

Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**OTIMIZAÇÃO DA ENTREGA E DA APRESENTAÇÃO DE
ANTICORPOS ANTI-CD3 NA LEVEDURA *Saccharomyces boulardii*
PARA APLICAÇÃO EM BIOTERAPIAS ORAIS**

Pietra Oliveira Guimarães

BRASÍLIA- DF
2026

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**OTIMIZAÇÃO DA ENTREGA E DA APRESENTAÇÃO DE
ANTICORPOS ANTI-CD3 NA LEVEDURA *Saccharomyces boulardii*
PARA APLICAÇÃO EM BIOTERAPIAS ORAIS**

Pietra Oliveira Guimarães

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia molecular.

Área de Concentração: Genética humana e de microrganismos

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brigido.

Coorientador: Prof. Dra. Andrea Queiroz Maranhão.

BRASÍLIA- DF
2026

Pietra Oliveira Guimarães

**OTIMIZAÇÃO DA ENTREGA E DA APRESENTAÇÃO DE
ANTICORPOS ANTI-CD3 NA LEVEDURA *SACCHAROMYCES
BOULARDII* PARA APLICAÇÃO EM BIOTERAPIAS ORAIS**

Trabalho desenvolvido no laboratório de
Imunologia Molecular da Universidade de
Brasília, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo
de Macedo Brígido e coorientação da Prof.
Dra. Andrea Queiroz Maranhão.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Prof. Dr. João Ricardo Moreira de Almeida

Prof. Dr. Gabriel Sérgio Costa Alves

Agradecimentos

Aos meus orientadores Marcelo Brigido e Andrea Maranhão. Entrei na biologia com total certeza de que gostava de ciência. Queria ser pesquisadora, só não sabia de qual assunto, porque eu gostava de todos (quase). No meio da graduação, em época de pandemia, fiz biologia molecular com o professor Marcelo. Eu desacreditava que seria uma matéria interessante, confesso. Erro meu. Na verdade, nenhum outro assunto tinha chamado tanto a minha atenção. Pouco tempo depois, saí da minha pesquisa em comportamento animal e entrei no laboratório do Marcelo, onde tive o privilégio de conhecer a professora Andrea, foi a melhor escolha da minha graduação. Tenho profunda admiração por ambos, como pessoas e como pesquisadores. Por isso, agradeço a oportunidade de contribuir para a pesquisa de vocês desde 2022. Agradeço a confiança em momentos delicados. Agradeço o ambiente acadêmico leve e engrandecedor.

À minha família. Concluir esse trabalho só foi possível pelo apoio imensurável dos meus pais, irmão e demais familiares e amigos. Não sei se meus pais iriam gostar de imunologia molecular. Minha mãe é matemática, meu pai se formou em geografia e em direito. Eu não entendo de recursos especiais nem de cálculo 3. E eles não têm ideia do que eu faço. Mesmo assim, eles incentivam incondicionalmente. A eles, eu agradeço profundamente.

Aos meus amigos e colegas de trabalho. Primeiramente, agradeço ao meu irmão adotivo Renato pelos 7 anos de parceria, minha passagem pela UnB não teria sido tão marcante sem você me esperando em todas as salas de aula. À Sylvia, por ser a melhor dupla de pesquisa já vista nesse planeta e por realizar os caprichos de uma certa levedura comigo. À equipe da colite Ana e Isadora, por toda a ajuda. Ao Paulo Vitor, por ter trazido mais risadas pra minha rotina. Aos demais queridos Ana Clara, Bel, Dyane, Igor, Lucas, Luísa, Manuela, Maria e Werneck, pelo prazer de trabalhar com todos vocês. Ao moço da banca do icc sul, por sempre escolher o pão-de-queijo mais quentinho pra me vender nos intervalos dos experimentos.

Um agradecimento especial à toda equipe de médicos, enfermeiros, técnicos e demais funcionários do hospital Sírio-Libanês.

Ao PPG-Patologia molecular, à Capes, à FAPDF e ao INCT Mucosas e Pele pelo suporte.

"É a observação, não o olhar, que revela o segredo das coisas".

(Arthur Conan Doyle)

Resumo

Desenvolvemos uma plataforma de bioterapia baseada na levedura *Saccharomyces boulardii* geneticamente modificada para expressar um fragmento variável de cadeia única (scFv) anti-CD3 ancorado à parede celular, combinando o perfil probiótico do microrganismo com a atividade imunossupressora do anticorpo para aplicação em terapias orais. Foram construídos e caracterizados sistemas de expressão baseados em vetores episossomais 2 μ e em vetores integrativos mediados por elementos Ty. O sistema integrativo apresentou desempenho superior em todos os parâmetros avaliados, com eficiência de transformação 5 vezes maior em comparação ao sistema episossomal e níveis significativamente mais elevados de expressão heteróloga, com 95,6% das células produtoras versus 58,1% no sistema 2 μ ($p = 0,002$). Adicionalmente, o vetor integrativo demonstrou elevada estabilidade genética ao longo de gerações sucessivas, sem evidências de perda do cassete de expressão ou de estresse metabólico associado. Visando otimizar a entrega oral do sistema, foi desenvolvido um encapsulamento lipídico à base de DOPA e colesterol (4:1), que promoveu aumento da viabilidade celular de 1,4 vezes em fluido gástrico simulado e de 1,8 vezes em fluido intestinal simulado *in vitro*. Na validação do *delivery in vivo* por imageamento de fluorescência em camundongos BALB/c, o encapsulamento aumentou em pelo menos três vezes o tempo de detecção da proteína heteróloga repórter em comparação ao controle não encapsulado. Em conjunto, os resultados estabelecem *S. boulardii* como uma plataforma robusta para expressão constitutiva estável e para entrega oral de fragmentos de anticorpos. Estudos futuros deverão concentrar-se na aplicação desse sistema terapêutico em modelos experimentais de doenças inflamatórias.

Palavras-chave: *Saccharomyces boulardii*; anti-CD3; expressão heteróloga; *delivery*; bioterapia.

Abstract

We developed a biotherapeutic platform based on the yeast *Saccharomyces boulardii* genetically engineered to express a cell wall–anchored anti-CD3 single-chain variable fragment (scFv), combining the probiotic profile of the microorganism with the immunosuppressive activity of the antibody for oral therapeutic applications. Expression systems based on 2 μ episomal vectors and Ty element–mediated integrative vectors were constructed and characterized. The integrative system outperformed the episomal system across all evaluated parameters, exhibiting a 5-fold higher transformation efficiency and significantly increased levels of heterologous expression, with 95.6% producing cells compared to 58.1% in the 2 μ system ($p = 0.002$). In addition, the integrative vector demonstrated high genetic stability over successive generations and no evidence of expression cassette loss or associated metabolic stress. To optimize oral delivery, a lipid-based encapsulation composed of DOPA and cholesterol (4:1) was developed, resulting in a 1.4-fold increase in cell viability in simulated gastric fluid and a 1.8-fold increase in simulated intestinal fluid *in vitro*. *In vivo* validation by fluorescence imaging in BALB/c mice showed that the encapsulation increased the detection of the heterologous reporter protein by at least three times longer compared to the non-encapsulated control. Collectively, these results establish *S. boulardii* as a robust platform for stable, constitutive expression and oral delivery of antibody fragments. Future studies should focus on applying this therapeutic system in experimental models of inflammatory diseases.

