac eukaryotic expression vector coding for IL-4 reduces chemically-induced intestinal inflammation by increasing the levels of IL-10-producing regulatory cells. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, 2016.
- SPADIUT, O. et al. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. **Trends in Biotechnology**, 2014.
- STANGE, E. F.; SCHROEDER, B. O. Microbiota and mucosal defense in IBD: an update. **Expert Review of Gastroenterology and Hepatology**, v.13, n.10, 2019.
- STEELAND, S.; LIBERT, C.; VANDENBROUCKE, R. E. A new venue of TNF targeting. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n.5, 2018.
- ŠTOFILOVÁ, J. et al. Probiotic-Based Intervention in the Treatment of Ulcerative Colitis: Conventional and New Approaches. **Biomedicines**, v.10, n.9, 2022.
- SWINGS, J.; GENETICS, M. The Biology of *Zymomonas*. v. 41, n. 1, 1977.
- TALLYNE DE AGUIAR SILVA, A. et al. Effect of *Zymomonas mobilis* probiotic on cholesterol and its lipoprotein fractions and the intestinal regulation. **Clinical Nutrition**, v. 39, n. 12, 2020.
- TARGAN, S. et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n.15, 1997.
- TATSUOKA, M. et al. Administration of *Bifidobacterium pseudolongum* suppresses the increase of colonic serotonin and alleviates symptoms in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v.42, n.3, 2023.
- THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 474, n.11, 2017.
- TORRES, J. et al. Crohn's disease. **The Lancet**, v. 389, n. 10080, 2017.
- TURSI, A. et al. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: A double-blind, randomized, placebo-controlled study. **American Journal of Gastroenterology**, v. 105, n. 10, 2010.
- UNGARO, R. et al. Ulcerative colitis. **The Lancet**, v. 389, n. 10080, 2017.
- VAN DER POST, S. et al. Structural weakening of the colonic mucus barrier is an early event in ulcerative colitis pathogenesis. **Gut**, v. 68, n. 12, 2019.
- VAN DER SLUIS, M. et al. Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. **Gastroenterology**, v. 131, n. 1, 2006.

- VAN DER WOUDE, C. J. et al. Phase I, double-blind, randomized, placebo-controlled, dose-escalation study of NI-0401 (a fully human anti-CD3 monoclonal antibody) in patients with moderate to severe active Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 16, n. 10, 2010.
- WALSH, G.; WALSH, E. Biopharmaceutical benchmarks 2022. **Nature Biotechnology**, v. 40, n. 12, 2022.
- WANG, J.; ZHAO, X.; WAN, Y. Y. Intricacies of TGF- β signaling in Treg and Th17 cell biology. **Cellular and Molecular Immunology**, v.20, n.9, 2023.
- WANG, X. et al. Chlamydia muridarum Alleviates Colitis via the IL-22/Occludin Signal Pathway. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.
- WEINER, H. et al. Oral tolerance. **Immunological Reviews**, v. 241, 2011.
- WHITTAKER, R. H. Evolution and Measurement of Species Diversity. **Taxon**, v. 21, n.2, 1972.
- WU, B. et al. Construction of a novel secretion expression system guided by native signal peptide of PhoD in *Zymomonas mobilis*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 78, n. 4, 2014.
- WU, H. Y. et al. Suppression of murine SLE by oral anti-CD3: Inducible CD4+CD25-LAP+ regulatory T cells control the expansion of IL-17+ follicular helper T cells. **Lupus**, v. 18, n. 7, 2009.
- WYSZYŃSKA, A. et al. Lactic acid bacteria—20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2015.
- XU, Y. H.; ZHU, W. M.; GUO, Z. Current status of novel biologics and small molecule drugs in the individualized treatment of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 28, n.48, 2022.
- YANG, S. et al. *Zymomonas mobilis* as a model system for production of biofuels and biochemicals. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 6, 2016.
- YANG, S. et al. Complete genome sequence and the expression pattern of plasmids of the model ethanologen *Zymomonas mobilis* ZM4 and its xylose-utilizing derivatives 8b and 2032. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, 2018.
- ZHANG, T. et al. The potential of *Akkermansia muciniphila* in inflammatory bowel disease. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 14–15, 2021.
- ZHANG, Y. et al. Association between intestinal microbiota and inflammatory bowel disease. **Animal Models and Experimental Medicine**, v. 5, n. 4, 2022.
- ZHENG, M. et al. The role of *Akkermansia muciniphila* in inflammatory bowel disease: Current knowledge and perspectives. **Frontiers in Immunology**, 2023.
- ZOU, S. L. et al. Enhanced electrotransformation of the ethanologen *Zymomonas mobilis* ZM4 with plasmids. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 2, 2012.
- ZURITA-TURK, M. et al. *Lactococcus lactis* carrying the pValac DNA expression vector coding for IL-10 reduces inflammation in a murine model of experimental colitis. **BMC Biotechnology**, v. 14, n. 1, 2014.

APÊNDICE

Apêndice A: Tabela com os valores de p value calculados pelo teste *one-way* ANOVA com Tukey para o peso corporal dos animais, referente à Figura 22A.

	Grupos	p value			Grupos	p value	
Dia 7	NT vs. DSS	< 0,05	*	Dia 13	NT vs. DSS	< 0,0001	****
	NT vs. DZTNF	< 0,05	*		NT vs. DZWT	< 0,01	**
					NT vs. DZTNF	< 0,001	***
Dia 8	NT vs. DZTNF	< 0,05	*	Dia 14	NT vs. DSS	< 0,0001	****
Dia 9	NT vs. DZTNF	< 0,05	*		NT vs. DZWT	< 0,001	***
					NT vs. DZTNF	< 0,0001	****
Dia 10	NT vs. DSS	< 0,05	*	Dia 15	NT vs. DSS	< 0,0001	****
	NT vs. DZTNF	< 0,05	*		NT vs. DZWT	< 0,0001	****
					NT vs. DZTNF	< 0,0001	****
Dia 11	NT vs. DSS	< 0,01	**				
	NT vs. DZTNF	< 0,01	**				
Dia 12	NT vs. DSS	< 0,001	***				
	NT vs. DZWT	< 0,05	*				
	NT vs. DZTNF	< 0,01	**				

Apêndice B: Tabela com os valores de p value calculados pelo teste *one-way* ANOVA com Tukey para DAI dos animais, referente à Figura 22B.

	Grupos	p value			Grupos	p value	
Dia 8	NT vs. DSS	< 0,05	*	Dia 13	NT vs. DSS	< 0,0001	****
	NT vs. DZWT	< 0,001	***		NT vs. DZWT	< 0,0001	****
	NT vs. DZTNF	< 0,0001	****		NT vs. DZTNF	< 0,0001	****
Dia 9	NT vs. DSS	< 0,001	***		DSS vs. DZWT	< 0,05	*
	NT vs. DZWT	< 0,0001	****		DSS vs. DZVW	< 0,01	**
	NT vs. DZTNF	< 0,0001	****		Dia 14	NT vs. DSS	< 0,0001
DSS vs. DZWT	< 0,01	**	NT vs. DZWT	< 0,0001		****	
			NT vs. DZTNF	< 0,0001		****	
Dia 10	NT vs. DSS	< 0,01	**	Dia 15	NT vs. DSS	< 0,0001	****
	NT vs. DZWT	< 0,001	***		NT vs. DZWT	< 0,0001	****
	NT vs. DZTNF	< 0,001	***		NT vs. DZTNF	< 0,0001	****
Dia 11	NT vs. DSS	< 0,0001	****	DSS vs. DZWT	< 0,01	**	
	NT vs. DZWT	< 0,01	**	DSS vs. DZTNF	< 0,001	***	
	NT vs. DZTNF	< 0,0001	****				
Dia 12	NT vs. DSS	< 0,0001	****				
	NT vs. DZWT	< 0,01	**				
	NT vs. DZTNF	< 0,0001	****				

Apêndice C: Tabela com os valores de p value calculados pelo teste *one-way* ANOVA com Tukey para DAI dos animais, referente à Figura 25B.

	Grupos	pvalue	
DIA 4	NT vs. DZOMP	< 0,01	**
	ZWT vs. DZOMP	< 0,05	*
	ZOMP vs. DZOMP	< 0,01	**
DIA 5	NT vs. DZOMP	< 0,001	***
	ZWT vs. DZOMP	< 0,01	**
	ZOMP vs. DZOMP	< 0,001	***
DIA 6	NT vs. DSS	< 0,05	*
	DSS vs. ZWT	< 0,01	**
	DSS vs. ZOMP	< 0,05	*
	ZWT vs. DZOMP	< 0,05	*
DIA 7	NT vs. DSS	< 0,01	**
	DSS vs. ZWT	< 0,01	**
	DSS vs. ZOMP	< 0,01	**

ANEXOS



Article

Therapeutic Effects of *Zymomonas mobilis* on Experimental DSS-Induced Colitis Mouse Model

Manuela Maragno do Almo ^{1,2}, Isabel Garcia Sousa ¹, Vitor Guimarães Olinto ^{1,3}, Sylvia Barbosa Pinhate ^{1,3}, José Luiz de Paula Rôlo Jivago ⁴, Davi Emanuel Ribeiro de Sousa ⁵, Márcio Botelho de Castro ⁵, Marciano Régis Rubini ⁶, Andrea Queiroz Maranhão ^{1,7} and Marcelo Macedo Brigido ^{1,7,*}

1 Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, Brazil; manu.maragno5@gmail.com (M.M.d.A.); isagarsousa@gmail.com (I.G.S.); olintogvitor@gmail.com (V.G.O.); sylviapinhate@gmail.com (S.B.P.); andreaqm@unb.br (A.Q.M.)

2 Molecular Pathology Graduation Program, Medicine Faculty, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, Brazil

3 Molecular Biology Graduation Program, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, Brazil

4 Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, Brazil; jivago@unb.br

5 Veterinary Pathology Laboratory, Campus Darcy Ribeiro, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, Brazil; daviers@hotmail.com (D.E.R.d.S.); mbcastro@unb.br (M.B.d.C.)

