



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
MOLECULAR) - PPGBIOMOL/UnB

SYLVIA BARBOSA PINHATE

**ANÁLISE DO EFEITO PROTETOR DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE
FRAGMENTO SCFV DE ANTI-CD3 PELA LEVEDURA *SACCHAROMYCES
BOULARDII* EM MODELO DE COLITE EXPERIMENTAL**

Brasília

2025

SYLVIA BARBOSA PINHATE

**ANÁLISE DO EFEITO PROTETOR DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE
FRAGMENTO SCFV DE ANTI-CD3 PELA LEVEDURA *SACCHAROMYCES
BOULARDII* EM MODELO DE COLITE EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como pré-requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Co-orientadora: Prof. Dra. Andrea Queiroz Maranhão

Brasília

2025

SYLVIA BARBOSA PINHATE

**ANÁLISE DO EFEITO PROTETOR DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE
FRAGMENTO SCFV DE ANTI-CD3 PELA LEVEDURA *SACCHAROMYCES*
BOULARDII EM MODELO DE COLITE EXPERIMENTAL**

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

Brasília, 12 de junho de 2025

BANCA AVALIADORA

Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Presidente da Banca

Dra. Lidia Maria Pepe de Moraes

Professora Avaliadora

Dr. Anderson Miyoshi

Professor Avaliador Externo

Dr. Aisel Valle Garay

Professor Avaliador Suplente

“Tudo na santa paz!”
Tarcisio Pinhate

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à minha família pelo apoio e amor incondicionais e por serem exemplo de força e perseverança. Sou imensamente grata por todo carinho e pela presença, especialmente nos momentos mais difíceis. Ao meu avô, Sebastião, que me chamava de mestre antes mesmo do título. À minha querida Bibi, por me acompanhar na vida e, claro, nessa jornada. A vida é tão divertida ao seu lado. Obrigada por ser minha inspiração diária com sua inteligência, determinação e paciência. Amo vocês, com todo meu coração.

Também agradeço aos meus orientadores, Marcelo e Andrea, por me acolherem no laboratório desde a iniciação científica, e me dar a oportunidade e o incentivo para atingir meu potencial. Agradeço também à Bel, por seu infinito conhecimento, apoio e ajuda, não só nos experimentos, mas sempre que precisei. Você é incrível. Foi um prazer te conhecer.

A todos os meus colegas do Laboratório de Imunologia Molecular da UnB, em especial Lucas, Ana e Dyane, pela companhia e cafezinhos na copa. À Mariana, pelos ensinamentos quando iniciei. Também a todos que fazem, ou já fizeram, parte do time da colite: Vitor, Manu, Renato e Ana Luiza. Obrigada pela companhia, pelo aprendizado, pela ajuda e, principalmente, pela amizade. À Pietra, um exemplo de força e luz, por pular de cabeça comigo, topa os testes mais mirabolantes e ser uma grande pesquisadora. Te admiro muito!

Ao Igor, Luísa e Maria, por dividir comigo cafés, risadas e chororô de pitangas. Estar ao lado de vocês deixava qualquer dia mais leve e feliz. Aos meus meninos, João e Natan, pela amizade desde o ensino médio e apoio, mesmo quando estive tão imersa na pesquisa. Amo tanto vocês e vou levá-los sempre no meu coração.

Ao CNPQ e à FAP-DF pelo apoio financeiro.

Resumo

A colite ulcerativa (UC) é uma doença inflamatória intestinal (DII) caracterizada por inflamação recorrente e dano à região do cólon. Nos últimos anos, sua incidência aumentou mundialmente. Embora os tratamentos disponíveis sejam eficazes em suprimir a inflamação, como o uso intravenoso de anticorpos imunoterápicos, estes são caros e podem causar efeitos adversos. *Saccharomyces boulardii*, uma levedura amplamente reconhecida como segura pela Food and Drug Administration (FDA), é comumente utilizada para o tratamento de distúrbios intestinais devido às suas propriedades probióticas. Estudos em modelos murinos de UC sugerem efeitos protetores contra a inflamação intestinal por este microrganismo. A capacidade de ser geneticamente modificada para expressão heteróloga, tolerar a temperatura corporal e baixos níveis de pH, fazem dessa levedura um organismo adaptável para a entrega oral de moléculas à mucosa do trato gastrointestinal. Nesse sentido, este trabalho tem como objetivo explorar a capacidade de produção e entrega de um fragmento scFv anti-CD3 por *S. boulardii* e seus efeitos protetores em modelo animal de colite induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS). Para isso, foram construídos dois plasmídeos contendo domínios extensores, a fim de melhorar a disponibilidade do anti-CD3. As leveduras transformadas foram cultivadas em condições ideais e estressantes para analisar seu impacto na produção do anticorpo. A expressão de anti-CD3 foi avaliada por citometria de fluxo e Dot-Blot. A condição que resultou na maior detecção de anticorpos e viabilidade celular foi utilizada para o cultivo de leveduras usadas no teste *in vivo*. Camundongos C57BL fêmeas receberam diariamente por gavagem oral a dose contendo leveduras selvagem ou transformadas. A UC foi induzida nos 5 dias seguintes com a adição de 3% de DSS na água, enquanto recebiam também os tratamentos. Os camundongos tratados com levedura que apresenta anti-CD3 apresentaram valores de DAI mais próximos do grupo saudável e diferiram significativamente dos camundongos não tratados. A expressão gênica do colón e dos linfonodos foram analisadas por testes de PCR quantitativa (qPCR). Nos linfonodos, foi observado aumento da expressão de *Tbx21* com o desenvolvimento da doença. No grupo tratado com a levedura produtora de anticorpo, houve redução significativa na expressão do gene *Il6* e aumento na de *Foxp3*, sugerindo que o tratamento pode favorecer um perfil regulatório no ambiente imune. Em adição, a administração da levedura com anti-CD3 resultou em aumento significativo da produção do gene *Muc3* em comparação ao grupo tratado apenas com o probiótico. Embora a doença tenha alterado os padrões histológicos, não houve diferença significativa com o tratamento. Com esse trabalho, foi possível confirmar a capacidade da levedura de produzir e expressar fragmentos de anticorpos em sua superfície. Além disso, no modelo de colite murina, sua administração mostrou efeito protetor e atenuou os sintomas e sinais inflamatórios da UC, sugerindo que seu uso pode ser uma alternativa terapêutica viável para as DII.

Palavras-chave: Doenças inflamatórias intestinais; imunoterapia; anti-CD3; scFv.

Abstract

Ulcerative Colitis (UC) is an Inflammatory Bowel Disease (IBD) characterized by recurrent inflammation and damage to the colon region. In recent years, its incidence has increased globally. Although treatments, like intravenous administration of immunotherapeutic antibodies, effectively suppresses inflammation, they are expensive and can cause adverse effects. The yeast *Saccharomyces boulardii* is classified as "Generally Recognized as Safe" (GRAS) by the Food and Drug Administration and is commonly used to treat intestinal disorders due to its probiotic properties. Studies suggest that it can also have protective effects against intestinal inflammation in UC murine models. Its capacity to be genetically modified for heterologous expression, tolerate body temperature and low pH levels make her an adaptable organism for oral delivery of molecules in the Gastrointestinal Tract. This work aims to explore the capacity of production and delivery of an scFv anti-CD3 fragment by *S. boulardii* and its effects in a Dextran Sodium Sulfate (DSS) induced colitis mouse model. For this, two different plasmid constructions containing stalk domains were designed in order to enhance anti-CD3 detection and its immune effects. Transformed yeasts were cultured under optimal and stressful conditions to analyze how it might impact the production of the antibody fragment. Anti-CD3 expression was assessed by flow cytometry and Dot-Blot. The culture protocol that resulted in highest antibody detection and cell-viability was applied for growing yeasts used for the *in vivo* test. C57BL female mice were orally gavaged daily, with either the dose with transformed yeast for the treatment group or 0.9% saline for the control group. UC was induced for the next 5 days by adding 3% DSS in water, while the mice were being treated. The animals were monitored daily on weight, fecal consistency, and rectal bleeding to evaluate the disease activity index (DAI). The colon was measured and weighed after euthanasia. Mice treated with anti-CD3 presenting yeast showed DAI values closer to the healthy group and significantly differed from the non-treated mice. Gene expression in the colon and lymph nodes was analyzed by quantitative PCR (qPCR) tests. Lymph nodes showed increased expression of *Tbx21* with the development of the disease. The group treated with the antibody-producing yeast showed a significant reduction in the expression of *Il6* gene and increase in *Foxp3*, suggesting that the treatment may favor a regulatory cell profile in the immune environment of the treated individuals. In addition, administration of the yeast with anti-CD3 resulted in a significant increase in the production of *Muc3* when compared to the group treated with the isolated probiotic. Although the disease altered histological patterns, there was no significant difference with the treatment. This study confirmed the yeast's capacity to produce and express antibody fragments on its surface. In addition, its administration had improved protective effects by delaying inflammation progression, attenuating visible UC symptoms and showed differential gene expression in the murine colitis model. This combination has great potential to reshape the immunotherapy field on IBD.

Keywords: Inflammatory Bowel Diseases; Immunotherapy; anti-CD3; scFv.

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura da barreira intestinal e patogênese da colite	18
Figura 2. Representação do efeito anti-CD3 oral na indução de tolerância	23
Figura 3. Esquema de vetores e cassetes de expressão.....	31
Figura 4. Cronograma experimental dos testes <i>in vivo</i>	37
Figura 5. Análise da digestão enzimática em gel de agarose	43
Figura 6. Análise de reação de PCR de colônia em gel de agarose.....	45
Figura 7. Curva de crescimento comparativa	46
Figura 8. Imunodeteção por Dot-Blot.....	47
Figura 9. Análise da arquitetura celular das linhagens de leveduras.....	48
Figura 10. Análise da tendência de desordem dos resíduos dos extensores	49
Figura 11. Análise do efeito do cultivo na produção de anti-CD3 por <i>S. boulardii</i>	52
Figura 12. Análise comparativa do impacto do cultivo na detecção por imunodeteção e por citometria de fluxo.....	57
Figura 13. Análise em Citometria de Fluxo do Efeito do Cultivo na Viabilidade Celular	60
Figura 14. Análise da expressão de anti-CD3 e viabilidade das células em doses.....	63
Figura 15. Efeito da administração das linhagens de <i>S. boulardii</i> no peso corporal de animais com Colite Ulcerativa induzida	65
Figura 16. Efeito geral da administração de <i>S. boulardii</i> na atividade da doença.....	66
Figura 17. Análises pareadas do efeito da administração das linhagens de <i>S. boulardii</i> produtora de anti-CD3 na atividade da doença por grupo	67
Figura 18. Efeito da administração das linhagens de <i>S. boulardii</i> produtora de anti-CD3 no encurtamento do cólon.....	69
Figura 19. Análise da expressão gênica das células dos linfonodos mesentéricos por PCR em tempo real	71
Figura 20. Análise da expressão gênica das células do cólon por PCR em tempo real	75

Lista de Tabelas

Tabela 1. Iniciadores utilizados para reação de PCR de colônia.	35
Tabela 2. Descrição dos grupos experimentais utilizados para os testes in vivo.	39
Tabela 3. Pontuação do Índice de Atividade da Doença (DAI)	40
Tabela 4. Pontuação das análises histológicas.....	41
Tabela 5. Iniciadores utilizados para testes de qPCR.....	43
Tabela 6. Efeito do período sob cultivo estressante no crescimento de UFC em meio YPD sólido	60

Lista de Abreviações e Siglas

cDNA	DNA complementar
CDRs	Regiões Determinantes de Complementaridade
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEUA	Comitê de Ética de Uso Animal
DAI	Índice de Atividade da Doença
DC	Doença de Crohn
DII	Doenças Inflamatórias Intestinais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSS	Dextrana Sulfato de Sódio
Fab	Porção variável do anticorpo
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
Fc	Porção constante do anticorpo
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
g	Força gravitacional
GALT	Tecido linfoide associado ao intestino
GRAS	Microrganismo Geralmente Considerado Como Seguro
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
M	Molar
mAb	Anticorpo monoclonal
NM	Não marcado
OD ₆₀₀	Densidade Óptica a 600nm

OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação de Cadeia Polimerase
PI	Iodeto de propídeo
qPCR	PCR Quantitativa em Tempo Real
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por Minuto
scFv	Fragmento Variável de Cadeia Única
TCR	Receptor de Células T
TGI	Trato Gastrointestinal
Th	Linfócito T Helper
TLRs	Toll-like Receptors
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UC	Colite Ulcerativa
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

Sumário

Introdução	14
1. Colite Ulcerativa, uma doença inflamatória intestinal	14
1.1 Epidemiologia	14
2. Patogênese e papel da microbiota	16
3. Abordagens terapêuticas utilizadas em colite ulcerativa	19
3.1 Uso de anticorpos monoclonais	20
3.1.1 Anticorpo anti-CD3	21
3.1.1.2 Indução da tolerância oral	22
3.2 O potencial terapêutico de probióticos	24
4. A levedura <i>Saccharomyces boulardii</i>	26
5. Resultados anteriores	28
Objetivo	29
Métodos	30
1. Linhagens e condições de cultivo	30
1.1 <i>Escherichia coli</i>	30
1.2 <i>Saccharomyces boulardii</i>	30
2. Plasmídeos	30
3. Produção de linhagens transformantes	32
3.1 Transformação de <i>Escherichia coli</i> por choque térmico	32
3.2 Transformação de <i>Saccharomyces boulardii</i> por eletroporação	33
4. Confirmação da transformação	34
4.1 Digestão enzimática	34
4.2 PCR de colônia	34
4.3 Eletroforese em gel de agarose	35
5. Caracterização das linhagens transformantes	36
5.1 Curva de crescimento	36
5.2 Imunodeteção por Dot-Blot	36
5.3 Citometria de fluxo	36
5.4 Efeito do tempo de cultivo sob detecção do anticorpo	37
6. Modelo de colite	37
6.1 Cronograma experimental	37
6.2 Animais e grupos	38
6.3 Preparo de doses	39
6.4 Análise de parâmetros macroscópicos	40
6.5 Análises histológicas	40

6.6 Extração de RNA e qPCR	42
6.7 Análises estatística.....	43
Resultados e discussão.....	44
1. Expansão Clonal em <i>E. coli</i>	44
2. Produção heteróloga por <i>S. boulardii</i>	45
2.1 Transformação e confirmação por PCR de colônia.....	45
2.2 Caracterização Comparativa do Crescimento.....	46
2.3 Produção heteróloga do fragmento scFv de anti-CD3	47
2.3.1 Imunodeteção por Dot-Blot	47
2.3.2 Estabilidade e crescimento das linhagens.....	47
2.3.3 Efeito das condições de cultivo na produção e detecção do anticorpo ancorado à parede celular por citometria de fluxo.....	51
2.3.4 Representatividade dos testes de imunodeteção para análise de amostras celulares	57
2.3.5 Impacto do cultivo estressante na viabilidade celular	59
2.3.6 Detecção do anti-CD3 nas doses utilizadas na experimentação in vivo.....	63
3. Análise do potencial imunoterápico em modelo animal	65
3.1 Análise dos parâmetros macroscópicos de inflamação	65
3.2 Análises morfológicas e histológicas do cólon	70
3.3 Expressão diferencial de genes inflamatórios	71
Conclusão e perspectivas.....	79
Referências	83

Introdução

1. Colite Ulcerativa, uma doença inflamatória intestinal

A Colite Ulcerativa (UC, do inglês *Ulcerative Colitis*) e a Doença de Crohn (CD, do inglês *Crohn's Disease*) são doenças crônicas imunomediadas classificadas como doenças inflamatórias intestinais (DII), caracterizadas por desequilíbrio imune que causa inflamação no trato gastrointestinal (TGI). Enquanto a inflamação de CD ocorre de forma transmural em qualquer segmento do intestino, em UC é observado inflamação superficial da mucosa intestinal restrita às regiões do cólon e do reto (Bruner *et al.*, 2023).

Os sintomas característicos da Colite Ulcerativa são perda de peso, dor abdominal, urgência de evacuação, diarreia e presença de sangue nas fezes com padrão de inflamação recorrente de ciclos de melhora e recidiva (Porter *et al.*, 2020; Le Berre *et al.*, 2023). Ademais, aumentam a chance de desenvolvimento de outras doenças inflamatórias, como asma e artrite reumatoide, e a incidência de câncer de colorretal (Halling *et al.*, 2017; Keller *et al.*, 2019).

Embora sua etiologia não esteja completamente elucidada, fatores como estilo de vida, urbanização, uso de antibióticos, dieta e exposição à diversidade de microrganismos nos primeiros anos de vida são apontados como contribuintes. Estes aspectos, aliados também à predisposição genética de um indivíduo, irão afetar o funcionamento do seu sistema imune, composição da microbiota colônica e integridade da barreira epitelial intestinal, fatores centrais no desenvolvimento da UC. Apesar de se observarem influência destes fatores, os mecanismos pelos quais atuam para contribuir no desenvolvimento da Colite Ulcerativa ainda não foram totalmente compreendidos (Singh & Bernstein, 2022; Du & Ha, 2020).

1.1 Epidemiologia

No mundo, as DII tiveram rápido aumento da incidência no século XXI, com índices maiores na Europa e na América do Norte. Estima-se que haja um milhão de pessoas com DII nos Estados Unidos, mais de 200 mil no Canadá e entre 2,5 e 3 milhões na Europa (Kaplan, 2015). Apesar da estabilização do número de novos casos, a prevalência da Colite Ulcerativa aumentou

significativamente nestas regiões, possivelmente devido a tendência de manifestações mais precoces da doença e à ausência de cura, o que torna necessário o aumento do investimento no sistema de saúde para sua administração (Du & Ha, 2020; Pasvol *et al.*, 2020). Na Europa, onde se observa uma das maiores taxas de prevalências globais, a UC gera um custo de assistência médica em torno de 4,6 a 5,6 bilhões de euros por ano (Burisch *et al.*, 2013).

Em países recentemente industrializados da África, da Ásia e da América do Sul, o número de casos de Colite Ulcerativa tem aumentado com a adoção de estilo de vida urbano, se aproximando rapidamente da incidência observada no hemisfério norte (Ng *et al.*, 2017; Kaplan *et al.*, 2015). No continente sul-americano, o número de casos tem aumentado em ritmo mais acelerado que em outras regiões em desenvolvimento do mundo, sendo o Brasil, maior país deste continente, responsável pela maior parte dos casos de UC (Selvaratnam *et al.*, 2019).

Apesar do número pequeno de estudos epidemiológicos no país, pesquisas apontam um aumento significativo de casos de DII no Brasil, especialmente de UC (Quaresma *et al.*, 2022; Zaltman *et al.*, 2021). Dentre os indivíduos acometidos, há predominância de pessoas do sexo feminino e de residentes de áreas urbanas, tanto no Nordeste (Parente *et al.*, 2015; da Silva *et al.*, 2015), quanto no Sudeste brasileiro, com alto número especialmente no estado de São Paulo (Gasparini *et al.*, 2018).

Devido à grande extensão territorial e às diferenças socioeconômicas interestaduais, o perfil sociodemográfico dos indivíduos com Colite Ulcerativa varia entre regiões. Destaca-se que indivíduos com UC das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste apresentaram maior índice de desemprego, o que pode ser associado tanto ao impacto da doença no funcionamento social quanto às dificuldades socioeconômicas preexistentes dessas regiões, como oferta de oportunidades de trabalho limitada e baixa escolaridade. Ademais, as regiões Nordeste e Centro-oeste apresentaram o maior número de pacientes com a doença ativa e que realizavam acompanhamento no setor de saúde pública, mostrando-se um desafio crescente ao setor público, devido ao aumento de indivíduos acometidos pela doença e ao alto custo dos tratamentos (Zaltman *et al.*, 2021).

2. Patogênese e papel da microbiota

A Colite Ulcerativa é desencadeada por eventos que prejudicam a integridade da barreira intestinal. Com isso, estimula-se a resposta imunitária exacerbada que, por sua vez, pode alterar a composição da microbiota intestinal, gerando disbiose, e mediar lesão ao tecido (Porter *et al.*, 2020).

A barreira intestinal é composta pela camada externa de muco, pela camada de células epiteliais especializadas, com células caliciformes, que produzem muco, e com células de Paneth, produtoras de peptídeos antimicrobianos, e pela lâmina própria interna, onde residem células imunes do sistema inato e sistema adaptativos que atuam como sentinelas (Stolfi *et al.*, 2022).

O epitélio intestinal atua como uma interface entre o ambiente externo e o meio interno. Dessa forma, seus componentes realizam a segregação necessária para equilibrar a resposta imune protetora, que previne a entrada de patógenos, com a tolerância imunológica à microbiota e aos antígenos alimentares, garantindo a absorção de nutrientes e a manutenção de uma população microbiana local benéfica (Mowat & Agace, 2014; Macura *et al.*, 2024).

A região intestinal do cólon contém grande riqueza de microrganismos, chegando a densidade bacteriana de 10^{10} a 10^{12} de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL (Kennedy & Chang, 2020). Esse componente contribui para a manutenção da homeostase intestinal por interagir mutuamente com as células imunes do hospedeiro. Fatores liberados por células imunes como defensinas, IgA e moléculas antibacterianas influenciam a composição da microbiota. Esta, por sua vez, contribui para induzir a expansão de células T reguladoras que reduzem a inflamação, estimula a produção de citocinas anti-inflamatórias e reduz a de pró-inflamatórias (Świrkosz *et al.*, 2023).

Ainda, os microrganismos podem liberar ácidos graxos de cadeia curta pela fermentação de carboidratos. Esses metabólitos secundários podem estimular a diferenciação de células T para perfil regulatório e à função de barreira pelos colonócitos, com aumento da produção de junções intracelulares (Deleu *et al.*, 2022). Além disso, a presença da microbiota contribui para a proteção do hospedeiro ao dificultar a colonização por patógenos, devido a competição por recursos no epitélio intestinal (Cheng *et al.*, 2019).

Uma característica central da patologia da colite é o desequilíbrio da comunidade microbiana, ou disbiose. Não está claramente estabelecido se a disbiose é causa ou consequência da inflamação na colite, mas é associada à manutenção e à progressão das doenças inflamatórias (Acevedo-Román *et al.*, 2024). Devido ao aumento da permeabilidade intestinal, a translocação de antígenos bacterianos do trato gastrointestinal para a corrente sanguínea é facilitada, contribuindo para manutenção da inflamação em patologias imunomediadas, como a colite (Świrkosz *et al.*, 2023).

Para melhor compreensão dos mecanismos que participam da patogênese da colite, os principais processos são representados esquematicamente na figura 1.

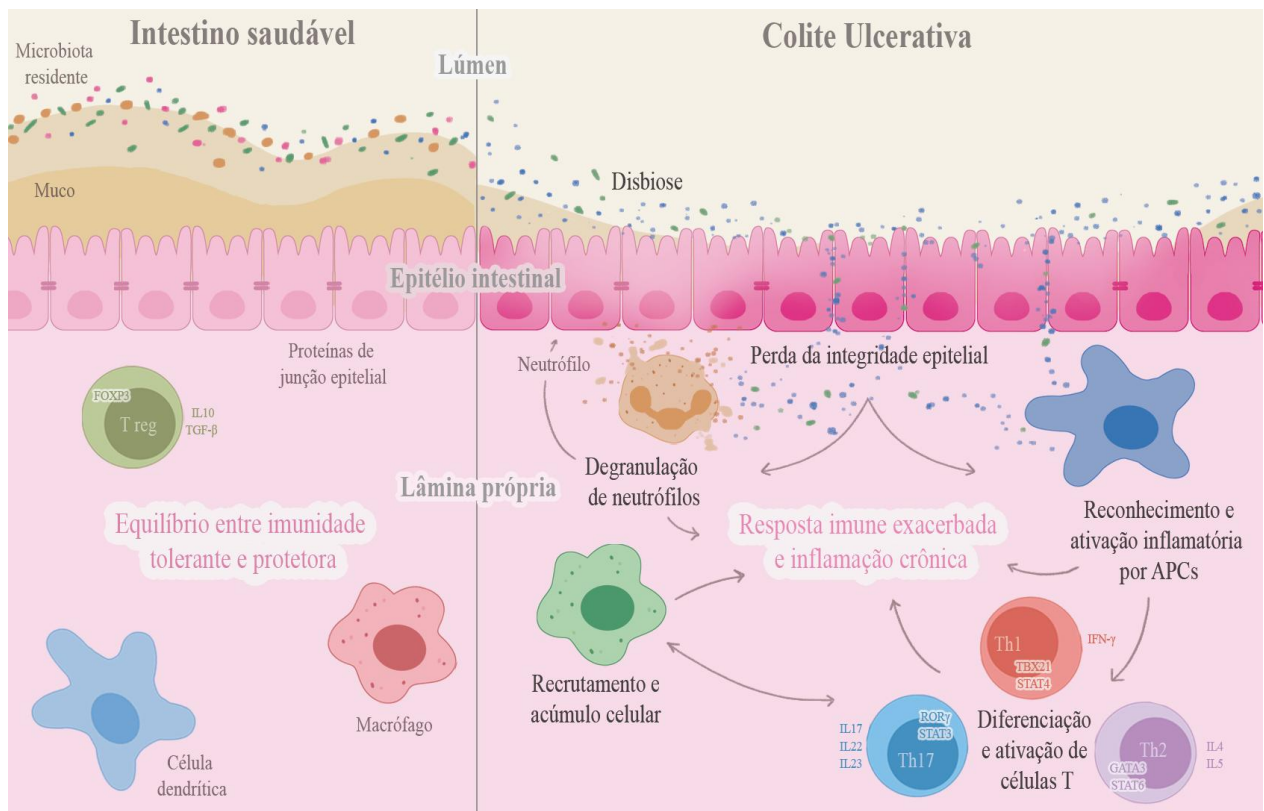


Figura 1. Estrutura da barreira intestinal e patogênese da colite. Em um ambiente intestinal saudável, as barreiras intestinais de células epiteliais e de muco se apresentam íntegras. Na lâmina própria, células imunes residentes, como macrófagos, células dendríticas e linfócitos T, regulam a tolerância a antígenos alimentares e a resposta imune protetora. Nesse ambiente, o perfil regulatório de linfócitos T predomina, com maior expressão da proteína FOXP3 e das citocinas IL10 e TGF-β. Na Colite Ulcerativa, a redução da camada de muco e aumento da permeabilidade intestinal permite o reconhecimento de antígenos microbianos por células sentinelas, iniciando a resposta inflamatória. Com isso, se observa expansão de outros perfis de linfócitos T e maior expressão de fatores de transcrição e de citocinas inflamatórias. O perfil TH17 é caracterizado pelo aumento de RORγ, STAT3 e das citocinas IL17, IL22 e IL23; TH1, com TBX21, STAT4 e IFNγ; TH2, com GATA3, STAT6 e citocinas IL4 e IL5. A liberação desses mensageiros inflamatórios aumenta o recrutamento celular e sua atividade inflamatória. Além disso, o reconhecimento da microbiota estimula a NETose por neutrófilos, levando à liberação de mediadores que causam danos às células epiteliais e contribuem para a perda da integridade epitelial. Em conjunto, esses fatores contribuem para o estabelecimento de um ambiente inflamatório crônico. Fonte: elaboração da autora.

Quando há prejuízo à função de barreira epitelial intestinal, há maior contato da microbiota com o epitélio, o que estimula a resposta imune inflamatória envolvida na patogênese da colite (Van Der Post *et al.*, 2019). Assim, antígenos da microbiota desequilibrada serão reconhecidos por receptores, como TLRs (do inglês, *toll-like receptors*) e Nod, o que ativará a via de sinalização NF-κB, resultando em resposta imune desregulada e na inflamação perpetuada observadas em DII (Zou & Liu *et al.*, 2021).