Keywords: *Saccharomyces boulardii*; anti-CD3; heterologous expression; delivery; biotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa do plasmídeo pSEDsa-CD3.	24
Figura 2	Confirmação do vetor pSEDsa-CD3 por análise de restrição enzimática.	36
Figura 3	Efeito da luz ultravioleta na eficiência de transformação de <i>S. boulardii</i> .	41
Figura 4	Confirmação de transformantes de <i>S. boulardii</i> por PCR de colônia.	41
Figura 5	Mapa dos plasmídeos pTy2sb-GFP, pTy2-GFP e pTy1.2-GFP.	43
Figura 6	Confirmação dos vetores Ty por análise de restrição enzimática.	43
Figura 7	Eficiência de transformação em função de diferentes vetores.	44
Figura 8	Confirmação de transformantes de <i>S. boulardii</i> por PCR de colônia.	45
Figura 9	Caracterização celular dos clones de <i>S. boulardii</i> .	46
Figura 10	Análise por microscopia confocal da expressão de GFP nos clones Ty.	47
Figura 11	Análise por citometria de fluxo da expressão de GFP nos clones Ty.	48
Figura 12	Mapa dos plasmídeos pTysb-2c11-Sed1-GFP e pTysb-2c11-Sed1.	48
Figura 13	Confirmação dos vetores Ty anti-CD3 por restrição enzimática.	49
Figura 14	Estabilidade genética dos vetores 2 μ e TyCD3 por plaqueamento.	50
Figura 15	Estabilidade genética dos vetores 2 μ e TyCD3 por PCR.	50
Figura 16	Análise por citometria de fluxo da expressão de anti-CD3.	51
Figura 17	Análise por citometria de fluxo da expressão de GFP.	52
Figura 18	Efeito da temperatura na expressão heteróloga do anticorpo.	53
Figura 19	Análise da estabilidade da expressão heteróloga.	54
Figura 20	Análise do clone superprodutor por citometria de fluxo.	55
Figura 21	Comparação de expressão em função da linhagem e do protocolo.	56
Figura 22	Curva de crescimento dos clones de <i>S. boulardii</i> .	57
Figura 23	Eficiência e manutenção do encapsulamento de <i>S. boulardii</i> .	58
Figura 24	Efeito do encapsulamento lipídico na viabilidade de <i>S. boulardii</i> .	59
Figura 25	Ensaio <i>in vivo</i> do delivery <i>S. boulardii</i> com e sem cápsula.	61
Figura 26	Ensaio <i>ex vivo</i> do delivery de <i>S. boulardii</i> com e sem cápsula.	62
Figura 27	Representação do ponto isoelétrico (pI) do scFv anti-CD3.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Legenda das linhagens de <i>S. boulardii</i> utilizadas nesse trabalho.	26
Tabela 2	Sequência dos iniciadores para o gene G418 e para o gene do scFv.	31
Tabela 3	Determinação da concentração inibitória mínima de G418.	37
Tabela 4	Efeito do tempo de recuperação na eficiência de transformação.	37
Tabela 5	Efeito da intensidade do pulso e da resistência na eletroporação.	38
Tabela 6	Efeito da intensidade do pulso e da densidade óptica na eletroporação.	38
Tabela 7	Eficiência de transformação por choque térmico.	39
Tabela 8	Viabilidade de <i>S. boulardii</i> incubada em diferentes soluções.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
2 μ	Plasmídeo 2 microns
DO ₆₀₀	Densidade óptica medida a 600 nm
FSC	Dispersão frontal (<i>forward scatter</i>)
GFP	Proteína fluorescente verde (<i>green fluorescent protein</i>)
h	Hora
IVIS	Sistema de imageamento in vivo (<i>in vivo imaging system</i>)
kb	Quilobases
kV	Quilovolt
LB	Meio de cultura Luria–Bertani
MFI	Intensidade média de fluorescência (<i>mean fluorescence intensity</i>)
mg	Miligramma
min	Minuto
ms	Milissegundo
μ F	Microfarad
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
mL	Mililitro
n	Número de amostras ou animais por grupo
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
Ω	Ohm
p	Valor de significância estatística
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pI	Ponto isoelétrico
ROI	Região de interesse (<i>region of interest</i>)
rpm	Rotações por minuto
scFv	Fragmento variável de cadeia única (<i>single-chain variable fragment</i>)

SSC	Dispersão lateral (<i>side scatter</i>)
Ty	Elemento transponível de levedura
UFC	Unidade formadora de colônia
V	Volt
V/cm	Volts por centímetro
WT	Linhagem selvagem (<i>wild type</i>)
× g	Força centrífuga relativa
YPD	Meio de cultura Yeast Extract Peptone Dextrose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Bioterapias e anticorpos recombinantes	15
1.2 Imunomodulação com anticorpos anti-CD3	17
1.3 <i>Saccharomyces boulardii</i> como plataforma bioterapêutica	18
1.4 Sistemas de revestimento para administração oral	20
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	23
3.1.2 Objetivos específicos	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Desenho e construção dos vetores de expressão	24
4.1.1 Vetor episomal para expressão de scFv anti-CD3	24
4.1.2 Vetores integrativos para expressão de scFv anti-CD3	25
4.2 Expansão clonal	26
4.2.1 Confirmação da identidade dos vetores por análise de restrição enzimática	27
4.3. Transformação de <i>S. boulardii</i>	28
4.3.1 Isolamento de <i>S. boulardii</i>	28
4.3.2 Transformação de <i>S. boulardii</i> por eletroporação	28
4.3.3 Transformação de <i>S. boulardii</i> por choque térmico	29
4.3.4. Confirmação da transformação	30
4.4. Caracterização dos clones de <i>S. boulardii</i>	31
4.4.1 Curva de crescimento	31
4.4.2 Determinação da concentração de marca seletiva	31
4.4.3 Determinação da solução para manutenção da viabilidade celular	32
4.4.4 Estabilidade genética dos vetores	32
4.4.5 Expressão do anti-CD3	32
4.5 Cápsula lipídica	33
4.5.1 Encapsulamento da levedura	33
4.5.1 Detecção da cápsula	33
4.5.1 Ensaio in vitro com leveduras encapsuladas	34
4.5.2 Ensaio in vivo com leveduras encapsuladas	34
4.5.3 Análises estatísticas	35
4.5.4 Determinação do Perfil de Carga e Ponto Isoelétrico in silico	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5.1 Desenvolvimento do vetor de expressão e clonagem	36
5.1.1 Confirmação do vetor episomal 2 μ para expressão de scFv anti-CD3	36
5.1.2 Otimização do protocolo de transformação de <i>S. boulardii</i> com o vetor 2 μ	36
5.1.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima de geneticina	36

5.1.2.2	Comparação entre eletroporação e choque térmico com o vetor 2 μ	37
5.1.2.3	Efeito da irradiação UV na eficiência de transformação com o vetor 2 μ	40
5.1.3	Confirmação molecular dos transformantes com o vetor 2 μ	41
5.1.4	Desenvolvimento de vetores integrativos baseados em elementos Ty	42
5.1.4.1	Eficiência de transformação	43
5.1.4.2	Confirmação molecular da integração do cassette	44
5.1.4.3	Caracterização celular dos clones	45
5.1.4.3	Vetores integrativos para a expressão de anticorpo	48
5.2	Caracterização dos clones produtores de anticorpo	49
5.2.1	Estabilidade genética: comparação entre sistemas episomal e integrativo	49
5.2.2	Expressão heteróloga	51
5.2.3	Curva de crescimento	57
5.3	Revestimento lipídico	58
5.3.1	Detecção do revestimento lipídico	58
5.3.2	Análise do efeito do revestimento in vitro	59
5.3.3	Análise do efeito do revestimento in vivo	60
5.3.4	Análise do efeito do revestimento ex vivo	61
5.3.5	Análise do perfil de estabilidade do scFv in silico	62
6	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

Como alternativa às limitações das abordagens bioterapêuticas clássicas, emergiram os *Engineered Live Biotherapeutic Products* (eLBPs), baseados em microrganismos vivos geneticamente modificados para produzir e liberar moléculas bioativas diretamente no sítio de ação (FDA, 2016). O primeiro ensaio clínico com eLBP, publicado em 2007, utilizou *Lactococcus lactis* modificada para expressar interleucina-10 humana *in situ* em pacientes com doença inflamatória intestinal (Frossard et al., 2007). Essa abordagem demonstrou a viabilidade de microrganismos atuarem simultaneamente como biorreatores e veículos de entrega, oferecendo vantagens substanciais em relação às bioterapias convencionais: síntese contínua e localizada da molécula terapêutica, proteção natural contra degradação enzimática, aumento da biodisponibilidade no tecido-alvo e redução de efeitos colaterais sistêmicos (Omer et al., 2022).

Entre os microrganismos candidatos para formulações eLBP, *Saccharomyces boulardii* destaca-se por combinar atributos biológicos relevantes com histórico clínico de segurança (Moslehi-Jenabian et al., 2010). Trata-se de uma levedura probiótica utilizada há mais de seis décadas, cuja ação inclui modulação benéfica da microbiota, reforço da barreira mucosa e efeitos anti-inflamatórios locais (McFarland, 2010; Vandenplas et al., 2008). Do ponto de vista biotecnológico, a *S. boulardii* apresenta capacidade robusta para expressão e secreção de proteínas heterólogas com modificações pós-traducionais eucarióticas, essenciais para a funcionalidade de moléculas complexas (Verma et al., 1998). Adicionalmente, a parede celular espessa confere proteção natural às proteínas ancoradas ou secretadas, preservando integridade e atividade durante o trânsito pelo trato gastrointestinal. Assim, a combinação dos atributos biológicos, farmacológicos e biotecnológicos posiciona a *S. boulardii* como plataforma particularmente adequada para a entrega de biofármacos.

A aplicação dessa plataforma é especialmente atrativa no contexto de anticorpos anti-CD3, cuja administração oral é viável e promissora devido à tolerância induzida por esse anticorpo. Os anticorpos anti-CD3 interagem com o complexo CD3 do receptor de células T, induzindo sinais de intensidade intermediária que favorecem perfis tolerogênicos: aumento de FOXP3, CTLA-4 e IL-10, com consequente expansão de células T reguladoras e supressão de respostas pró-inflamatórias (Chatenoud et al., 1994; Belghith et al., 2003; Kohm et al., 2005). Resultados pré-clínicos e clínicos indicam que a via oral promove imunomodulação local sem imunossupressão sistêmica e evita a síndrome de liberação de citocinas associada à via

intravenosa, além de induzir tolerância por mecanismos de *bystander suppression* (Ochi et al., 2006; Chatenoud & Bluestone, 2007).

No entanto, a tradução dessa estratégia para a clínica permanece limitada. A degradação proteolítica no TGI, a instabilidade de anticorpos frente a variações extremas de pH e a baixa biodisponibilidade local comprometem a eficácia terapêutica da administração oral (Mahler et al., 2003; Brayden & Mrsny, 2011; Khafagy et al., 2007). Nesse cenário, a engenharia de *S. boulardii* para expressar anticorpos anti-CD3 emerge como uma alternativa: a produção contínua e localizada não apenas aumenta a concentração local do anticorpo, como também o protege durante o trânsito, mitigando a perda de atividade. Embora a levedura ofereça proteção intrínseca, estratégias complementares de encapsulamento podem reforçar ainda mais a eficiência dessa plataforma. Sistemas de encapsulamento físico-químico adicionam uma barreira que melhora a viabilidade celular e protege o anticorpo contra degradação prematura (Cook et al., 2012; Cao & Liu, 2024).