6 Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Embrapa Agroenergy, Brasilia 70770-901, Brazil; mrrubini@gmail.com

7 Institute for Immunology Investigation, National Institute of Science and Technology (iii-INCT), Brasilia 70067-900, Brazil

- Correspondence: brigido@unb.br

Abstract: *Zymomonas mobilis*, a Gram-negative bacteria observed in some popular beverages, is considered safe and has been studied for its potential therapeutic benefits. In this study, we explored its effects on the inflammatory process, tissue integrity, differential gene expression, and microbiota composition in an experimental dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis model in mice. As a result, *Z. mobilis* alleviated the symptoms caused by DSS administration, as indicated by reduced weight loss, disease activity index, a significant reduction in the colon weight/length ratio, and histopathological improvement. Also, *Z. mobilis* could restore the mucosal barrier as well as increase the expression of *Muc3* and *Ocln* genes. An analysis of 16S rRNA sequences showed that *Z. mobilis* alters gut microbiota, increasing *Akkermansia muciniphila* abundance and decreasing *Escherichia coli*. Furthermore, *Z. mobilis* seems to be involved in potentiating a regulatory phenotype by inducing immunomodulatory genes like *Tgfb*, *Il5*, *Il10*, and *Foxp3* and reducing the relative mRNA expression of

proinflammatory cytokines *TNF*, *Il6*, and *Il17*. Our data suggest that *Z. mobilis* could alleviate disease progression and be considered a possible probiotic adjuvant for pathologies of the bowel.

Keywords: *Zymomonas mobilis*; DSS-induced colitis; microbiota; immunomodulation; probiotics.

1. Introduction

The Gram-negative bacteria *Zymomonas mobilis* was initially identified in the ritualistic fermented beverage pulque, popular in Mesoamerica. However, it attracted attention for its anaerobic metabolism, which uses the alternative Entner–Doudoroff (ED) pathway, and its efficient ethanol production. It is also widely studied for its metabolite production of ethanol, sorbitol, succinic acid, levan, and lactate [1,2].

The use of *Z. mobilis* as a probiotic precedes its technological interest. Liquid cultures of *Z. mobilis* were used to treat patients with intestinal disorders, such as chronic colitis [3]. Its probiotic potential and improvement of immune function were also evaluated in rats [4]. In humans, *Z. mobilis* broth effectively regulated intestinal transit [5]. This bacterium has a differentiated physiology which is beginning to be understood, giving it unique nuances that can be better explored for its therapeutic use. Also, *Z. mobilis* is generally recognized as safe (GRAS status), which ensures its use in products for human consumption [6].

Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease belong to the intestinal bowel disease (IBD) group, characterized as idiopathic disorders that cause inflammation in the gastroin- testinal tract (GIT). Currently, UC has no cure and treatments are aimed at controlling and reducing the disease's symptoms. Treatment possibilities include the use of corticos- teroids, anti-inflammatories such as aminosaliclates, immunosuppressants, as well as the administration of immunotherapies [7,8].

Probiotic microorganisms appear as an adjuvant for IBD. In UC, they can help restore the epithelial/mucosal barrier, increasing the thickness of the mucus and the proteins that make up the intercellular junctions [9]. Also, they can increase the anti-inflammatory immune response by upregulating immunoglobulins, defensins, and bacteriocins in the lumen [10,11]. Several species of bacteria (e.g., *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*) and fungi (e.g., *Saccharomyces boulardii*) have been evaluated for their beneficial effects on humans [12]. To test whether UC patients could benefit from consuming *Z. mobilis* as a probiotic, we tested it in a mouse model of colitis. Experimental colitis was induced with dextran sulfate sodium (DSS) in mice receiving

Z. mobilis. The course of colitis was evaluated, and its effect on the inflammatory process was tested by analyzing its role in gene differential expression, in its impact on the microbiota of these animals, and in tissue recomposition. We found that treating mice orally with *Z. mobilis* ameliorates disease indexes and immunological and molecular markers. Moreover, *Z. mobilis* treatment partially reversed the alterations in the gut microbiota in colitis mice, mainly by increasing the abundance of potentially beneficial bacteria and decreasing the abundance of potentially harmful bacteria. This is the first report on *Z. mobilis* use in the experimental model of ulcerative colitis.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strain and Growth Conditions

Zymomonas mobilis (ZM4—ATCC 31821) cultures were grown in RM medium (2% w/v glucose; 1% w/v yeast extract; 0.1% w/v NH_4SO_4 ; 0.1% w/v MgSO_4 ; 0.2% w/v KH_2PO_4 ; pH 6) at 30°C and 200 rpm overnight. Doses were made with *Z. mobilis* at a concentration of 5×10^8 – 5×10^9 CFU/mL (Colony Forming Units per mL) with glycerol 25% (v/v) and stored at –80°C freezer. Before oral gavage, the doses were centrifuged (5000× g at 4°C for 12 min) and resuspended in 100 µL of sterile saline.

2.2. Experimental Design

All animal procedures followed the rules of the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA/ICB- UnB/Brazil) and approved by CEUA with protocol number 78/2018. Female C57BL/6 mice (10 weeks) were purchased from the CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica) of Universidade Estadual de Campinas (Unicamp—Campinas, Brazil). Animals from the same experimental group were housed in a single cage in a controlled temperature (25 °C) room with a 12 h light/dark cycle and ad libitum access to food and water.

The experiment consisted of 24 mice randomly distributed in 4 groups, and it lasted 10 days. The groups were (i) healthy negative control group (NC); (ii) colitis-positive control group (DSS); (iii) experimental group (ZM); and (iv) experimental colitis-positive plus *Z. mobilis* group (DZM). The ZM and DZM groups were administered with 100 µL of *Z. mobilis* dose once daily by oral gavage while the NC and DSS groups were administered with 100 µL of sterile saline.

2.3. DSS-Induced Colitis

For acute colitis induction, dextran sulfate sodium salt—DSS (MP Biomedical, Irvine, CA, USA) with a molecular weight range of 36,000–50,000 and a concentration

of 3% (w/v) was added to the water of animals in the DSS and DZM groups during the first five days of the experiment, followed by the ingestion of normal water (Figure 1a). The NC and ZM groups consumed water without DSS throughout the period. Liquid consumption was monitored, and all groups consumed similar volumes of liquid, equivalent to an average of ± 5 mL per mouse/day. The experiment was carried out in independent replicates.

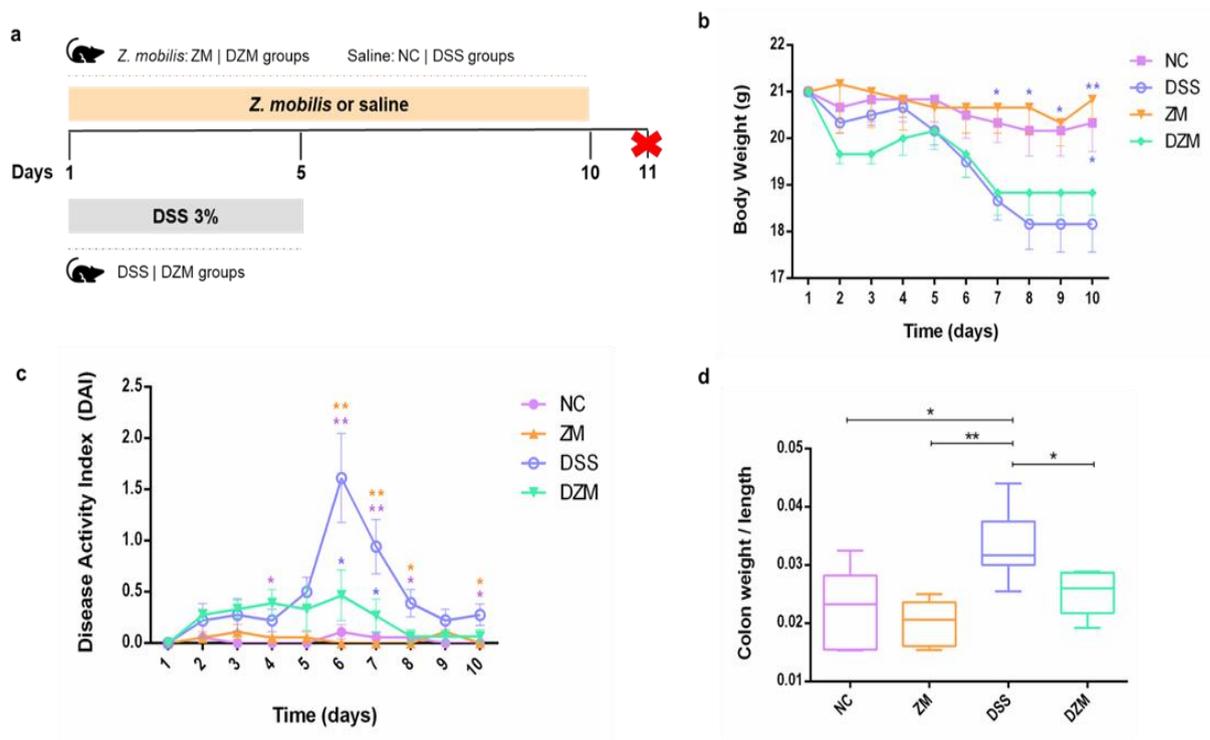


Figure 1. Oral administration of *Z. mobilis* and its effects on DSS-induced colitis in mice. **(a)** Animal experimental design: groups of six female C57BL/6 mice were used. Those from DSS and DZM groups ingested filtered water containing 3% DSS in the first 5 days for colitis induction. Throughout the experiment, the animals from the ZM and DZM groups were gavaged with *Z. mobilis*, while the NC and DSS groups were gavaged with saline. On day 11, all animals were euthanized (represented by the red X). **(b)** The average body weight (g) of the animals was measured during the ten days of the experiment. Data are shown as the mean \pm SEM, and each asterisk color represents the group for which there was a significant statistical difference. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with the Tukey test, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. **(c)** DAI was calculated over the entire experiment period. Data are shown as the mean \pm SEM, and each asterisk color represents the group for which there was a significant statistical difference. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with the Tukey test, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. **(d)** Colon weight/length ratio

(cm) after euthanasia. Data are shown as the median and SD (n = 6). Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test, * p < 0.05 and ** p < 0.01.