Dessa forma, o número de neutrófilos aumenta, assim como sua atividade inflamatória, na qual realizam NETose e liberação de espécies reativas de oxigênio, mediando dano tecidual local (Porter *et al.*, 2020). Em adição, macrófagos e células dendríticas irão reconhecer antígenos microbianos e padrões moleculares e sinalizam para ativação de células T e para secreção de citocinas inflamatórias no ambiente intestinal (Ivanov *et al.*, 2022).

O sistema imune adaptativo também responderá de forma excessiva, com aumento na ativação e no número de células T CD4⁺ dos subtipos Th1, Th17 e Th2 no cólon, o que leva a uma maior liberação de citocinas pró-inflamatórias (Imam *et al.*, 2018; De Souza & Fiocchi, 2016). Ademais, o aumento na secreção de moléculas inflamatórias resultante recruta células imunes para o local e promove sua diferenciação para perfil inflamatório, causando acúmulo celular e instaurando um ciclo pró-inflamatório de constante ativação e resposta, característico da inflamação intestinal crônica (Neurath, 2019).

3. Abordagens terapêuticas utilizadas em colite ulcerativa

Por sua característica inflamatória crônica, a Colite Ulcerativa leva a complicações no organismo e nos tecidos proximais (Le Berre *et al.*, 2023). Esse curso recidivante-remitente afeta a capacidade do paciente de participar da sociedade, além de aumentar o número de internações, cirurgias e custos hospitalares para tratamento. Com isso, a patologia acaba por prejudicar a qualidade de vida do indivíduo acometido (Armuzzi & Liguori, 2021).

Assim, abordagens terapêuticas devem almejar a remissão clínica, promover a cicatrização da mucosa intestinal e diminuir a inflamação com o objetivo de melhorar o bem-estar do paciente e evitar o desenvolvimento de outras doenças, como câncer colorretal (Armuzzi & Liguori, 2021; Buchman, 2020). Ademais, a progressão para quadros mais graves necessita intervenção cirúrgica de colectomia (Gajendran *et al.*, 2019).

São convencionalmente receitados o uso de aminossalicilatos, corticosteroides e imunossupressores como tratamento para UC. Esses medicamentos atuam na redução da inflamação e manutenção da remissão. Porém, sua eficácia é limitada a longo prazo, principalmente devido ao grande número de efeitos colaterais associados, como osteoporose e hipertensão causadas por corticosteroides e toxicidade e insuficiência renal causadas por alguns

imunomoduladores (Di Renzo *et al.*, 2021). Desta forma, a busca por terapias mais eficazes e direcionadas é necessária, como o uso de anticorpos monoclonais.

3.1 Uso de anticorpos monoclonais

Anticorpos são moléculas do sistema imunológico compostas pela porção constante (Fc) e a variável (Fab). Nesta última, são encontradas as regiões determinantes de complementaridade (CDRs), formando o paratopo, região que reconhece especificamente um epítipo presente no antígeno (Chiu & Gilliland, 2016). Os anticorpos monoclonais (mAb) são clones idênticos de anticorpos obtidos a partir de hibridomas (clones) de células B em cultura (Packer, 2021) ou por tecnologias recombinantes aplicadas em outros sistemas celulares, como linhagens de células de mamífero (Zhang & Shen, 2012).

Essas moléculas podem ser construídas com especificidade a antígenos, o que as torna capazes de atuar diretamente em vias patogênicas. Com isso, mAbs se tornaram uma modalidade de tratamento mais utilizada para várias doenças nos últimos 25 anos, como câncer, artrite, infecções e DII (Lu *et al.*, 2020). O uso desses agentes biológicos mudou o cenário terapêutico da UC (Segal *et al.*, 2021).

O primeiro mAb aprovado para uso em UC tem como alvo o fator de necrose tumoral α (TNF α), como Infliximabe, que objetiva controlar a proliferação e a diferenciação celular pró-inflamatória. Atualmente, também são explorados outros alvos para essa estratégia, como a subunidade p40 das Interleucinas 12 e 23, alvo do Ustequinumabe, que diminui a ativação de linfócitos CD4 por APCs e sua diferenciação nos perfis inflamatórios Th1 e Th17 (Di Paolo & Luci, 2021). Assim, reduz a população de células inflamatórias e previne a progressão da inflamação.

Também são aprovados para uso em UC e demonstram resultados promissores em estudos clínicos o Mirikizumabe, direcionado à p19 contra a Interleucina 23 (D'Haens *et al.*, 2023), Vedolizumabe, que inibe a integrina $\alpha 4\beta 7$, expressa em células T de memória (Sandborn *et al.*, 2020), o Tofacitinibe, inibidor de JAK1, JAK2 e JAK3, e outros vários medicamentos que têm emergido nos últimos anos, oferecendo mais alternativas terapêuticas (Tian *et al.*, 2024).

A utilização desses mAbs para tratamento de DII é eficiente, pois atuam diretamente nas vias envolvidas na doença pelo bloqueio de moléculas específicas (Di Rienzo *et al.*, 2024). Tratamento com anticorpos monoclonais se mostram mais eficazes e seguros quando comparados às abordagens tradicionais, causando melhora nos aspectos clínicos, endoscópicos, histológicos, genéticos, inflamatórios e na qualidade de vida dos pacientes (Avedillo-Salas *et al.*, 2023).

Contudo, indivíduos que utilizam mAbs podem apresentar recaídas, um desafio ainda a ser superado (Roblin *et al.*, 2020). Portanto, apesar de apresentar a melhor alternativa terapêutica devido à sua eficiência, não apresentam possibilidade de cura, sendo necessárias administrações periódicas para controle da doença.

Também, esses medicamentos possuem preço elevado devido ao alto custo da estrutura necessária para sua produção. Por exemplo, os valores para compra de Remicade® (Infliximabe) são a partir de R\$5.950 e de R\$18.345 para Stelara® (Ustequinumabe) (Consulta Remédios, 2025).

No Brasil, há menor índice de pacientes de UC que utilizam biofármacos como tratamento quando comparado com pacientes de DC (Sasaki *et al.*, 2021; Zaltman *et al.*, 2021). Apesar de gratuito e universal, o Sistema de Saúde Público brasileiro não cobria o uso de biofármacos para casos de UC até recentemente (Zaltman *et al.*, 2021). Portanto, para o acesso a essa terapia mais eficaz e segura, pacientes ainda precisam ou recorrer à petição judicial ou custear o tratamento com recursos próprios (Sasaki *et al.*, 2021).

Além disso, grande parte destes medicamentos possuem administração intravenosa. Assim, ocorre uma distribuição sistêmica e ação em todo o corpo, ao invés de se limitar a uma única área, como o intestino (Griffiths *et al.*, 2020). Desta forma, a busca por alternativas orais desses tratamentos nos casos de UC pode tornar a terapia mais acessível aos pacientes ao mesmo tempo que aproxima o anticorpo do seu alvo, o sistema imune associado ao cólon.

3.1.1 Anticorpo anti-CD3

As células T regulatórias (Treg) do cólon possuem capacidade de atenuar a resposta inflamatória de linfócitos T CD4⁺ efetores ao limitar sua proliferação, o que é essencial para manutenção da homeostase (Smith *et al.*, 2013). Essas células podem ser estimuladas pelo uso de anticorpos anti-CD3, induzindo um estado de tolerância (Kuhn & Weiner, 2016).

O anti-CD3 é um anticorpo monoclonal que se acopla à molécula CD3, componente do Receptor de Células T (TCR), na superfície de linfócitos T (Riddell & Greenberg, 1990). O primeiro mAb a ser aprovado pela FDA foi o Muromonab CD3, ou OKT3, que apresentava risco de imunogenicidade aos pacientes devido à resposta imune gerada a seus componentes murinos. Com isso, estratégias de quimerização e humanização de anticorpos foram desenvolvidas a fim de gerar moléculas mais seguras para uso clínico (Singh *et al.*, 2018).

O Teplizumabe, um anti-CD3, foi aprovado em 2023 pelo FDA e já pode ser encontrado no mercado. Sua imunogenicidade foi reduzida por mutações em sua porção Fc, tornando-o uma opção mais segura para uso terapêutico (Kaplon *et al.*, 2023). Em diabetes tipo 1, o uso desse anticorpo tem se mostrado seguro, com melhora do quadro clínico e da progressão e desenvolvimento da doença (Herold *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2024).

Apesar de a administração intravenosa de anti-CD3 ter demonstrado efeitos colaterais anteriormente (Friend *et al.*, 1999; Ilan *et al.*, 2009), sua administração oral se mostrou eficiente para tratamento de doenças autoimunes mediadas por células T, como diabetes tipo 1 (Herold *et al.*, 2019) e lúpus (Wu *et al.*, 2009). Pela via oral, esses anticorpos têm menor risco de ocasionar efeitos adversos e conseguem exercer seu efeito de forma eficaz e segura devido à tolerância oral.

3.1.1.2 Indução da tolerância oral

A tolerância oral é definida como o mecanismo pelo qual o sistema imunológico mantém a falta de resposta, ou a tolerância, a antígenos introduzidos no ambiente da mucosa para evitar respostas imunológicas exacerbadas (Strober *et al.*, 1998). Este mecanismo de proteção é comprometido na patogênese da Colite Ulcerativa. Com isso, a reatividade a microrganismos comensais pode levar ao desenvolvimento de doença inflamatória intestinal (Tordesillas & Berin, 2018). No entanto, pode ser induzido e restaurado durante a inflamação ativa em modelos experimentais de UC, sendo, portanto, uma via promissora a ser explorada para imunoterapias orais (Ino *et al.*, 2016).

A utilização oral do anti-CD3 pode induzir um perfil tolerante por atuar no número de células efectoras e sua atividade inflamatória. Diferente dos efeitos adversos sistêmicos que ocorrem pela administração do anti-CD3 via intravenosa, sua administração oral induz a ação de células

Treg, principalmente do subtipo Th3 LAP⁺ (peptídeo associado à latência), que reduzem a diferenciação de células T para os perfis Th1 e Th2 de maneira dependente de TGF- β e IL-10 (Kuhn & Weiner, 2016; Sasaki *et al.*, 2009. Ambas são citocinas anti-inflamatórias que atuam induzindo a diferenciação de células T regulatórias e o perfil tolerante. Com isso, contribuem para a homeostase e para a redução da atividade inflamatória exacerbada. Este mecanismo é representado esquematicamente na figura 2.

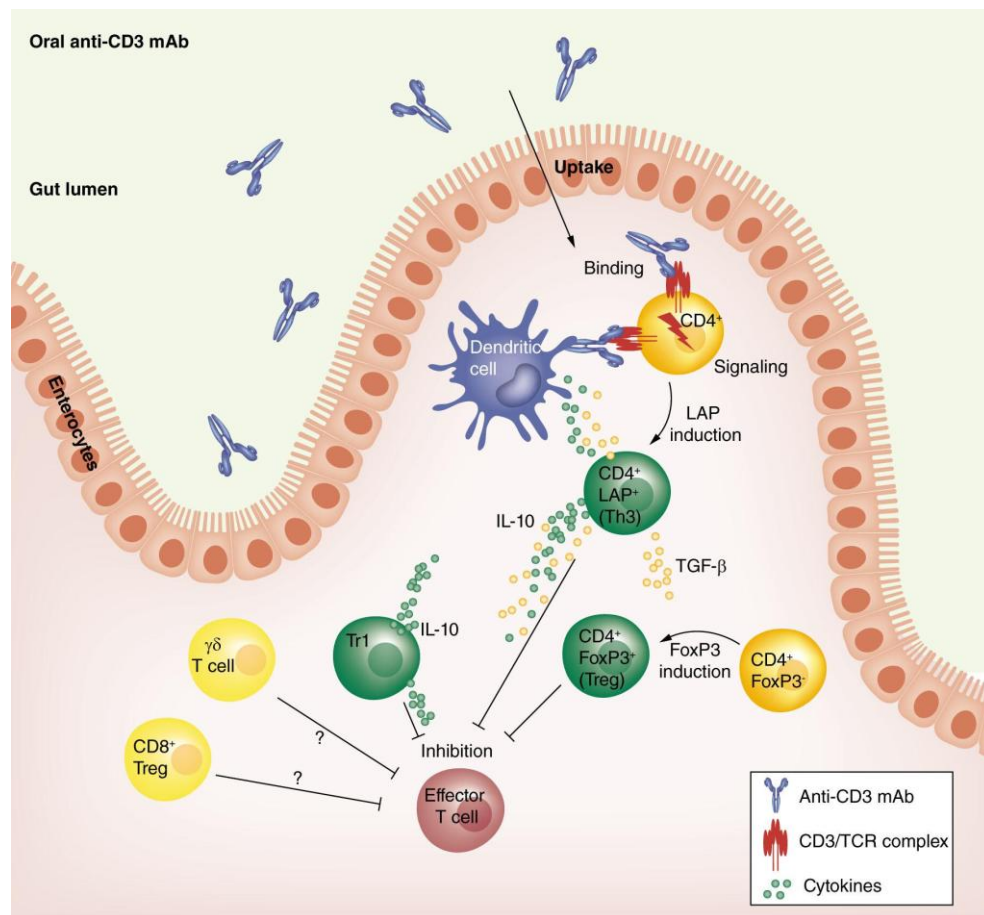


Figura 2. Representação do efeito anti-CD3 oral na indução de tolerância. A imagem ilustra o epitélio intestinal e o efeito do anti-CD3 nas células residentes da lâmina própria. Com a ligação ao complexo CD3/TCR, há estímulo para liberação de IL-10 e TGF- β por células LAP⁺, contribuindo para induzir um ambiente mais tolerogênico. Fonte: adaptado de Kuhn & Weiner (2016).

Em modelo animal de UC, a população de células Treg LAP⁺ demonstraram capacidade de suprimir a inflamação intestinal (Oida *et al.*, 2003). Também, foi observado menor resposta de células T efetoras na lâmina própria à ação das Tregs em pacientes com DII, sugerindo que a diminuição da sua atividade anti-inflamatória contribui para a patogênese da doença (Geremia *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a administração oral de anti-CD3 foi capaz de reduzir a inflamação típica em modelo animal de colite, modulando a ativação das células TCD4⁺ e promovendo a produção de IL-10 e TGF- β (Forster *et al.*, 2012). Em células intestinais isoladas de pacientes com DII, a incubação com anti-CD3 também mostrou capacidade de diminuir os níveis de citocinas inflamatórias e aumentar o nível de IL-10 (Vossenkämper *et al.*, 2014).

Dessa forma, o uso de anti-CD3 no contexto da UC, que envolve aumento da atividade e população de células inflamatórias de maneira desregulada, é uma linha interessante para maior investigação. Contudo, ainda existem poucos estudos detalhando e explorando o efeito terapêutico desse anticorpo entregue oralmente no contexto da Colite Ulcerativa, sendo necessário maior exploração do seu potencial.

3.2 O potencial terapêutico de probióticos

Devido à sua função central no desenvolvimento e na patogênese da Colite, a microbiota intestinal tem sido investigada como um alvo terapêutico (Lavelle & Sokol, 2020). Nesse contexto, e considerando a ausência de terapias curativas, o uso de microrganismos probióticos tem sido explorado como uma abordagem de menor custo e de fácil aplicação.

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization*) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), probióticos são organismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidade adequada (WHO, FAO, 2006). Atualmente, esse conceito tem sido reavaliado com o surgimento de estudos que indicam que os probióticos inativados ou não viáveis mantêm seus efeitos benéficos no hospedeiro (Zendeboodi *et al.*, 2020).

Dentre os benefícios atribuídos ao uso desses organismos, estão as capacidades de imunomodulação, de inibição de microrganismos patogênicos, de promoção do equilíbrio da microbiota intestinal e do fortalecimento da função de barreira intestinal (Suez *et al.*, 2019). A compreensão destes efeitos e de seus mecanismos moleculares subjacentes permite desenvolver abordagens inovadoras de regulação da imunidade da mucosa durante a infecção, autoimunidade e câncer (Ivanov & Honda, 2012).

A imunorregulação promovida por probióticos se dá pela interação com células epiteliais e imunes do hospedeiro, estimulando a secreção de IgA e liberação diferencial de citocinas (Mazziotta *et al.*, 2023). As citocinas, por sua vez, modulam a ativação de células do sistema imunológico, favorecendo diferentes perfis de resposta imunológica (Azad *et al.*, 2018).

Além disso, probióticos são capazes de aumentar a expressão e a secreção de mucina e de peptídeos antimicrobianos. Também preservam a estabilidade de junções epiteliais devido ao estímulo à expressão de genes relacionados a suas proteínas, como a Ocludina e a Zonula Occludens. Assim, fortalecem a integridade da barreira epitelial por diminuir a permeabilidade a patógenos e seus produtos (Ohland & Macnaughton, 2010).

Esses mecanismos podem ser explorados para promover um perfil imunológico anti-inflamatório. Dessa forma, busca-se reequilibrar a composição da microbiota, diminuindo comunidades e restabelecendo a integridade das barreiras intestinais para contribuir com o manejo de aspectos centrais no desenvolvimento da Colite Ulcerativa. Muitos microrganismos probióticos são estudados para este uso e demonstram resultados benéficos em relação ao controle dos sintomas e à manutenção da remissão da UC (Jadhav *et al.*, 2023).

A administração oral da bactéria probiótica *Akkermansia muciniphila* demonstrou capacidades de atenuar sintomas e nível da inflamação de tecidos do cólon em modelos experimentais de UC (Qu *et al.*, 2021). O mesmo foi observado para *Lactobacillus plantarum*, que também resultou em expressão diferencial de genes relacionados a barreira celular e vias inflamatórias (Wu *et al.*, 2022). Já *Zymomonas mobilis*, além de influenciar a expressão gênica, alterou a composição da microbiota intestinal de camundongos com colite induzida por DSS, aumentando a abundância de *A. muciniphila* e reduzindo a de *Escherichia coli*.

Também são exploradas outras estratégias, como a terapia simbiótica. Esta consiste em combinações de diferentes cepas de microrganismos com substratos pré-bióticos buscando efeito sinérgico para melhorar a saúde intestinal e a persistência no organismo (Roselli, 2020). Misturas, como das bactérias *Tetragenococcus halophilus* e *Eubacterium rectale*, e do probiótico *Lactobacillus casei* com o substrato de inulina enriquecida com oligofrutose, demonstraram redução da inflamação e do dano colônico em modelos animais (Ryu *et al.*, 2024; Ivanovska *et al.*, 2017).

Entretanto, é importante ressaltar que ainda não existem dados suficientes para concluir que o uso de microrganismos benéficos isoladamente seja uma abordagem terapêutica viável para controle da inflamação de UC. No entanto, seu uso como tratamento adjuvante potencializa a melhora no quadro inflamatório de pacientes com Colite (Bjarnason *et al.*, 2019), uma abordagem promissora ainda pouco estudada.

4. A levedura *Saccharomyces boulardii*

Em 1920, a levedura *Saccharomyces boulardii* foi isolada pela primeira vez na casca de lichia por Henri Boulard, após observar que pessoas que bebiam seu chá não desenvolveram cólera durante um surto na península da Indochina (Fu *et al.*, 2023; McFarland, 2010). Definida como probiótico, essa levedura possui status GRAS (do inglês, *Generally Accepted As Safe*) pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*). Seu uso é seguro e benéfico para o hospedeiro, sendo aplicada para o tratamento e a prevenção de distúrbios intestinais (Czerucka *et al.*, 2007), e utilizada em produtos comerciais com este fim, como Floratil® e Repoflor®.

A levedura possui atividade antibacteriana, favorecendo o combate a infecções por patógenos entéricos, como *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile*, *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Shigella*. Além disso, seu uso em transtornos no TGI como diarreia aguda infantil, diarreia associada ao uso de antibióticos e síndrome do intestino irritável demonstra melhora clínica (Ansari *et al.*, 2021), também observada em doenças inflamatórias intestinais, como a Doença de Crohn e a Colite Ulcerativa (Guslandi *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2011).

Observam-se benefícios complementares do uso da levedura em comparação a tratamentos convencionais isolados para UC. De 24 pacientes que receberam *S. boulardii* três vezes ao dia em conjunto com o tratamento de mesalazina, 17 mostraram melhora e remissão da doença (Guslandi *et al.*, 2003). Recentemente, o uso de *S. boulardii* se mostrou mais eficiente que a terapia combinada e monoterapia de mesalazina, atuando na inflamação da colite ulcerativa por meio da redução de fatores inflamatórios séricos, como TNF- α (Dong *et al.*, 2021).

Em modelo animal de Colite induzida, a *S. boulardii* demonstra capacidade de manter a integridade epitelial pela proteção de proteínas da barreira intestinal, e de reduzir a via de sinalização pró-inflamatória NF- κ B, bem como a ativar o mecanismo de defesa antioxidante

associado à via Nrf2 (Gao *et al.*, 2021). Além de possuir efeito protetor contra o dano tecidual, a levedura diminui a produção de citocinas inflamatórias, aumenta a diversidade bacteriana, melhorando a disbiose, e modifica a expressão de miRNAs associados à inflamação (Rodríguez-Nogales *et al.*, 2018).

Observa-se, portanto, capacidade imunomodulatória dessa levedura, pois auxilia na restauração da microbiota intestinal e no fortalecimento da barreira epitelial, além de estimular respostas anti-inflamatórias. Sendo assim, seu uso é uma abordagem promissora para o manejo de Colite, podendo ser aliada para potencializar abordagens já utilizadas.

Diversos mecanismos são propostos para explicar o efeito da *S. boulardii* no intestino. Uma possibilidade é a produção de bioativos por ela. Em destaque, metabólitos com propriedades antioxidantes, antibacterianas e anti-inflamatórias que são explorados pela indústria alimentícia e farmacêutica (Fu *et al.*, 2023). Além disso, este microrganismo libera poliaminas no ambiente intestinal e estimula a atividade enzimática relacionada à digestão de dissacarídeos pelas células epiteliais, promovendo o crescimento de vilosidades e o aumento da absorção de nutrientes neste tecido (Buts *et al.*, 1999).

Em contrapartida, a levedura pode produzir efeitos mesmo em forma inativada ou morta. Em modelos animais de colite induzida pelo composto Dextrana Sulfato de Sódio (DSS), a administração oral de *S. boulardii* em forma pós-biótica, congelada ou pulverizada, diminuiu a perda de peso, evitou lesões intestinais, manteve integridade epitelial e regulou a resposta imune, evitando progressão da inflamação (Xu *et al.*, 2023). O mesmo foi observado utilizando um modelo animal de obstrução intestinal (Generoso *et al.*, 2011). Dessa forma, é possível que componentes da sua estrutura celular ou moléculas resultantes da sua metabolização também exerçam efeitos benéficos ao hospedeiro.

Além disso, *S. boulardii* apresenta tolerância à alta temperatura e baixo pH (Li *et al.*, 2021), condições encontradas no TGI, o que a torna um potencial veículo de entrega de moléculas ao intestino sem apresentar riscos ao hospedeiro (Douradinha *et al.*, 2014). Também, em um ambiente intestinal inflamado, o aumento do recrutamento de células imunológicas e a ruptura da barreira epitelial podem intensificar o contato de probióticos com o sistema imune do hospedeiro (Hudson

et al., 2016). Esse cenário pode favorecer a ação de moléculas imunomodulatórias expressas por probióticos, potencializando seus efeitos terapêuticos.

A levedura é capaz de expressar altas quantidades de proteínas recombinantes continuamente no contexto *in vivo* (Hudson *et al.*, 2014; Durmusoglu *et al.*, 2021). Também, já foi utilizada para produção heteróloga de ácidos graxos de cadeia média, com efeitos antagônicos contra *Candida albicans*, e de peptídeo Leucocina C, inibidor de *Listeria monocytogenes* (Ling *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2021), aliando o efeito probiótico da levedura com a ação antipatogênica das moléculas apresentadas.

Apesar de apresentar potencial para entrega de biomoléculas de forma segura e benéfica ao hospedeiro, seu uso ainda é pouco explorado, principalmente no contexto de tratamentos de DII.

5. Resultados anteriores

A mucosa intestinal apresenta tecido linfoide associado (GALT) que tem importância central na manutenção da homeostase intestinal (Mörbe *et al.*, 2021). Além disso, ele está sempre em contato com a microbiota residente e essa interação tem efeitos no sistema imune local (Gomes *et al.*, 2018). Nas DII é tipicamente notado disbiose, em que a composição da microbiota é afetada e seus efeitos benéficos também (Manos, 2022). O uso de probióticos geneticamente modificados surge como uma alternativa terapêutica devido ao seu efeito duplo: agir na disbiose intestinal e entregar moléculas terapêuticas diretamente ao seu alvo, o intestino (Pesce *et al.*, 2023).

Este trabalho dá continuidade a estudos previamente realizados no Laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília e contribuir para o avanço do conhecimento sobre o uso de microrganismos probióticos produtores de anticorpos recombinantes. Esta associação foi inicialmente proposta pelo trabalho de Chiabai *et al.*, (2019), que utilizou *Lactococcus lactis* com a entrega de um fragmento scFv de anti-TNF α à mucosa intestinal em modelo animal de Colite. Foi observado que a administração da bactéria produtora de anticorpo reduziu marcadores morfológicos e moleculares de inflamação. Posteriormente, Almo (2024) explorou o efeito terapêutico da produção de fragmentos de anticorpos pela bactéria probiótica *Z. mobilis*, que reduziu a atividade da doença e parâmetros histopatológicos da inflamação.

Especificamente, esta pesquisa visa investigar o uso da levedura probiótica *Saccharomyces boulardii* como veículo de entrega de um fragmento scFv de anti-CD3. Esta levedura é segura, não tóxica ao organismo e comumente utilizada para tratamento de distúrbios intestinais. Também tem sua capacidade de expressão heteróloga demonstrada em estudos prévios (Hudson *et al.*, 2014), mas ainda pouco explorada em modelos terapêuticos.

O fragmento scFv é mais facilmente produzido pelos microrganismos devido ao seu tamanho menor, mantendo apenas a especificidade ao antígeno desejado. Devido à ausência da porção efetora, esse formato de anticorpo reduz os riscos de reconhecimento por células do hospedeiro e direcionamento de resposta imune indesejada.

A capacidade de produção de fragmentos de anticorpo por *S. boulardii* foi observada pela primeira vez por Azevêdo (2021) e caracterizada por Olinto (2024). Recentemente, esta levedura demonstrou alta capacidade de produção heteróloga de scFv de anti-TNF α e efeito anti-inflamatório demonstrou capacidade de aliviar a inflamação em modelo animal de UC (Han *et al.*, 2025). Estes estudos demonstram o potencial terapêutico dessa associação e evidenciam a necessidade de investigações adicionais para melhor compreensão e desenvolvimento deste tratamento.

Objetivo

Esta pesquisa busca avaliar a produção e expressão de fragmentos scFv de anti-CD3 pela levedura *Saccharomyces boulardii* e o seu efeito em modelos animais de Colite Ulcerativa a fim de explorar seu potencial como um vetor de produção heteróloga inovador para entrega de imunoterapias.

Nesse sentido, as atividades desta pesquisa objetivaram especificamente:

- Gerar linhagens de *S. boulardii* transformantes expressando o fragmento scFv de anti-CD3;
- Caracterizar e avaliar a capacidade de produção do anticorpo a partir do vetor de expressão pela levedura *S. boulardii*;
- Analisar o efeito da administração oral da levedura transformada em modelo animal de colite.

Métodos

1. Linhagens e condições de cultivo

1.1 *Escherichia coli*

Para a expansão clonal dos plasmídeos, foi realizada a transformação de bactérias *Escherichia coli* da linhagem XL1-Blue. As bactérias foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB, composição: peptona de caseína 1%, extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 1%, ajustado para pH 7,0) e em *shaker* com agitação de 250 rpm, a 37°C, por 16 horas.