Em suma, propomos que a engenharia de *S. boulardii* para expressão de anticorpos anti-CD3, associada ao encapsulamento, constitui uma plataforma alternativa para terapias orais. Espera-se que essa abordagem integrada supere limitações das terapias convencionais, ampliando eficácia por meio de sinergia entre probiótico e imunomodulação, de preservação estrutural e de aumento da biodisponibilidade *in situ*.

1.1 Bioterapias e anticorpos recombinantes

A bioterapia é entendida pela Food and Drug Administration (FDA, 2020) como o conjunto de intervenções terapêuticas derivadas de organismos, seus componentes ou produtos recombinantes. Apesar do termo moderno, trata-se de uma abordagem aplicada desde o final do século XVIII, quando os primeiros experimentos com organismos vivos demonstraram a possibilidade de manipular o sistema imunológico por meio de produtos biológicos. Em 1796, o médico britânico Edward Jenner desenvolveu a primeira vacina ao inocular o vírus da varíola bovina em uma criança que, em seguida, se tornou imune à doença (Jenner, 1801). Em 1890, o cirurgião americano William Coley administrou toxinas bacterianas em pacientes com câncer após observar a regressão de tumores associada à infecção pela bactéria *Streptococcus pyogenes* (Coley WB, 1910).

Com o advento da engenharia genética entre as décadas de 1970 e 1980, a produção de proteínas e de organismos recombinantes possibilitou novos avanços na pesquisa em saúde. Em 1982, a FDA aprovou a primeira droga produzida por um microrganismo: a insulina humana recombinante sintetizada pela bactéria *Escherichia coli* (Goeddel et al., 1979). Subsequentemente, anticorpos monoclonais (Köhler & Milstein, 1975) e citocinas (Weissmann, 1982) passaram a compor o arsenal bioterápico. Ao final do século XX, a evolução da biologia molecular permitiu o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas (Drews, 2000), incluindo vírus oncolíticos, terapias gênicas e RNA de interferência (RNAi). Dessa forma, as pesquisas sobre bioterapia expandiram-se para o tratamento de câncer, doenças autoimunes, distúrbios metabólicos, infecções e doenças genéticas raras.

Os anticorpos recombinantes foram precursores para terapias baseadas no design de moléculas capazes de reconhecer antígenos com alta especificidade. Esse campo deriva diretamente das descobertas sobre a estrutura dos anticorpos, sobretudo os trabalhos de Gerald Edelman e Rodney Porter nas décadas de 1950 e 1960, que renderam o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1972 pela elucidação da estrutura das imunoglobulinas. Entretanto, a transição de conhecimento estrutural para aplicação terapêutica só ocorreu após os avanços das técnicas de hibridoma descritas por Köhler e Milstein em 1975, também laureados com o Nobel em 1984. Essa tecnologia permitiu, pela primeira vez, a produção estável de anticorpos monoclonais em larga escala, contribuindo para uma das transformações mais expressivas da biotecnologia do século XX (Liu, 2014).

A partir dos anos 1980 e 1990, a biologia molecular expandiu as possibilidades da engenharia de anticorpos por meio de estratégias recombinantes capazes de superar as limitações dos anticorpos murinos originais, principalmente a imunogenicidade e a baixa meia-vida (Cole et al., 1984). Nesse período, a humanização e a engenharia de CDRs consolidaram a produção de anticorpos como uma tecnologia modular, versátil e progressivamente mais precisa. Em paralelo, surgiram esforços pioneiros para produzir anticorpos recombinantes em microrganismos com o objetivo de estabelecer sistemas de expressão mais simples, econômicos e escaláveis (Skerra & Plückthun, 1988).

1.2 Imunomodulação com anticorpos anti-CD3

O desenvolvimento de anticorpos anti-CD3 iniciou-se ao final da década de 1970, quando o grupo de Thomas A. Waldmann e Jonathan W. Uhr identificou o potencial de anticorpos contra o complexo CD3 para regular a ativação de linfócitos T. Posteriormente, produzido pelo laboratório de John Abbott, o anticorpo murino OKT3 foi aprovado pela FDA em 1986, tornando-se o primeiro anticorpo monoclonal terapêutico licenciado nos Estados Unidos (Ortho Multicenter Transplant Study Group, 1985). Essa aprovação marcou o início do uso clínico de anticorpos imunomoduladores e, conseqüentemente, possibilitou a manipulação direta dos circuitos de ativação, expansão e tolerância dos linfócitos T.

A modulação do CD3 por meio de anticorpos monoclonais foi inicialmente explorada no contexto de transplantes, no qual o muromonab-CD3 (OKT3), anticorpo murino IgG2a, foi aprovado para prevenção e tratamento de rejeição aguda mediada por células T (Cosimi et al., 1981). Contudo, estudos clínicos subsequentes evidenciaram que a administração intravenosa do anti-CD3 promove ativação policlonal transitória de linfócitos T remanescentes, acompanhada por liberação sistêmica de citocinas inflamatórias, caracterizando a síndrome de liberação de citocinas (Chatenoud et al., 1990). Além disso, observou-se depleção significativa de células T periféricas, o que restringiu de forma substancial o uso clínico prolongado dessa abordagem.

A administração oral de anticorpos anti-CD3, em contraste com a via parenteral, resulta em perfil de ação radicalmente distinto, caracterizado pela ausência de depleção sistêmica de células T e por efeitos imunomodulatórios associados predominantemente à mucosa intestinal (Ochi et al., 2006). Nesses modelos, o tratamento oral foi capaz de induzir estados de tolerância imunológica sem evidências de imunossupressão sistêmica significativa. Do ponto de vista mecanístico, os dados experimentais disponíveis indicam que a interação do anti-CD3 com linfócitos T da lâmina própria intestinal ocorre em um contexto de baixa ou ausente coestimulação, condição associada à indução de estados de não responsividade funcional, como anergia, ou à eliminação de populações efetoras hiperativadas (Smith et al., 1997). Revisões integrativas da literatura sustentam que mecanismos semelhantes estejam envolvidos na tolerância induzida pelo anti-CD3 administrado por via oral (Chatenoud & Bluestone, 2007).

Paralelamente, o anti-CD3 oral demonstrou favorecer a expansão de populações reguladoras, incluindo linfócitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, reconhecidamente centrais para a manutenção da tolerância periférica (Belghith et al., 2003). Essas células produzem citocinas imunossupressoras, como TGF- β , capazes de modular a função de células apresentadoras de antígenos e suprimir respostas efetoras patogênicas.

Além das Tregs Foxp3⁺, o anti-CD3 oral induz populações de células T produtoras de IL-10, frequentemente classificadas como células Tr1, bem como outras populações reguladoras, contribuindo para o estabelecimento de um microambiente imunológico tolerogênico na mucosa intestinal (Ochi et al., 2006). Esse estado regulatório apresenta ainda o fenômeno de *bystander suppression*, no qual células reguladoras ativadas em resposta a um determinado estímulo são capazes de suprimir respostas inflamatórias dirigidas a antígenos distintos presentes no mesmo microambiente tecidual (Weiner et al., 1994).

Assim, esses dados demonstram a possibilidade, embora ainda pouco explorada experimentalmente, do uso da via oral para modular seletivamente a resposta imunológica no trato gastrointestinal.

1.3 *Saccharomyces boulardii* como plataforma bioterapêutica

A *Saccharomyces boulardii* é uma levedura não patogênica taxonomicamente próxima à *Saccharomyces cerevisiae*, porém apresenta características fenotípicas distintas que favorecem sua aplicação clínica. Entre elas, destaca-se a resistência à temperatura corporal de 37°C e ao pH ácido (McFarland, 2010; Kelesidis & Pothoulakis, 2012), o que possibilita a passagem da levedura pelo trato gastrointestinal. Outro aspecto relevante é a incapacidade da *S. boulardii* em colonizar permanentemente o intestino (Buts et al., 1994; McFarland, 2010); essa característica reduz preocupações relacionadas à persistência de microrganismos geneticamente modificados e reforça sua adequação para aplicações terapêuticas controladas.

Do ponto de vista biotecnológico, *S. boulardii* apresenta maquinaria de expressão eucariótica compatível com modificações pós-traducionais complexas, incluindo N-glicosilação, O-glicosilação, formação de pontes dissulfeto e processamento proteolítico, essenciais para a funcionalidade de proteínas terapêuticas, como anticorpos (Romanos et al., 1992; Walsh & Jefferis, 2006). Outro diferencial é a facilidade de manipulação da parede celular para fins de ancoragem proteica. A *S. boulardii* apresenta composição e organização

da parede semelhantes às de *S. cerevisiae*, permitindo o uso dos sistemas clássicos de *yeast surface display*, baseados em proteínas como α -aglutinina, Sed1, Cwp1 e Flo1 (Tanaka et al., 2012).