Mouse weights were recorded throughout the experiment, and fecal samples were collected on days 5 and 10 and stored at -80°C until analysis. Euthanasia was performed by administering a sublethal dose of ketamine (300 mg) and xylazine (30 mg) anesthetics on the final day of the experiment (day 11). Colons were collected and divided into two parts, one for RNA extraction (maintained with RNAlater Stabilization Solution—Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and the other for histological evaluation (maintained in 10% paraformaldehyde).

2.4. Disease Activity Index (DAI)

The severity of DSS-induced colitis was measured by macroscopic parameters using the disease activity index (DAI) [13]. This index stipulates values (score) for body weight loss (0, none; 1, 1–5% loss; 2, 5–10% loss; 3, 10–20% loss; and 4, >20% loss), stool consistency (0, normal; 2, loose stools and 4, diarrhea) and rectal bleeding (0, absent; 2, moderate and 4, severe). Body weight loss was defined as the difference between initial and final weight. Stool consistency and rectal bleeding were determined by daily visual assessment of the animals. Colon weight and length were evaluated after mice euthanasia.

2.5. Histopathological Analysis

Colon samples were collected and fixed in 10% paraformaldehyde, then embedded in paraffin; histological sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). The slides were scanned with Aperio CS2 equipment (Leica, Wetzlar, Germany) and viewed under 20 \times and 40 \times magnification power with Aperio ImageScope Software, v12 (Leica, Wetzlar, Germany). Blind histological analyses were performed considering morphological changes in the following parameters: inflammatory cell infiltrate in terms of severity and extent; epithelial changes, which include degrees of hyperplasia, goblet cell loss, cryptitis, crypt abscess, and erosion; mucosal architecture damage such as ulceration, presence of irregular crypts, and crypt loss. The scores were assigned as previously described by Erben et al. (2014) [14].

2.6. Microbiome Analysis

Three weeks before the beginning of the experiment, the mice went through a co-housing process: once a week, the animals were randomly mixed in the cages to homogenize the microbiota. Feces from days 5 and 10 of all animals were collected. To verify changes in the profile of microbial diversity in the group and not just

individually, a pool of samples from each group was carried out on the established days. Total bacterial DNA from the feces pool was extracted with the GenElute™ Stool DNA Isolation Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The V3–V4 region of the 16S ribosomal RNA gene was sequenced to generate 250 bp paired-end raw reads using the HiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) by GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brazil).

Paired-end reads were merged using FLASH (V1.2.7) [15]. Quality filtering was performed on raw tags to obtain high-quality clean tags according to QIIME (V1.7.0) [16,17]. The tags were compared with the SILVA 138 reference database using UCHIME algorithm to detect and remove chimera sequences [18–20]. Effective tags were finally obtained, and sequence analysis was performed by Uparse software, v11 [21]. Sequences with $\geq 97\%$ similarity were assigned to the same OTUs (operational taxonomic units). To obtain the phylogenetic relationship of all OTs representative sequences, the MUSCLE software, v5 was used (V3.8.31) [22]. Species richness and evenness (alpha diversity) were measured using the Chao1 and Shannon indexes, and beta diversity was calculated with QIIME. A heatmap was plotted using SRPLOT (www.bioinformatics.com.cn/en (accessed on 1 July 2023)). The raw sequencing data have been uploaded to the NCBI Sequence Read Archive (SRA) database under BioProject number PRJNA997586.

2.7. RNA Isolation and Real-Time PCR Analysis

A fraction of the intestinal colon was macerated using TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Germany) to disrupt the tissue. The extraction of total RNA was performed using the RNeasy® Protect Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Quantifications of RNA samples were performed using a NanoDrop One spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). To eliminate genomic DNA from RNA samples, TURBO™ DNase (Invitrogen, Waltham, MA, USA) was used, followed by reverse transcription with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Assays were performed in duplicate using the LightCycler® RNA Master SYBR Green I kit (Roche, Basel, Switzerland) in ABI Step One Plus Real-Time PCR System equipment (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Relative mRNA expression was normalized from endogenous gene beta-2-microglobulin (B2m) expression, and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used to calculate transcript levels. The oligonucleotides are described in Supplemental Table S1. Data are expressed as the mean \pm standard error

of the mean. Real-time pCR fold changes were calculated using RT2 Profiler PCR Array Data Analysis software, v5.1 (Qiagen, Hilden, Germany).

2.8. Statistical Analysis

The results of body weight and DAI experiments are expressed as means \pm SEM. Colon weight/length ratio results are expressed as medians \pm SD and real-time PCR and histological score results are expressed as means \pm SD. Statistical differences were determined by one-way ANOVA with a Tukey post hoc test for body weight and DAI curves and by the Mann–Whitney test for colon weight/length ratios, histological scores, and real-time PCR charts. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism version 6.0 (La Jolla, CA, USA) and p-values were considered significant <0.05 .

3. Results

3.1. Oral Administration of *Zymomonas mobilis* Attenuates DSS-Induced Colitis In Vivo

The effects of *Z. mobilis* ingestion on DSS-induced colitis in mice were evaluated. The experiment lasted 10 days. From the first to the fifth day of the experiment, the animals in the DSS and DZM groups consumed DSS 3% in their water, while the NC and ZM groups only drank water. The animals were evaluated daily for weight, stool consistency, and degree of rectal bleeding. The animals were orally gavaged throughout the experiment: the ZM and DZM groups with 100 μ L *Z. mobilis* (5×10^9 CFU/mL) and the NC and DSS groups with 100 μ L of saline. On the 11th day, all animals were euthanized (Figure 1a).

Body weights showed a gradual decrease in the experimental groups during the first five days of DSS treatment, with a markedly accelerated decline in the DSS-treated groups from the fifth day until the end of the experiment (Figure 1b). *Z. mobilis* (ZM) treatment did not impact body weight. The DZM group lost weight during DSS treatment, which stabilized after day 8.

The disease activity index (DAI) quantifies the macroscopic parameters of DSS-induced colitis based on weight loss, stool consistency, and rectal bleeding. The higher this index, the more intense the macroscopic symptoms and the sicker the animals are. The effect of *Z. mobilis* treatment on murine colitis was assessed using these indexes during the 10 days of the experiment. The DSS group had the highest DAI throughout the experiment and peaked on the sixth day. The peak was not observed for induced colitis mice treated with *Z. mobilis* (DZM group). After halting DSS administration,

DAI scores declined until day 10, where most groups were comparable, except the DSS group (Figure 1c).

Intestinal inflammation can be assessed by measuring the size and weight of the colon [23–26]. Colon weight/length ratio reflects the intestinal inflammatory status. The ratio was significantly different between the groups that received DSS and the group that received DSS along with *Z. mobilis*—DZM ($p < 0.05$) (Figure 1d). The data shown in Figure 1b–d suggest that the presence of *Z. mobilis* in the gastrointestinal tract of mice may have ameliorated disease progression, controlling weight loss and severe symptoms in these animals.

These data also corroborate with a previous pilot experiment, in which the DZM group treated with *Z. mobilis* only in the last six days of the experiment (14 days—Supplemental Figure S1a) showed DAI and weight stability and a low colon weight/length ratio (Supplemental Figure S1b–d).

3.2. *Zymomonas mobilis* Alters Mice Colon Mucosa

The progression of DSS-induced colitis is marked by an increase in inflammatory cell infiltration into the colonic mucosa, leading to the destruction of colonocytes and raising inflammatory activity [27]. To explore whether treatment with *Z. mobilis* could alleviate colitis by regulating inflammation and decreasing mucosal damage, histological analysis of the colon with H&E staining was performed [14].

The DSS-treated group showed classic signs of induced colitis, such as damaged mucosa and inflammatory cell growth in the lamina propria (blue arrow); crypt architectural disarray, crypt loss, irregular crypts, and crypts with hyperplasia (white arrowhead); loss of surface epithelium—erosion (black arrowhead); crypt abscess (yellow arrowhead); focal ulceration and decreased goblet cells (Figure 2a).

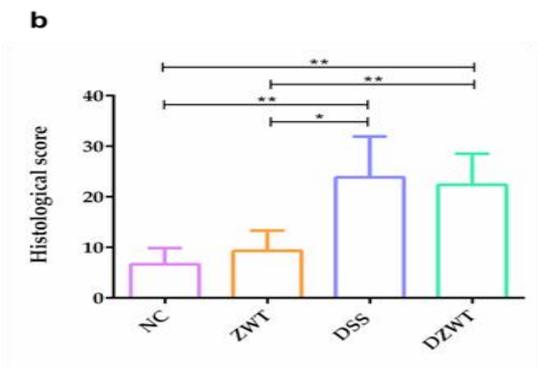
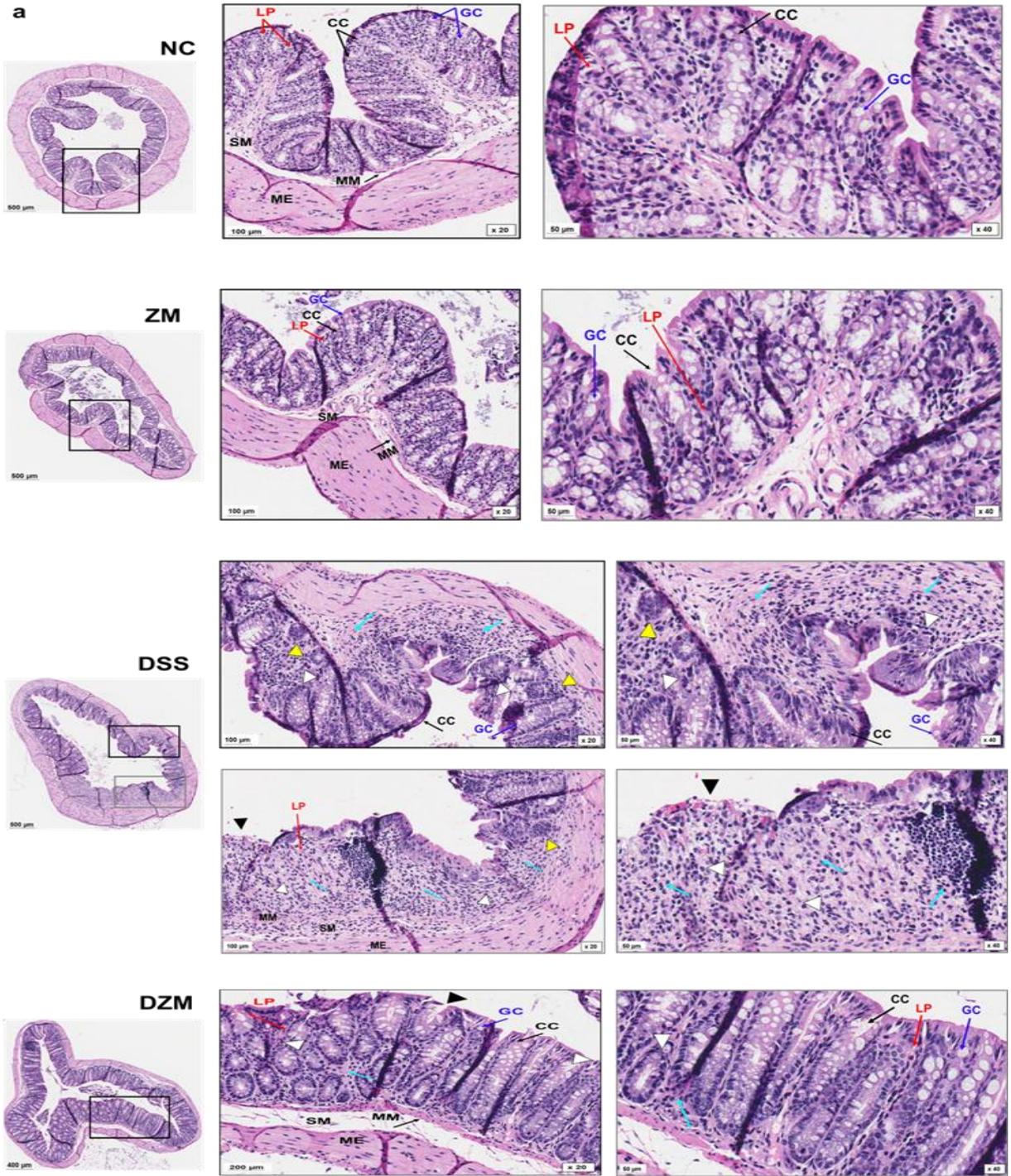