Para crescimento em meio sólido, foi utilizado meio LB (1,5% ágar) mantido em estufa a 37°C. Após a transformação, as bactérias foram cultivadas em meio suplementado com 150µg/mL do antibiótico Ampicilina, que foi utilizado como marca seletiva de transformantes.

1.2 *Saccharomyces boulardii*

A levedura *Saccharomyces boulardii* 17 liofilizada foi isolada de comprimidos de REPOFLOR® (Lote: L2X7916) por plaqueamento em meio YPD ágar (peptona de caseína 2%, extrato de levedura 1%, peptona de caseína 2%, e glicose 2%, ágar 1,5%), mantido a 30 °C por 48 horas. Para cultivo em meio líquido, foi utilizado meio YPD em *shaker* em agitação de 200 rpm, a 30°C. Esta condição é referida como “Ideal” ao longo deste trabalho.

Previamente, foi observado que a expressão do promotor SED pode ser aumentada em condições estressantes (Shimoi *et al.*, 1998; Inokuma *et al.*, 2014). Assim, além do cultivo “Ideal”, foi testado o efeito do cultivo a 37°C, em meio YPD adicionado de 0,5 M de cloreto de sódio (NaCl) e 20% de etanol no crescimento celular e na produção do fragmento do anticorpo. Esta condição é referida como “Stress”.

2. Plasmídeos

Este trabalho parte de projetos anteriores do Laboratório de Imunologia Molecular da UnB. Então, foram construídos dois novos vetores para melhorar a exposição do fragmento scFv na

parede celular derivados do plasmídeo utilizado por Azevêdo (2021) (Figura 3), com alterações no cassete de expressão.

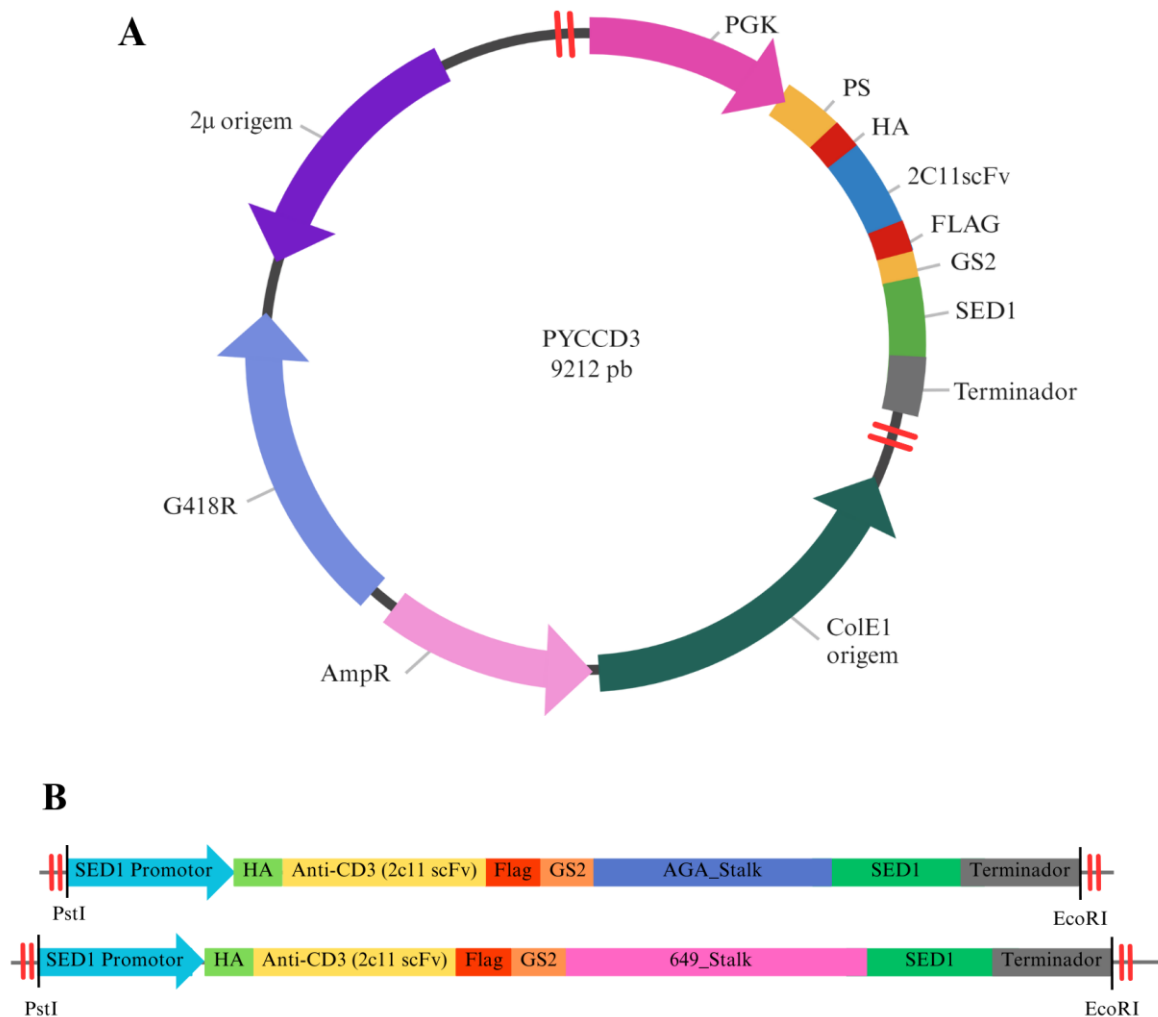


Figura 3. Esquema de vetores e cassetes de expressão. (A) Vetor PYCCD3 usado por Azevêdo (2021) contendo o cassete de expressão, entre barras vermelhas, com o promotor Fosfogliceraldeído Quinase (PGK), gene de resistência a Geneticina (G418R) e origem de replicação 2μ. (B) Novos cassetes de expressão. Contém o promotor Sed, sequências HA e FLAG para imunodeteção da proteína, linker GS2 e terminador de transcrição. Os plasmídeos se diferenciam pelos extensores, 649_Stalk e AGA_Stalk.

Assim como o plasmídeo construído por Azevêdo (2021) (Figura 3A), os utilizados neste trabalho contém sequências dedicadas para expansão clonal em bactérias e para expressão por leveduras. Assim, possuem a origem de replicação ColE1 e gene de resistência a ampicilina para seleção de bactérias transformantes, AmpR. Para leveduras, possui a origem de replicação 2μ,

natural de *S. cerevisiae* e com replicação independente (Futcher, 1988) e o gene de resistência ao antibiótico Geneticina, G418R, utilizado como marca seletiva.

Os novos vetores possuem o promotor de SED1, sequência utilizada no trabalho de Inokuma *et al.*, (2014) e que se mostrou eficiente na expressão e apresentação de proteínas em *Saccharomyces cerevisiae* (Yang *et al.*, 2019). Ainda, os extensores AGA_Stalk e 649_Stalk (Figura 3B) foram adicionados para melhorar a projeção do anticorpo para além da parede celular. A sequência do extensor 649_Stalk advém do trabalho de McMahon *et al.* (2018) e a do AGA_Stalk foi desenvolvida em nosso laboratório com base na proteína Aga1 de parede celular de leveduras.

A sequência codificadora do fragmento scFv advém do anti-CD3 de camundongo (clone 145-2C11), do estudo de Leo *et al.*, (1987). O cassete inclui as sequências HA e FLAG para marcação e detecção específicas.

Para análise de perfil de restrição, os plasmídeos continham sítios para as endonucleases PstI e EcoRI localizados nas extremidades do cassete de expressão. O tamanho dos plasmídeos é de 9422 pares de base (pb) para AGA_Stalk e 10433 pb para 649_Stalk.

Além disso, a sequência de aminoácidos resultante das leituras dos genes dos extensores e carboxi terminal foram analisadas pela ferramenta AIUPred (Erdős & Dosztányi, 2024) para predição de estruturas desorganizadas dos extensores.

3. Produção de linhagens transformantes

3.1 Transformação de *Escherichia coli* por choque térmico

Colônias isoladas de *E. coli* XL1-Blue foram utilizadas para realizar pré-inóculo de 5 mL, mantidos a 250 rpm, 37°C por 16 horas. Foi utilizado 500 µL do pré-inóculo para inocular em 50 mL de LB em frasco Erlenmeyer, mantido sob as mesmas condições, até que a densidade ótica (OD₆₀₀) atingisse o intervalo de 0,1-0,3. A seguir, a fração celular foi coletada e lavada com Cloreto de Cálcio (CaCl₂) 100 mM por centrifugação a 3000 g, por 15 minutos a 4°C. Após a incubação, as células foram centrifugadas, ressuspensas e mantidas por 1 hora e 30 minutos em 10 mL de CaCl₂, tornando-as competentes.

Para a transformação, as bactérias competentes foram incubadas com 200 ng de DNA plasmidial por 30 minutos e, depois, levadas ao banho-maria a 42°C por 3 minutos. Em seguida, as células foram mantidas em meio LB a 37°C por 1 hora e, posteriormente, plaqueadas em meio sólido suplementado com 150 µg/mL de ampicilina para a seleção de transformantes.

3.2 Transformação de *Saccharomyces boulardii* por eletroporação

Diferentes protocolos para a transformação de leveduras descritos na literatura foram testados, mas não demonstraram eficiência. Portanto, neste trabalho foi elaborado um novo protocolo para eletroporação adaptando as metodologias de Hudson (2016) e de Suga & Hatakeyama (2003), descrito a seguir.

Colônias isoladas crescidas em YPD sólido foram cultivadas em 5 mL de YPD por 24 horas. Após esse período, 1 mL do pré-inóculo foi inoculado em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de YPD e mantidos a 30°C e 200 rpm até atingir OD₆₀₀ de 1,6. Ao atingir, a fração celular foi separada por centrifugação lavada com água destilada estéril e ressuspensa em alíquotas com 1 mL de Sorbitol 1M e CaCl 0,1 M para congelamento a -80°C.

Para a eletroporação, as alíquotas foram descongeladas à temperatura ambiente, lavadas água destilada estéril e duas vezes com Sorbitol 1M. Em seguida, a fração celular foi ressuspensa para um volume final de 400 µl em Sorbitol e incubadas com 20 µg de DNA plasmidial e com 10 µg de DNA carreador de espermatozoário de Arenque por 5 minutos em gelo. Este sistema foi colocado em cubetas de eletroporação de 0,2 cm (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) geladas e submetidas ao pulso de 2,5 kV, capacitância 25 µF e resistência de 200 Ω no aparelho GenePulser Xcell (BioRad, Hercules, CA, EUA).

As células eletroporadas foram imediatamente recuperadas com 1 mL de sorbitol e mantidas a 30°C por 2 horas. Em seguida, 1 mL de YPD foi adicionado e as células permaneceram nas mesmas condições por mais 1 hora. Por fim, a fração celular foi coletada por centrifugação, ressuspensa em 200 µl de YPD e plaqueada em meio sólido suplementado com 400 µg/mL de Geneticina (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) com auxílio de pérolas de vidro estéreis.

Após 48 horas de crescimento em meio sólido, colônias transformantes foram coletadas e cultivadas em 5 mL de meio YPD com 200 µg/mL de Geneticina por 24 horas. A partir desse cultivo, foram sintetizadas alíquotas com 25% de Glicerol para congelamento a -80°C.

A partir dessa metodologia foram produzidas as linhagens com o plasmídeo contendo o extensor 649_Stalk (linhagem denominada 649) e com o extensor AGA_Stalk (linhagem denominada AGA) utilizadas neste trabalho.

4. Confirmação da transformação

4.1 Digestão enzimática

A fração celular da cultura de 5 mL em LB suplementado com 150 µg/mL de Ampicilina de bactérias transformantes foi separada e utilizada para extração plasmidial com o Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante.

A digestão enzimática foi realizada com os plasmídeos isolados a partir da extração, utilizando as enzimas EcoRI e PstI (Promega, Madison, WI, EUA) que realizavam corte em um único sítio. As reações continham 1 µg de DNA plasmidial, as endonucleases e o Buffer H (Promega, Madison, WI, EUA) nas concentrações recomendadas pelo fabricante. A incubação foi realizada a 37°C por 3 horas e o resultado analisado por eletroforese em gel de agarose.

4.2 PCR de colônia

Colônias das linhagens transformantes cultivadas em meio sólido seletivo foram coletadas e ressuspensas em 20 µl de água ultrapura livre de DNase. Em seguida, a suspensão foi fervida por 20 minutos.

A reação foi realizada utilizando LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Basel, Suíça), que contém a enzima Taq DNA Polymerase e os componentes necessários para sua atividade. Também, inclui 2 µl da solução da colônia fervida e iniciadores específicos para as sequências 2C11, Aga_Stalk e 649_Stalk, especificados na Tabela 1, na concentração final de 1 uM.

A levedura selvagem foi utilizada como controle negativo e o plasmídeo previamente extraído como controle positivo na reação. Além disso, foram feitas reações controle individuais de cada iniciador.

As reações foram submetidas ao seguinte programa no termociclador: 95°C por 5 minutos para a incubação inicial, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento a 60°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose para análise.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para reação de PCR de colônia.

Alvo	Sequência	Temperatura de anelamento	Tamanho do Amplicon
AGA_Stalk	R: GTGTGGGCAGTAGGAGCAAT	57.5°C	406 pb
2C11	F: GGTGGTGGTGGTTCTGACAT		
649_Stalk	R: ATGGGGAAGACGATGAACTGG	57.0°C	403 pb

4.3 Eletroforese em gel de agarose

O gel foi confeccionado utilizando 1,2% de agarose diluído em tampão TAE (tris base 40 mM, ácido acético Glacial 20 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0) com adição de brometo de etídio (0,5 µg/mL). As amostras foram adicionadas de tampão para concentração 1 x (Azul de bromofenol 0,041%, Sacarose 6,67%). O gel foi submerso em tampão TAE e submetido a corrente de 30 a 70 Volts. O marcador 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos separados.

5. Caracterização das linhagens transformantes

5.1 Curva de crescimento

Após 24 horas de crescimento em 5 mL de YPD, seletivo para cultivo de transformantes, as leveduras foram utilizadas para preparar inóculos de 100 mL em Erlenmeyer de capacidade de 1 L. Os inóculos foram mantidos a 30°C e a rotação de 200 rpm. A OD₆₀₀ foi monitorada a cada 4 horas até a confirmação da fase estacionária.

5.2 Imunodeteção por Dot-Blot

Amostras da fração celular foram separadas por centrifugação e 3 µL pipetados em membrana de nitrocelulose com poros de 0,45 µm (Cytiva, Amersham, Reino Unido). Após absorção total das amostras, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (PBS (NaCl 150mM, NaHPO₄ 10 mM pH 7,4) adicionado 5% de leite em pó Molico) por uma hora. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes com PBST (PBS adicionado de 0,1% de Tween 20) e incubada por uma hora com anti-HA murino (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) diluído para 1:1000 em PBS.

Posteriormente, a membrana foi lavada novamente e incubada com Anti-mouse IgG conjugado a Fosfatase Alcalina (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) diluído para 1:2000 por uma hora. Por fim, foi feita a revelação a partir da incubação com NBT/BCIP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído em APB (NaCl 100 mM; Tris-HCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM).

5.3 Citometria de fluxo

Os ensaios de citometria foram realizados utilizando o equipamento Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) e os dados resultantes analisados no software FlowJo™ V10.10 (FlowJo, LLC), também utilizado para a preparação de imagens.

Para análise da produção de proteína, inóculos de cada linhagem tiveram 1 mL do seu volume centrifugado e lavado três vezes com PBS. A partir desse volume, 10 µL da cultura foram utilizados para marcação com 3 µL de Anti-Flag produzido em coelho (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em 30 µL de PBS, mantido por 1 hora em gelo. Em seguida, as amostras foram lavadas

com PBS e ressuspendidas novamente em 30 μ L para marcação com 3 μ L do anticorpo secundário Anti Rabbit IgG – FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), mantidas em gelo por 30 minutos. Então, as células foram lavadas três vezes com 1 mL de PBS e ressuspendidas para volume final de 100 μ L.

Para análise da viabilidade celular, foi utilizado 10 μ L de Iodeto de Propídeo (PI) (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e incubado em gelo por 10 minutos. Em ensaios que utilizaram mais de um fluoróforo, a compensação foi realizada no FlowJo™ utilizando amostras com marcação única, dupla e não marcadas como referências.

5.4 Efeito do tempo de Cultivo sob detecção do anticorpo

Foram utilizados diferentes períodos de cultivo das linhagens para analisar se a deposição de parede celular exerceria efeito sob a detecção do anticorpo. Inóculos em meio YPD foram cultivados por 16, 24, 40 e 48 horas, e o volume correspondente a 100 mil células foi utilizado na marcação para os testes de citometria de fluxo. O restante da cultura foi processado para imunodetecção por Dot-Blot.

6. Modelo de colite

6.1 Cronograma experimental

O experimento foi conduzido por 11 dias seguindo o esquema ilustrado na Figura 4. Para indução da Colite, foi administrado sal de sódio de sulfato de dextrana (DSS) 3% (p/v) (MPBiomedicals, CA, EUA) diluído em água filtrada *ad libitum* a partir do 3º dia de experimento. O volume de água consumido foi monitorado diariamente. A eutanásia foi realizada no 11º dia. Além disso, os animais recebiam diariamente ou a dose do tratamento ou a salina por gavagem oral.

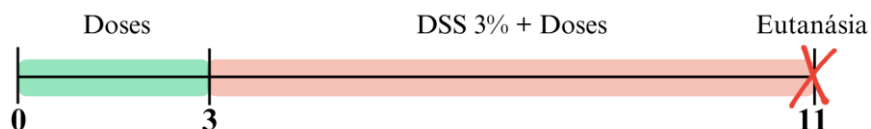


Figura 4. Cronograma experimental dos testes *in vivo*. O experimento ocorreu por 11 dias. Nos três primeiros dias, foram administradas as doses aos camundongos contendo ou salina 0,9% ou leveduras. A partir do dia 3, foi iniciado a indução da Colite Ulcerativa a partir da adição de 3% de DSS na água filtrada, *ad libitum*, que ocorreu até o último dia. A eutanásia foi realizada no 11º dia, indicado pelo “X” em vermelho.

6.2 Animais e grupos

Camundongos C57BL/6 fêmeas com 9 semanas de vida foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, sob o protocolo 78/2018.

Os animais foram mantidos em ambiente controlado no biotério em ciclo claro escuro de 12 horas, temperatura ambiente e alimentados com ração para roedores e água filtrada. Três semanas anteriores ao início do experimento, os camundongos passaram por *cohousing*, que consistia na aleatorização semanal em gaiolas com 4 animais, a fim de homogeneizar a microbiota intestinal dos grupos.

Durante o experimento, cada grupo continha 8 animais, separados em duas gaiolas, sendo aleatorizados diariamente. Os grupos experimentais e os tratamentos correspondentes são listados na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos grupos experimentais utilizados para os testes *in vivo*.

Grupo	Tratamento
NT	Salina 0,9%
DSS	DSS 3% + Salina 0,9%
WT	DSS 3% + levedura selvagem
AGA	DSS 3% + transformantes AGA_Stalk
649	DSS 3% + transformantes 649_Stalk

6.3 Preparo de doses

Colônias isoladas de cada linhagem foram selecionadas após 48 horas de crescimento a 30°C em YPD Ágar para inóculo em 5 mL de YPD mantido em shaker a 30°C e agitação de 200 rpm. Após 24 horas, foi utilizado para inocular 100 mL de YPD para OD600 inicial de 0,2. O meio utilizado para o cultivo de transformantes foi suplementado com Geneticina a 400 µg/mL. O inóculo foi separado em Eppendorfs contendo 1 mL de cultura com glicerol a 25% para congelamento a -80°C. As culturas também foram diluídas para 10^6 a 10^8 e plaqueadas utilizando pérolas de vidro estéreis em meio YPD Ágar com 200 µg/mL de Geneticina. Após 48 horas de crescimento a 30°C, as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram contatadas para calcular o número de células viáveis. Dessa forma, cada dose foi preparada a partir do cultivo das linhagens para conter de 9×10^8 a $1,80 \times 10^9$ UFCs.

No dia do experimento, as alíquotas foram descongeladas, centrifugadas a 3000 g, por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. A fração celular foi ressuspensa em 100 µL de solução salina 0,9% estéril e administrada por gavagem oral para cada camundongo.

6.4 Análise de parâmetros macroscópicos

Ao longo do experimento, os animais eram pesados e suas fezes coletadas diariamente. A perda de peso, sangramento retal e consistência de fezes dos camundongos foram monitorados e pontuados de acordo com a Tabela 3 para cálculo do índice de atividade da doença (DAI, do inglês Disease Activity Index) (Cooper *et al.*, 1993). A perda de peso foi definida como a diferença entre o peso inicial e final de cada animal em porcentagem. O cálculo do índice consistia na média das pontuações de cada parâmetro de forma que, quanto maior o valor, mais ativa se apresentava a doença.

Tabela 3. Pontuação do Índice de Atividade da Doença (DAI) de acordo com Cooper *et al.*, (1993).

Pontuação	Perda de peso (%)	Consistência das fezes	Sangramento Retal
0	Nenhuma	Normal 0	Ausente 0
1	1 – 5	Pastosa 1	Moderado 1
2	6 – 10	Pastosa 2	Moderado 2
3	11 – 20	Diarreica 3	Avançado 3
4	>20	Diarreica 4	Avançado 4

A eutanásia foi conduzida pela administração de superdosagem de indutor anestésico Tiopental em concentração de 200 mg/kg por injeção intraperitoneal. Após isso, foram coletados os linfonodos e o cólon de cada animal para extração de RNA (tópico 6.6). Além disso, os cólons foram pesados, medidos e separados também para análise histológica, detalhadas no tópico a seguir.

6.5 Análises histológicas

Amostras do cólon foram colocadas em cassetes histológicos e fixadas em paraformaldeído 4%. Posteriormente, foram mergulhadas em parafina, seccionadas e coradas com hematoxilina e

eosina. As lâminas foram escaneadas com o equipamento ScanScope ® CS System captura de imagens.

Foi realizada uma análise cega dos parâmetros histológicos - infiltrado de células inflamatórias, alterações epiteliais, arquitetura da mucosa - pontuados de acordo com Erben (2014) segundo os critérios a seguir (Tabela 4).

Tabela 4. Pontuação das análises histológicas.

Característica	Parâmetro	Pontuação
Infiltrado de células inflamatórias	Mínimo <10%	1
	Médio 10-25%	2
	Severidade Moderado 26-50%	3
	Intenso >51%	4
	Mucosa	1
	Extensão Mucosa e submucosa	2
	Mucosa, submucosa e transmural	3
	Mínimo	1
	Médio	2 ou 3
	Hiperplasia Moderado	3 ou 4
Alterações epiteliais	Intenso	4 ou 5
	Mínimo	1 ou 2
	Médio	2 ou 3
	Perda de células caliciformes Moderado	3 ou 4
	Intenso	4
	Criptite	2 ou 3

	Erosão	1 ou 4
	Ulceração	3 a 5
Arquitetura da mucosa	Criptas irregulares	4 ou 5
	Perda de criptas	4 ou 5

6.6 Extração de RNA e qPCR

Após eutanásia dos camundongos, os tecidos do cólon e linfonodos foram submergidos em Qiazol (Qiagen, Valencia, CA, EUA) e congelados a -80°C. Posteriormente, os tecidos foram homogeneizados e macerados com beads de Carboneto de Tungstênio de 5 mm agitadas no equipamento TissueLyser LT (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Após, a extração do RNA total das amostras foi realizada com RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

Para a PCR quantitativa (qPCR), foram utilizados iniciadores específicos de marcadores imunes, de ativação celular e de integridade da barreira epitelial, especificados na Tabela 5. A expressão foi normalizada para a expressão do gene endógeno, Beta-actina (*Actb*) para linfonodos e Beta-2-microglobulina (*B2m*) para o cólon, de cada indivíduo.

Tabela 5. Iniciadores utilizados para testes de qPCR.

Gene	Sequência	Gene	Sequência
<i>B2m</i>	F: TGCTATCCAGAAAACCCCTCA R: TTTCAATGTGAGGCGGGTGG	<i>ActB</i>	F: GCAGATGTGGATCAGCAAGC R: CAAAGCCATGCCAATGTTGT
<i>Tbx21</i>	F: TCAGGACTAGGCGAAGA R: GCCTTCGGTTTCCTTATC	<i>Muc3</i>	F: CGTGGTCAACTGCGAGAATGG R: CGGCTCTATCTCTACGCTCTC
<i>Ifng</i>	F: AAGTTTGAGGTCAACAACCCAC R: AATCTCTTCCCCACCCCGAA	<i>Tjp1</i>	F: GAGCGGGCTACCTTACTGAAC R: GTCATCTCTTTCCGAGGCATTAG
<i>Il6</i>	F: GCCTTCTTGGGACTGATGCT R: TGCCATTGCACAACCTCTTTTCT	<i>Il5</i>	F: CTCTGTTGACAAGCAATGAGACG R: TCTTCAGTATGTCTAGCCCCTG
<i>Stat5</i>	F: CACTCCTGTACTTGGTTCGTCA R: CCAGGTCAAACCTCGCCATCT	<i>Stat6</i>	F: GGATTCAGATTTGGAAGCGGC R: AATTTCCACCAGGCTTTACAC
<i>Il23</i>	F: CAGCTCTCTCGGAATCTCTGC R: GATCCTTTGCAAGCAGAACTGG	<i>Il17</i>	F: TTAACTCCCTTGCGCAAAA R: CTTTCCCTCCGCATTGACAC
<i>Il22</i>	F: GCTCAGCTCCTGTCACATCA R: CAGTTCCCAATCGCCTTGA	<i>Tgfb</i>	F: CTGACGTCACTGGAGTTGTACGG R: GGTTCATGTCATGGATGGTGC
<i>Ifng</i>	F: AAGTTTGAGGTCAACAACCCAC R: AATCTCTTCCCCACCCCGAA	<i>Foxp3</i>	F: ACTCGCATGTTGCGCTACTT R: AGGGATTGGAGCACTTGTTG
<i>Gata3</i>	F: TTTACCCTCCGGCTTCATCCTCCT R: GCACCTGATACTTGAGGCACTCT	<i>Il10</i>	F: GGTTGCCAAGCCTTATCGGA R: GAGAAATCGATGACAGCGCC

6.7 Análises estatísticas

Os dados foram analisados estatisticamente pelo programa GraphPad Prism versão 5.0 (La Jolla, CA, EUA). O programa também foi utilizado para síntese dos gráficos deste trabalho, nos quais os dados são representados em média $\pm$ erro padrão (SEM).

Para os dados de qPCR, os outliers foram identificados e removidos com base no cálculo do intervalo interquartil (IQR). Para a razão peso/comprimento do cólon, pontuações histológicas e análises da expressão gênica, foi realizado o teste estatístico Mann-Whitney. Para o DAI e para a análise de perda de peso ao longo do tempo, foi realizado o teste Two-Way Anova. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

Resultados e discussão

1. Expansão Clonal em *E. coli*

As amostras extraídas de bactérias transformadas com plasmídeos AGA_Stalk e 649_Stalk foram digeridas com endonucleases de clivagem em sítio único, EcoRI e PstI. Em seguida, as amostras foram analisadas em gel de agarose. A reação de digestão enzimática (Figura 5) apresentou duas bandas de tamanhos esperados. Nos poços 1 e 2, foram utilizados os plasmídeos intactos e, em 3 e 4, os plasmídeos digeridos extraídos dos dois clones.