Além das propriedades biotecnológicas, a *S. boulardii* apresenta atividades terapêuticas intrínsecas que contribuem diretamente para sua relevância clínica. Em modelos de colite experimental, *S. boulardii* reduz o estresse oxidativo ao induzir a expressão de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase e catalase, e preserva a expressão de proteínas de junção oclusiva, incluindo ocludina, claudina-1 e ZO-1 (Wu et al., 2008). Em pacientes com doença de Crohn, melhora a permeabilidade intestinal por meio do aumento da expressão de mucinas (MUC2 e MUC3) e da redução da apoptose de enterócitos (Vilela et al., 2008). A levedura também diminui a severidade da mucosite intestinal induzida por quimioterapia ao estimular a proliferação celular nas criptas e acelerar a renovação epitelial (Sezer et al., 2009). Adicionalmente, restaura vias de transporte de fluidos e eletrólitos por regular positivamente transportadores de membrana, como o trocador sódio-hidrogênio (NHE3), e por inibir a secreção de cloreto dependente de AMPc (Schroeder et al., 2004).

As propriedades imunomoduladoras da *S. boulardii* constituem outro componente essencial de sua ação terapêutica. A levedura estimula a produção de imunoglobulina A secretória (IgA) por células plasmáticas da lâmina própria, fortalecendo a defesa imunológica da mucosa (Pothoulakis, 2008). Simultaneamente, aumenta a concentração sérica de IgG, contribuindo para a resposta imune sistêmica. Além disso, induz a produção de citocinas anti-inflamatórias por células dendríticas e macrófagos intestinais através da ativação de receptores de reconhecimento padrão, especialmente TLR2 e TLR6, ao mesmo tempo em que inibe a ativação de MAP quinases (ERK1/2, p38 e JNK), reduzindo assim a síntese de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α e IL-8 (Pothoulakis, 2008). Adicionalmente, a *S. boulardii* promove o aprisionamento de linfócitos T helper nos linfonodos mesentéricos por modular a expressão de moléculas de adesão, particularmente integrinas $\alpha4\beta7$ e selectinas, limitando desse modo a migração dessas células para a mucosa intestinal e diminuindo a intensidade da resposta inflamatória (Pothoulakis, 2008).

Em conjunto, esses mecanismos demonstram que a levedura atua de forma multifacetada no trato gastrointestinal, conferindo-lhe um perfil terapêutico amplo e integrado. A utilização de vetores bioterapêuticos vivos para a entrega de proteínas terapêuticas no trato gastrointestinal representa uma estratégia complementar à administração

sistêmica de anticorpos purificados, pois oferece vantagens potenciais relacionadas à estabilidade, à biodistribuição e à interação direta com o sistema imunológico da mucosa. Nesse contexto, a *S. boulardii* emerge como plataforma particularmente atrativa para bioterapia, uma vez que combina propriedades probióticas, histórico de uso seguro e características biotecnológicas favoráveis à expressão de proteínas heterólogas, formando um conjunto de atributos relevantes para aplicações terapêuticas no ambiente intestinal (Azevedo, 2021; Olinto, 2023; Pinhate, 2025).

1.4 Sistemas de revestimento para administração oral

A modificação da interface celular de microrganismos probióticos tem sido amplamente investigada como estratégia para aprimorar a estabilidade e a funcionalidade de sistemas terapêuticos baseados em células vivas. Nesse contexto, diferentes abordagens vêm sendo exploradas, incluindo o emprego de polissacarídeos aniônicos, nanopartículas híbridas e, de maneira particularmente relevante, revestimentos lipídicos baseados em fosfolipídios e lipossomas. Esses sistemas têm como objetivo principal aumentar a resistência ao ambiente ácido gástrico, reduzir a clivagem por proteases pancreáticas e mitigar os efeitos desnaturantes dos sais biliares, fatores que comprometem de forma significativa a estabilidade de proteínas recombinantes expostas na superfície celular ou secretadas localmente (Zhang et al., 2018; Cao et al., 2020).

Entretanto, apesar de seu potencial, essas estratégias enfrentam limitações metodológicas importantes. A aplicação de revestimentos deve preservar a fisiologia microbiana e permitir a difusão adequada de nutrientes e metabólitos. Matrizes poliméricas espessas, embora eficazes como barreiras físico-químicas, podem reduzir a viabilidade celular e prejudicar a atividade metabólica da levedura. Por outro lado, lipossomas livres ou fracamente associados à superfície celular apresentam estabilidade limitada *in vivo*, uma vez que não garantem ancoragem direta e duradoura à parede celular, especialmente sob condições dinâmicas do TGI (Zhou et al., 2019; Koo et al., 2021).

Nesse cenário, sistemas de deposição lipídica inspirados em mecanismos bioadesivos naturais emergem como alternativas conceitualmente mais robustas. Estratégias baseadas na 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) exploram interações físico-químicas análogas às observadas nas proteínas adesivas de mexilhões marinhos, cuja elevada afinidade por superfícies orgânicas e inorgânicas decorre da presença de grupos catecólicos altamente reativos (Lee et

al., 2007; Waite, 2017). Essa propriedade confere à DOPA o papel de intermediário adesivo universal, permitindo a ancoragem estável de componentes lipídicos a grupos funcionais da parede celular fúngica como mananas, glucanas e proteínas estruturais, sem promover imobilização celular ou perturbações críticas da integridade da levedura (Sedó et al., 2013; Lynge et al., 2011).

A associação sinérgica entre DOPA e colesterol apresenta vantagens adicionais bem estabelecidas na literatura de biomateriais. Enquanto a DOPA assegura a fixação eficiente da camada lipídica à superfície celular, o colesterol atua como modulador estrutural da bicamada, reduzindo sua fluidez excessiva, controlando a permeabilidade e aumentando a estabilidade mecânica em ambientes aquosos e fisiológicos complexos (Yeagle, 2014; Allen & Cullis, 2013). Essa organização estrutural é particularmente relevante para aplicações no trato gastrointestinal, onde variações abruptas de pH, força iônica e composição enzimática impõem desafios severos à integridade de sistemas terapêuticos baseados em proteínas.

Dessa forma, o revestimento lipídico passa a atuar como uma camada complementar de estabilização, adicionando uma proteção físico-química adicional àquela já conferida pela própria célula de levedura. Ao estabelecer um revestimento biocompatível e estruturalmente estável por meio da interface DOPA/colesterol, o sistema busca reduzir a taxa de degradação tanto da célula quanto do anticorpo exposto, aumentando a probabilidade de que o anticorpo anti-CD3 ancorado alcance a mucosa do intestino distal em conformação estrutural e funcionalmente preservada.

2 JUSTIFICATIVA

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), incluindo colite ulcerativa e doença de Crohn, configuram condições crônicas que impõem impacto clínico, social e econômico significativo. A prevalência global dessas doenças cresce continuamente, com países recém-industrializados apresentando aumento superior a dez vezes entre 1990 e 2016 (Ng et al., 2017; Kaplan & Ng, 2025). Atualmente, o arsenal terapêutico baseia-se principalmente em anticorpos monoclonais anti-TNF α . Entretanto, aproximadamente 30-40% dos pacientes não respondem adequadamente ao tratamento inicial, e entre os respondedores, 23-46% perdem eficácia terapêutica ao longo do tempo devido ao desenvolvimento de anticorpos anti-droga (Ben-Horin, Kopylov & Chowers, 2014). Além disso, essas terapias exigem administração parenteral frequente, aumentando o risco de imunossupressão sistêmica e eventos adversos graves, incluindo infecções oportunistas como tuberculose e pneumonia (Toruner et al., 2008; Kane et al., 2008).

Adicionalmente, os custos dessas terapias constituem uma barreira relevante, que se reflete diretamente no alto preço dos biofármacos disponíveis comercialmente (Chen et al., 2024). No Brasil, os imunobiológicos são majoritariamente fornecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e representam cerca de 60% dos gastos totais em saúde pública no país (IEA-USP, 2017). Reconhecendo esse cenário, o Brasil tem destacado a necessidade estratégica de estimular a produção nacional de biofármacos e o desenvolvimento de plataformas terapêuticas inovadoras, no âmbito das políticas de Complexo Econômico-Industrial da Saúde (Brasil, 2017).

Portanto, a necessidade de estratégias terapêuticas mais seguras, eficazes e acessíveis impulsiona a busca por sistemas de entrega oral de proteínas terapêuticas. Probióticos convencionais, como *Lactococcus lactis*, demonstram potencial para entrega de moléculas bioativas, mas apresentam limitações como baixa sobrevivência em pH ácido (Braat et al., 2006). Diante do exposto, a *Saccharomyces boulardii* surge como uma plataforma mais adequada para entrega oral de fármacos por ser mais resistente às condições do TGI (Graff et al., 2008; McFarland, 2010). Apesar do potencial teórico, a literatura sobre engenharia genética de *S. boulardii* continua limitada. Em comparação com *Saccharomyces cerevisiae*, cuja biologia molecular e capacidade de expressão heteróloga estão amplamente descritas, *S. boulardii* carece de métodos otimizados para inserção, expressão estável e manutenção de genes exógenos, especialmente proteínas complexas como anticorpos (Hudson et al., 2014). Protocolos adaptados de *S. cerevisiae* frequentemente apresentam eficiência reduzida em *S. boulardii*, dificultando sua aplicação direta sem ajustes.