Figure 2. Histopathological analysis and effects of *Z. mobilis* on mouse colon mucosa. (a). Representative H&E staining of colon tissues in the NC, DSS, ZM, and DZM groups. LP: lamina propria; GC: goblet cell; CC: colon crypts; MM: muscularis mucosae; SM: submucosa; ME: muscularis externa; inflammatory cells increased in the lamina propria (blue arrow); crypt architectural disarray/crypt loss/irregular crypts/crypts with hyperplasia (white arrowhead); erosion (black arrowhead); crypt abscess (yellow arrowhead). Slides were analyzed under 20× (scale bar 100 μm) or 40× (scale bar 50 μm) magnification power with Aperio ImageScope Software (Leica, Wetzlar, Germany). (b). Histological score of colon tissues. Data are shown as means and SD (n = 6). Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test: * p < 0.05 and ** p < 0.01.

The group that was orally gavaged with *Z. mobilis* (ZM) only was morphologically similar to the healthy group (NC). In mice that received DSS and *Z. mobilis* (DZM), histological damage in the mucosa was ameliorated, and it was possible to observe few areas of erosion in the epithelium, a decrease in inflammatory cells, regular crypts with areas of hyperplasia, and an increase in goblet cells. In addition, the group that received only DSS showed stronger inflammatory signs in an overall damaged mucosa. The histological score is shown in Figure 2b.

3.3. Administration of *Z. mobilis* Alters Gut Microbiota

The V3–V4 regions of the 16S rRNA gene were sequenced from pooled animal stool samples to evaluate the effects of *Z. mobilis* on the gut microbiota. Fecal samples were collected from six animals from the NC, DSS, ZM, and DZM groups on days 5 and 10.

Alpha diversity is an analytic method to assess community complexity in each sample through specific metrics [28]. Part of this analysis index is the number of observed species that presented a lower rarefaction plateau in the DZM10 sample (Figure 3a).

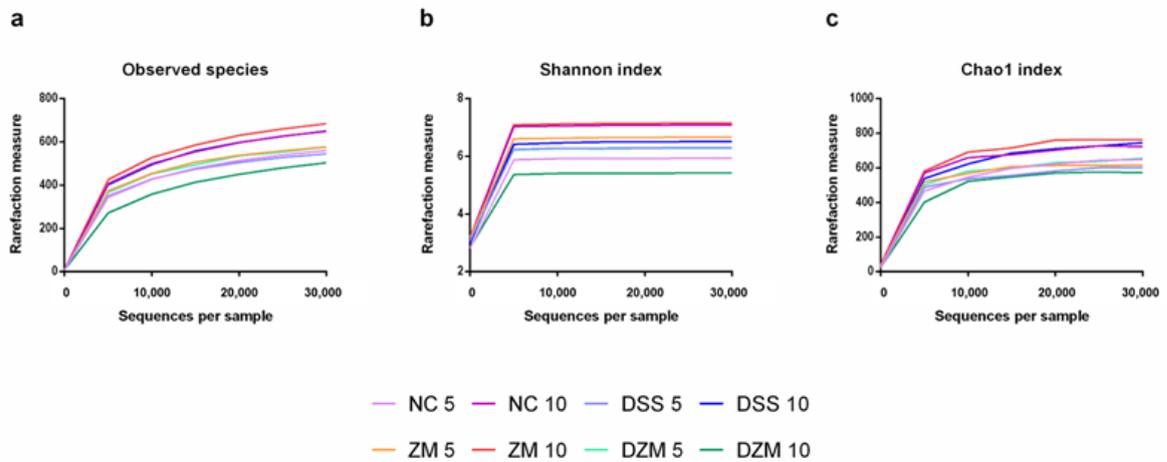


Figure 3. Alpha diversity analysis. (a). Observed species in each sample pool on days 5 and 10. (b). Shannon diversity index measured in each sample pool on days 5 and 10. (c). Chao1 richness index measured in each sample pool on days 5 and 10.

Bacterial community diversity, assessed by the Shannon index, showed an increase in the ZM 10 and NC 10 groups, in contrast to groups DZM 10 and NC 5, which had a lower species diversity (Figure 3b). Another alpha diversity analysis index is Chao1, which evaluates the richness of bacterial communities. Based on the sequencing data, the ZM 10, NC 10, and DSS 10 groups presented increased rarefaction indexes in relation to the other groups (Figure 3c).

The topmost relative abundant microbial communities were identified in the composition of each sample taxa at the phylum level (Figure 4a). In a general comparative analysis, the most abundant phyla in all samples during the days analyzed were *Bacillota* and *Bacteroidota*. *Actinomycetota* was more abundant in the DSS group on day 5. On day 10, there was an increase in *Pseudomonadota* in the DSS and DZM groups, and in the latter group, there was also an increase in *Verrucomicrobiota*. The phyla *Cyanobacteriota*, *Thermodesulfobacteriota*, and *Chloroflexota* remained stable during the analyzed days.

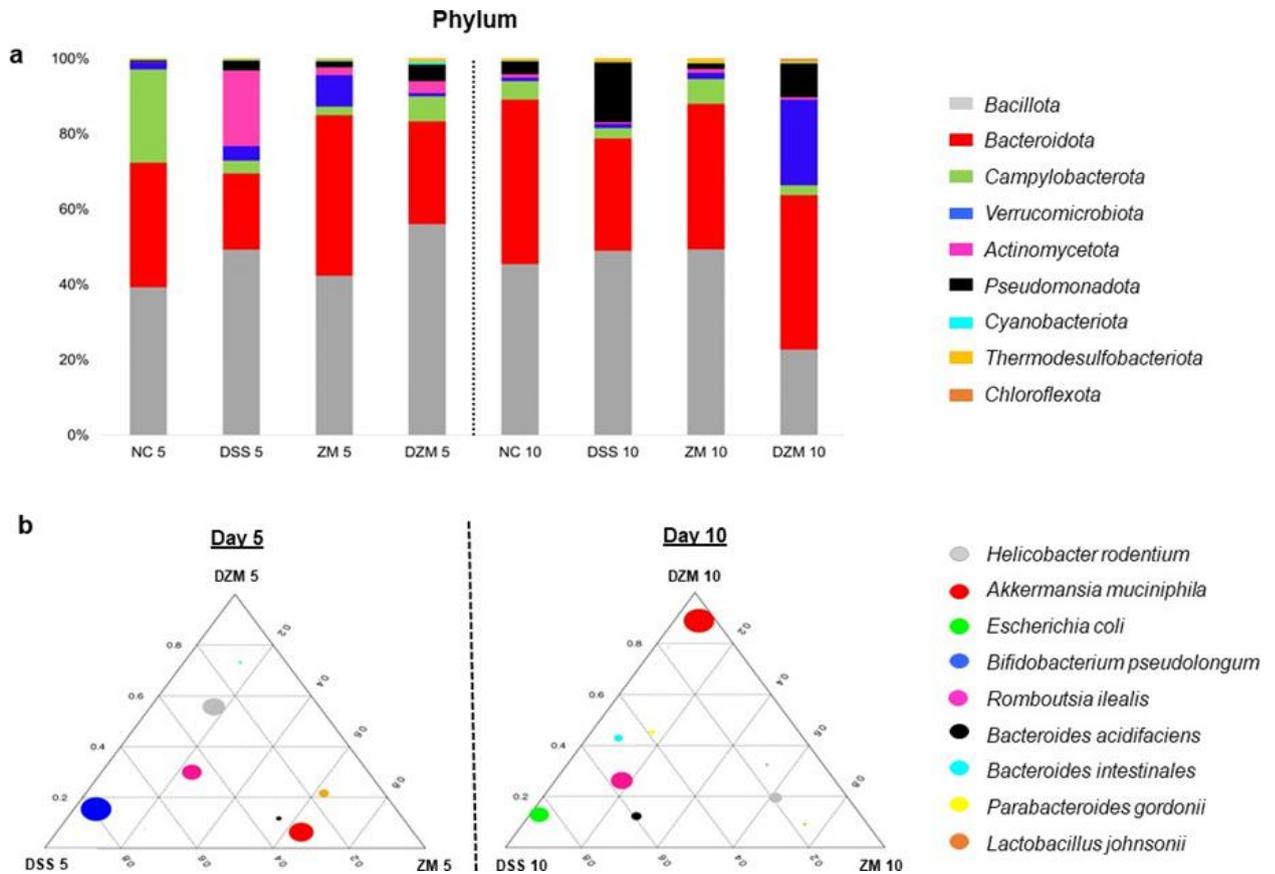


Figure 4. Composition of gut microbial community in mice. **(a).** Histogram of relative abundance of dominant phyla on days 5 and 10. **(b).** Ternary plots of relative abundance of dominant species on days 5 and 10 in which each corner of the triangle represents a time point (D5, NZW5, DZW5 or D10, NZW10, DZW10) and each circle size represents species abundance.