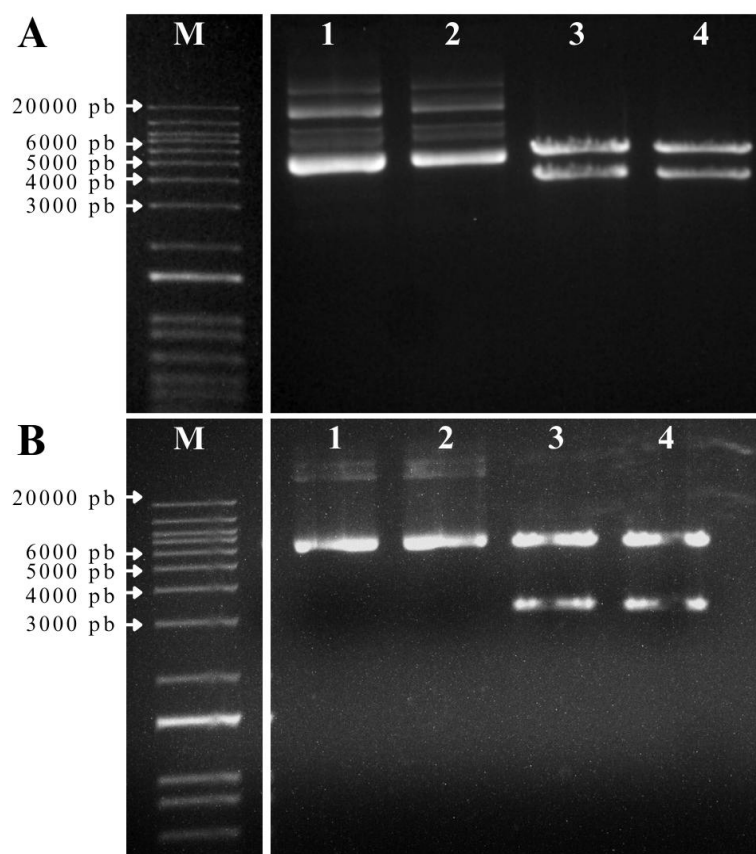


Figura 5. Análise da digestão enzimática em gel de agarose. Contém amostras intactas (1 e 2) e digeridas duplamente com EcoRI e PstI (3 e 4) dos plasmídeos 649_Stalk (A) e AGA_Stalk (B). Os tamanhos das bandas resultantes foram comparados com o marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (M).

As amostras digeridas do plasmídeo 649_Stalk resultaram em bandas de tamanho aproximado de 6 kb e 4 kb e, para o plasmídeo AGA_Stalk, bandas de 6 kb e 3 kb, o que

correspondia aos tamanhos esperados. Com a confirmação da extração dos vetores desejados pela análise do perfil de restrição, os plasmídeos foram utilizados para a transformação da levedura *S. boulardii*.

2. Produção heteróloga por *S. boulardii*

2.1 Transformação e confirmação por PCR de colônia

A transformação de leveduras seguiu o protocolo de eletroporação adaptado (tópico 3.2 da seção de Métodos). Após a transformação, as leveduras foram cultivadas em meio YPD seletivo. Colônias isoladas foram ressuspensas em 20 µl de água e utilizadas na reação de PCR.

Iniciadores para as moléculas extensoras, 649_Stalk e AGA_Stalk, e para a sequência do anticorpo anti-CD3 (2C11), listadas na tabela 1, foram utilizados para amplificação específica de colônias transformantes. Os amplicons resultantes foram analisados em um gel de agarose a 0,8% com adição de Brometo de Etídio (Figura 6).

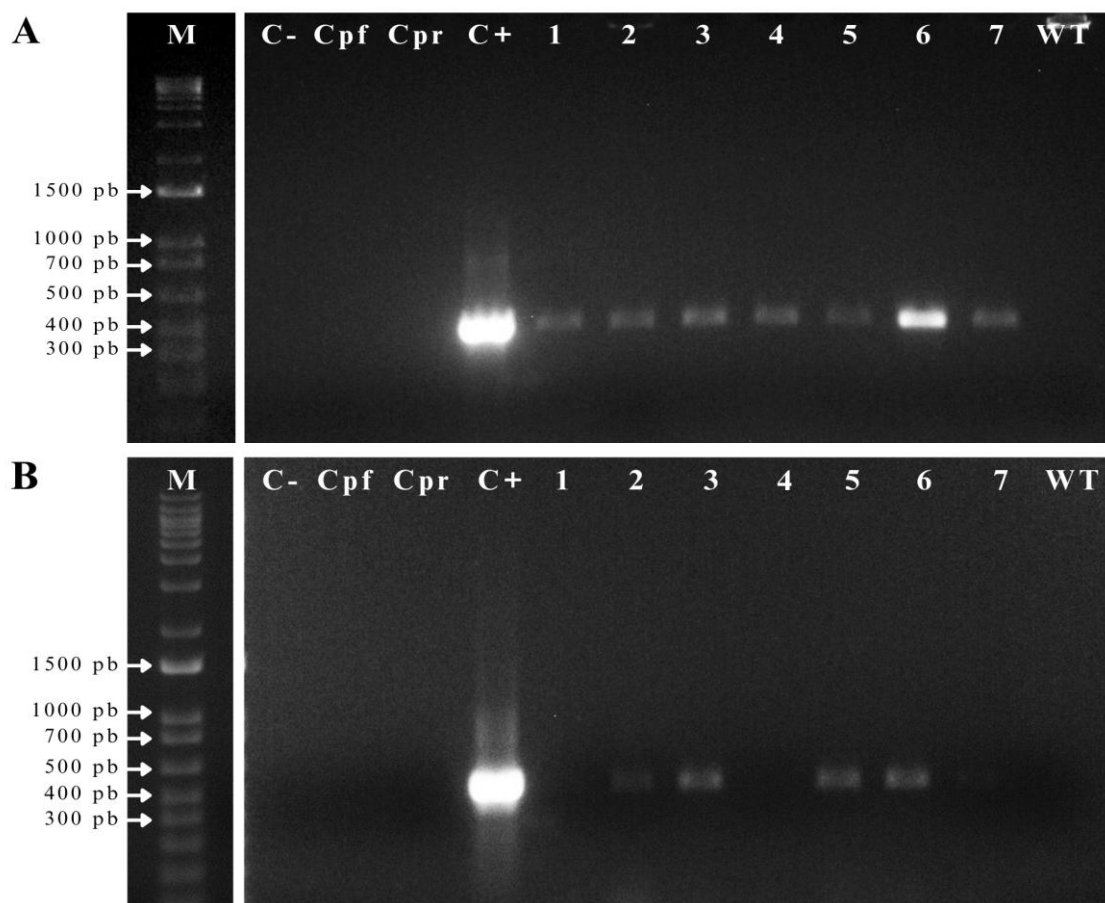


Figura 6. Análise de reação de PCR de colônia em gel de agarose. Colônias de leveduras transformantes (1 a 7) de AGA **(A)** e de 649 **(B)** e de levedura selvagem (WT), controle negativo da reação (C-), controles dos primers (forward - Cpf e reverso - Cpr), controle positivo com DNA plasmidial isolado (C+).

Assim, foi confirmada a transformação das leveduras com os plasmídeos, observando os amplicons nos tamanhos esperados: 406 pb para o plasmídeo AGA_Stalk e 403 pb para o plasmídeo 649_Stalk. As leveduras transformadas foram cultivadas para caracterização do crescimento e comparação com a linhagem selvagem.

2.2 Caracterização Comparativa do Crescimento

As condições ideais para o crescimento da levedura *Saccharomyces boulardii* são variáveis na literatura. Nesse contexto, Azevêdo (2021) investigou diferentes cultivos para otimizar o crescimento de *S. boulardii*. Os resultados indicaram que o cultivo a 30 °C, em proporção de 1:10 entre o volume do meio e a capacidade do recipiente, foi o mais favorável, alinhando-se com a temperatura ideal descrita por Altmann (2017).

Assim, para avaliar o impacto da transformação e da produção heteróloga no padrão de crescimento, as linhagens AGA, 649 e WT foram cultivadas sob as condições ótimas previamente estabelecidas: meio YPD, a 200 rpm e 30 °C. A densidade óptica foi analisada a cada quatro horas.

Como resultado, todas as linhagens alcançaram a fase estacionária após 28 horas, indicando que a transformação e a produção da proteína não interferiram na capacidade de crescimento das células e em seu metabolismo quando comparado com as leveduras selvagens.

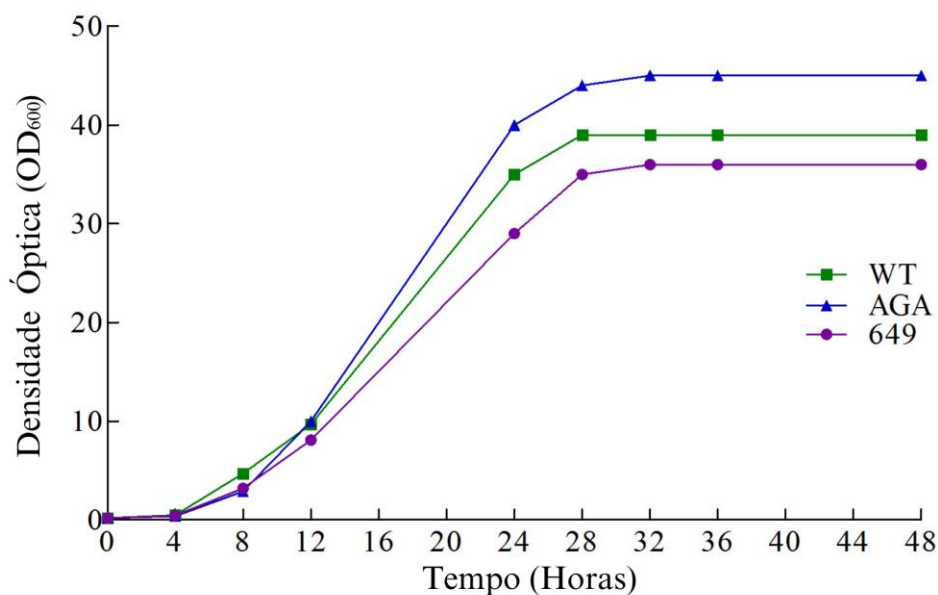


Figura 7. Curva de crescimento comparativa. Densidade Óptica (OD₆₀₀) das culturas das linhagens 649 (roxo), AGA (azul) e WT (verde) por tempo. O crescimento foi monitorado por 48 horas.

2.3 Produção heteróloga do fragmento scFv de anti-CD3

2.3.1 Imunodeteção por Dot-Blot

Após a transformação e sua confirmação por PCR de colônia, 6 colônias isoladas de cada linhagem foram cultivadas em meio seletivo e preparadas de acordo com o item 5.2 da seção de Métodos para avaliar a produção da proteína de interesse pelo ensaio Dot-Blot.

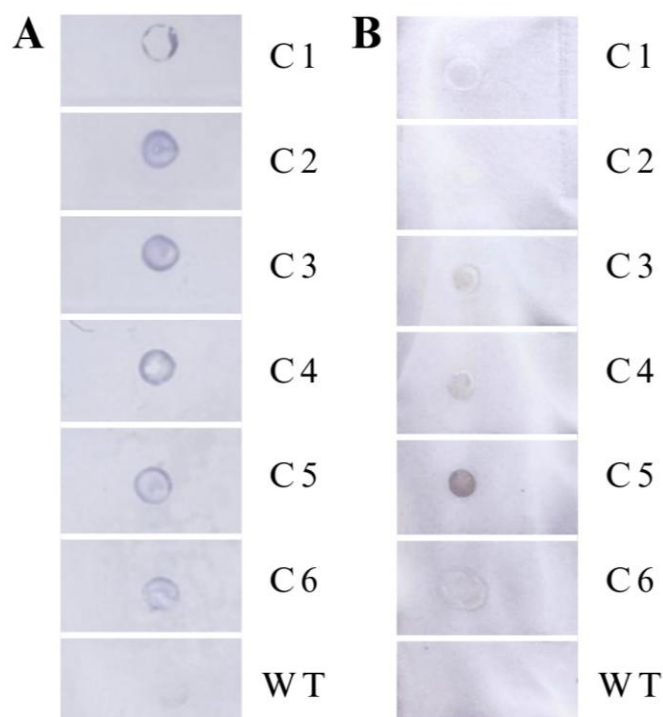


Figura 8. Imunodeteção por Dot-Blot. Avaliação de seis colônias das leveduras transformantes (C1 a C6) e da levedura selvagem (WT) para produção de anti-CD3 das linhagens AGA (A) e 649 (B).

Aliado aos resultados da PCR de colônia, os resultados do Dot-Blot demonstram que houve sucesso na internalização do plasmídeo e confirmam a capacidade das leveduras transformadas em expressar o anticorpo. Dessa forma, os plasmídeos construídos foram eficazes na geração das linhagens.

No entanto, foi observada baixa estabilidade dos transformantes, principalmente da linhagem 649, que apresentou maior variação na detecção da proteína entres as amostras de cada colônia. Portanto, para preservá-las, as colônias que resultaram melhor detecção foram cultivadas e armazenadas a -80°C em alíquotas com glicerol 25% e utilizadas nos testes seguintes.

2.3.2 Estabilidade e crescimento das linhagens

Os plasmídeos construídos neste trabalho contêm a origem de replicação 2μ . Estes são naturalmente encontrados em leveduras *S. cerevisiae*, em média de 40 a 60 cópias, com tamanho de 6300 pares de bases e apresentam grande estabilidade populacional com baixa taxa de perda entre divisões celulares (Chan *et al.*, 2017). Uma das hipóteses para a persistência populacional é

que, além de realizar segregação independente, os plasmídeos podem seguir o modelo de "hitchhiking", em que grupos de plasmídeos se associam aos cromossomos, permitindo que sejam segregados simultaneamente durante a divisão celular (Rizvi *et al.*, 2017).

No entanto, a linhagem 649 apresentou baixa estabilidade, evidenciada pela redução na detecção do anticorpo e pelo menor crescimento em meio seletivo ao longo do tempo. Foi necessário realizar múltiplas transformações para manter a linhagem ativa até o final do estudo. Leveduras dessa linhagem também apresentavam tamanho menor quando comparadas à linhagem AGA e WT, como pode ser observado na Figura 9.

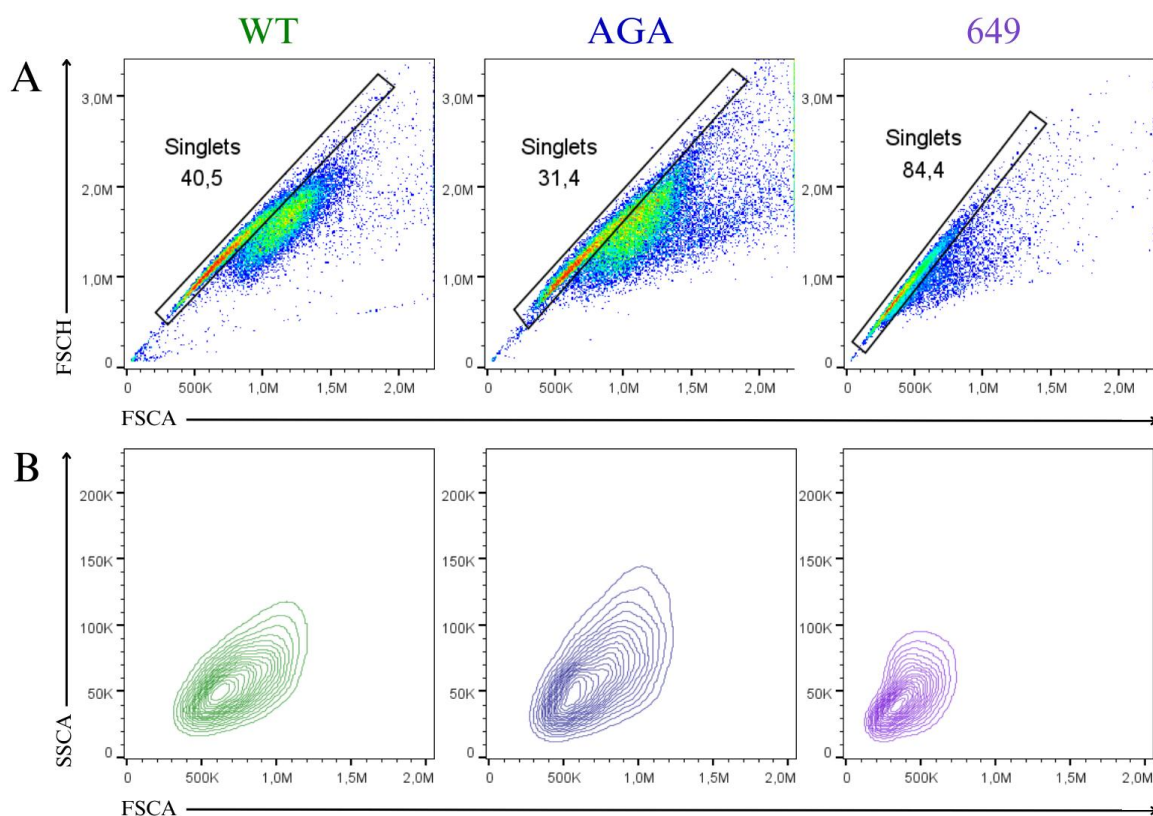


Figura 9. Análise da arquitetura celular das linhagens de leveduras. As células foram analisadas por citometria de fluxo, com seleção das células únicas (A) e análise de tamanho e granulosidade (B).

Apesar de também conter o plasmídeo, a linhagem AGA não apresentou esse comportamento. Assim, é possível que a baixa estabilidade e menor crescimento da linhagem 649 não seja resultado da construção plasmidial, e sim do tamanho da molécula de extensor e do impacto da sua produção.

Diante disso, com o intuito de analisar a organização das proteínas de fusão produzidas de forma heteróloga, as sequências de aminoácidos correspondentes aos domínios do extensor e de ancoragem SED1 foram analisadas na ferramenta AIUPred (Figura 10).

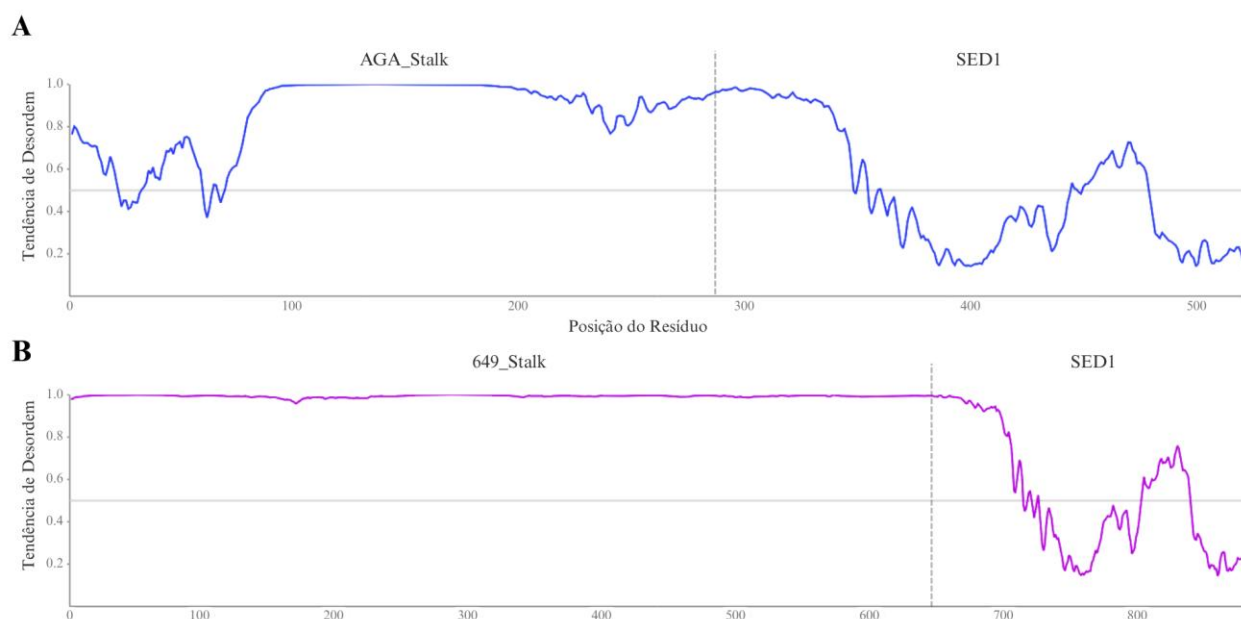


Figura 10. Análise da tendência de desordem dos resíduos dos extensores. A sequência de aminoácidos correspondentes dos extensores AGA_Stalk (A) ou 649_Stalk (B), fusionados ao domínio carboxi-terminal da proteína SED1, foram analisadas pela ferramenta AIUPred para identificar regiões intrinsecamente desordenadas.

A ferramenta previu maior tendência de formação de estruturas desordenadas no extensor 649_Stalk em relação ao Aga_Stalk. Proteínas intrinsecamente desordenadas são estruturas flexíveis com abundância de sítios que necessitam de modificação pós-traducional, as quais são essenciais na manutenção das propriedades conformacionais e estruturais da molécula e de suas interações (Berlow *et al.*, 2015).

Contudo, foi observado que, para *S. bouldarii*, estratégias que objetivam a redução da atividade de proteases, modulação do controle de qualidade no retículo endoplasmático (ER) e otimizações no transporte pós-Golgi reduzem o impacto metabólico da produção heteróloga e podem amplificá-la (Durmusoglu *et al.*, 2023).

Moléculas maiores com sítios intrinsecamente desordenados abundantes podem necessitar de modificações pós-traducionais mais extensas e, assim, sobrecarregar o metabolismo celular. Como consequência, o ônus metabólico gerado pela produção da proteína pode impactar

negativamente o crescimento e a viabilidade celular, o que pode explicar a instabilidade da linhagem 649.

Além disso, proteínas de parede celular de leveduras, como a SED1, são ricas em resíduos de serina e treonina, os quais são alvos de modificações pós-traducionais por glicosilação (Shimoi *et al.*, 1998). Da mesma forma, espaçadores utilizados para aprimorar a apresentação de proteínas de interesse ancoradas à parede celular e sua acessibilidade a substratos também apresentam riqueza desses resíduos (Teymennet-Ramírez *et al.*, 2022). Essas regiões são mais O-glicosiladas, o que as protege contra a degradação por proteases (Teymennet-Ramírez *et al.*, 2022).

Ambos os extensores utilizados neste trabalho também apresentam maior frequência desses resíduos, o que pode aumentar esse tipo de modificação e, conseqüentemente, a demanda metabólica associada à sua produção.

Portanto, para evitar a perda destes transformantes e conseguir sintetizar as doses para os testes *in vivo*, seguiu-se para a análise da capacidade de expressão do anticorpo na parede celular e busca da condição com maior produção da proteína por citometria de fluxo.

2.3.3 Efeito das condições de cultivo na produção e detecção do anticorpo ancorado à parede celular por citometria de fluxo

A fim de avaliar a capacidade da produção e expressão do fragmento de anticorpo ancorado à parede celular da levedura e qual construção demonstrava melhor detecção, foi realizada análise por citometria de fluxo.

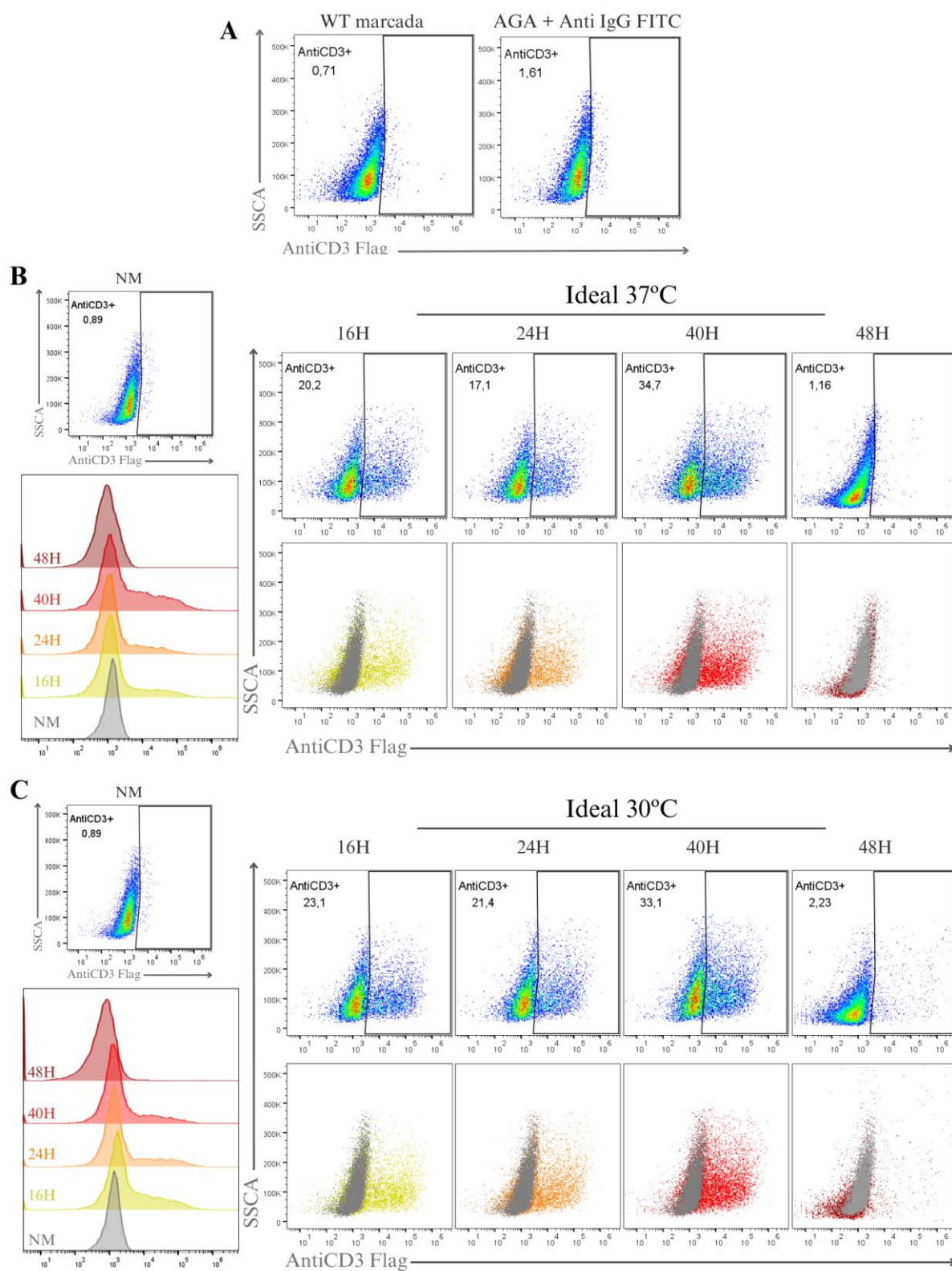
O promotor SED utilizado nestas construções está envolvido em vias de produção de proteínas que compõem a parede celular das leveduras. Em situações de estresse, quando há necessidade de espessamento da parede, pode gerar maior expressão do promotor. Também, a proteína SED1 se torna o componente de parede celular mais abundante nas células em fase estacionária (Shimoi *et al.*, 1998).