Assim, este projeto justifica-se pela necessidade de preencher lacunas científicas relacionadas à engenharia genética de *S. boulardii*, com foco no desenvolvimento de estratégias eficientes de expressão e ancoragem de anticorpos terapêuticos. Ao estabelecer protocolos robustos e avaliar a entrega funcional em modelo animal, a pesquisa proposta visa criar uma plataforma de bioterapia oral que concilie eficácia, segurança e custo, contribuindo para o avanço de tratamentos inovadores para DII e oferecendo alternativas acessíveis e eficazes em contextos clínicos diversos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho propõe o desenvolvimento, a caracterização e a otimização de uma linhagem transformante de *Saccharomyces boulardii* capaz de expressar um scFv anti-CD3 ancorado à superfície celular, com potencial aplicação como bioterapia para imunomodulação do trato gastrointestinal por via oral.

3.1.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecer e otimizar o vetor de expressão e os protocolos mais eficientes para a engenharia genética de *S. boulardii*;
- b) Selecionar e caracterizar um clone transformante de *S. boulardii* com estabilidade genética e elevados níveis de expressão heteróloga do anticorpo;
- c) Avaliar a eficácia do encapsulamento lipídico na proteção do sistema frente a condições que simulam o trato gastrointestinal, em ensaios *in vitro*;
- d) Demonstrar o *delivery* da levedura em modelo animal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho e construção dos vetores de expressão

4.1.1 Vetor epissomal para expressão de scFv anti-CD3

Inicialmente, foi utilizado um plasmídeo epissomal previamente caracterizado em nosso laboratório (Pinhate et al., em preparação) para expressão de fragmento scFv (*single-chain variable fragment*) anti-CD3 ancorado à superfície celular de *S. boulardii* (Figura 1). Este vetor é derivado do vetor pYC230 (obtido com o Dr. Fernando Torres), e contém os seguintes elementos: (i) origem de replicação 2 μ , conferindo replicação autônoma; (ii) gene de resistência *Neo* (G418R); (iii) promotor constitutivo *SEDI* para expressão heteróloga (corresponde às coordenadas 599.992 a 600.793 do arquivo do GenBank NC_001136; arquivo referência do genoma da *S. cerevisiae* S288C cromossomo 4); (iv) peptídeo sinal *SEDI* para direcionamento à via secretória; (v) fragmento scFv anti-CD3; (vi) espaçador YNR044W-Aga-stalk (correspondente aos nucleotídeos na posição 304 a 1167 da sequência GenBank NM_001183221.1; o códon para Cys na posição 316-318 foi substituído por um códon para Ala) para projeção do scFv além da camada de manoproteínas da parede celular, aumentando sua acessibilidade; e (vii) domínio de ancoragem *SEDI* para ligação covalente à parede celular (correspondente às coordenadas 672 a 1358 da sequência GenBank X66838.1).

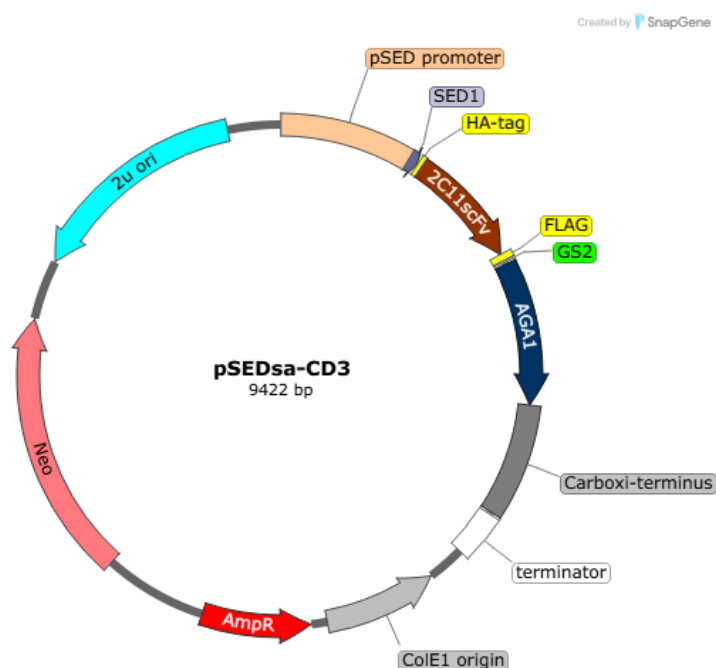


Figura 1 - Mapa do plasmídeo pSEDSa-CD3. O esquema mostra o *backbone* do plasmídeo, o cassete de expressão do anticorpo anti-CD3, o promotor SED, a origem de replicação 2 μ , o peptídeo sinal SED1, as *tags* HA e FLAG e o espaçador da proteína AGA1.

4.1.2 Vetores integrativos para expressão de scFv anti-CD3

Devido às limitações inerentes aos sistemas episomais, como instabilidade genética, foram desenvolvidos vetores integrativos para expressão estável do scFv anti-CD3. Para identificar o sítio de integração cromossomal mais eficiente no genoma de *S. boulardii*, foram construídos inicialmente três vetores-teste contendo apenas (i) cassete de expressão de GFP (Maury et al., 2016); (ii) cassete de resistência *kanMX* (IGEM part BBa_K300989); (iii) peptídeo sinal *AGA2* para direcionamento à via secretória; (iv) domínio de ancoragem *SEDI* para ligação covalente à parede celular; e (v) regiões de homologia aos elementos de transposição Ty1.2 e Ty2, direcionando a integração cromossomal por recombinação homóloga (Liu et al., 2020). As sequências dos elementos Ty foram derivadas do genoma de referência de *S. cerevisiae* S288C.

Considerando a divergência de sequência de *S. boulardii* em relação a *S. cerevisiae*, um terceiro vetor foi desenvolvido contendo a região 3' do elemento Ty2 modificada (Ty2sb - Ty2 modificado para *S. boulardii*) visando otimizar o alinhamento com as sequências LTR (*Long Terminal Repeats*) endógenas de *S. boulardii*. O cassete de integração, contendo dois cassetes de expressão, foi sintetizado por terceiros. Para permitir a propagação em *E. coli*, o cassete de integração foi clonado no vetor de clonagem pBluescript, contendo origem de replicação ColE1 e gene de resistência à ampicilina.

Após a caracterização comparativa da eficiência de integração dos três vetores-teste contendo GFP, o vetor baseado em Ty2sb foi selecionado como plataforma para desenvolvimento dos vetores integrativos finais. Dois novos vetores integrativos Ty2sb foram então construídos para expressão do fragmento scFv anti-CD3 ancorado à superfície celular de *S. boulardii*. As construções diferem pela presença ou ausência do gene repórter *GFP* a fim de possibilitar, respectivamente: (i) detecção e quantificação por citometria de fluxo durante a caracterização (vetor TyCD3GFP); ou (ii) produção sem marcador fluorescente para aplicações terapêuticas (vetor TyCD3).

A arquitetura geral dos vetores integrativos TyCD3 compreende, sequencialmente: região de homologia 5' Ty2sb, promotor *TEF1*, peptídeo sinal *AGA2*, scFv anti-CD3, espaçador de *SEDI*, domínio de ancoragem *SEDI*, cassete *GFP* opcional, cassete *kanMX* e região de homologia 3' Ty2sb (Figura X). Esta configuração permite integração dirigida aos múltiplos loci Ty presentes no genoma de *S. boulardii*, resultando em múltiplas integrações independentes e potencial amplificação da expressão heteróloga. A ORF foi desenhada por tradução reversa da sequência proteica utilizando a ferramenta de otimização de códons da GeneScript (<https://www.genscript.com/tools/gensmart-codon-optimization>).

Tabela 1 - Linhagens de *S. boulardii* utilizadas nesse trabalho.

Linhagem	Descrição
Sb WT	<i>Saccharomyces boulardii</i> wild type (selvagem)
Sb Ty1	<i>S. boulardii</i> transformada com vetor pTy1.2-GFP
Sb Ty2	<i>S. boulardii</i> transformada com vetor pTy2-GFP
Sb Ty2sb	<i>S. boulardii</i> transformada com vetor pTy2sb-GFP
Sb 2 μ CD3	<i>S. boulardii</i> transformada com vetor pSEDsa-CD3
Sb TyCD3	<i>S. boulardii</i> transformada com vetor pTy2sb-2C11-Sed1
Sb TyCD3GFP	<i>S. boulardii</i> transformada com vetor pTysb-2C11-Sed1-GFP

4.2 Expansão clonal

A cepa *Escherichia coli* XL1-Blue foi utilizada para propagação e manutenção dos plasmídeos. Inicialmente, a bactéria foi semeada em meio Luria-Bertani (LB) ágar [peptona de caseína 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), ágar bacteriológico 1,4% (p/v)] suplementado com 10 μ g/mL de tetraciclina para seleção do marcador de resistência endógeno da cepa. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido suplementado com 10 μ g/mL de tetraciclina e cultivada sob agitação de 280 rpm a 37°C *overnight*. No dia seguinte, 500 μ L do pré-inóculo foram transferidos para 50 mL de meio LB fresco e mantidos sob agitação de 280 rpm a 37°C até atingir a OD₆₀₀ entre 0,1 e 0,3. Para obtenção de células quimicamente competentes pelo

método de Cloreto de Cálcio (CaCl_2), a cultura foi imediatamente transferida para tubos Falcon de 50 mL pré-resfriados em gelo e centrifugada a $3000 \times g$ durante 10 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi gentilmente ressuspensão em 10 mL de solução de CaCl_2 50 mM estéril gelado. O sedimento foi então centrifugado nas mesmas condições e ressuspensão em 1 mL de solução de CaCl_2 50 mM, e as células competentes foram mantidas em gelo por no mínimo 60 min antes do uso. Para a transformação, alíquotas de 150 μL de células competentes foram transferidas para microtubos de 1,5 mL pré-resfriados em gelo e incubadas com 100-500 ng de DNA plasmidial durante 30 min em gelo. Após a incubação, os tubos foram submetidos a choque térmico em banho-maria a 42°C durante 3 min. Imediatamente após o choque, as células foram recuperadas adicionando 1 mL de meio LB e incubadas sob agitação de 280 rpm lenta a 37°C durante 1 h para expressão do gene de resistência à ampicilina. As células recuperadas foram plaqueadas em meio LB ágar suplementado com 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 h. A extração do DNA plasmidial foi realizada utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemanha, Cat. nº 27106), seguindo o protocolo do fabricante.