At the species level, more intense changes occurred among the groups on days 5 and 10, as shown by ternary plots (Figure 4b). DSS treatment was associated with a dominant presence of *Bifidobacterium pseudolongum* on day 5 (DSS 5) and *Escherichia coli* on day 10 (DSS 10), as well as *Romboutsia ilealis* at both time points. In contrast, the group that received DSS plus treatment with *Z. mobilis* increased the relative abundance of the bacteria *Akkermansia muciniphila* at day 10 (DZM 10) after its increased abundance in the ZM group at day 5.

To evaluate the relationship between the bacteria genus distribution in the microbiota of the control samples (NC and DSS) and those that received *Z. mobilis* (ZM and DZM), a heatmap analysis was used with the 20 most abundant common genera among all samples. The samples were clustered by their abundance distribution in different samples (by the Euclidean distance method) (Figure 5a). Interestingly, groups

from the same day tended to cluster together. Also, of note is the abundance of *Akkermansia* in the DZM group and *Escherichia-Shigella* in the DSS group on day 10. The *Zymomonas* genus is not among the most abundant. However, it was added to the heatmap as it is the object of our work.

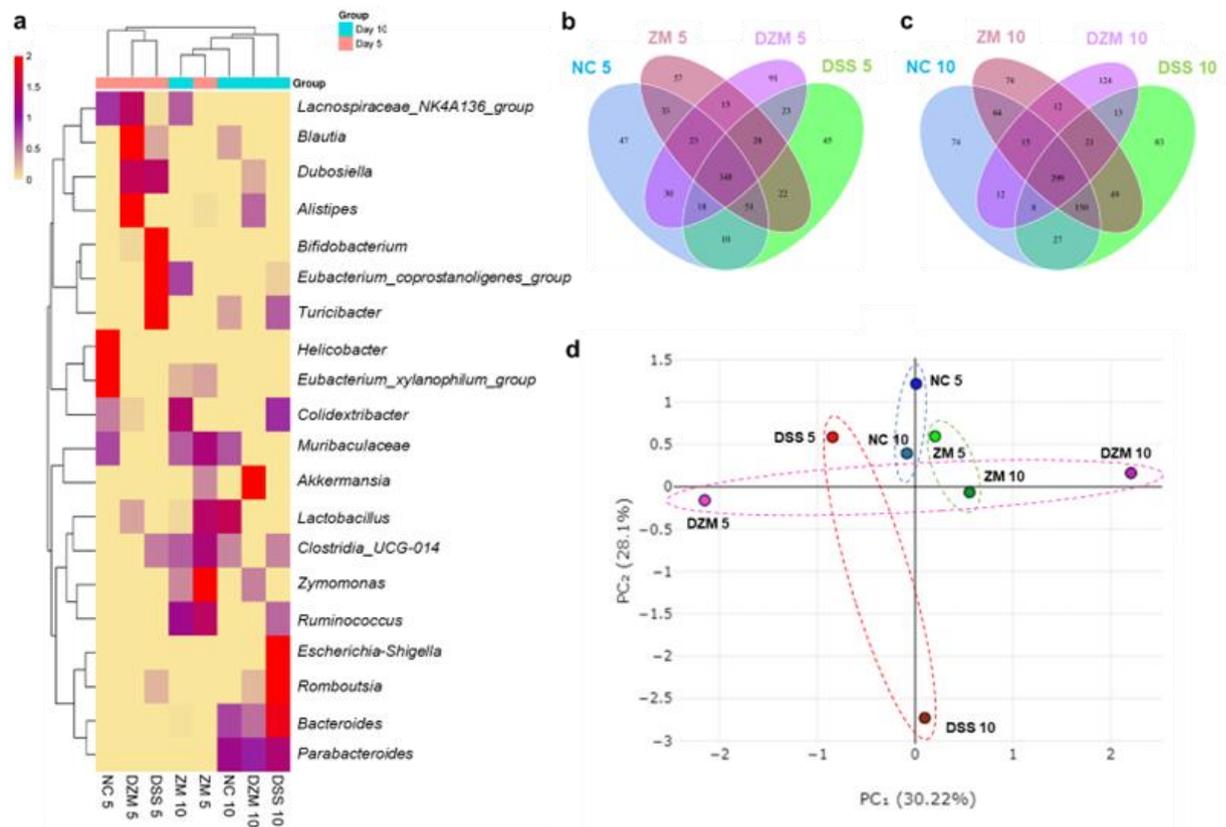


Figure 5. Microbiome diversity analysis. (a). Heatmap of topmost abundant genera of mice gut microbiota groups NC, DSS, ZM, and DZM on days 5 and 10 of analyzes. (b,c). Venn diagram of OTUs distributed among groups on day 5 and day 10, respectively. (d). PCA plot points represent different sample groups and their clusters.

According to the results of OTU clustering analysis, a Venn diagram was generated with common and unique information for the different samples on days 5 (NC 5, DSS 5, ZM 5, and DZM 5) and 10 (NC 10, DSS 10, ZM 10, and DZM 10) (Figure 5b,c). The reduction in the number of common species (348 to 299) and the rise in unique OTUs in all groups on day 10 are remarkable. There is also an increase in shared OTUs between the NC 10 and DSS 10 groups in relation to the NC 5 and DSS 5 groups, suggesting a possible recovery of homeostasis in the DSS group.

Beta diversity was also observed, using principal component analysis (PCA). The control group measurements on days 5 and 10 appear close to each other, similarly

to those for the group that received *Z. mobilis* only, both clustering in the middle of the graph. However, neither DSS group clusters, and their day 5 and day 10 sample results are spread antagonistically (Figure 5d).

3.4. *Zymomonas mobilis* Treatment Suggests Regulation of the Inflammatory Response in the Experimental Colitis Model

Genes that play a key role in mediating the immune response in inflammatory diseases were analyzed to evaluate the impact of *Z. mobilis* treatment on modulating the immune response. The expression of these genes was evaluated by real-time PCR with colonic mRNA from animals in the NC, DSS, and DZM groups at the end of the experiment.

Molecular markers such as Mucin 3 (*Muc3*) and Occludin (*Ocln*) are related to mucus production by goblet cells and the integrity of tight junctions in colonocytes, respectively. Their expression reflects tissue restoration. DSS treatment seems to have impaired *Muc3* expression, but treating with *Z. mobilis* activated it. *Ocln* expression was not affected after DSS treatment, but it was induced by *Z. mobilis* supplementation. Consistently with histopathological analyses, the expression of these markers increased in the DZM group compared to the DSS and NC group (Figure 6a,b).

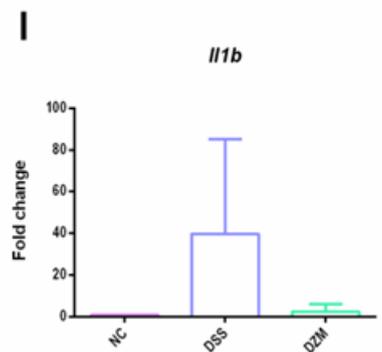
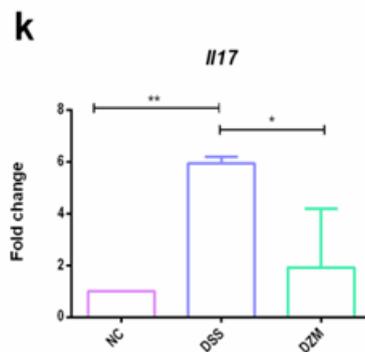
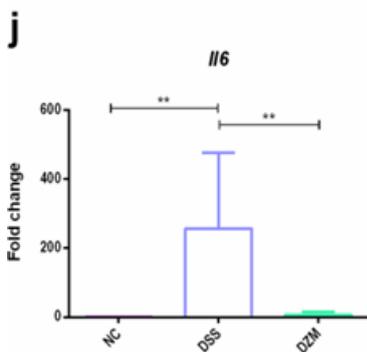
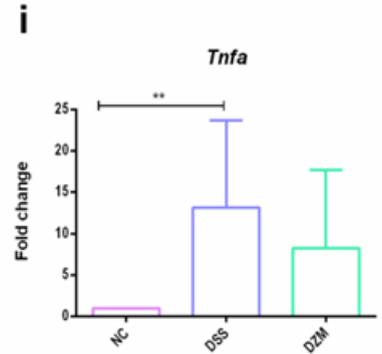
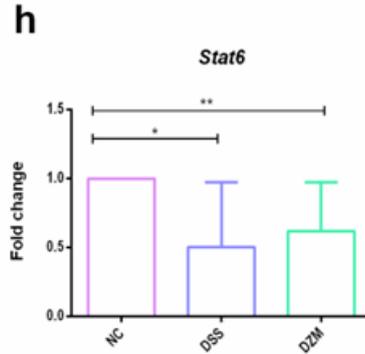
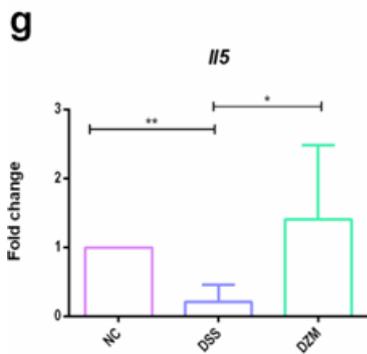
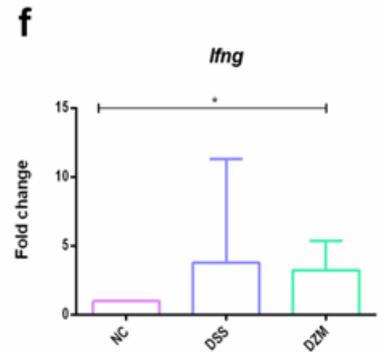
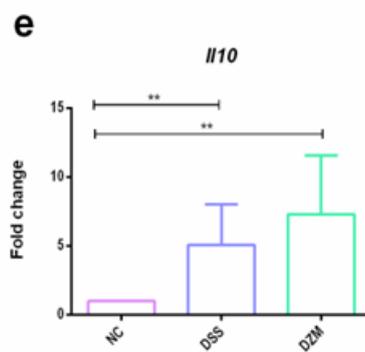
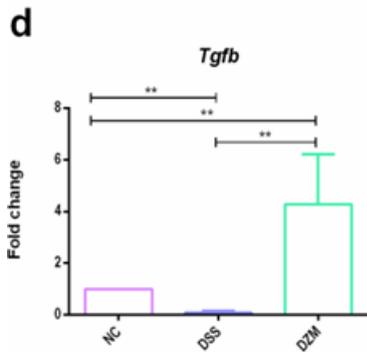
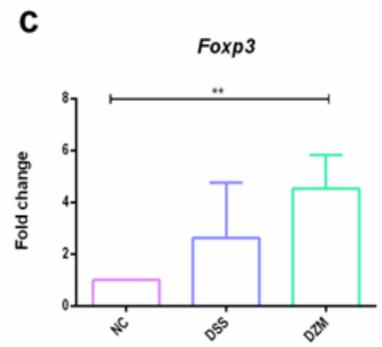
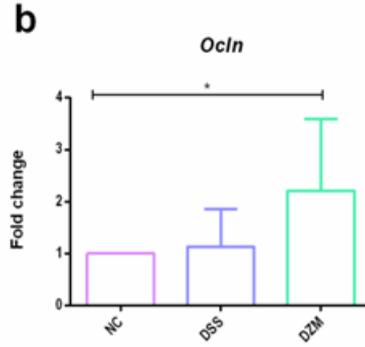
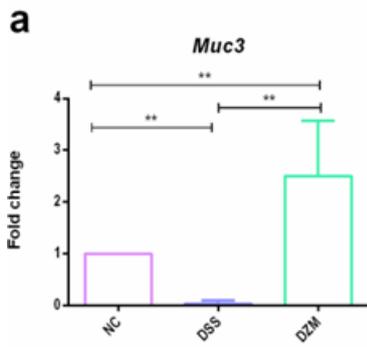