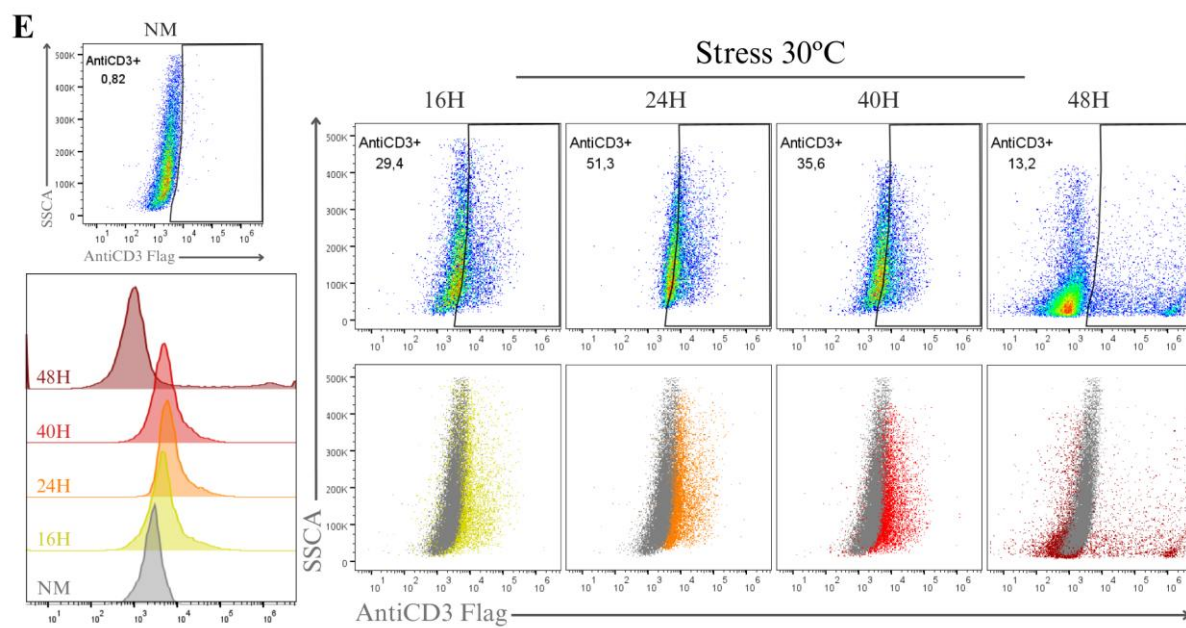
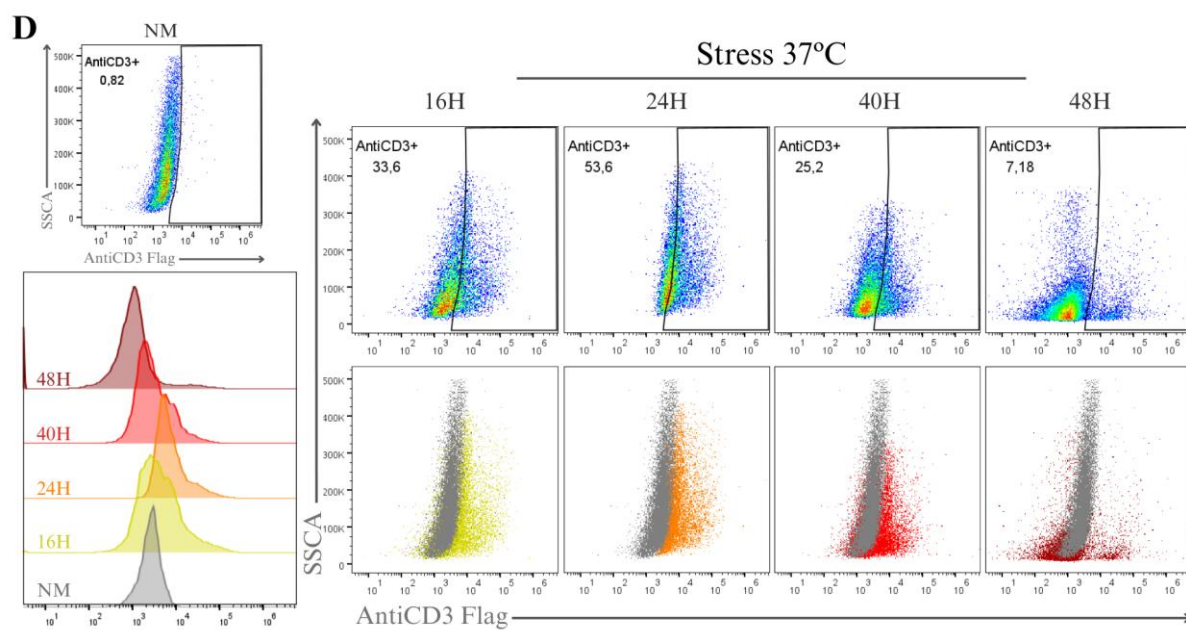
Como essa proteína tem função essencial na integridade celular, sua expressão é induzida por condições estressantes como alta concentração celular, pressão osmótica, temperatura e baixa capacidade nutricional (Inokuma *et al.*, 2014). Estudos anteriores observaram maior expressão da proteína em condições estressantes por *Saccharomyces cerevisiae* em fermentação de saquê (Wu

et al., 2006) é possível efeito de estresse osmótico em altas concentrações de NaCl (Cuevas-Velazques *et al.*, 2021).

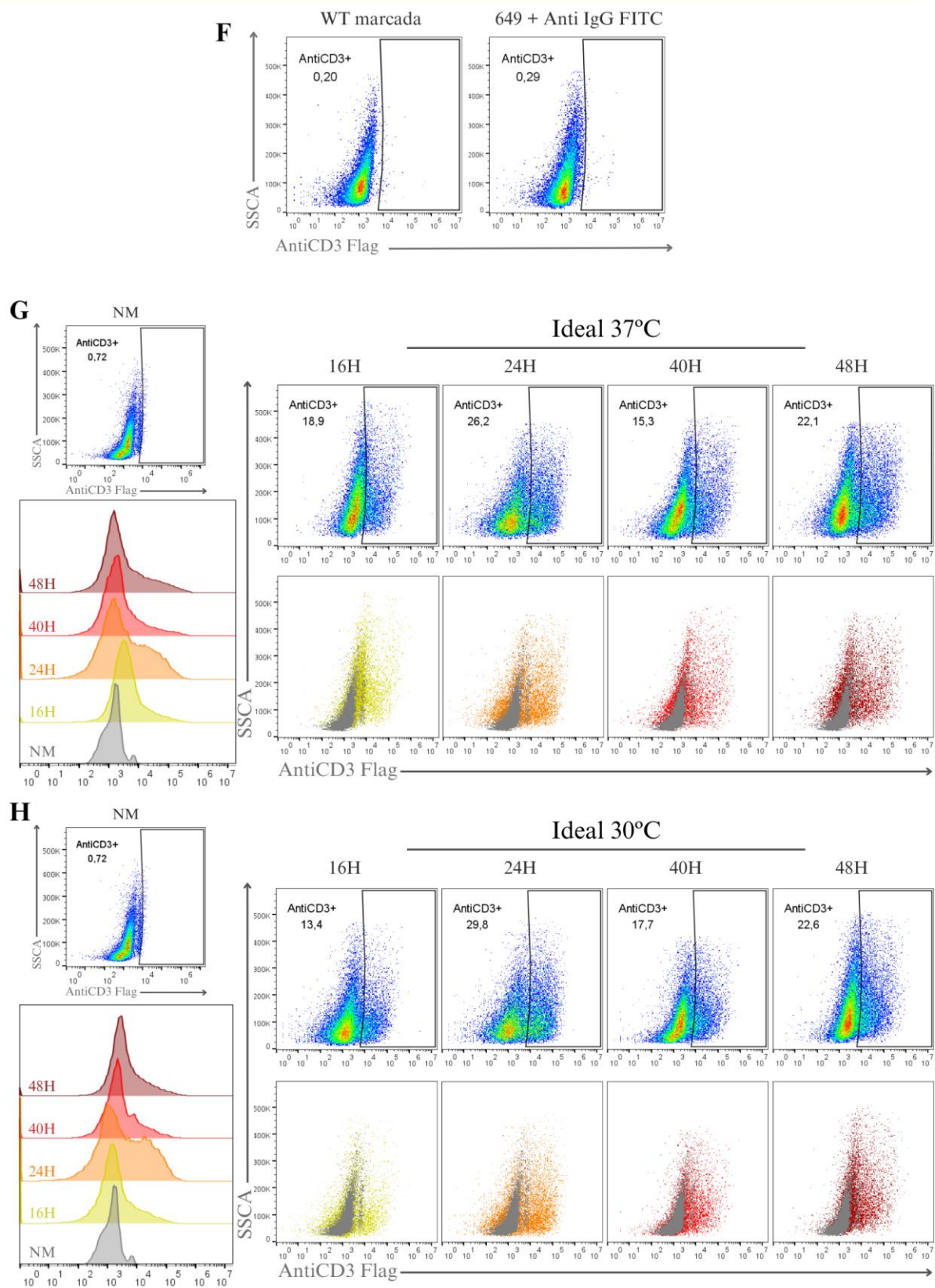
Portanto, esta seção tem como objetivo explorar o efeito de diferentes períodos e condições de cultivo na produção do fragmento do anticorpo por leveduras transformantes. Para isso, foram comparadas células cultivadas nas condições “Ideal” (meio YPD) e “Stress” (YPD com adição de 20% de etanol e 0,5M NaCl) sob diferentes temperaturas, por meio de análises por citometria de fluxo.

AGA





649



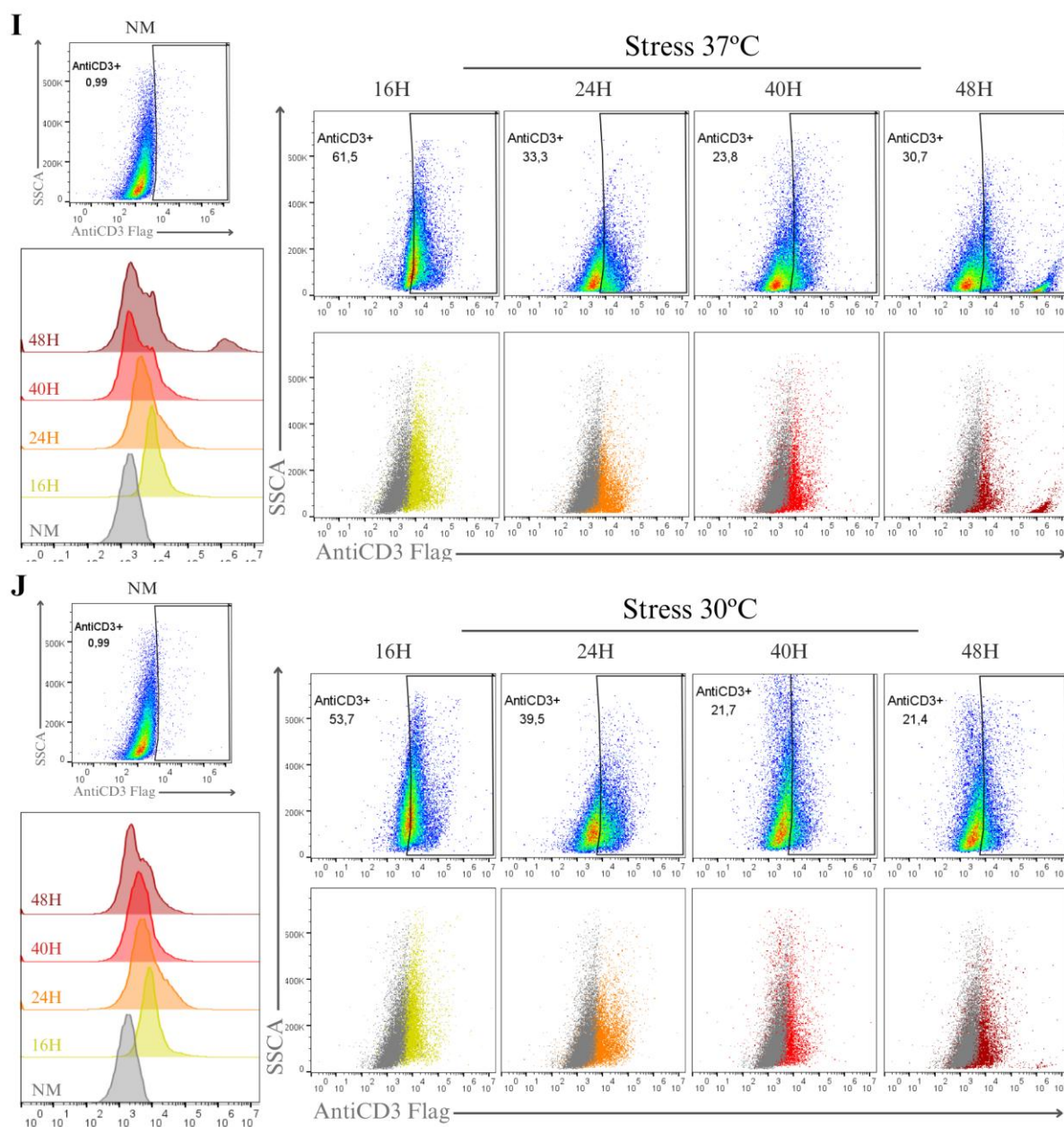


Figura 11. Análise do efeito do cultivo na produção de anti-CD3 por *Saccharomyces boulardii*. Leveduras das linhagens AGA (A a E) e 649 (F a J) foram cultivadas em condição nos períodos de 16 a 48 horas a 30°C ou 37°C. Posteriormente, as células foram ressuspensas em PBS e marcadas com Anti-Flag (Rabbit) e Anti Rabbit IgG conjugado a FITC.

Como esperado, em geral, houve maior detecção do anticorpo em células do cultivo sob estresse. É possível que o estímulo para produção de proteínas de parede aumentou a expressão do promotor SED1 e, consequentemente, resultou em maior produção e detecção do anticorpo.

Ambas as construções demonstraram mais disponibilidade de anti-CD3 na parede em comparação ao sistema de expressão utilizado por Olinto (2024), que resultou em 3,14% positivas para produção. As linhagens AGA e 649 tiveram níveis comparativos de expressão, maior sob a condição ideal em 40 horas para AGA e 24 horas para 649. Já sob a condição estressante, houve maior detecção em 24 horas para AGA e 16 horas para 649.

A linhagem 649 apresentou maior detecção em 48 horas de cultivo, fase de grande deposição de parede celular. Isso sugere que o uso da molécula extensora maior deixou o anticorpo mais disponível para detecção e prolongou sua disponibilidade na superfície da célula durante o cultivo.

Em condições estressantes, tempos de cultivo maiores apresentaram menor detecção. Devido ao alto estresse osmótico, o cultivo estressante pode causar morte celular se mantido por períodos longos. Observa-se, inicialmente, um maior número de células positivas detectadas no teste, mas, com o tempo, a morte celular pode diminuir essa população e reduzir o sinal detectado. Para melhor compreensão do efeito estressante, é importante avaliar também o efeito do cultivo na viabilidade da cultura e qual parcela do sinal positivo é resultante de células vivas.

2.3.4 Representatividade dos testes de imunodeteção para análise de amostras celulares

As mesmas células cultivadas e utilizadas para análise em citometria de fluxo foram preparadas para testes de imunodeteção por Dot-Blot a fim de avaliar a representatividade deste teste sobre a produção da fração celular.

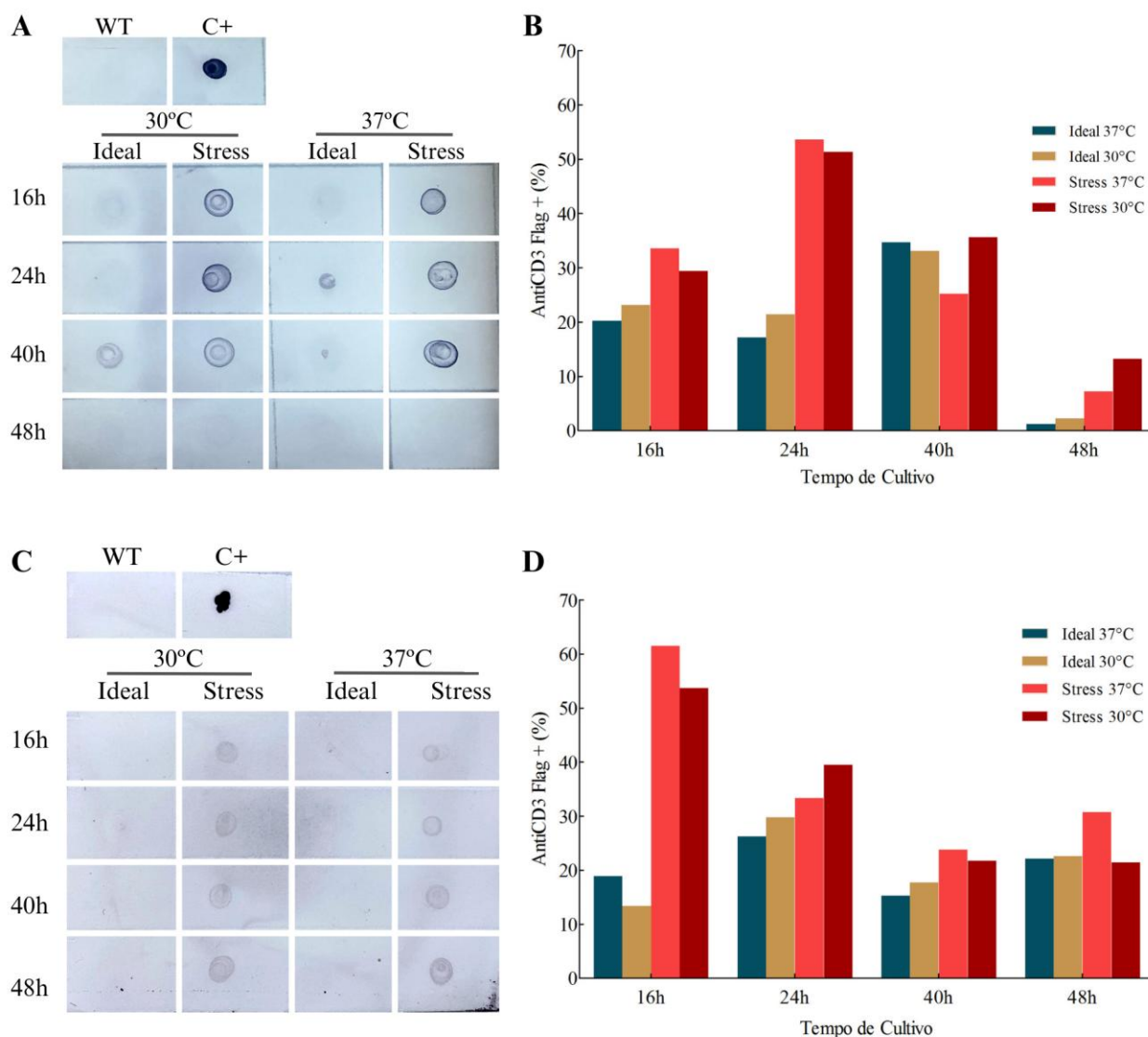


Figura 12. Análise comparativa do impacto do cultivo na detecção por imunodetecção e por citometria de fluxo. Detecção de leveduras produtoras de anti-CD3 das linhagens AGA (A e B) e 649 (C e D) por Dot-Blot (A e C) e por citometria de fluxo (B e D). Para a imunodetecção foram utilizadas levedura selvagem (WT) e proteína purificada que continha tag HA (C+) para controle.

A partir dessa comparação, foi possível observar que as condições com maior detecção no Dot-Blot e na citometria de fluxo divergiram. Apesar do Dot-Blot fornece uma resposta qualitativa sobre a presença da proteína de interesse, uma maior produção nem sempre se reflete no sinal detectado nesse teste. É possível que isso ocorra devido à riqueza de proteínas da fração celular, que, mesmo processada, pode não ser completamente absorvida pela membrana de nitrocelulose. Além disso, essa grande quantidade de proteínas pode bloquear ou dificultar a interação do anticorpo da marcação com a proteína de interesse, reduzindo o sinal resultante.

No Dot-Blot, amostras com menos células, como as do cultivo estressante, podem apresentar sinais mais fortes. Por outro lado, as amostras com maior densidade celular apresentam pouco ou nenhum sinal, como observado nos itens A e C da figura 12. Para que esse teste seja mais preciso, é necessário padronizar a quantidade de amostra com base no número de células. Essa estratégia reduziria a variabilidade entre as amostras.

Além disso, o teste de Dot-Blot com material celular pode levar a conclusões imprecisas, pois envolve a trituração das células, o que pode expor o material intracelular. Esse material, por sua vez, pode interferir ou ser mais reativo na detecção, enquanto a citometria revela apenas a detecção na parede celular.

Assim, conclui-se que os testes de Dot-Blot não são adequados para análise da produção heteróloga de proteínas expressas na parede celular. Nesse contexto, a avaliação por citometria de fluxo é uma metodologia mais representativa da presença de células que expressam o anticorpo em sua superfície.

2.3.5 Impacto do cultivo estressante na viabilidade celular

Durante o cultivo estressante, não foi observado aumento na densidade óptica em relação ao valor inicial, indicando que não houve crescimento populacional da cultura. Assim, para que essa metodologia fosse aplicada a esta pesquisa, seria necessário adaptá-la para utilizar em um número fixo de células, visto que o estresse não permite o aumento da população e que as doses precisam conter um número padronizado de células para possibilitar a comparação dos seus efeitos no experimento *in vivo*.

Ademais, considerando a falta de crescimento populacional, é possível que as células estivessem mortas. Os debris celulares resultantes apresentam maior autofluorescência e ligação não específica de anticorpos, o que pode levar a falsos positivos (Bio-Rad, 2025), o que pode ter influenciado o aumento de detecção observado no teste de citometria (Figura 11).

Dessa forma, para avaliar se o cultivo estressante seria aplicável para potencializar a expressão do anticorpo em células utilizadas para as doses do *in vivo*, é necessário observar seu impacto na viabilidade celular.

Para isso, cultivos em condições ideais das linhagens WT, AGA e 649 tiveram a condição estressante induzida pela adição de 0,5 M NaCl, etanol 20% e temperatura de 37°C. Depois disso, 100 µl das culturas foram plaqueadas em meio YPD sólido para contagem do número de UFC viáveis.

Tabela 6. Efeito do período sob cultivo estressante no crescimento de UFC em meio YPD sólido.

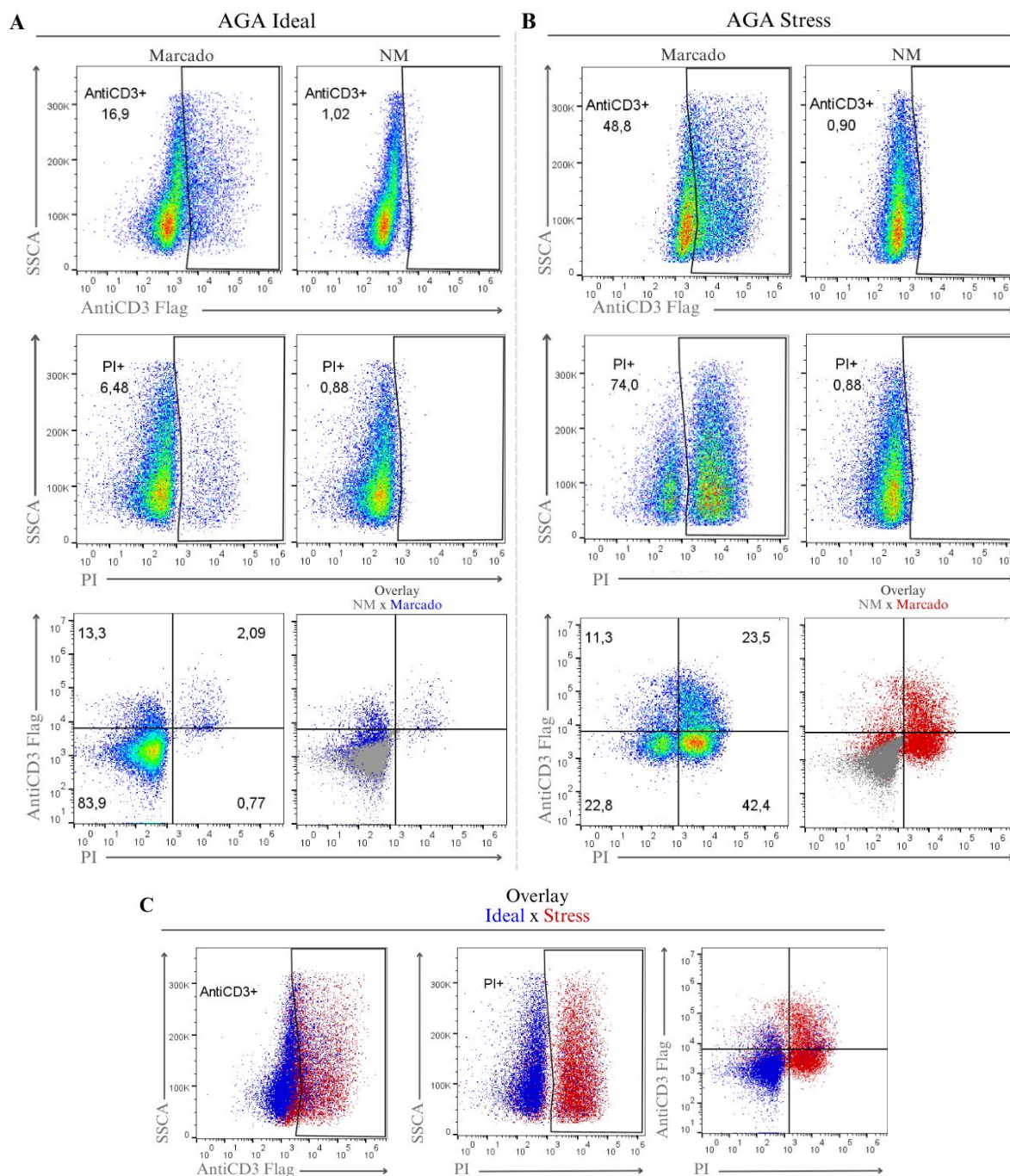
Tempo de Cultivo	WT	AGA	649
15 minutos	>1000	>1000	>1000
30 minutos	>1000	>1000	51
60 minutos	95	0	0
120 minutos	60	0	0
240 minutos	0	0	0

A partir de 1 hora de cultivo estressante, observou-se efeito significativo no crescimento celular das linhagens transformantes. Em contrapartida, as leveduras selvagens ainda estavam viáveis após duas horas sob condições estressantes. Isto sugere que, por possuir o mesmo promotor utilizado para produzir a proteína de estresse SED1, o transgene pode competir por fatores de expressão específicos fazendo com que a produção da proteína recombinante possa interferir com a síntese de proteínas de parede, que são essenciais para suportar a pressão osmótica do meio estressante, diminuindo sua capacidade de sobrevivência.

Ademais, a linhagem 649 perdeu a capacidade de crescimento mais rápido que a linhagem AGA, o que corrobora a ideia de que a molécula com extensor maior gera mais ônus metabólico

para a levedura e em situações estressantes e isso pode ser evidenciado pela perda mais rápida na viabilidade.

Portanto, para observar o efeito do cultivo estressante tanto na viabilidade celular quanto na produção do anti-CD3, as culturas das linhagens transformantes foram submetidas a um período de 30 minutos de cultivo estressante e comparadas com os cultivos ideais.