4.2.1 Confirmação da identidade dos vetores por análise de restrição enzimática

A identidade dos plasmídeos extraídos foi confirmada mediante análise de restrição enzimática. O plasmídeo 2 μ foi submetido à digestão dupla com as endonucleases de restrição EcoRI (10 U/ μL ; Promega, 15965516) e PstI (10 U/ μL ; Promega, 13036131). Os vetores baseados em elementos Ty foram clivados com NotI (10 U/ μL ; New England Biolab, 10205834). As reações de digestão foram preparadas conforme a especificação do fabricante. Os produtos de digestão e os controles foram analisados em Eletroforese em Gel de Agarose 0,8% acrescido de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Brometo de Etídio. O marcador usado para confirmar os tamanhos dos fragmentos foi o 1kb Plus Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 10488085). A corrida foi realizada em cuba média por 2 horas e 30-70 volts, com o tampão TAE 1X (Tris Base 40 mM, Ácido Acético Glacial 20 mM, EDTA 10mM pH 8,0).

4.3. Transformação de *S. boulardii*

4.3.1 Isolamento de *S. boulardii*

A cepa de *Saccharomyces boulardii* foi isolada de um comprimido do probiótico Repoflor® (Legrand, lote 2X7916) diluído em 50 mL de meio Yeast Peptone Dextrose (YPD; extrato de levedura 1%, glicose 2%, peptona de caseína 2%). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas até a obtenção de suspensão celular na ordem de 10^1 células/mL. Dessa diluição, 100 μ L foram semeados em meio YPD ágar (ágar 2,8%, extrato de levedura 1%, glicose 2%, peptona de caseína 2%), e as placas foram incubadas por 48 h a 30 °C. As colônias foram inoculadas em meio YPD e, por fim, alíquotas foram preparadas para armazenamento em -80°C.

4.3.2 Transformação de *S. boulardii* por eletroporação

Uma colônia isolada de *S. boulardii* crescida em YPD ágar foi inoculada em 5 mL de meio YPD e cultivada overnight sob agitação de 200 rpm a 30°C. No dia seguinte, o pré-inóculo foi diluído em 100 mL de meio YPD fresco, ajustando a densidade óptica inicial (DO_{600}) para 0,3. O inóculo subsequente foi mantido nas mesmas condições até atingir uma OD_{600} de 0,6; 1,2 ou 1,6.

As células foram coletadas por centrifugação a $3000 \times g$ durante 5 min a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. O sedimento celular foi ressuspenso em 1 mL de sorbitol 2 M estéril e mantido em gelo. O sistema de transformação foi preparado adicionando-se 400 μ L da suspensão celular, 20 μ g do plasmídeo episossomal e 10 μ g de DNA carreador de esperma de arenque (previamente desnaturado a 95°C por 5 min). A mistura foi transferida para cubeta de eletroporação de 0,2 cm (pré-resfriada em gelo) e submetida a pulso elétrico no sistema GenePulser Xcell™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Os parâmetros testados foram: voltagem de 0,75 a 2,5 kV, capacitância de 25 μ F e resistência de 200 ou 400 Ω .

Imediatamente após a eletroporação, adicionou-se 1 mL de sorbitol 2 M à cubeta para recuperação celular. As células foram transferidas para tubo estéril e incubadas a 30°C durante 2 ou 3 h sem agitação. Alíquotas das células recuperadas foram semeadas em placas de YPD ágar suplementadas com 200 μ g/mL de geneticina. Para avaliar a viabilidade celular,

diluições seriadas das células foram plaqueadas em meio YPD ágar sem pressão seletiva, antes e após a eletroporação. A eficiência de transformação foi calculada como a razão entre UFC e a quantidade de DNA em μg . As colônias transformantes foram observadas após 48 h de incubação a 30°C. Um teste adicional foi feito com incidência de luz ultravioleta (UV) por 10 segundos nas células competentes antes da incubação com o plasmídeo, seguindo os parâmetros de eletroporação mais eficientes.

4.3.3 Transformação de *S. boulardii* por choque térmico

Uma colônia isolada de *S. boulardii* selvagem crescida em YPD ágar foi inoculada em 5 mL de meio YPD e cultivada overnight sob agitação de 200 rpm a 30°C. No dia seguinte, o pré-inóculo foi diluído em 100 mL de meio YPD fresco, ajustando a DO_{600} inicial para 0,1. O cultivo foi mantido nas mesmas condições até atingir DO_{600} de 0,4 (fase exponencial inicial). A suspensão celular foi centrifugada a $3000 \times g$ durante 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi lavado três vezes com água Milli-Q estéril para remoção completa dos componentes do meio. As células foram então ressuspensas em 1 mL de solução LTE (acetato de lítio 0,1 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) e incubadas a 30°C durante 1 h sob agitação lenta para permeabilização da parede celular.

Após a incubação, o sistema de transformação foi preparado contendo: 200 μL de células competentes, 50 μL de LTE, 2 μg do plasmídeo (íntacto se for epissomal, e digerido com NOTI se for integrativo) 10 μg de DNA carreador de esperma de arenque (previamente desnaturado). O sistema foi homogeneizado gentilmente e incubado a 30°C durante 1 h sem agitação. Em seguida, adicionaram-se 0,7 mL de solução PLTE (LTE acrescida de 40% p/v de polietilenoglicol 4000), e o sistema foi incubado a 30°C durante 30 min sem agitação. Posteriormente, foi conduzido o choque térmico a 42°C por 15 min em banho-maria. Imediatamente após o choque térmico, as células foram lavadas duas vezes com tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) por centrifugação a $3000 \times g$ durante 3 min a 4°C. O sedimento foi ressuspensado em 1 mL de meio YPD e incubado overnight a 30°C sob agitação de 200 rpm para recuperação e expressão do marcador de resistência.

Por fim, as células recuperadas foram semeadas em placas de YPD ágar suplementadas com 200 µg/mL de geneticina. A viabilidade celular foi avaliada plaqueando-se diluições seriadas em meio não seletivo antes e após o choque térmico. A eficiência de transformação foi calculada como descrito anteriormente (seção 4.3.2). As colônias transformantes foram observadas após 48 h de incubação a 30°C, e a confirmação da integração foi realizada por PCR de colônia conforme descrito na seção 4.3.4.

Um teste adicional foi feito com incidência de luz ultravioleta (UV) por 10 segundos nas células competentes antes da incubação com o plasmídeo, seguindo os parâmetros de choque térmico mais eficientes.

4.3.4. Confirmação da transformação

Iniciadores específicos para o gene de resistência a G418 (*kanMX*) e para o gene do anti-CD3 scFv foram desenhados utilizando a ferramenta Primer-Blast NCBI (Tabela 2). As colônias crescidas em meio seletivo após a transformação foram submetidas à lise enzimática para extração do DNA. Para tal, as células foram ressuspensas em solução contendo 10 µL de água Milli-Q e 5 µL de liticase (5000 U/mL) e incubadas a 30°C durante 30 min. Posteriormente, as amostras foram submetidas a choque térmico a -80°C três vezes para rompimento celular adicional. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi preparada em volume final de 20 µL, contendo: 2 µL de lisado celular, 10 µL de MasterMix (LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche), 10 µM de cada iniciador e água Milli-Q para completar o volume final. As condições de amplificação no termociclador (Veriti™ 96-Well Thermal Cycler) consistiram em: lise inicial a 95°C por 10 min; 30 ciclos de: desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento a 63°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v). O tamanho esperado do amplicon foi de aproximadamente 456 pb, confirmado mediante comparação com marcador de peso molecular 1 kB Plus Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 10488085).

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores para o gene G418 e para o gene do scFv.

Fragmento	Sequência dos Iniciadores	Tm	Tamanho do amplicon
G418	GATTGTCGCACCTGATTGCC CATGGAGGCCCAAGAATACCC	63°C	456pb
Anti-CD3	CCAACAAAAGCCAGGTAAGG CGTCGTCGTCCTTGTAAGCA	55°C	260 pb

4.4. Caracterização dos clones de *S. boulardii*

4.4.1 Curva de crescimento

Para caracterizar o perfil de crescimento da levedura, uma colônia isolada de *S. boulardii* foi inoculada em 5 mL de meio YPD e cultivada overnight sob agitação de 200 rpm a 30°C. Subsequentemente, 5 µL do pré-inóculo foram transferidos para 5 mL de meio YPD fresco e mantidos nas mesmas condições. A curva de crescimento foi construída mediante mensuração da densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) até atingir a fase estacionária. O mesmo procedimento foi realizado após a transformação da levedura, visando comparar o perfil de crescimento entre a linhagem selvagem e os clones transformantes. A curva de crescimento também foi aferida pelo equipamento BioTek Eon™ Microplate Spectrophotometer com placas de 96 poços acrescidas de 200 µL de meio YPD seletivo e 1 µL do inóculo. O equipamento foi setado para 25°C e rotação orbital de 205 cpm até as células atingirem a fase estacionária.