Figure 6. Colonic mRNA expression by real-time PCR analysis. Relative gene expression: (a). *Muc3*; (b). *Ocln*; (c). *Foxp3*; (d). *Tgfb*; (e). *Il10*; (f). *Ifng*; (g). *Il5*; (h). *Stat6*; (i). *Tnfa*; (j). *Il6*; (k). *Il17*; (l). *Il1b*. Data are shown as means and SD (n = 6). Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test: * p < 0.05 and ** p < 0.01.

DSS treatment increased inflammatory markers such as *Il6*, *Il17* and *Tnfa*, and the two formers were reversed with *Z. mobilis* treatment. Moreover, the DZM group showed a significant increase in the gene expression of transcription factor *Foxp3* and cytokines *Tgfb*, *Il10*, and *Il5*, associated with a regulatory profile, compared to NC and DSS groups (Figure 6c–g). The DSS and DZM groups also showed a significantly decreased expression of the *Stat6* transcription factor, which is related to colitis development and epithelial tight junction disruption [29] (Figure 6h). Other inflammatory markers, such as *Ifng*, *Il1b* (Figure 6f,l), *Rorc*, and *Il22* (Supplemental Figure S2), were also tested, but did not show statistically significant differences.

4. Discussion

Chronic inflammation of the bowel is a modern-day disease that affects a large number of individuals, principally in industrialized countries. Even though no specific treatment is available, the use of probiotics could lead to benefits in terms of disease control. For example, *E. coli* Nissle 1917 (Mutaflor, Ardeypharm) has been shown to induce remission of UC in patients and maintain it for a certain period [30,31]. This effect was also compared with the drug aminosalicylate mesalamine, one of the main treatments for UC [32–34].

Another relevant clinical trial used a bacterial mixture VSL#3 (VSL Pharmaceuticals, Inc.), which combines eight species of bacteria from the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, and *Streptococcus*. This medication proved to be safe and effective in reducing the symptoms caused by UC, in addition to inducing and maintaining remission of this disease for a period in the patients tested [35–37]. In this context, the bacterium *Z. mobilis* appears as a possible therapeutic candidate as it presents probiotic characteristics associated with GRAS status and its cultural use [3–5], combined with the promising results obtained in this work.

The effects of *Z. mobilis* consumption on DSS-induced colitis in mice were evaluated. This experimental design is accepted as a model for human IBD due to the clinical and histopathological damage it generates in the intestinal mucosa of mice, similar to the damage that occurs in humans affected with ulcerative colitis [38,39]. This work assesses, in a preliminary way, the efficacy and mechanisms of action of possible probiotics for IBD treatment.

After a pilot test, we designed a 10-day protocol to test DSS administration in *Z. mobilis*-treated mice. The new protocol essentially resulted in the same observations. Animals in the DSS and DZM groups that drank water with DSS 3% during the first five days showed a gradual weight loss, which stabilized after the seventh day after DSS withdrawal. The NC and ZM groups remained stable and very similar throughout the experiment. Interestingly, the DZM group presented DAI results similar to the NC and ZM control groups, with a statistical difference between it and the DSS group, suggesting that this was possible due to *Z. mobilis*. Another evaluated parameter that suggested the use of *Z. mobilis* can alleviate the symptoms caused by DSS use is the significant reduction in colon weight/length ratio, whose increase is related to the intensity of the inflammatory process, observed in the DZM group in relation to the DSS group. These macroscopic evaluation features related to the severity of DSS-induced colitis suggest that disease progression and symptoms decreased in the presence of *Z. mobilis* in the gastrointestinal tract of mice.

The effect of DSS administration on the murine colon is the loss of intestinal epithelial cell barrier integrity. Due to these injuries, the tissue is exposed to microorganisms in the intestinal lumen, causing an acute inflammatory response [40,41]. This inflammatory process cause crypt architectural disarray and may lead to loss of crypts or irregular rearrangements such as hyperplasia; other histological changes typical of DSS-induced colitis are an increase in inflammatory cells in the lamina propria, erosion, ulceration, and decreased goblet cells [38,39].

All these typical changes were found in the DSS group colonic sections, unlike those of the NC and ZM groups, which presented healthy colons with an integral histological architecture. In the DZM group, an improvement in the colonic mucosa was observed, such as decreased inflammatory cells in the lamina propria, crypts recovering their regular appearance, and an increase in goblet cells. However, as the DSS treatment was suspended on day 5, some of these microscopic changes was found to have been reversed at the end of the experiment, which was reflected in the low statistical relevance of the histological score. Part of this rapid recovery may have been affected by sex. DSS-induced colitis is known to be biased by sex. Hormonal issues seem to make female mice less prone to develop colitis-associated inflammatory symptoms [42,43]. In the present work, we only used female mice to achieve a less variable response and to reduce type I error.

Mucins, the glycoproteins that make up mucus and are produced by goblet cells, play an important role in protecting the intestinal mucosal barrier. Mucin 3 is expressed in the colon and secreted in response to inflammatory cytokines. It is related

to IBD pathophysiology, such as in ulcerative colitis [44,45]. However, we observed a reduction in the levels of *Muc3* mRNA in DSS-treated mice, even after five days without DSS consumption, indicating a persistent degradation of the mucus layer, keeping inflammation levels high. Conversely, the DZM group showed a significant increase in the expression of *Muc3* compared with the DSS group, suggesting a process of restoration of the mucosal barrier, possibly due to the ingestion of *Z. mobilis*.

The other structural protein studied, Occludin, is a component of intercellular tight junctions which promotes this barrier's structural integrity [46,47]. Its expression is associated with the recovery of the intestinal mucosa. The group that received DSS and was treated with *Z. mobilis* (DZM) showed a significant increase in the *Ocln* gene in relation to the control group. These data corroborate the hypothesis that the presence of *Z. mobilis* could reestablish the integrity of the colonic epithelium, improving tissue recomposition and controlling the inflammation caused by DSS administration.

Ulcerative colitis is also related to intestinal microbial dysbiosis in humans, with decreased diversity and abundance of microorganisms [48,49]. DSS administration also changes the distribution pattern of microbial taxa in mice [38,41]. Samples from the same group were pooled before 16S rRNA gene sequencing and then used to estimate community-level microbiome diversity, as performed by Ray et al. (2019) and Rodríguez-Ruano et al. (2020) [50,51].

Microbiota were observed to change during the experiment, and in the end, five days after DSS withdrawal (day 10), animals from the DSS and DZM groups showed a marked change in the distribution profile of the phyla. A marked increase in *Pseudomonadota* (replacing *Actinomycetota*) occurred in the DSS group with an abundance of *E. coli* at the species level. The presence of this microorganism, often opportunistic, is present both in cases of ulcerative colitis in humans and in murine models and may worsen the severity of the disease [52,53]. This increase in *Actinomycetota* phyla in the DSS group on day 5 and *Pseudomonadota* on day 10 was also found in murine models of colitis induced by DSS [38,41].

The DZM group on day 10 showed a decrease in the *Bacillota* and an increase in the *Verrucomicrobiota* phylum, with an emphasis on the presence of the bacterium *Akkermansia muciniphila*. This bacterium plays a role in regulating intestinal barrier function and is involved in the host's immune and metabolic responses [54]. Furthermore, *A. muciniphila* can modulate the expression of genes related to mucus production, since it uses these glycoproteins as an energy source [55]. Qu et al. (2021) reported a relationship between *A. muciniphila* and increased *Muc3* gene expression,

also observed in our study in *Z. mobilis*-treated mice [56]. Moreover, this microorganism is reduced in patients with IBD, contrasting with its marked presence in healthy individuals [50,53]. The improved abundance of *A. muciniphila* after *Z. mobilis* consumption needs further clarification due to the statistical limitation of this finding, but it could represent a mechanism of action for *Z. mobilis* on experimental colitis.