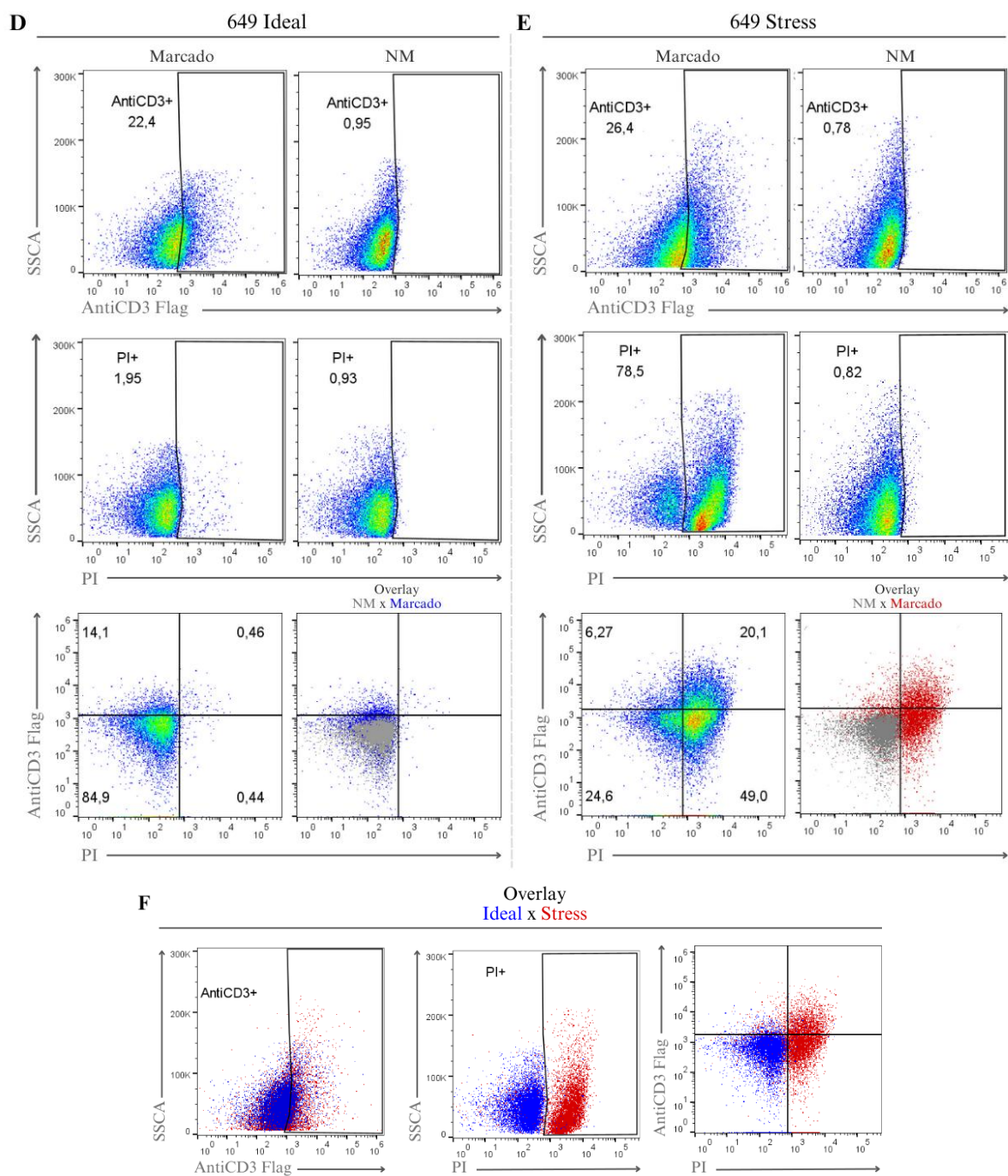


Figura 13. Análise em Citometria de Fluxo do Efeito do Cultivo na Viabilidade Celular. Leveduras AGA (A, B e C) foram cultivadas em condição “Ideal” por 40 horas e 649 (D, E e F) por 24 horas. A viabilidade celular foi analisada pela marcação com Iodeto de Propídio (PI) e a produção de anti-CD3 pela marcação com Anti-Flag (Rabbit) e Anti Rabbit IgG conjugado a FITC.

Mesmo com apenas 30 minutos de cultivo estressante, a viabilidade celular foi muito afetada, mas isso não impede que o organismo exerça efeito imunoregulador no ambiente intestinal. Estudos demonstram que a levedura *S. boulardii* e seus componentes pós-bióticos aliviam a colite induzida por DSS e mantém seu efeito benéfico ao hospedeiro mesmo que introduzidos na forma inativa ou morta (Xu *et al.*, 2023; Jin *et al.*, 2024). Esta é uma linha ainda pouco explorada, mas que pode ser utilizada no futuro para aumentar a produção por microrganismos e sua aplicabilidade terapêutica em indivíduos imunossuprimidos.

Entretanto, como neste estudo é necessário manter a capacidade de produção heteróloga pelo microrganismo, optou-se por manter o cultivo ideal e coletar células produtoras viáveis para os testes *in vivo*.

2.3.6 Detecção do anti-CD3 nas doses utilizadas na experimentação *in vivo*

Para a síntese das doses, leveduras 649 e AGA foram cultivadas por 24 e 40 horas respectivamente, períodos que resultaram em maior detecção de células produtoras do anti-CD3 em condições ideais (Figura 11).

Após este período, as doses foram preparadas de acordo com o descrito no tópico 6.3 da seção de “Métodos” e congeladas até o uso. Antes da administração aos camundongos, uma dose de cada linhagem foi descongelada e analisada em citometria de fluxo para avaliar os níveis de expressão e viabilidade das células.

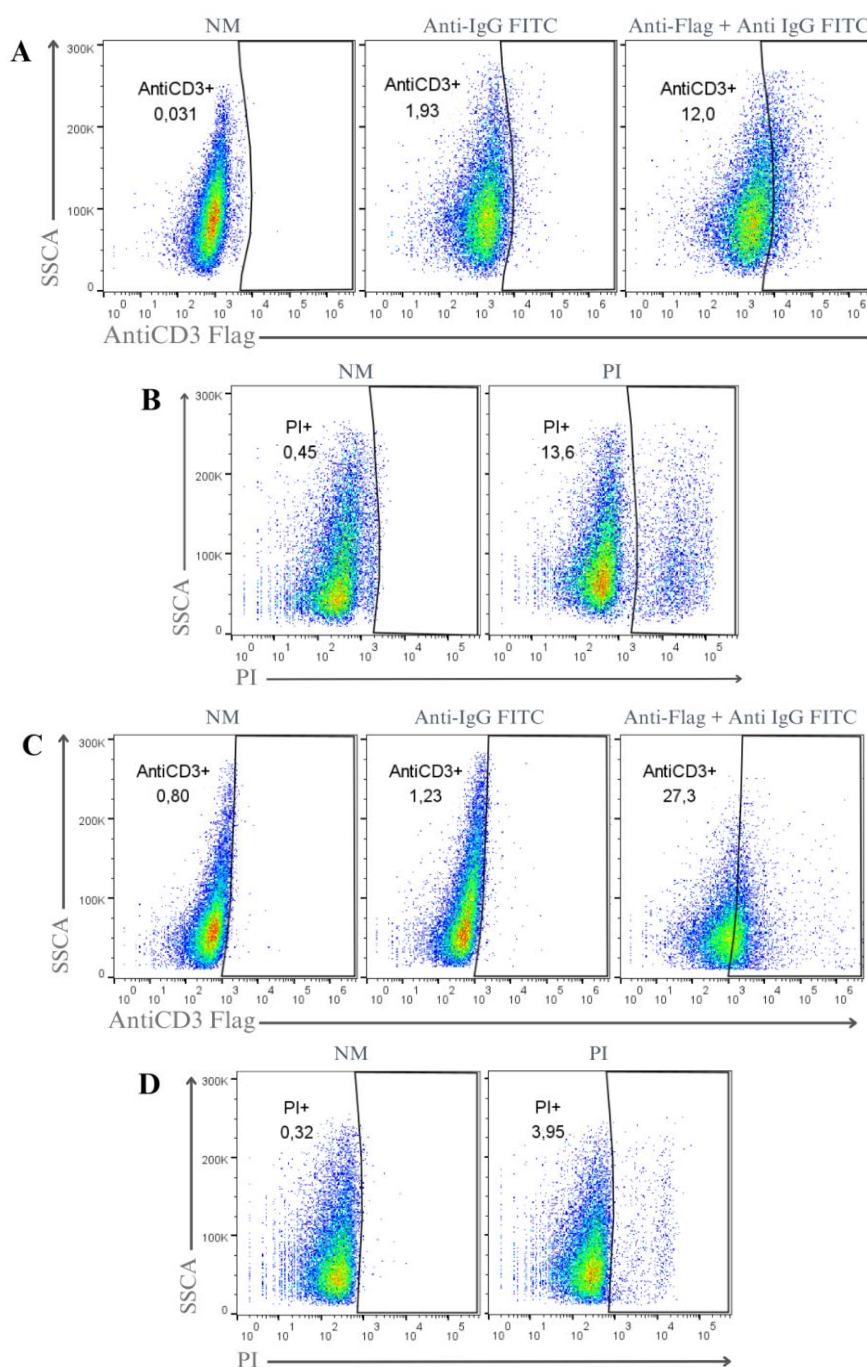


Figura 14. Análise da expressão de anti-CD3 e viabilidade das células em doses. Testes de leveduras AGA (A e B) e 649 (C e D). A expressão de anti-CD3 foi analisada pela marcação com Anti-Flag (Rabbit) e Anti Rabbit IgG conjugado a FITC (A e C) e a viabilidade celular com Iodeto de Propídeo (PI) (B e D).

Quando comparadas, a linhagem AGA apresentou menor viabilidade do que a 649, além de expressão menor de anti-CD3 em comparação ao teste anterior (Figura 11). No entanto, este teste permitiu concluir que o congelamento não teve impacto notável sobre a viabilidade celular.

Para o futuro, seria relevante analisar como o armazenamento a -80°C pode afetar a expressão heteróloga. Também, a partir dessas informações, mostra-se necessário analisar a expressão do anticorpo após o descongelamento das doses, a fim de estimar a quantidade real de células produtoras utilizadas no experimento *in vivo*.

De posse dessas informações, seguiu-se para a avaliação do efeito da levedura produtora no contexto de UC em modelo animal.

3. Análise do potencial imunoterápico em modelo animal

O experimento *in vivo* teve como objetivo avaliar o efeito da utilização das leveduras produtoras no contexto inflamatório da colite ulcerativa, utilizando um modelo de indução por adição de DSS à água filtrada, na concentração de 3%

A indução de colite por DSS em camundongo é um protocolo bem estabelecido e amplamente utilizado em estudos que investigam DII (Katsandegwaza *et al.*, 2022). Este composto causa dano ao revestimento epitelial colônico e compromete a integridade da barreira intestinal, aumentando sua permeabilidade e, assim, inicia a resposta inflamatória local e estabelece o quadro de colite aguda (Choi *et al.*, 2024).

O experimento foi planejado para complementar a compreensão sobre o efeito da levedura produtora de anti-CD3 observado por Olinto (2024), no qual sua administração evitou a progressão da doença e reduziu os sinais macroscópicos da inflamação quando comparado à levedura WT.

O ensaio teve duração de 11 dias, no qual as doses foram administradas diariamente enquanto a indução da colite, pela adição de DSS 3% na água, ocorreu a partir do dia 3 até o fim do experimento, esquematizado na figura 4. O consumo de água com DSS apresentou média de 22 mL por dia e por grupo. Assim, seu objetivo foi avaliar a capacidade de utilização da levedura como vetor de entrega de anticorpos e analisar o papel protetor deste modelo na inflamação em um contexto de inflamação ativa de Colite Ulcerativa.

3.1 Análise dos parâmetros macroscópicos de inflamação

Os camundongos foram pesados diariamente a fim de avaliar as variações no peso com a progressão da doença. Os resultados são ilustrados na figura 15.

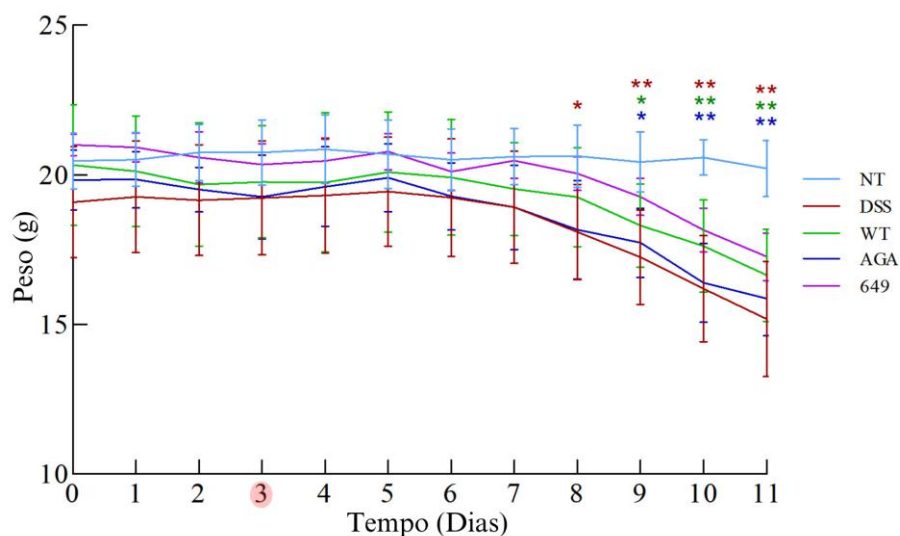


Figura 15. Efeito da administração das linhagens de *S. boulardii* no peso corporal de animais com Colite Ulcerativa induzida. Os indivíduos foram pesados diariamente e os dados de cada grupo são apresentados em média $\pm$ SEM. Destacado em vermelho, o dia do início da indução da Colite pela adição de DSS 3% à água. A análise estatística foi realizada por Two-Way Anova em que ‘*’ indica $p < 0,05$ e ‘**’ $p < 0,01$ em relação ao grupo saudável (NT).

Os grupos que tiveram a doença induzida apresentaram menor peso ao fim do experimento. Houve diferença significativa do grupo DSS com o grupo saudável (NT) a partir do 5º dia após o início da indução. Ademais, observou-se perda de peso significativa a partir do 9º dia para o grupo AGA e do 10º dia para o grupo WT em relação à NT. Não houve diferença estatística entre o peso dos grupos tratados e o do doente.

Apenas o grupo tratado com a levedura 649 não demonstrou diferença significativa com o grupo saudável, sugerindo que esse tratamento foi capaz de evitar a perda de peso associada à UC. Para melhor compreensão do seu efeito, seguiu-se para análise dos demais parâmetros.

Os outros sintomas clínicos analisados foram o sangramento retal e a consistência das fezes. Além da perda de peso, esses sinais foram utilizados para o cálculo do Índice da Atividade da Doença segundo Cooper *et al.*, (1993), que objetivou compreender a indução de colite por DSS em modelos murinos e analisar quais parâmetros da inflamação eram afetados. Com isso, foram calculados os DAI diários de cada grupo (Figura 16) para analisar suas mudanças ao longo do período experimental.

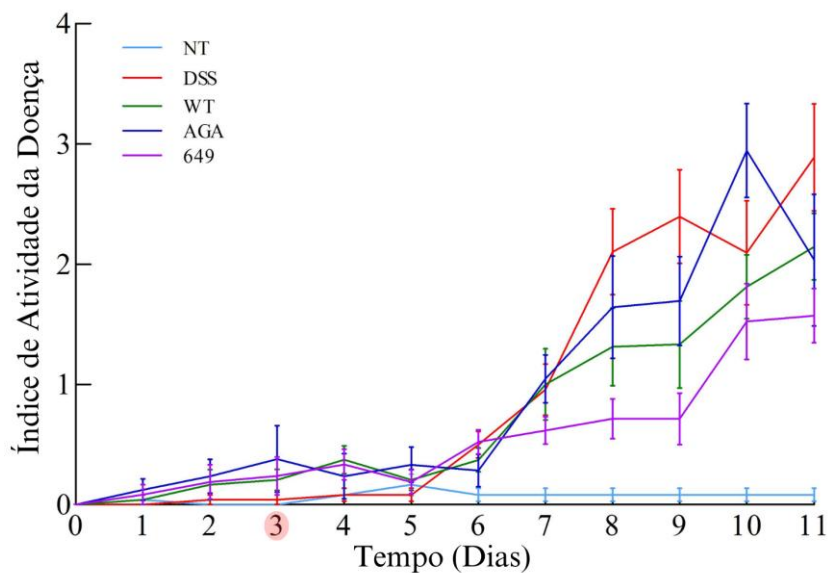


Figura 16. Efeito geral da administração de *S. boulardii* na atividade da doença. Gráfico do Índice de Atividade da Doença (DAI) longo do experimento apresentado em média $\pm$ SEM. Destacado em vermelho, o dia do início da indução da Colite pela adição de DSS 3% à água.

Observou-se aumento constante de sinais macroscópicos de inflamação a partir do terceiro dia de experimento com o início da indução da colite, principalmente para o grupo DSS. Para melhor avaliar as diferenças entre os grupos, foram feitas comparações pareadas e análises estatísticas por Two-Way Anova.

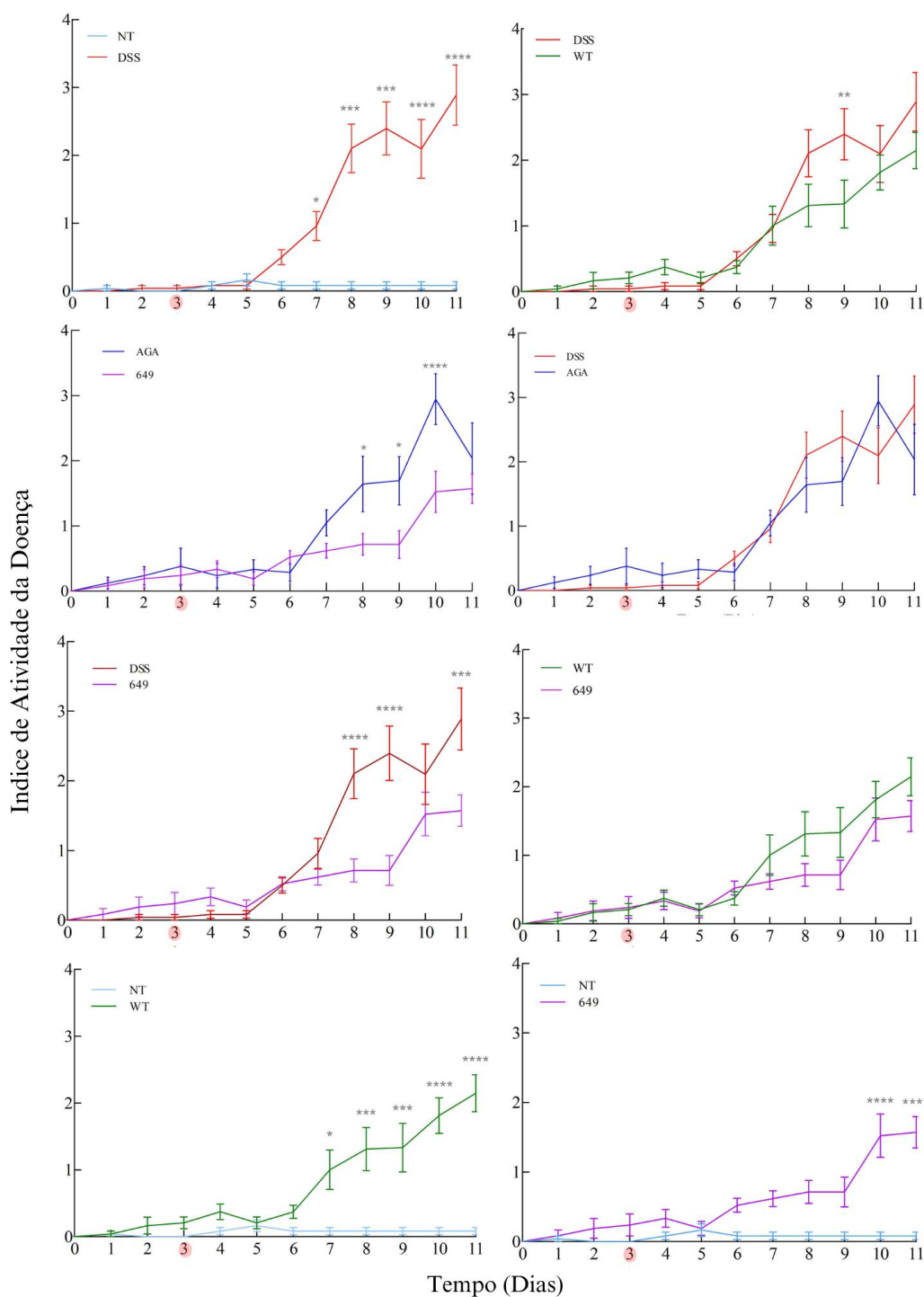


Figura 17. Análises pareadas do efeito da administração das linhagens de *S. boulardii* produtora de anti-CD3 na atividade da doença por grupo. Gráfico comparativo do Índice de Atividade da Doença (DAI) entre grupos ao longo do experimento apresentado em média $\pm$ SEM. Destacado em vermelho, o dia do início da indução da Colite pela adição de DSS 3% à água. A análise estatística foi realizada por Two-Way Anova em que ‘*’ indica $p < 0,05$, ‘**’ $p < 0,01$ e ‘***’ $p < 0,001$ entre os grupos

A partir destes resultados, foi observado a indução da colite pela adição de DSS à água, visto que foram observados o aumento dos sinais visíveis de sangramento retal, perda de peso e diarreia nos grupos doentes, o que é esperado com o com a instauração do doença (Chassaing *et al.*, 2014).

A levedura *S. boulardii* em estudos com modelo animal de colite induzida demonstrou efeito protetor, em que reduziu os sintomas e índice de atividade da doença (Dong *et al.*, 2019). Os sinais clínicos também foram reduzidos em humanos com colite ativa que receberam o em conjunto com o tratamento de mesalazina, resultando em remissão (Guslandi *et al.*, 2003).

Em contrapartida, a administração das doses contendo leveduras selvagens não foi suficiente para reduzir os sintomas, visto que o grupo WT apresentou aumento significativo do DAI em relação aos indivíduos saudáveis a partir do sétimo dia, acompanhando o grupo DSS. Em relação a esse último, o grupo tratado com WT apresentou apenas um dia de diferença significativa.

Em relação às linhagens transformantes, grupos tratados com a levedura 649 apresentaram DAI significativamente reduzido quando comparado a AGA. Enquanto o grupo AGA teve DAI semelhante ao grupo DSS, o grupo 649 apresentou redução significativa em três dias: 8, 9 e 10.

Apesar do índice do grupo 649 ter se assemelhado ao do grupo WT, quando comparados ao grupo saudável, o DAI do grupo que recebeu a levedura selvagem demonstrou-se significativamente maior a partir do sétimo dia. Em contrapartida, o grupo que recebeu a levedura 649 apresentou diferença em relação ao grupo NT apenas nos últimos dois dias do experimento, com a continuidade da indução da inflamação.

Portanto, isso pode indicar que a maior disponibilidade proporcionada pelo maior extensor potencializa o efeito do anti-CD3 e contribui para aprimorar a eficácia imunoterápica do modelo. Assim, as leveduras 649 apresentaram capacidade protetora amplificada pois foram mais eficientes em reduzir os sinais inflamatórios e atrasar a progressão da doença.

3.2 Análises morfológicas e histológicas do cólon

A inflamação recorrente das camadas mucosa e submucosa da UC leva ao espessamento da musculatura local. Com isso, há encurtamento ou enrijecimento do cólon, em que há sinais de fibrose tecidual rapidamente após o estabelecimento da inflamação (D'Alessio *et al.*, 2022).

Portanto, a análise da razão peso/comprimento do cólon avalia o encurtamento tecidual e o peso, indicativos de fibrose e acúmulo celular. Para isso, após a eutanásia, o cólon de cada indivíduo foi isolado, medido e pesado. Com essas informações, foram calculadas a razão de cada grupo e analisadas pelo teste estatístico Mann-Whitney, e mostrado na figura 18.

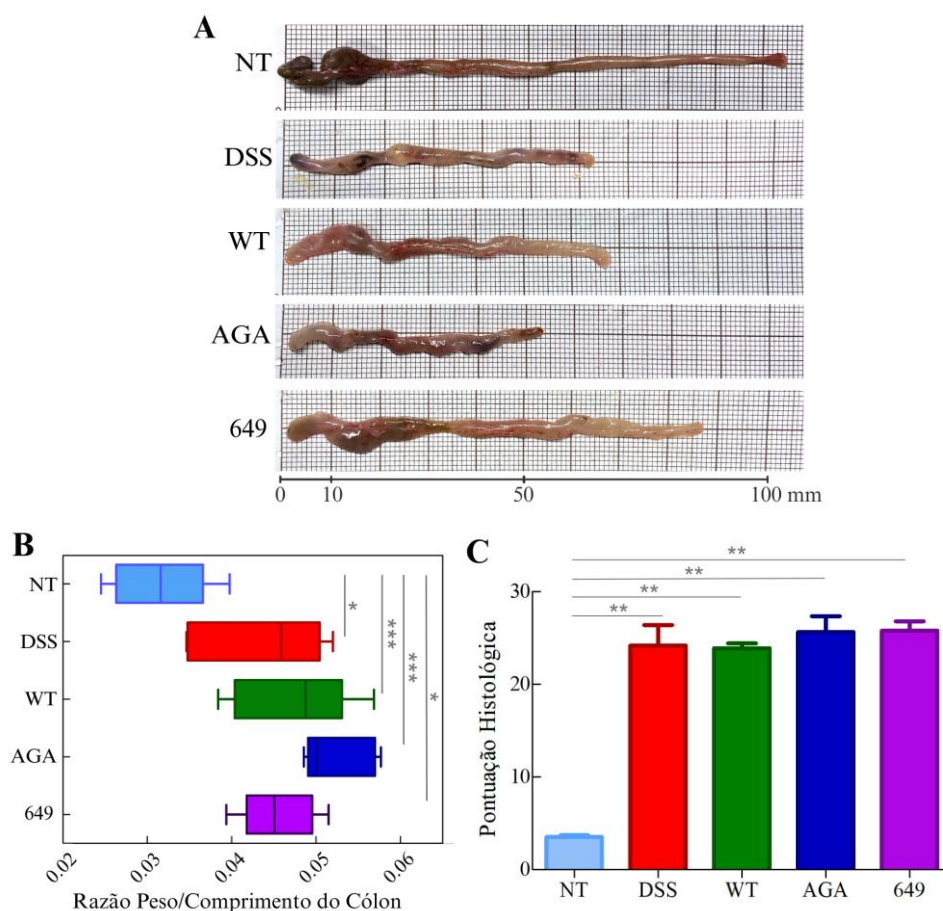


Figura 18. Efeito da administração das linhagens de *S. boulardii* produtora de anti-CD3 no encurtamento do cólon. (A) Fotos exemplo do cólon de cada grupo sob papel milimetrado, onde foi medido o tecido. (B) Gráfico comparativo da razão peso/comprimento do cólon e (C) pontuação histológica dos tecidos do cólon de cada grupo, representado em média $\pm$ SEM. A análise estatística foi realizada por Mann-Whitney, em que “*” indica $p < 0,05$, “**” $p < 0,01$ e “***” $p < 0,001$.

Como esperado, a indução da doença causou aumento significativo da razão quando comparado ao grupo doente. Contudo, quando comparados os tratamentos e o grupo doente, não houve diferença significativa.

É possível que o protocolo experimental utilizado neste trabalho não permita observar mudanças significativas neste parâmetro por analisar indivíduos com a inflamação ativa da colite. Em diferentes protocolos, a levedura demonstra aumento de moléculas de junção epitelial (Gao *et al.*, 2021), modulação da angiogênese (Chen *et al.*, 2013), estímulo à secreção de citocinas anti-inflamatórias (Thomas *et al.*, 2011) e ao recrutamento de enterócitos ao local da injúria (Canonici *et al.*, 2011) que podem estimular a cicatrização e restituição epitelial.

Para observar melhora tecidual significativa, seria necessário um período sem o estímulo inflamatório, permitindo que a levedura exercesse influência no processo de cicatrização. Dessa forma, é justificado a observação prévia de melhoras nesse parâmetro por Olinto (2024), mas não reproduzidas neste estudo, visto que diferiram no desenho experimental utilizado.