4.4.2 Determinação da concentração de marca seletiva

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de geneticina (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) foi realizada concomitantemente à curva de crescimento. A cada tempo de mensuração da DO₆₀₀, alíquotas de 50 µL do cultivo foram semeadas em placas de YPD ágar suplementadas com concentrações crescentes de geneticina: 0, 50, 100, 200, 300

e 400 µg/mL. As placas foram incubadas a 30°C durante 48 h, e a contagem de colônias foi realizada para determinação da CIM.

4.4.3 Determinação da solução para manutenção da viabilidade celular

Paralelamente, ensaios foram conduzidos para determinar a solução ótima de ressuspensão e manutenção da viabilidade celular. Para tal, alíquotas de 100 µL de *S. boulardii* selvagem foram incubadas durante 3 h sob agitação de 200 rpm a 30°C com 100 µL das seguintes soluções: água Milli-Q, tampão fosfato-salino 1× (PBS; NaCl 150 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7,4), solução salina 0,9%, ou Sorbitol 2M. Após a incubação, diluições seriadas foram semeadas em placas de YPD ágar sem pressão seletiva para quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC).

4.4.4 Estabilidade genética dos vetores

Para avaliar a estabilidade dos vetores, três clones de cada linhagem transformada foram subcultivados durante seis gerações consecutivas em meio não seletivo e, subsequentemente, re-expostos à geneticina 200 µg/mL. A confirmação da presença do vetor foi realizada por PCR de colônia antes e após a remoção da pressão seletiva, utilizando os iniciadores descritos na Tabela 2.

4.4.5 Expressão do anti-CD3

As linhagens de *S. boulardii* transformadas com vetores para expressão constitutiva de scFv anti-CD3 foram cultivadas em meio YPD suplementado com geneticina (200 µg/mL) como marcador de seleção. Para determinar as condições ótimas de expressão, inóculos de 5 mL foram cultivados overnight sob agitação de 200 rpm, testando-se três temperaturas distintas: 25°C, 28°C e 30°C. A proteína recombinante ancorada à superfície celular foi marcada com o anticorpo anti-HA-FITC ou anti-FLAG conjugado com anti-rabbit IgG-FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em células não permeabilizadas, conforme instruções

do fabricante. Posteriormente, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo Accuri C6 Plus Flow Cytometer (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), com aquisição de 10.000 eventos por amostra. Os dados de citometria foram analisados no *software* FlowJO™ v10.10.

4.5 Cápsula lipídica

4.5.1 Encapsulamento da levedura

O revestimento lipídico das células foi realizado segundo metodologia adaptada de Cao et al. (2019). Inicialmente, preparou-se um filme lipídico pela dissolução de DOPA (18:1 PA Avanti Research™, 840875P-25MG-E-151) e colesterol (Sigma-Aldrich, SLCG0989) na proporção molar de 4:1 em 1 mL de clorofórmio, seguida de evaporação completa do solvente em temperatura ambiente. O filme resultante foi hidratado com uma suspensão de *S. boulardii* em cloreto de cálcio 12,5 mM gelado, e a mistura foi agitada em vórtex por 15 min para permitir a deposição dos lipídios sobre a superfície celular. Após o revestimento, as células foram lavadas três vezes com água Milli-Q para remoção do excesso de lipídios não aderidos e armazenadas a -80°C em meio YPD suplementado com glicerol.

4.5.1 Detecção da cápsula

A eficiência do revestimento foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o marcador de lipídio BTD-QN (fluoróforo de quinolina conjugado com benzenotiadiazol, λ de excitação = 488 nm) desenvolvido pelo laboratório do Prof. Dr. José Raimundo Correa. Para a marcação, aproximadamente 10^7 células revestidas foram incubadas com BTD-QN 10 μ M em volume final de 30 μ L (completado com água Milli-Q) por 30 min à temperatura ambiente e protegidas de luz. Após a incubação, as células foram lavadas com água Milli-Q, mantidas a 4°C e analisadas por citometria de fluxo.

4.5.1 Ensaio *in vitro* com leveduras encapsuladas

A viabilidade celular de *S. boulardii* encapsulada e não encapsulada foi avaliada após exposição a fluidos gastrointestinais simulados. Alíquotas de 10^6 células (encapsuladas ou não encapsuladas) ressuspensas em 100 μ L de água Milli-Q foram adicionadas a 100 μ L de fluido gástrico simulado estéril (SGF, pH 1,5; Biochemazone, BZ175) ou fluido intestinal simulado estéril suplementado com lipase (SIF, pH 6,8; Biochemazone, BZ176), resultando em volume final de 200 μ L. As suspensões foram incubadas por 1 h a 37°C sem agitação. Como controle, células foram ressuspensas apenas em água Milli-Q e submetidas ao mesmo procedimento. Após a incubação, as células foram recuperadas por centrifugação ($3.000 \times g$, 3 min, 4°C), lavadas três vezes com água Milli-Q e diluídas seriadamente até a diluição 10^{-5} . Alíquotas de 100 μ L da diluição foram plaqueadas em meio YPD sólido e incubadas a 30°C por 48 h para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Amostras das suspensões celulares antes da exposição aos fluidos simulados também foram plaqueadas para determinação da viabilidade inicial.

4.5.2 Ensaio *in vivo* com leveduras encapsuladas

A experimentação animal foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília (CEUA/UnB, Processo SEI 23106.086054/2021-12). A biodistribuição de *S. boulardii* encapsulada e não encapsulada foi avaliada em camundongos BALB/c fêmeas (n=4 por grupo) utilizando a linhagem Sb Ty2sb, a qual expressa constitutivamente a proteína fluorescente verde (GFP). Os animais receberam dose única de 10^8 células (encapsuladas ou não encapsuladas) por gavagem oral. A fluorescência *in vivo* foi monitorada por imageamento óptico no equipamento IVIS™ Lumina (Revvity) nos seguintes tempos após a gavagem: 8 h, 24 h e 48 h. Os animais foram anestesiados com isoflurano durante a aquisição das imagens, obtidas com os seguintes parâmetros: tempo de exposição de 10 s, binning 4, abertura f/stop 2, excitação em 440 nm, emissão em 570 nm e campo de visão (FOV) C. As imagens foram analisadas no Living Image™ software (Revvity). Fezes foram coletadas e plaqueadas em meio seletivo para detecção da levedura transformante.

Um segundo ensaio foi realizado nas mesmas condições para avaliar a biodistribuição em tempo mais precoce (1 h após gavagem) e para análise *ex vivo* do trato

gastrointestinal 2 h após a administração. Para as imagens *ex vivo*, os animais foram eutanasiados com Tiopental 200 mg/Kg, o intestino foi retirado e imageado nas mesmas condições descritas anteriormente.

4.5.3 Análises estatísticas

O tratamento e a análise estatística dos dados experimentais foram conduzidos em ambiente computacional utilizando a linguagem Python (v. 3.x) e a plataforma Google Colab. A manipulação de dados brutos e a organização em *dataframes* foram realizadas via biblioteca Pandas. Dada a natureza biológica das amostras (n=3), optou-se pelo Teste t de Welch, implementado via *scipy.stats*, para comparações entre médias de grupos independentes, por ser uma alternativa que não pressupõe homocedasticidade (igualdade de variâncias). As métricas de dispersão foram reportadas como Erro Padrão da Média (EPM). A síntese visual foi elaborada com as bibliotecas Matplotlib e Seaborn. Os códigos-fonte utilizados para as análises e geração dos gráficos encontram-se disponíveis em: https://colab.research.google.com/drive/17aAwAjJ2iR3BzJYHDtQ1uLOStylbz_0q.

4.5.4 Determinação do Perfil de Carga e Ponto Isoelétrico *in silico*

A caracterização eletrostática do scFv anti-CD3 iniciou-se com a determinação do ponto isoelétrico (pI) por meio da plataforma Benchling (Molecular Biology Suite). O software realiza o cálculo preditivo com base na sequência primária de aminoácidos, utilizando o algoritmo de carga líquida fundamentado no conjunto de constantes de dissociação ácida (pKa) do EMBOSS. A partir do valor de referência obtido (pI = 5,16), procedeu-se à modelagem da curva de carga líquida em um gradiente de pH (1,5 a 10,0) via Python, disponibilizado na seção 4.5.3. Utilizando a biblioteca NumPy, aplicou-se interpolação linear para estimar o estado de ionização da molécula em pontos críticos que simulam o trânsito pelo trato gastrointestinal. Foram delimitadas zonas de instabilidade coloidal na proximidade do pI e zonas de risco de desnaturação ou proteólise em pH extremo (< 2,5). Essa integração entre predição por *software* e modelagem computacional permitiu correlacionar a estabilidade teórica da proteína com as variações fisiológicas de pH esperadas *in vivo*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Desenvolvimento do vetor de expressão e clonagem

5.1.1 Confirmação do vetor episossomal 2 μ para expressão de scFv anti-CD3

A análise de restrição enzimática com EcoRI e PstI confirmou o perfil esperado com bandas de aproximadamente 6000 pb e 3000 pb (Figura 2); assim, validamos a correta identidade do plasmídeo extraído e expandido.