In intestinal inflammation, the immune mechanism of action also occurs by activating genes that encode cytokines, chemokines, and other important factors for maintaining intestinal homeostasis [57]. Given the action of injury, infiltration of microorganisms, and inflammatory cells in the mucosa caused by DSS administration in mouse and human UC, cytokines associated with the inflammatory response, such as IL-6, TNF, and IL-17, all induced here by DSS, are important clues for understanding the progression of the disease [58].

In ulcerative colitis, IL-6, together with TNF, mediates the intestinal inflammatory response [57,59,60]. The cytokine TNF is highly upregulated in IBD patients. It is related to damage to the integrity of the intestinal mucosa, necrosis of Paneth and goblet cells, neoangiogenesis, and macrophage activation to enhance the production of inflammatory cytokines [60,61].

In our study, the relative mRNA expression of the proinflammatory cytokines *Tnfa*, *Il6*, and *Il17* was induced by DSS, but *Il6* and *Il17* were significantly decreased in the DZM group, suggesting that *Z. mobilis* alleviated the inflammatory response.

Transforming growth factor β (TGF- β) is an important cytokine in T-cell-mediated tolerance, inducing regulatory T cell (Treg) differentiation concomitant to Foxp3 expression, in addition to being involved in cell growth control, production of extracellular matrix, and intestinal mucosa regeneration [62,63]. DSS reduces the expression of *Tgfb* while *Z. mobilis* coadministration induces it, compared to non-treated mice. This, combined with a decrease in *Il17*, may result in the induction of regulatory cells. Another cytokine related to regulatory T cells is IL-10, which can reduce the expression of inflammatory cytokines such as TNF and IL-6. The inactivation of IL-10 causes the condition of chronic colitis, with an increase in several inflammatory cytokines [57]. In our study, both DSS and *Z. mobilis* induced *Il10*, but *Z. mobilis* administration seemed to potentiate the regulatory phenotype by efficiently inducing a broader range of immunomodulatory genes, including *Tgfb*, *Il5* and *Foxp3*.

5. Conclusions

The presented data suggest the ability of *Z. mobilis* to reduce disease progression in the intestinal colon in a murine model of DSS-induced colitis by reestablishing the integrity of the colonic epithelium, beneficially altering the microbiota, and significantly relieving inflammation caused by DSS administration. Despite the limitations of this work, this is a pioneering study using *Z. mobilis* in a murine model of DSS-induced colitis. It paves the way for new studies to be carried out using this innovative microorganism to ameliorate inflammatory intestinal diseases.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: [https:// www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms11112793/s1](https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms11112793/s1), Figure S1: Pilot experimental analysis of oral administration of *Z. mobilis* and its effects on DSS-induced colitis in mice. Figure S2. Colonic mRNA expression by real-time PCR analysis. Table S1. Primers used for real-time qPCR analysis.

Author Contributions: M.M.d.A., M.M.B. and A.Q.M. conceived and designed the research. M.M.d.A., J.L.d.P.R.J., V.G.O. and S.B.P. conducted the animal experiments. D.E.R.d.S. and M.B.d.C. performed the histological analyses. M.M.d.A. and I.G.S. conducted the qPCR experiments. M.M.d.A., I.G.S., M.R.R., A.Q.M. and M.M.B. performed the data analysis and wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Financial support was received from FAP-DF (grant application: 00193-00000892/2021- 25). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) contributed fellowships. The funders played no role in the execution or design of this study.

Data Availability Statement: Data from the 16S rDNA analysis are available from the NCBI Sequence Read Archive (SRA) database under BioProject number PRJNA997586. All data are available from the corresponding author on request.

Acknowledgments: We thank Lidia Maria Pepe de Moraes for providing and helping with *Z. mobilis*.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. He, M.X.; Wu, B.; Qin, H.; Ruan, Z.Y.; Tan, F.R.; Wang, J.L.; Shui, Z.X.; Dai, L.C.; Zhu, Q.L.; Pan, K.; et al. *Zymomonas mobilis*: A Novel Platform for Future Biorefineries. *Biotechnol. Biofuels* 2014, 7, 1553–1562.
2. Liu, L.; Li, J.T.; Li, S.H.; Liu, L.P.; Wu, B.; Wang, Y.W.; Yang, S.H.; Chen, C.H.; Tan, F.R.; He, M.X. The Potential Use of *Zymomonas Mobilis* for the Food Industry. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; Taylor and Francis Ltd.: Abingdon, UK, 2022.
3. De Moraes, J.; Rios, E.; Calazans, G.; Lopes, C. *Zymomonas Mobilis* Research in the Pernambuco Federal University. *J. Biotechnol.* 1993, 31, 75–91.
4. de Azerêdo, G.A.; Stamford, T.L.M.; de Souza, E.L.; Veras, F.F.; de Almeida, E.R.; de Araújo, J.M. In Vivo Assessment of Possible Probiotic Properties of *Zymomonas Mobilis* in a Wistar Rat Model. *Electron. J. Biotechnol.* 2010, 13, 3–4.
5. Tallyne de Aguiar Silva, A.; Lima Cavalcanti, I.D.; Ayanny de Lima Fernandes, M.; Gisele de Oliveira Coimbra, C.; Manoella de Souza Lima, G. Effect of *Zymomonas Mobilis* Probiotic on Cholesterol and Its Lipoprotein Fractions and the Intestinal Regulation. *Clin. Nutr.* 2020, 39, 3750–3755.
6. International Dairy Federation. *Inventory of Microbial Food Cultures with Safety Demonstration in Fermented Food Products*; International Dairy Federation: Schaerbeek, Belgium, 2018. Available online: www.fil-idf.org (accessed on 5 August 2023).
7. Danese, S.; Fiocchi, C. Ulcerative Colitis. *N. Engl. J. Med.* 2011, 365, 1713–1738.
8. Kobayashi, T.; Siegmund, B.; Le Berre, C.; Wei, S.C.; Ferrante, M.; Shen, B.; Bernstein, C.N.; Danese, S.; Peyrin-Biroulet, L.; Hibi, T. Ulcerative Colitis. *Nat. Rev. Dis. Primers* 2020, 6, 74.
9. Halloran, K.; Underwood, M.A. Probiotic Mechanisms of Action. *Early Hum. Dev.* 2019, 135, 58–65.
10. Fedorak, R.N. Understanding Why Probiotic Therapies Can Be Effective in Treating IBD. *J. Clin. Gastroenterol.* 2008, 42, 111–115.
11. Shen, Z.-H.; Zhu, C.-X.; Quan, Y.-S.; Yang, Z.-Y.; Wu, S.; Luo, W.-W.; Tan, B.; Wang, X.-Y. Relationship between Intestinal Microbiota and Ulcerative Colitis: Mechanisms and Clinical Application of Probiotics and Fecal Microbiota Transplantation. *World J. Gastroenterol.* 2018, 24, 14.
12. Ghosh, S.; Van Heel, D.; Playford, R.J. Probiotics in Inflammatory Bowel Disease: Is It All Gut Flora Modulation? *Gut* 2004, 53, 620–622.
13. Cooper, H.S.; Murthy, S.N.; Shah, R.S.; Sedergran, D.J. Clinicopathologic Study of Dextran Sulfate Sodium Experimental Murine Colitis. *Lab. Invest.* 1993, 69, 238–249.
14. Erben, U.; Loddenkemper, C.; Doerfel, K.; Spieckermann, S.; Haller, D.; Heimesaat, M.M.; Zeitz, M.; Siegmund, B.; Kühl, A.A. A Guide to Histomorphological Evaluation of Intestinal Inflammation in Mouse Models. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014, 7, 4557–4576.
15. Magoc̆, T.; Salzberg, S.L. FLASH: Fast Length Adjustment of Short Reads to Improve Genome Assemblies. *Bioinformatics* 2011, 27, 2957–2963.
16. Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Pea, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; et al. QIIME Allows Analysis of High-Throughput Community Sequencing Data. *Nat. Methods* 2010, 7, 335–336.

17. Bokulich, N.A.; Subramanian, S.; Faith, J.J.; Gevers, D.; Gordon, J.I.; Knight, R.; Mills, D.A.; Caporaso, J.G. Quality-Filtering Vastly Improves Diversity Estimates from Illumina Amplicon Sequencing. *Nat. Methods* 2013, 10, 57–59.
18. Edgar, R.C.; Haas, B.J.; Clemente, J.C.; Quince, C.; Knight, R. UCHIME Improves Sensitivity and Speed of Chimera Detection. *Bioinformatics* 2011, 27, 2194–2200.
19. Haas, B.J.; Gevers, D.; Earl, A.M.; Feldgarden, M.; Ward, D.V.; Giannoukos, G.; Ciulla, D.; Tabbaa, D.; Highlander, S.K.; Sodergren, E.; et al. Chimeric 16S rRNA Sequence Formation and Detection in Sanger and 454-Pyrosequenced PCR Amplicons. *Genome Res.* 2011, 21, 494–504.
20. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools. *Nucleic Acids Res.* 2013, 41, D590–D596.
21. Edgar, R.C. UPARSE: Highly Accurate OTU Sequences from Microbial Amplicon Reads. *Nat. Methods* 2013, 10, 996–998.
22. Edgar, R.C. MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32, 1792–1797.
23. Deguchi, Y.; Andoh, A.; Yagi, Y.; Bamba, S.; Inatomi, O.; Tsujikawa, T.; Fujiyama, Y. The S1P Receptor Modulator FTY720 Prevents the Development of Experimental Colitis in Mice. *Oncol. Rep.* 2006, 16, 699–703.
24. Cho, J.Y.; Kim, H.Y.; Kim, S.K.; Park, J.H.Y.; Lee, H.J.; Chun, H.S. β -Caryophyllene Attenuates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice via Modulation of Gene Expression Associated Mainly with Colon Inflammation. *Toxicol. Rep.* 2015, 2, 1039–1045.
25. Lo Sasso, G.; Phillips, B.W.; Sewer, A.; Battey, J.N.D.; Kondylis, A.; Talikka, M.; Titz, B.; Guedj, E.; Peric, D.; Bornand, D.; et al. The Reduction of DSS-Induced Colitis Severity in Mice Exposed to Cigarette Smoke Is Linked to Immune Modulation and Microbial Shifts. *Sci. Rep.* 2020, 10, 3829.
26. Amamou, A.; Rouland, M.; Yaker, L.; Goichon, A.; Guérin, C.; Aziz, M.; Savoye, G.; Marion-Letellier, R. Dietary Salt Exacerbates Intestinal Fibrosis in Chronic TNBS Colitis via Fibroblasts Activation. *Sci. Rep.* 2021, 11, 15055.
27. Laroui, H.; Ingersoll, S.A.; Liu, H.C.; Baker, M.T.; Ayyadurai, S.; Charania, M.A.; Laroui, F.; Yan, Y.; Sitaraman, S.V.; Merlin, D. Dextran Sodium Sulfate (Dss) Induces Colitis in Mice by Forming Nano-Lipocomplexes with Medium-Chain-Length Fatty Acids in the Colon. *PLoS ONE* 2012, 7, e0032084.
28. Whittaker, R.H. *Evolution and Measurement of Species Diversity*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 1972; Volume 21.
29. Lin, Y.; Li, B.; Yang, X.; Liu, T.; Shi, T.; Deng, B.; Zhang, Y.; Jia, L.; Jiang, Z.; He, R. Non-Hematopoietic STAT6 Induces Epithelial Tight Junction Dysfunction and Promotes Intestinal Inflammation and Tumorigenesis. *Mucosal Immunol.* 2019, 12, 1304–1315.
30. Matthes, H.; Krummnerl, T.; Giensch, M.; Wolff, C.; Schulze, J. Clinical Trial: Probiotic Treatment of Acute Distal Ulcerative Colitis with Rectally Administered *Escherichia Coli* Nissle 1917 (EcN). *BMC Complement Altern. Med.* 2010, 10, 13.
31. Oh, G.M.; Seo, I.; Jung, K.; Kim, J.H.; Kim, S.E.; Park, S.J. Therapeutic Potential of *Escherichia Coli* Nissle 1917 in Clinically Remission-Attained Ulcerative Colitis Patients: A Hospital-Based Cohort Study. *Korean J. Gastroenterol.* 2021, 77, 12–21.