3.3 Expressão diferencial de genes inflamatórios

Os linfonodos mesentéricos são órgãos importantes no desenvolvimento da resposta imune adaptativa, no qual as células T são estimuladas à diferenciação e à proliferação pela apresentação de antígenos por células dendríticas que migram do cólon e do intestino delgado (Houston *et al.*, 2015).

Tendo em vista essa função, a análise do perfil de expressão gênica nesse tecido pode fornecer informações sobre diferenças na resposta imune com o desenvolvimento da doença e com o tratamento. Para isso, iniciadores para fatores de transcrição e citocinas (Tabela 5) foram utilizados em testes de PCR quantitativa a partir de cDNA sintetizado de mRNA extraído dos linfonodos mesentéricos (Figura 19).

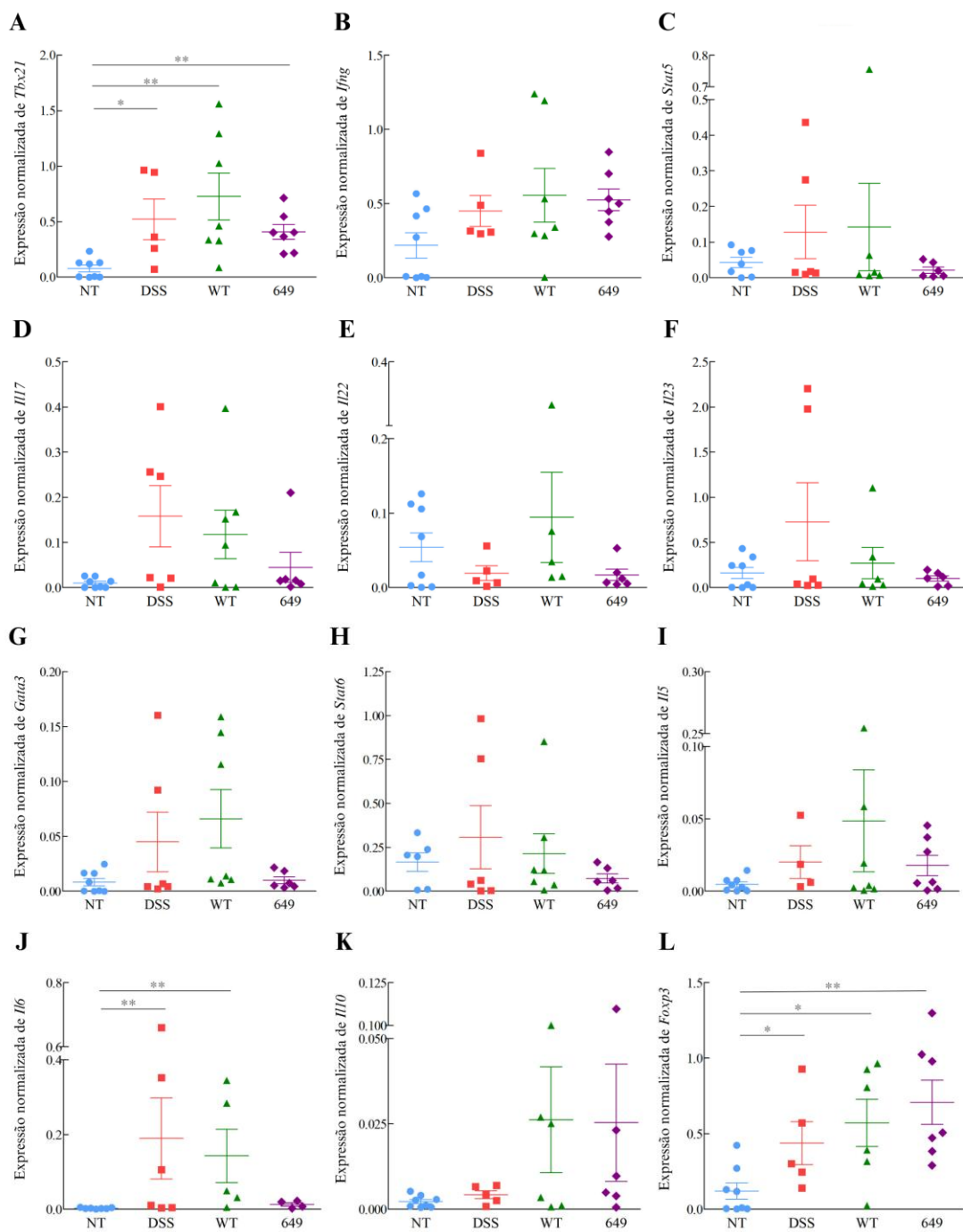


Figura 19. Análise da expressão gênica das células dos linfonodos mesentéricos por PCR em tempo real. A expressão de genes relacionados a respostas inflamatórias dos indivíduos do grupo saudável (NT), doentes não tratados (DSS), tratados com levedura selvagem (WT) ou produtora de anti-CD3 (649) foi analisada. São apresentados os níveis de *Tbx21* (A), *Ifng* (B), *Stat5* (C), *Il17* (D), *Il22* (E), *Il23* (F), *Gata3* (G), *Stat6* (H), *Il5* (I), *Il6* (J), *Il10* (K) e *Foxp3* (L). Os níveis dos genes foram normalizados utilizando os níveis do gene endógeno Actb. Cada grupo é representado em média $\pm$ SEM. A análise estatística foi realizada por Mann-Whitney, em que “*” indica $p < 0,05$, “**” $p < 0,01$.

Estudos que investigam a expressão gênica em modelos animais de UC apresentam resultados variados. Além de analisarem alvos distintos, esses estudos utilizam cronogramas e metodologias para indução diferentes, o que influencia as respostas obtidas. Por isso, além de comparar com outras pesquisas, é importante observar como os grupos doentes diferiram do saudável, considerando esta como referência para a fisiologia esperada da resposta imune em condições normais.

A análise da expressão de genes relacionados a fatores de transcrição permite avaliar os perfis de células T sendo estimulados no ambiente inflamatório. Nos linfonodos, foi observado aumento significativo da expressão do gene *Tbx21* nos grupos doentes (Figura 19A).

A expressão do fator de transcrição T-bet, codificado pelo gene *Tbx21*, tem função importante na polarização para o fenótipo Th1 em células T, além de atuar no desenvolvimento, migração e expressão de citocinas em outras células imunes inatas e adaptativas (Lazarevic *et al.*, 2021). Em modelo animal de UC por transferência adotiva de células T CD4+, foi observado que células knockout de T-bet não ocasionaram colite enquanto a superexpressão desse gene resultou em um quadro severo e de início precoce (Neurath *et al.*, 2002).

Portanto, o aumento da expressão de *Tbx21* nos grupos doentes em relação ao grupo saudável indica que a indução da doença foi eficaz. Já o nível de expressão dos grupos WT e 649 demonstra que os tratamentos podem não ter sido capazes de atrasar completamente a progressão da doença até o fim do período experimental, que foi encerrado no ápice da inflamação.

A média maior da expressão do gene *Ifng*, citocina associada ao perfil Th1, nos grupos doentes em relação ao saudável, reforça que há maior presença e atividade de linfócitos Th1 no ambiente da UC (Figura 19B).

A IL-6 é um dos principais mediadores da inflamação intestinal crônica pois estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias e favorece a sobrevivência e atividade das células T, prevenindo a apoptose (Neurath, 2019). A expressão do seu gene é significativamente maior em animais com colite induzida por DSS quando comparada a animais saudáveis, indicando papel importante no desenvolvimento da doença (Zhang & Chen, 2017).

Neste estudo, enquanto a expressão de *Il6* foi significativamente maior para os grupos DSS e WT, não houve diferença estatística da média do grupo 649 em relação ao grupo NT (Figura 19J). Essa redução indica que a administração da levedura associada ao anti-CD3 reduziu o estímulo à inflamação, diferente da administração apenas da levedura (WT).

A sinalização por IL-6 é associada a ativação e proliferação dos linfócitos T de forma geral, mas desempenha papel essencial para a diferenciação de células Th17 (Korn & Hiltensperger, 2021). No entanto, apesar da maior expressão de *Il6* nos grupos DSS e WT, não houve aumento significativo da expressão de *Il17*, *Il22* e *Il23* (Figuras 19C, 19D e 19E), genes característicos da atividade do perfil Th17.

Já o gene *Foxp3* demonstrou aumento significativo em todos os grupos em relação ao controle saudável, sendo maior no grupo 649 (Figura 19L). O *Foxp3* é relacionado ao perfil Treg e atua na regulação do desenvolvimento e da função dessas células (Wan & Flavell, 2005). A UC é caracterizada pelo desbalanço entre as populações de células Treg em relação às Th17 nos linfonodos mesentéricos (Zhang *et al.*, 2024) que contribui para manter o estado inflamatório crônico na mucosa.

Visto que nos grupos DSS e WT houve diferença significativa na expressão de *Il6* (Figura 18J) e aumento da média da expressão de genes relacionados a outros perfis celulares, o aumento significativo do *Foxp3* pode ser resultado de maior acúmulo e recrutamento celular decorrente do estabelecimento da inflamação.

Em contrapartida, o aumento da expressão de *Foxp3* no grupo tratado com a levedura produtora de anti-CD3, foi acompanhado da redução da expressão média de outros genes. Indivíduos tratados com a levedura 649 demonstraram uma redução da expressão, mesmo que não significativa, de genes relacionados ao perfil Th17 (Figuras 19C, 19D e 19E) e ao perfil Th2 (Figuras 19G e 19H). Isso sugere que células dos perfis Th17 e Th2 estão menos representados neste grupo em relação aos demais devido ao efeito do anticorpo ao se ligar ao alvo.

O acoplamento do anti-CD3 ao seu alvo em células T, resulta em uma ativação incompleta dessas células devido à ausência de sinais coestimulatórios, podendo induzir um estado de anergia

ou não responsividade, o que contribui para a tolerância imunológica (Kohm *et al.*, 2005; Kuhn & Weiner, 2016).

A indução de anergia de linfócitos T auxilia no controle de doenças que envolvem inflamação exacerbada, pois causa imunorregulação e melhora do quadro (Kohm *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2009, 2010; Ma *et al.*, 2024). Tendo em vista o protagonismo das células T CD4⁺ que mantém a inflamação crônica no ambiente imune da colite ulcerativa (Imam *et al.*, 2018), o uso do anti-CD3 pode induzir a diminuição da inflamação e a tolerância, sendo esse efeito observado tanto em estudos clínicos (Boden *et al.*, 2019) quanto em modelos murinos (Forster *et al.*, 2012).

Portanto, o uso da levedura expressando o anti-CD3 pode induzir anergia de células inflamatórias, reduzindo sua ação e influência no ambiente imune, enquanto favorece a atividade da população de células T regulatórias, que irão suprimir a resposta exacerbada e manter a homeostase intestinal.

Entretanto, o protocolo experimental utilizado neste estudo pode subestimar o efeito deste anticorpo. Como o composto DSS é tóxico para células epiteliais intestinais, há comprometimento da integridade da mucosa e início de um quadro inflamatório agudo. Nesse contexto, o recrutamento de mecanismos e de células imunes inatas é predominante aos da resposta imune adaptativa neste esquema experimental (Wirtz *et al.*, 2017).

Em estudos futuros, o uso de modelos animais que simulem a inflamação crônica, como aqueles baseados em ciclos de exposição ao DSS (Bang & Lichtenberger, 2016) podem ser mais adequados. Além de simular a natureza da doença, caracterizada por ciclos de melhora e recidiva, envolveria mais diretamente a participação de células adaptativas. Assim, a análise do potencial terapêutico da levedura produtora de anti-CD3 poderia ser melhor observada.

Além da análise dos linfonodos, a expressão gênica do cólon foi avaliada com o objetivo de identificar as vias e mecanismos moleculares mais expressos no local e compreender sua contribuição para a fisiopatologia da doença (Figura 19).

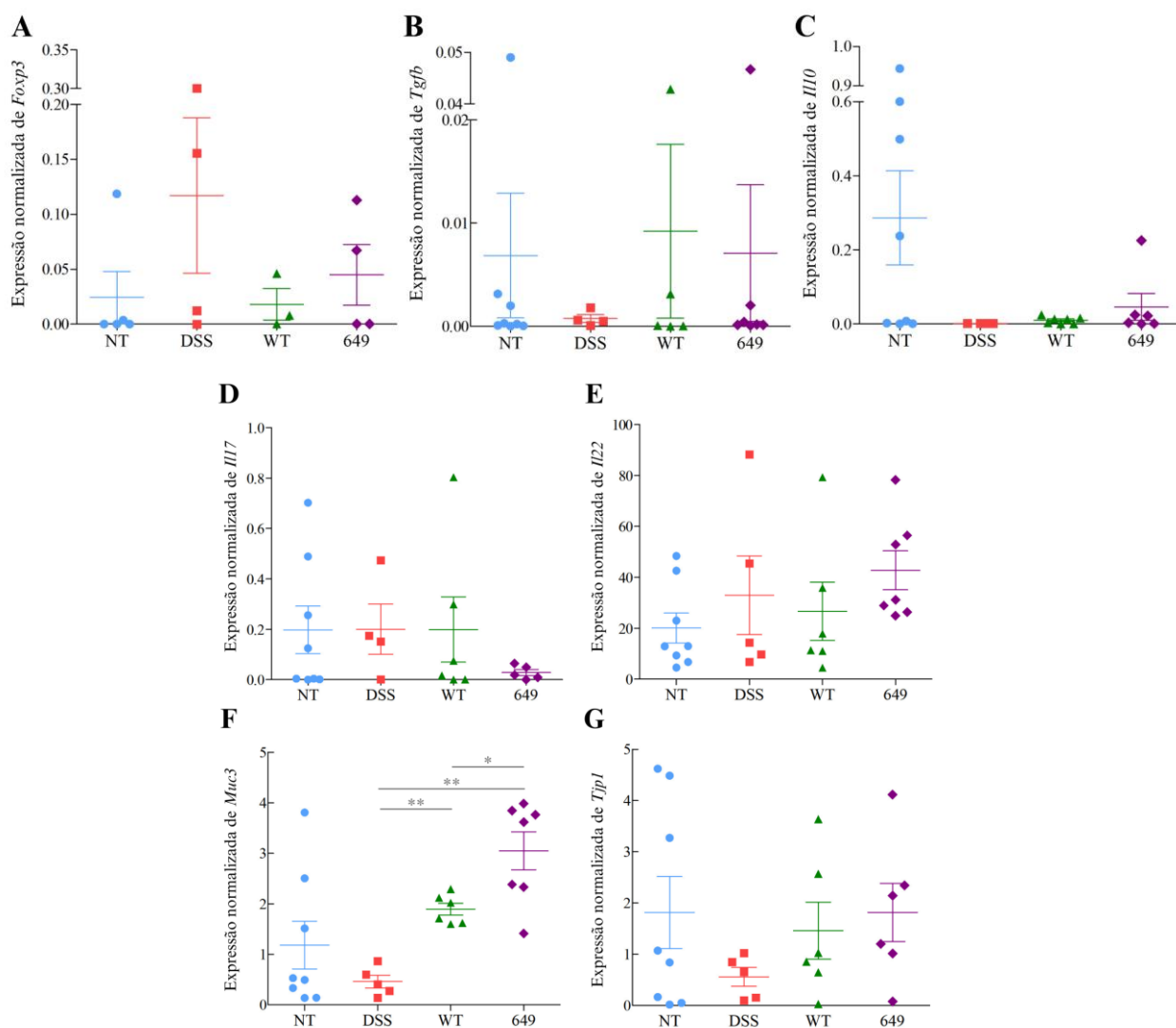


Figura 20. Análise da expressão gênica das células do cólon por PCR em tempo real. A expressão de genes relacionados a respostas inflamatórias dos indivíduos do grupo saudável (NT), doentes não tratados (DSS), tratados com levedura selvagem (WT) ou produtora de anti-CD3 (649) foi analisada. São apresentados os níveis de *Foxp3* (A), *Tgfb* (B), *Il10* (C), *Il17* (D), *Il22* (E), *Muc3* (F), *Tjp1* (G). Os níveis dos genes foram normalizados utilizando os níveis do gene endógeno *B2m*. Cada grupo é representado em média ± SEM. A análise estatística foi realizada por Mann-Whitney, em que ‘*’ indica $p < 0,05$, ‘***’ $p < 0,01$.

O aumento significativo da expressão de *Foxp3* observado nos linfonodos dos grupos doentes não foi refletido no cólon (Figura 20A). Neste tecido, a ação das células Treg é indispensável para a manutenção da homeostase. Além de expressar a citocina anti-inflamatória IL-10, essas células utilizam outros mecanismos efetores, como a sinalização via CD39, CTLA-4 e galectina-3, para suprimir a atividade celular inflamatória e preservar a saúde colônica (Dikiy *et al.*, 2025).

O papel imunoregulatório da expressão de *Foxp3* e *Il10* pode ser observado em camundongos com colite induzida por DSS, nos quais o tratamento com uma mistura de probióticos levou ao aumento da expressão desses genes, associado à melhora do quadro inflamatório (Ryu *et al.*, 2024). Contribuindo também para tolerância imune, a citocina TGF- β influencia a diferenciação de células T regulatórias e a inativação de sua sinalização resulta no aumento da autoimunidade e no desenvolvimento de colite espontânea em modelo animal (Ihara *et al.*, 2017).

Em contrapartida, neste estudo não foi observado diferença da expressão de *Foxp3*, *Il10* ou de *Tgfb* no cólon entre o grupo doente e os tratados (Figuras 20A, 20B e 20C). Esse resultado pode estar relacionado à severidade da doença ao fim do cronograma experimental. Nesse contexto, os tratamentos não foram capazes de impedir a progressão da colite ou proteger contra a inflamação no local após cinco dias de indução contínua por DSS.

Também foram analisados a expressão dos genes *Il17* e *Il22*, citocinas produzidas por células do perfil Th17, abundantes na lâmina própria e responsáveis pela defesa contra patógenos extracelulares (Chen *et al.*, 2023). Este subtipo celular pode ser influenciado pela disbiose intestinal a adotar respostas patogênicas e contribuir com a autoimunidade (Yasuda *et al.*, 2019). Portanto, podem ser um alvo interessante em estudos que utilizam probióticos ou que objetivam restaurar o equilíbrio da microbiota diretamente.

Assim como nos linfonodos (Figuras 19D e 19E), não foi observado diferença significativa para expressão desses genes entre os grupos no cólon (Figuras 20C e 20D). Isso pode ser explicado pelo papel duplo que células Th17 podem desempenhar: enquanto atuam na manutenção da homeostase em condições normais, podem iniciar uma resposta imune patogênica devido a disbiose e, assim, contribuir para inflamação da mucosa intestinal no contexto das DII (Owaga *et al.*, 2015).

No entanto, foi observado redução dos níveis da expressão de *Il17* com o tratamento com a levedura produtora de anti-CD3 (Figura 20D). Mesmo que não estatisticamente significativo, o resultado sugere que o uso do anticorpo reduziu a contribuição desse perfil celular para a inflamação associada à doença. Assim, o uso da levedura 649 pode ter favorecido a constituição de um ambiente imune intestinal mais regulado durante a doença, em comparação aos grupos WT e DSS.

Além de genes relacionados à atividade e diferenciação celular, foram utilizados iniciadores para avaliar diferenças na produção de proteínas de junção epitelial, *Tjp1*, e de mucina, *Muc3* (Figura 20F E 20G). Apesar de não ter sido observado diferença estatística na expressão de *Tjp1* entre os grupos, a expressão de *Muc3* foi significativamente maior no grupo 649, apresentando um efeito amplificado em relação à levedura selvagem (WT).

Segundo o estudo de Rodríguez-Nogales e et al. (2018), em modelo animal de colite induzida por DSS, a instauração da doença foi associada à redução da expressão de genes relacionados à mucina e de proteínas de junção epitelial. Por outro lado, o uso de *S. boulardii* aumentou significativamente estes níveis, sugerindo que contribui para recuperação da integridade epitelial. O efeito de *S. boulardii* na expressão de proteínas de junção epitelial também foi observado por Gao e et al. (2021).

Ambos estudos tiveram protocolos de indução da colite diferentes do utilizado nesta pesquisa, que buscou observar a capacidade protetora dos tratamentos. Portanto, a ausência de efeito significativo na expressão de *Tjp1* pode ser atribuída a injúria contínua do epitélio intestinal pelo uso do DSS. Como não houve um período sem a indução, não foi possível observar a influência dos tratamentos na recuperação tecidual, apenas seu papel protetor. Esse resultado corrobora com o observado nas análises morfológicas e histológicas do cólon.

Conclusão e perspectivas

Neste trabalho, foi explorada a capacidade da levedura probiótica *S. boulardii* de produzir, ancorar e expressar o fragmento de anticorpo na superfície celular. A produção heteróloga por esta levedura já havia sido observada em trabalhos anteriores (Hudson *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2021; Shin *et al.*, 2025), porém, as pesquisas conduzidas no Laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília foram pioneiras em investigar a produção heteróloga de anticorpos.

Esta pesquisa propõe o aprimoramento dos modelos previamente explorados por Azevêdo (2021) e por Olinto (2024) pela adição de proteínas extensoras. Para isso, foram construídos dois plasmídeos com domínios extensores distintos, AGA_Stalk e 649_Stalk, que diferem em tamanho (286 e 649 resíduos de aminoácidos, respectivamente). A inclusão destes teve o intuito de reduzir o enterramento do anticorpo pela deposição da parede celular.

As linhagens produtoras de anti-CD3 foram obtidas com sucesso e sua capacidade de expressão foi confirmada por testes de citometria de fluxo. Também, demonstraram maior expressão do anticorpo quando comparadas às linhagens dos estudos anteriores, que não utilizavam extensores. Especificamente, o uso do extensor maior, 649_Stalk, apresentou detecção alta com 48 horas de cultivo, sugerindo que seu uso prolonga a disponibilidade do scFv.

No entanto, a linhagem 649 apresentou instabilidade, reduzindo o crescimento em meio seletivo e a produção do anticorpo ao longo das gerações. A substituição de vetores episomais por integrativos pode solucionar esse problema. Esses vetores fazem a replicação utilizando a maquinaria celular e são divididos igualmente entre as células-filhas. Assim, haveria maior persistência do plasmídeo na população e estabilidade da linhagem superior à observada neste estudo. Também, evitar o uso de sequências longas, que aumentem a necessidade de modificações pós-traducionais, pode reduzir o impacto metabólico da produção e melhorar a estabilidade das linhagens.

A habilidade da produção de anticorpo pela levedura reforça seu potencial como vetor para entrega de imunoterapias ao trato gastrointestinal. Assim, para avaliar a aplicabilidade deste

modelo e seu efeito protetor no contexto da colite ulcerativa, foi utilizado um modelo experimental de UC induzida por DSS.

Durante o experimento, foram monitorados os parâmetros de sangramento retal, a consistência das fezes e a perda de peso para cálculo do DAI. O grupo tratado com a levedura 649 demonstrou redução da atividade da doença, se assemelhando por mais tempo ao grupo saudável. Esse efeito não foi observado nos grupos WT e AGA, indicando que tanto a produção quanto a maior exposição do anticorpo na superfície celular potencializam a proteção contra a progressão do processo inflamatório.

Em contrapartida, o tratamento não evitou o encurtamento do cólon e o aumento de sinais inflamatórios histológicos. Isso pode ter ocorrido devido a manutenção do estímulo inflamatório até o fim do experimento, o que resultou na coleta e análise dos tecidos em estágio avançado de inflamação e dano colônico semelhante entre os grupos.

Além disso, foram realizados testes para avaliar alterações na expressão gênica entre os grupos. A indução da colite resultou em aumento significativo dos genes *Tbx21*, *Il6* e *Foxp3* nas células dos linfonodos mesentéricos. Este resultado indica ativação de populações celulares inflamatórias e regulatórias, possivelmente devido ao recrutamento celular estimulado pela inflamação no cólon. No entanto, o grupo tratado com a levedura 649 não apresentou aumento de *Il6* como os demais grupos doentes. Também, os genes relacionados à produção de citocinas inflamatórias e fatores de transcrição apresentaram expressão reduzida nesse grupo, enquanto *Foxp3* se manteve significativamente aumentado em relação ao grupo DSS.

Já nos tecidos do cólon, foi observado diferença estatística apenas para o gene *Muc3*, relacionado a produção de mucinas pela mucosa epitelial. Especificamente, os grupos tratados com a levedura tiveram expressão desse gene aumentada em relação ao grupo DSS, se assemelhando mais a produção observada pelo grupo NT. Porém, esse aumento foi mais significativo para o grupo tratado com a levedura 649.

Em conjunto, esses resultados sugerem que o uso do anti-CD3 reduz a influência de células inflamatórias e favorece a participação de células Treg, que atuam na manutenção da homeostase intestinal. A indução deste perfil mais tolerogênico pode ter evitado a progressão da inflamação, o

que pode explicar a semelhança da pontuação do DAI do grupo 649 em relação ao grupo NT por mais tempo.

Assim, foi possível observar que os tratamentos conseguem modular a expressão gênica do indivíduo, o que pode representar um mecanismo responsável pelo efeito protetor contra a inflamação. Também, a administração da levedura produtora de anticorpo teve resultado distinto em comparação à levedura isolada, sendo o uso do anti-CD3 mais eficaz para controlar a progressão da colite.

Esse efeito foi atingido mesmo com apenas 27,3% de células positivas para produção do anticorpo nas doses avaliadas por citometria. Assim, o desenvolvimento de estratégias que ampliem essa população pode potencializar a eficácia deste modelo no ambiente intestinal.

Com este intuito, foi investigado o cultivo de condições estressantes para aumento da produção do anticorpo a partir do promotor de SED1, proteína abundante na parede celular. Apesar de aumentar o número de células positivas, também impactou a viabilidade destas células. Testar o impacto de diferentes concentrações dos compostos e de temperaturas na mortalidade e na produção heteróloga pelas leveduras pode ser uma metodologia relevante para futuros estudos.

Uma outra possibilidade é o uso de separação celular por fluorescência em citômetro, que é capaz de selecionar células positivas para produção do anticorpo. Assim, as doses podem ser produzidas para conter um número maior de leveduras expressando o anticorpo e potencialmente amplificar seu efeito *in vivo*.

Além disso, o uso de diferentes protocolos que estabeleçam a UC também pode fornecer melhor compreensão da levedura produtora do anticorpo e de seu efeito. Dessa forma, desenhos experimentais com ciclos de indução por DSS ou por TNBS podem manter a praticidade da indução química e envolver maior recrutamento de células imunes adaptativas. Assim, seria mais adequado para analisar o efeito do anti-CD3 associado a levedura, tendo em vista que tem alvo o complexo CD3/TCR de linfócitos T.

Este estudo apresentou uma rota biotecnológica inovadora para entrega de anticorpos imunoterapêuticos, utilizando a produção heteróloga por probióticos. Considerando os resultados obtidos no teste *in vivo*, o uso de *S. boulardii* como vetor para entrega de imunoterapias mostra

potencial para transformar os tratamentos de DII. No entanto, por se tratar de uma abordagem nova, este estudo representa um ponto de partida. São necessárias investigações futuras que explorem estratégias, como as previamente discutidas, a fim de aprimorar a eficácia e a viabilidade clínica deste modelo.

Referências

ACEVEDO-ROMÁN, A.; et al. Insights into gut dysbiosis: inflammatory diseases, obesity, and restoration approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 17, 2024. DOI: 10.3390/ijms25179715. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39273662/>. Acesso em: 14 nov. 2024.

ALMO, M. M. D. **Produção dos anticorpos recombinantes anti-TNF e anti-CD3 na bactéria *Zymomonas mobilis* para o tratamento de colite experimental em camundongos**. 2024.

ALMO, M. M. D. et al. (2023). Therapeutic Effects of *Zymomonas mobilis* on Experimental DSS-Induced Colitis Mouse Model. **Microorganisms**, v. 11, n. 2793, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112793>. Acesso em: 15 jan. 2025.