32. Kruis, W.; Schütz, E.; Frick, P.; Fixa, B.; Judmaier, G.; Stolte, M. Double-Blind Comparison of an Oral *Escherichia Coli* Preparation and Mesalazine in Maintaining Remission of Ulcerative Colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1997, 11, 853–858.
33. Kruis, W.; Frick, P.; Pokrotnieks, J.; Lukáš, M.; Fixa, B.; Kaščák, M.; Kamm, M.A.; Weismueller, J.; Beglinger, C.; Stolte, M.; et al. Maintaining Remission of Ulcerative Colitis with the Probiotic *Escherichia Coli* Nissle 1917 Is as Effective as with Standard Mesalazine. *Gut* 2004, 53, 1617–1623.
34. Rembacken, B.; Snelling, A.; Hawkey, P.; Chalmers, D.; Axon, A. Non-Pathogenic *Escherichia Coli* versus Mesalazine for the Treatment of Ulcerative Colitis: A Randomised Trial. *Lancet* 1999, 354, 635–639.
35. Bibiloni, R.; Fedorak, R.N.; Tannock, G.W.; Madsen, K.L.; Gionchetti, P.; Campieri, M.; De Simone, C.; Sartor, R.B. VSL#3 Probiotic-Mixture Induces Remission in Patients with Active Ulcerative Colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 2005, 100, 1539–1546.
36. Sood, A.; Midha, V.; Makharia, G.K.; Ahuja, V.; Singal, D.; Goswami, P.; Tandon, R.K. The Probiotic Preparation, VSL#3 Induces Remission in Patients With Mild-to-Moderately Active Ulcerative Colitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2009, 7, 1202–1209.
37. Tursi, A.; Brandimarte, G.; Papa, A.; Giglio, A.; Elisei, W.; Giorgetti, G.M.; Forti, G.; Morini, S.; Hassan, C.; Pistoia, M.A.; et al. Treatment of Relapsing Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis with the Probiotic VSL3 as Adjunctive to a Standard Pharmaceutical Treatment: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *Am. J. Gastroenterol.* 2010, 105, 2218–2227.
38. Perše, M.; Cerar, A. Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 2012, 718617.
39. Chassaing, B.; Aitken, J.D.; Malleshappa, M.; Vijay-Kumar, M. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr. Protoc. Immunol.* 2014, 104, 15.25.1–15.25.14.
40. Johansson, M.E.V.; Gustafsson, J.K.; Sjöberg, K.E.; Petersson, J.; Holm, L.; Sjövall, H.; Hansson, G.C. Bacteria Penetrate the Inner Mucus Layer before Inflammation in the Dextran Sulfate Colitis Model. *PLoS ONE* 2010, 5, e12238.
41. Eichele, D.D.; Kharbanda, K.K. Dextran Sodium Sulfate Colitis Murine Model: An Indispensable Tool for Advancing Our Understanding of Inflammatory Bowel Diseases Pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2017, 23, 6016–6029.
42. Bábíčková, J.; Tóthová, L.; Lengyelová, E.; Bartončová, A.; Hodosy, J.; Gardlík, R.; Celec, P. Sex Differences in Experimentally Induced Colitis in Mice: A Role for Estrogens. *Inflammation* 2015, 38, 1996–2006.
43. Goodman, W.A.; Havran, H.L.; Quereshey, H.A.; Kuang, S.; De Salvo, C.; Pizarro, T.T. Estrogen Receptor α Loss-of-Function Protects Female Mice From DSS-Induced Experimental Colitis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2018, 5, 630–633.e1.
44. Shekels, L.L.; Ho, S.B. Characterization of the Mouse Muc3 Membrane Bound Intestinal Mucin 5t Coding and Promoter Regions: Regulation by Inflammatory Cytokines. *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expr.* 2003, 1627, 90–100.
45. Dorofeyev, A.E.; Vasilenko, I.V.; Rassokhina, O.A.; Kondratiuk, R.B. Mucosal Barrier in Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Gastroenterol. Res. Pr.* 2013, 2013, 431231.

46. Chelakkot, C.; Ghim, J.; Ryu, S.H. Mechanisms Regulating Intestinal Barrier Integrity and Its Pathological Implications. *Exp. Mol. Med.* 2018, 50, 1–9.
47. Wang, X.; Zeng, H.C.; Huang, Y.R.; He, Q.Z. Chlamydia Muridarum Alleviates Colitis via the IL-22/Occludin Signal Pathway. *Biomed. Res. Int.* 2020, 2020, 8894331.
48. Lee, M.; Chang, E.B. Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and the Microbiome—Searching the Crime Scene for Clues. *Gastroenterology* 2021, 160, 524–537.
49. Zhang, Y.; Si, X.; Yang, L.; Wang, H.; Sun, Y.; Liu, N. Association between Intestinal Microbiota and Inflammatory Bowel Disease. In *Animal Models and Experimental Medicine*; John Wiley and Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2022; pp. 311–322.
50. Ray, K.J.; Cotter, S.Y.; Arzika, A.M.; Kim, J.; Boubacar, N.; Zhou, Z.; Zhong, L.; Porco, T.C.; Keenan, J.D.; Lietman, T.M.; et al. High-Throughput Sequencing of Pooled Samples to Determine Community-Level Microbiome Diversity. *Ann. Epidemiol.* 2019, 39, 63–68.
51. Rodríguez-Ruano, S.M.; Juhanáčková, E.; Vávra, J.; Nováčková, E. Methodological Insight Into Mosquito Microbiome Studies. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020, 10, 86.
52. Nguyen, T.L.A.; Vieira-Silva, S.; Liston, A.; Raes, J. How Informative Is the Mouse for Human Gut Microbiota Research? *DMM Dis. Models Mech.* 2015, 8, 1–16.
53. Chloé Mirsepasi-Lauridsen, H.; Vallance, B.A.; Krogfelt, K.A.; Petersen, A.M. *Escherichia Coli* Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2019, 32, 2.
54. Bian, X.; Wu, W.; Yang, L.; Lv, L.; Wang, Q.; Li, Y.; Ye, J.; Fang, D.; Wu, J.; Jiang, X.; et al. Administration of *Akkermansia Muciniphila* Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 2259.
55. Zheng, M.; Han, R.; Yuan, Y.; Xing, Y.; Zhang, W.; Sun, Z.; Liu, Y.; Li, J.; Mao, T. The Role of *Akkermansia Muciniphila* in Inflammatory Bowel Disease: Current Knowledge and Perspectives. *Front. Immunol.* 2023, 13, 1089600.
56. Qu, S.; Fan, L.; Qi, Y.; Xu, C.; Hu, Y.; Chen, S.; Liu, W.; Liu, W.; Si, J. *Akkermansia Muciniphila* Alleviates Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Acute Colitis by NLRP3 Activation. *Microbiol. Spectr.* 2021, 9, e0073021.
57. Friedrich, M.; Pohin, M.; Powrie, F. Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Immunity* 2019, 50, 992–1006.
58. Alex, P.; Zachos, N.C.; Nguyen, T.; Gonzales, L.; Chen, T.E.; Conklin, L.S.; Centola, M.; Li, X. Distinct Cytokine Patterns Identified from Multiplex Profiles of Murine DSS and TNBS-Induced Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2009, 15, 341–352.
59. Grivennikov, S.; Karin, E.; Terzic, J.; Mucida, D.; Yu, G.Y.; Vallabhapurapu, S.; Scheller, J.; Rose-John, S.; Cheroutre, H.; Eckmann, L.; et al. IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell* 2009, 15, 103–113.
60. Neurath, M.F. Targeting Immune Cell Circuits and Trafficking in Inflammatory Bowel Disease. *Nat. Immunol.* 2019, 20, 970–979.
61. Günther, C.; Martini, E.; Wittkopf, N.; Amann, K.; Weigmann, B.; Neumann, H.; Waldner, M.J.; Hedrick, S.M.; Tenzer, S.; Neurath, M.F.; et al. Caspase-8 Regulates TNF- α -Induced Epithelial Necroptosis and Terminal Ileitis. *Nature* 2011, 477, 335–339.

62. Faria, A.M.C.; Weiner, H.L. Oral Tolerance. *Immunol. Rev.* 2005, 206, 232–259.

63. Wang, J.; Zhao, X.; Wan, Y.Y. Intricacies of TGF- β Signaling in Treg and Th17 Cell Biology. *Cell Mol. Immunol.* 2023, 20, 1002–1022.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.