ALTMANN, M. The Benefits of *Saccharomyces boulardii*. In: The Yeast Role in Medical Applications. **IntechOpen**, 2017.

ANSARI, F. et al. Health-promoting properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* as a probiotic; characteristics, isolation, and applications in dairy products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 4, p. 457–485, 2021.

ARMUZZI, A.; LIGUORI, G. Quality of life in patients with moderate to severe ulcerative colitis and the impact of treatment: A narrative review. **Digestive and Liver Disease**, v. 53, n. 7, p. 803-808, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33744172>. Acesso em: 09 dez. 2024.

AVEDILLO-SALAS, A.; et al. The efficacy and safety of biologic drugs in the treatment of moderate–severe Crohn’s disease: A systematic review. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 11, 2023. DOI: 10.3390/ph16111581. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9032/16/11/1581>. Acesso em: 09 dez. 2024.

AZAD, M. A. K.; SARKER, M.; WAN, D. Immunomodulatory effects of probiotics on cytokine profiles. **Biomed Research International**, 2018. DOI: 10.1155/2018/8063647.

AZEVEDO, M. G. D. D. **Expressão heteróloga de fragmentos de anticorpos em *Saccharomyces boulardii* para tratamento da colite experimental**. 2021.

BANG, B.; LICHTENBERGER, L. M. Methods of inducing inflammatory bowel disease in mice. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 72, 2016.

BERLOW, R. B.; et al. Functional advantages of dynamic protein disorder. **FEBS Letters**, v. 589, n. 19, p. 2433-2440, 2015.

BHATTACHARYA, A.; OSTERMAN, M. T. Biologic therapy for ulcerative colitis. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 49, n. 4, p. 717–729, 2020.

BIO-RAD. **Flow cytometry live/dead exclusion**. Disponível em: <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-live-dead-exclusion.html>. Acesso em: 05 jan. 2025.

BJARNASON, I.; SISSION, G.; HAYEE, B. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of a multi-strain probiotic in patients with asymptomatic ulcerative colitis and Crohn's disease. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 3, p. 465–473, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6554453/>. Acesso em: 13 abr. 2025.

BODEN, E. K.; et al. Immunologic alterations associated with oral delivery of anti-CD3 (OKT3) monoclonal antibodies in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. **Crohns Colitis** 360, v. 1, n. 2, 2019.

- BRUNER, L. P.; WHITE, A. M.; PROKSELL, S. Inflammatory Bowel Disease. **Primary Care**, v. 50, n. 3, p. 411-427, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pop.2023.03.009>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37516511/>. Acesso em: 14 nov. 2024.
- BUCHMAN, A. L. Ulcerative colitis: Where we are and where we are not in 2020. **Gastroenterology Clinics**, v. 49, n. 4, 2020. Disponível em: [https://www.gastro.theclinics.com/article/S0889-8553\(20\)30130-6/fulltext](https://www.gastro.theclinics.com/article/S0889-8553(20)30130-6/fulltext). Acesso em: 09 dez. 2024.
- BURISCH, J; et al. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 7, n. 4, p. 322-337, 2013. DOI: 10.1016/j.crohns.2013.01.010.
- BUTS, J. P.; et al. *Saccharomyces boulardii* upgrades cellular adaptation after proximal enterectomy in rats. **Gut**, v. 45, n. 1, p. 89–96, 1999.
- CANONICI, A.; et al. *Saccharomyces boulardii* improves intestinal cell restitution through activation of the $\alpha 2\beta 1$ integrin collagen receptor. **PloS One**, v. 6, n. 3, 2011.
- CHAN, K. M.; et al. The 2 micron plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*: a miniaturized selfish genome with optimized functional competence. **Plasmid**, v. 70, n. 1, p. 2-17, 2013.
- CHASSAING, B.; et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Current Protocols in Immunology**, v. 104, p. 15.25.1-15.25.14, 2014.
- CHEN, X.; et al. Probiotic yeast inhibits VEGFR signaling and angiogenesis in intestinal inflammation. **PLoS One**, v. 8, n. 5, 2013.
- CHENG, Hong-Yu; et al. Interactions between the gut microbiota and the host innate immune response against pathogens. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00607/full>. Acesso em: 14 nov. 2024.
- 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, p. 1-12, 2019.
- CHIU, M. L.; GILLILAND, G. L. Engineering antibody therapeutics. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 38, p. 163-173, 2016. DOI: 10.1016/j.sbi.2016.07.012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27525816>. Acesso em: 09 dez. 2024.
- CHOI, E. K.; et al. The manganese transporter SLC39A8 links alkaline ceramidase 1 to inflammatory bowel disease. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 4775, 2024.
- CONSULTA REMÉDIOS. **Consulta Remédios**: site de comparação de preços de medicamentos. Disponível em: <https://consultaremedios.com.br/>. Acesso em: 13 abr. 2025.
- COOPER, H. S.; et al. Clinicopathologic Study of Dextran Sulfate Sodium Experimental Murine Colitis. **Lab Invest**, v. 69, n. 2, p. 238 – 249, 1993.
- CUEVAS-VELAZQUEZ, C. L. et al. Intrinsically disordered protein biosensor tracks the physical-chemical effects of osmotic stress on cells. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 5438, 2021.
- CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, n. 6, p. 767–778, 2007.
- D’ALESSIO, S.; et al. Revisiting fibrosis in inflammatory bowel disease: the gut thickens. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 19, p. 169-184, 2022.

DA SILVA, B. C.; et al. The demographic and clinical characteristics of ulcerative colitis in a Northeast Brazilian population. **Biomed Research International**, 2015. DOI: 10.1155/2015/359130. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26509150/>. Acesso em: 14 nov. 2024.

DELEU, S.; et al. Short chain fatty acids and its producing organisms: an overlooked therapy for IBD? **EBioMedicine**, v. 66, 2021. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103293. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33813134/>. Acesso em: 14 nov. 2024.

DE SOUZA, Heitor SP; FIOCCHI, Claudio. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n. 1, p. 13-27, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2015.169>. Acesso em: 09 dez. 2024.

D'HAENS, G.; et al. Mirikizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. **New England Journal of Medicine**, v. 388, n. 26, 2023. DOI: 10.1056/NEJMoa2207940. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37379135/>. Acesso em: 09 dez. 2024.

DIKIY, S.; et al. Terminal differentiation and persistence of effector regulatory T cells essential for preventing intestinal inflammation. **Nature Immunology**, 2025.

DI PAOLO, A.; LUCI, G. Personalized medicine of monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring, and beyond. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2021. DOI: 10.3389/fphar.2020.610806. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7487790/>. Acesso em: 09 dez. 2024.

DI RIENZO, A.; et al. Advancements in inflammatory bowel disease management: From traditional treatments to monoclonal antibodies and future drug delivery systems. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 9, 2024. DOI: 10.3390/pharmaceutics16091185. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11435298/>. Acesso em: 09 dez. 2024.

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

DOURADINHA, B.; et al. Novel insights in genetic transformation of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. **Bioengineered**, v. 5, n. 1, p. 21–29, 2014.

DU, Lilian; HA, Christina. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 49, n. 4, p. 643-654, 2020. DOI: 10.1016/j.gtc.2020.07.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33121686/>. Acesso em: 14 nov. 2024.

DURMUSOGLU, D.; et al. In situ biomanufacturing of small molecules in the mammalian gut by probiotic *Saccharomyces boulardii*. **ACS Synthetic Biology**, v. 10, n. 5, p. 1039–1052, 2021.

DURMUSOGLU, D.; et al. Improving therapeutic protein secretion in the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* using a multifactorial engineering approach. **Microbial Cell Factories**, v. 22, p. 109, 2023.

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.

ÉRDŐS, Gábor; DOSZTÁNYI, Zsuzsanna. AIUPred: combining energy estimation with deep learning for the enhanced prediction of protein disorder. **Nucleic Acids Research**, v. 52, 2024.

FORSTER, Katharina; et al. An oral CD3-specific antibody suppresses T-cell-induced colitis and alters cytokine responses to T-cell activation in mice. **Gastroenterology**, v. 143, n. 5, p. 1298-1307, 2012. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.06.016. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.016>. Acesso em: 09 fev. 2025.

FRIEND, P. J.; et al. Phase I Study of An Engineered Aglycosylated Humanized Cd3 Antibody in Renal Transplant Rejection. **Transplantation**, v. 68, n. 11, p. 1632-1637, 1999.

FU, J.; et al. Unique probiotic properties and bioactive metabolites of *Saccharomyces boulardii*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 15, p. 967–982, 2023.

FUTCHER, A. B. The 2 µm circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 4, n. 1, p. 27-40, 1988.

GAO, Hui; et al. *Saccharomyces boulardii* ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice by regulating NF-κB and Nrf2 signaling pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2021.

GASPARINI, R. G.; SASSAKI, L. Y.; SAAD-HOSSNE, R. Inflammatory bowel disease epidemiology in São Paulo State, Brazil. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 11, 2018. DOI: 10.2147/CEG.S176583. Erratum in: **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 13, 2020. DOI: 10.2147/CEG.S266121. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30464570/>. Acesso em: 14 nov. 2024.

GENEROSO, S. V.; et al. Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. **European Journal of Nutrition**, v. 50, p. 261–269, 2011.

GEREMIA, A.; et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 1, p. 3-10, 2014. DOI: 10.1016/j.autrev.2013.06.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.06.004>. Acesso em: 09 fev. 2025.

GOMES, A. C.; HOFFMANN, C.; MOTA, J. F. The human gut microbiota: metabolism and perspective in obesity. **Gut Microbes**, v. 9, n. 4, p. 308-325, 2018.

GRIFFITHS, O. R.; et al. Inflammatory bowel disease and targeted oral anti-TNFα therapy. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 119, p. 157-198, 2020.

GUSLANDI, Mario; GIOLLO, Patrizia; TESTONI, Pier Alberto. A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 15, n. 6, p. 697-698, 2003.

GUSLANDI, Mario. Role of probiotics in Crohn's disease and in pouchitis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 49, p. S46–S49, 2015.

HALLING, M. L.; KJELDSSEN, J.; KNUDSEN, T.; NIELSEN, J.; HANSEN, L. K. Patients with inflammatory bowel disease have increased risk of autoimmune and inflammatory diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 33, 2017. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v23/i33/6137.htm>. Acesso em: 14 nov. 2024.

HAN, K.; et al. Efficient surface display of single-chain variable fragments against tumor necrosis factor α on engineered probiotic *Saccharomyces boulardii* and its application in alleviating intestinal inflammation in vivo. **New Biotechnology**, v. 86, p. 107-114, 2025.

HEROLD, K. C.; et al. An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for Type 1 Diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 7, p. 603-613, 2019. DOI: 10.1056/NEJMoa1902226.

HOUSTON, S.; et al. The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. **Mucosal Immunology**, v. 9, p. 468-478, 2016.

HUDSON, L. E.; et al. Characterization of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in the healthy mucosal immune system. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, 2016.

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

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

IHARA, S.; HIRATA, Y.; KOIKE, K. TGF- β in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. **Journal of Gastroenterology**, v. 52, p. 777–787, 2017.

ILAN, Y. Oral tolerance: can we make it work? **Human Immunology**, v. 70, n. 10, p. 768–776, 2009.

IMAM, T; et al. Effector T helper cell subsets in inflammatory bowel diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02784/full>. Acesso em: 09 dez. 2024.

INO, S; et al. Oral tolerance is inducible during active dextran sulfate sodium-induced colitis. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 7, n. 2, p. 242–253, 2016. DOI: 10.4292/wjgpt.v7.i2.242. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848247/>. Acesso em: 09 dez. 2024.

INOKUMA, K.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Efficient yeast cell-surface display of exo- and endo-cellulase using the SED1 anchoring region and its original promoter. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 8, 2014.

IVANOV, Ivaylo I.; et al. T cell responses to the microbiota. **Annual Review of Immunology**, v. 40, p. 559–587, 2022. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-101820-111032>. Acesso em: 09 dez. 2024.

IVANOV, Ivaylo I.; HONDA, K. Intestinal commensal microbes as immune modulators. **Cell Host & Microbe**, v. 12, n. 4, p. 496–508, 2012. DOI: 10.1016/j.chom.2012.09.009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.009>. Acesso em: 09 fev. 2025.

IVANOVSKA, T. P.; et al. Synbiotic loaded chitosan-Ca-alginate microparticles reduces inflammation in the TNBS model of rat colitis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 527, n. 2, p. 126–134, 2017.

JADHAV, A.; et al. Reviewing the potential of probiotics, prebiotics and synbiotics: advancements in treatment of ulcerative colitis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1268041, 2023. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1268041.

JIN, Y.; WU, J.; HUANG, K.; LIANG, Z. Heat-killed *Saccharomyces boulardii* alleviates Dextran Sulfate Sodium-induced ulcerative colitis by restoring the intestinal barrier, reducing inflammation, and modulating the gut microbiota. **Nutrients**, Basel, v. 16, n. 5, p. 702, 2024.

KAPLAN, G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, p. 720–727, 2015. DOI: 10.1038/nrgastro.2015.150.

KAPLON, H.; et al. Antibodies to watch in 2023. **MAbs**, v. 15, n. 1, 2023. DOI: 10.1080/19420862.2022.2153410.

KATSANDEGWAZA, B.; HORSNELL, W.; SMITH, K. Inflammatory bowel disease: a review of pre-clinical murine models of human disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 9344, 2022.

KELLER, D. S; et al. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence. **Techniques in Coloproctology**, v. 23, n. 1, p. 3–13, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10151-018-1894-2>. Acesso em: 14 nov. 2024.

KENNEDY, M. S.; CHANG, E. B. The microbiome: composition and locations. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 176, p. 1–42, 2020. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2020.08.013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33814111/>. Acesso em: 14 nov. 2024.

- KOHM, A. P.; et al. Treatment with nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody induces CD4+ T cell unresponsiveness and functional reversal of established experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 8, p. 4525-4534, 2005.
- KORN, T.; HILTENSBERGER, M. Role of IL-6 in the commitment of T cell subsets. **Cytokine**, v. 146, 2021.
- KUHN, Chantal; WEINER, Howard L. Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: from bench to bedside. **Immunotherapy**, v. 8, n. 8, p. 889-906, 2016.
- LAVELLE, A.; SOKOL, H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 4, p. 223-237, 2020. DOI: 10.1038/s41575-020-0165-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0165-7>. Acesso em: 09 fev. 2025.
- LAZAREVIC, V.; GLIMCHER, L.; LORD, G. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 777-789, 2013.
- LE BERRE, C.; HONAP, S.; PEYRIN-BIROULET, L. Ulcerative colitis. **The Lancet**, v. 402, n. 10401, p. 571-584, 2023. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)00966-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37573077/>. Acesso em: 14 nov. 2024.
- LEO, Oberdan; et al. Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 5, p. 1374-1378, 1987.
- LI, R.; et al. Heterologous expression of the *Leuconostoc* bacteriocin Leucocin C in probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, p. 229-237, 2021.
- LING, H.; et al. Engineering of a probiotic yeast for the production and secretion of medium-chain fatty acids antagonistic to an opportunistic pathogen *Candida albicans*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, 2023.
- LU, R. M.; et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, 2020. DOI: 10.1186/s12929-019-0592-z. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6981981/>. Acesso em: 09 dez. 2024.
- MACURA, B.; KIECKA, A.; SZCZEPANIK, M. Intestinal permeability disturbances: causes, diseases and therapy. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 24, n. 1, 2024. DOI: 10.1007/s10238-024-01496-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39340718/>. Acesso em: 14 nov. 2024.
- MANOS, J. The human microbiome in disease and pathology. **APMIS**, v. 130, n. 12, p. 690-705, 2022.
- MAZZIOTTA, C. et al. Probiotics mechanism of action on immune cells and beneficial effects on human health. **Cells**, v. 12, n. 1, p. 184, 2023. DOI: 10.3390/cells12010184. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells12010184>. Acesso em: 09 fev. 2025.
- MA, X. L.; GE, D.; HU, X. J. Evaluation of teplizumab's efficacy and safety in treatment of type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. **World Journal of Diabetes**, v. 15, n. 7, p. 1615-1626, 2024. DOI: 10.4239/wjdv15.i7.1615.
- MCFARLAND, L. V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 18, p. 2202-2222, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20458757>. Acesso em: 13 abr. 2025.
- MCMAHON, Conor; et al. Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies. **Nature structural & molecular biology**, v. 25, n. 3, p. 289-296, 2018.

- MÖRBE, U. M.; et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT): diversity, structure, and function. **Mucosal Immunology**, v. 14, n. 4, p. 793-802, 2021.
- MOWAT, Allan M.; AGACE, William W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667-685, 2014.
- NEURATH, Markus F. Targeting immune cell circuits and trafficking in inflammatory bowel disease. **Nature Immunology**, v. 20, n. 8, p. 970-979, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41590-019-0394-2>. Acesso em: 09 dez. 2024.
- NEURATH, Markus F.; et al. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 11, p. 1129-1143, 2002.
- OWAGA, E.; et al. Th17 cells as potential probiotic therapeutic targets in inflammatory bowel diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20841-20858, 2015.
- PACKER, D. The history of the antibody as a tool. **Acta Histochemica**, v. 123, n. 4, 2021. DOI: 10.1016/j.acthis.2021.151710. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33721607>. Acesso em: 09 dez. 2024.
- PALMA, M. L.; et al. Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement? **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 99, n. 16, p. 6563–6570, 2015.
- PARENTE, J. M.; et al. Inflammatory bowel disease in an underdeveloped region of Northeastern Brazil. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 4, p. 1197-1206, jan. 2015. DOI: 10.3748/wjg.v21.i4.1197. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4306164/>. Acesso em: 28 abr. 2025.
- PASVOL, T. J.; et al. Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in UK primary care: a population-based cohort study. **BMJ Open**, v. 10, n. 7, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32690524/>. Acesso em: 14 nov. 2024.
- PESCE, M.; et al. Next-generation probiotics for inflammatory bowel disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, p. 5466, 2022.
- PORTER, R. J.; KALLA, R.; HO, G. Ulcerative colitis: recent advances in the understanding of disease pathogenesis. **F1000Research**, v. 9, 2020. Disponível em: <https://f1000research.com/articles/9-294>. Acesso em: 14 nov. 2024.
- OHLAND, C. L.; MACNAUGHTON, W. K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 298, n. 6, 2010. DOI: 10.1152/ajpgi.00243.2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00243.2009>. Acesso em: 09 fev. 2025.
- OIDA, T.; et al. CD4+ CD25– T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+ CD45RB^{high}-induced colitis by a TGF- β -dependent mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 5, p. 2516-2522, 2003. DOI: 10.4049/jimmunol.170.5.2516. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.5.2516>. Acesso em: 09 fev. 2025.
- OLINTO, V. G. **Expressão heteróloga de fragmentos de anticorpos ancorados à parede de *Saccharomyces boulardii***. 2024.
- QU, S.; et al. Akkermansia muciniphila alleviates dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis by NLRP3 activation. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 2, 2021.
- RIDDELL, Stanley R.; GREENBERG, Philip D. The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 128, n. 2, p. 189-201, 1990.

RIZVI, S. M. A.; PRAJAPATI, H. K.; GHOSH, S. K. The 2 micron plasmid: a selfish genetic element with an optimized survival strategy within *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 64, p. 25–42, 2018.

ROBLIN, Xavier; et al. Addition of azathioprine to the switch of anti-TNF in patients with IBD in clinical relapse with undetectable anti-TNF trough levels and antidrug antibodies: a prospective randomised trial. **Gut**, v. 69, n. 7, p. 1206-1212, 2020.

RODRÍGUEZ-NOGALES, A.; et al. Intestinal anti-inflammatory effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* in DSS-induced colitis in mice: impact on microRNAs expression and gut microbiota composition. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 61, p. 129–139, 2018.

ROSELLI, M.; FINAMORE, A. Use of synbiotics for ulcerative colitis treatment. **Current Clinical Pharmacology**, v. 15, n. 3, p. 174-182, 2020.

RYU, H. M.; et al. Immunomodulatory effects of a probiotic mixture: alleviating colitis in a mouse model through modulation of cell activation markers and the gut microbiota. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 16, p. 8571, 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11354276/>. Acesso em: 13 abr. 2025.

SANDBORN, W. J; et al. Efficacy and safety of vedolizumab subcutaneous formulation in a randomized trial of patients with ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 158, n. 3, 2020. DOI: 10.1053/j.gastro.2019.08.027. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31470005/>. Acesso em: 09 dez. 2024.

SASAKI, N.; et al. Oral anti-CD3 antibody treatment induces regulatory T cells and inhibits the development of atherosclerosis in mice. **Circulation**, v. 120, n. 20, p. 1996-2005, 2009. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.881146. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.881146>. Acesso em: 09 fev. 2025.

SASSAKI, L. Y.; et al. Real-world treatment patterns and disease control over one year in patients with inflammatory bowel disease in Brazil. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 23, p. 3396–3412, 2021.

SEGAL, J. P.; LeBLANC, J. F.; HART, A. L. Ulcerative colitis: an update. **Clinical Medicine (London)**, v. 21, n. 2, p. 135-139, 2021. DOI: 10.7861/clinmed.2021-0080. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8002778/>. Acesso em: 09 dez. 2024.

SELVARATNAM, S; et al. Epidemiology of inflammatory bowel disease in South America: a systematic review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 47, p. 6866-6875, 2019. DOI: 10.3748/wjg.v25.i47.6866. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31885427/>. Acesso em: 14 nov. 2024.

SHIMOI, H.; et al. Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 13, p. 3381-3387, 1998.

SHIN, J.; et al. Engineering *Saccharomyces boulardii* for cell surface display of heterologous protein. **Journal of Biotechnology**, 2025, v. 397, p. 44-50, 2025.

SIEW, N.G.; et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **The Lancet**, v. 390, n. 10114, p. 2769-2778, 2017.

SMITH, Patrick M.; et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. **Science**, v. 341, n. 6145, p. 569-573, 2013.

SINGH, N.; BERNSTEIN, C. N. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. **United European Gastroenterology Journal**, v. 10, n. 10, p. 1047-1053, 2022. DOI: 10.1002/ueg2.12319. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36262056/>. Acesso em: 14 nov. 2024.

- SINGH, S.; et al. Monoclonal Antibodies: A Review. **Current Clinical Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 85-99, 2018. DOI: 10.2174/1574884712666170809124728.
- STOLFI, C.; MARESCA, C.; MONTELEONE, G.; LAUDISI, F. Implication of intestinal barrier dysfunction in gut dysbiosis and diseases. **Biomedicines**, v. 10, n. 2, p. 289, 2022. DOI: 10.3390/biomedicines10020289. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35203499/>. Acesso em: 14 nov. 2024.
- STROBER, W.; KELSALL, B.; MARTH, T. Oral tolerance. **Journal of Clinical Immunology**, v. 18, p. 1-30, 1998. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1022556301410>. Acesso em: 09 dez. 2024.
- SUEZ, J.; et al. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. **Nature Medicine**, v. 25, p. 716-729, 2019. DOI: 10.1038/s41591-019-0439-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x>. Acesso em: 09 fev. 2025.
- SUGA, M.; HATAKEYAMA, T. High-efficiency electroporation by freezing intact yeast cells with addition of calcium. **Current Genetics**, v. 43, p. 206–211, 2003.
- ŚWIRKOSZ, G; et al. The role of the microbiome in the pathogenesis and treatment of ulcerative colitis—A literature review. **Biomedicines**, v. 11, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9032/11/1/45>. Acesso em: 14 nov. 2024.
- Teymennet-Ramírez, K.V.; Yeast Surface Display System: Strategies for Improvement and Biotechnological Applications **Frontier in Bioengineering and Biotechnology**. v. 9, n. 794742, 2022.
- THOMAS, S.; et al. Anti-inflammatory effects of *Saccharomyces boulardii* mediated by myeloid dendritic cells from patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 301, n. 6, 2011.
- TIAN, Z.; ZHAO, Q.; TENG, X. Anti-IL23/12 agents and JAK inhibitors for inflammatory bowel disease. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1393463, 2024. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1393463. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39086483/>. Acesso em: 09 dez. 2024.
- TORDESILLAS, L.; BERIN, M. C. Mechanisms of Oral Tolerance. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 55, n. 2, p. 107-117, 2018. DOI: 10.1007/s12016-018-8680-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8680-5>. Acesso em: 09 fev. 2025.
- 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, p. 2142-2151, 2019. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/68/12/2142>. Acesso em: 14 nov. 2024.
- VOSENKÄMPER, A.; et al. A CD3-specific antibody reduces cytokine production and alters phosphoprotein profiles in intestinal tissues from patients with inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 147, n. 1, p. 172-183, 2014. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.03.049. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.03.049>. Acesso em: 09 fev. 2025.
- WAN, Y.Y.; FLAVELL, R.A. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 14, p. 5126-5131, 2005.
- WIRTZ, S.; et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. **Nature Protocols**, v. 12, n. 7, p. 1295-1309, 2017.
- WHO. World Health Organization; Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. Roma, 2006.

WU, H. Y.; et al. Mucosal anti-CD3 monoclonal antibody attenuates collagen-induced arthritis that is associated with induction of LAP⁺ regulatory T cells and is enhanced by administration of an emulsome-based Th2-skewing adjuvant. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 6, p. 3401-3407, 2010.

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, p. 586-596, 2009.

WU, H.; et al. Global gene expression analysis of yeast cells during sake brewing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7353-7358, 2006.

WU, Y.; et al. Probiotics (*Lactobacillus plantarum* HNU082) supplementation relieves ulcerative colitis by affecting intestinal barrier functions, immunity-related gene expression, gut microbiota, and metabolic pathways in mice. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 6, 2022.

XU, X. et al. Both *Saccharomyces boulardii* and its postbiotics alleviate dextran sulfate sodium-induced colitis in mice, association with modulating inflammation and intestinal microbiota. **Nutrients**, v. 15, n. 6, p. 1484, 2023.

YANG, Xiaoyu; et al. Development of novel surface display platforms for anchoring heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial cell factories**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2019.

YASUDA, K.; TAKEUCHI, Y.; HIROTA, K. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. **Seminars in Immunopathology**, v. 41, p. 283-297, 2019.

ZALTMAN, C.; et al. Real-world disease activity and sociodemographic, clinical and treatment characteristics of moderate-to-severe inflammatory bowel disease in Brazil. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 2, p. 208-223, 2021. DOI: 10.3748/wjg.v27.i2.208. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33510560/>. Acesso em: 14 nov. 2024.

ZHANG, H.; CHEN, W. Interleukin 6 inhibition by triptolide prevents inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. **Experimental Therapeutic Medicine**, v. 14, n. 3, p. 2271-2276, 2017.

ZHANG, Q.; et al. Mesenteric lymph nodes: a critical site for the up-regulatory effect of hUC-MSCs on Treg cells by producing TGF- β 1 in colitis treatment. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 15, p. 190, 2024.

ZHANG, R. Y.; SHEN, W. D. Monoclonal antibody expression in mammalian cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 907, p. 341-358, 2012. DOI: 10.1007/978-1-61779-974-7_20. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22907362>. Acesso em: 09 dez. 2024.

ZENDEBOODI, F.; KHORSHIDIAN, N.; MORTAZAVIAN, A. M.; DA CRUZ, A. G. Probiotic: conceptualization from a new approach. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 103-123, 2020. DOI: 10.1016/j.cofs.2019.12.001. Acesso em: 09 fev. 2025.

ZOU, J; et al. Cross talk between gut microbiota and intestinal mucosal immunity in the development of ulcerative colitis. **Infection and Immunity**, v. 89, 2021. DOI: 10.1128/iai.00014-21. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33518896/>. Acesso em: 14 nov. 2024.