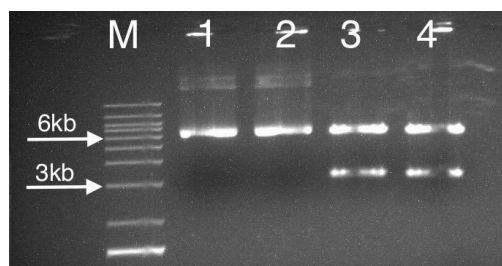


Figura 2 - Confirmação do vetor pSEDSa-CD3 por análise de restrição enzimática. Eletroforese em Gel de Agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio. (M) marcador 1kb Plus Ladder. (1) e (2) vetor intacto. (3) e (4) vetor digerido com EcoRI e PstI.

5.1.2 Otimização do protocolo de transformação de *S. boulardii* com o vetor 2 μ

Ensaio prévios de transformação da *S. boulardii* em nosso grupo revelaram uma baixa de transformabilidade (taxa de transformações bem-sucedidas) e uma baixa eficiência de transformação (número de clones transformantes) com o vetor contendo origem de replicação 2 μ usado neste trabalho (pSEDSa-CD3). Em concordância, alguns trabalhos na literatura relataram a mesma dificuldade em clonar essa levedura (Liu et al., 2020). Para estabelecer um protocolo mais adequado, foram testadas sistematicamente duas metodologias: eletroporação e choque térmico com acetato de lítio.

5.1.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima de geneticina

Previamente aos ensaios de transformação, estabeleceu-se a concentração ótima do agente seletivo geneticina (G418). Células selvagens de *S. boulardii* foram expostas a

concentrações crescentes do antibiótico em diferentes fases de crescimento (Tabela 3). A concentração de 200 µg/mL inibiu completamente o crescimento da cepa não transformada em todas as fases testadas, sendo selecionada como concentração padrão para pressão seletiva nos experimentos subsequentes.

Tabela 3 - Determinação da concentração inibitória mínima de geneticina para *S. boulardii* wt.

Geneticina	0h	4h	8h	12h	24h
0 µg/mL	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
50 µg/mL	0	0	3	66	92
100 µg/mL	0	0	0	0	8
200 µg/mL	0	0	0	0	0
300 µg/mL	0	0	0	0	0
400 µg/mL	0	0	0	0	0

5.1.2.2 Comparação entre eletroporação e choque térmico com o vetor 2µ

Para a eletroporação, múltiplas condições foram testadas, variando voltagem (0,75-2,5 kV), resistência (200-400 Ω), densidade óptica celular (0,6-1,6) e tempo de recuperação pós-pulso (2-3h). Os resultados mostraram que, nos parâmetros de eletroporação usuais de levedura (1,5kV, 25µF e 200Ω), o tempo de recuperação foi determinante: apenas culturas recuperadas por ≥ 3h geraram transformantes (Tabela 4). A variação da voltagem, da capacitância e da densidade óptica (tabelas 4, 5 e 6) influenciou diretamente a viabilidade celular após o choque, mas não demonstrou um impacto conclusivo na eficiência de transformação.

Tabela 4 - Efeito do tempo de recuperação pós-choque na eficiência de transformação por eletroporação em *Saccharomyces boulardii*.

Pulso (kV)	Capacitância (µF)	Resistência (Ω)	Tempo de recuperação (h)	Densidade óptica (600nm)	Eficiência de transformação (n°CFU/ µg
---------------	----------------------	--------------------	--------------------------------	--------------------------------	--

					de DNA)
1,5	25	200	2	1,4	zero
1,5	25	200	3	1,4	0,6

Tabela 5 - Efeito da intensidade do Pulso (kV) e da Resistência (Ω) na viabilidade e na eficiência de transformação de *Saccharomyces boulardii* por eletroporação.

Pulso (kV)	Capacitância (μ F)	Resistência (Ω)	Tempo de recuperação (h)	Densidade óptica (600nm)	Viabilidade pós choque	Eficiência de transformação (n ^o CFU/ μ g de DNA)
0,75	25	200	3	1,6	~100%	zero
1,5	25	200	3	1,6	~63%	zero
2,5	25	200	3	1,6	~4%	0,05
0,75	25	400	3	1,6	~100%	zero
1,5	25	400	3	1,6	~8%	zero
2,5	25	400	3	1,6	~0,5%	zero

Tabela 6 - Efeito combinado da intensidade do Pulso (kV) e da Densidade Óptica (600nm) na viabilidade e na eficiência de transformação de *Saccharomyces boulardii* por eletroporação.

Pulso (kV)	Capacitância (μ F)	Resistência (Ω)	Tempo de recuperação (h)	Densidade Óptica (600nm)	Viabilidade pós choque	Eficiência de transformação (n ^o CFU/ μ g de DNA)
0,75	25	200	3	0,6	~100%	0,1
0,75	25	200	3	1,2	~100%	zero

1,5	25	200	3	0,6	~19%	zero
1,5	25	200	3	1,2	~4,9%	zero
2,5	25	200	3	0,6	~3,3%	zero
2,5	25	200	3	1,2	~1%	zero

Com relação ao choque térmico, observamos uma eficiência de transformação superior à eletroporação. A otimização dos parâmetros (Tabela 7) revelou que 42°C por 15 minutos, seguido de recuperação *overnight*, resultou na maior eficiência de transformação, representando aumento de 15 vezes em relação à melhor condição de eletroporação. Embora não fosse possível conduzir replicatas dos testes de transformação devido à baixa taxa de transformabilidade, a análise comparativa dos ensaios demonstrou um melhor desempenho do choque térmico em comparação com eletroporação para clonagem de *S. boulardii*. Logo, este protocolo foi adotado para as etapas subsequentes do projeto.

Tabela 7 - Comparação da eficiência de transformação em função do tempo e da temperatura do choque térmico e do tempo de recuperação da *Saccharomyces boulardii* transformada.

Temperatura do choque térmico	Tempo de choque térmico	Tempo de recuperação (h)	Eficiência de transformação (n° CFU/ μ g de DNA)
42°C	5 min	3	zero
42°C	5 min	overnight	4
42°C	15 min	overnight	9
45°C	5 min	overnight	2,5

A eficiência de transformação de leveduras com plasmídeos episomais derivados do 2 μ é um fenômeno multifatorial, pois a manutenção estável do 2 μ requer a expressão funcional das proteínas Rep1 e Rep2, o reconhecimento do locus STB e o recrutamento de componentes da maquinaria de segregação cromossômica da célula hospedeira (Broach et al., 1979; Hartley and Donelson 1980; Jayaram et al. 1983). Quando um plasmídeo 2 μ é introduzido na célula, primeiramente deve ser transcrito para permitir a produção das proteínas de manutenção e, sobretudo, montar um complexo funcional de partição antes que a

célula entre em mitose (Rizvi et al., 2017). Caso esse acoplamento não ocorra a tempo, o plasmídeo comporta-se como um elemento nuclear passivo e tende a segregar aleatoriamente ou a ser perdido em uma das células-filhas, extinguindo o evento de transformação (Murray & Szostak, 1983; Futcher & Cox, 1984).

Sendo assim, a clonagem bem-sucedida não depende apenas da entrada do DNA, mas também do estabelecimento como replicon estável e segregável antes da primeira mitose reprodutiva (Futcher, 1988; Velmurugan et al., 2000; Mehta et al., 2005). É nesse contexto cujas diferenças entre choque térmico e eletroporação se tornam relevantes. O método LiAc/PEG promove a entrada do DNA por meio de uma desorganização química gradual da parede celular e da neutralização de cargas, sem causar ruptura física abrupta (Gietz & Woods, 2002). Apesar de induzir estresse, esse método preserva o potencial de membrana, a homeostase iônica e a integridade metabólica global da célula. A eletroporação, por sua vez, atua por um mecanismo de maior custo físico à parede e à membrana, de perda do potencial eletroquímico e de desbalanço osmótico (Becker & Guarente, 1991). A consequência imediata não é um *checkpoint* clássico do ciclo celular, mas um estado de recuperação fisiológica dominado por processos de reparo de membrana e reorganização iônica. Durante esse período, embora a divisão celular possa ser retardada, a célula não se encontra em um estado nuclear ideal para o estabelecimento de plasmídeos episomais: a transcrição inicial pode ser comprometida, a tradução atrasada e a montagem do complexo STB–Rep prejudicada.

Por fim, esse efeito pode explicar por que a eletroporação, embora frequentemente relatada como mais eficaz para leveduras, apresentou desempenho inferior para a clonagem com o vetor episomal neste trabalho.

5.1.2.3 Efeito da irradiação UV na eficiência de transformação com o vetor 2 μ

Um achado notável, consistente em todos os testes, foi o efeito positivo da incidência de luz ultravioleta nas células competentes (Figura 3). A luz UV demonstrou, consistentemente, dobrar a eficiência de transformação tanto na eletroporação quanto no choque térmico. Este fenômeno ainda não foi descrito na literatura; dessa forma, mais estudos devem ser conduzidos para elucidá-lo. Nós propomos uma investigação acerca da possível relação com o *timing* de ciclo celular abordado na seção 5.1.2.2. Apesar da melhor eficiência, não mantivemos o protocolo com UV e nem utilizamos os clones gerados a partir dele com o intuito de evitar vieses frente à possibilidade de mutações induzidas por UV (Kupiec, 2025).

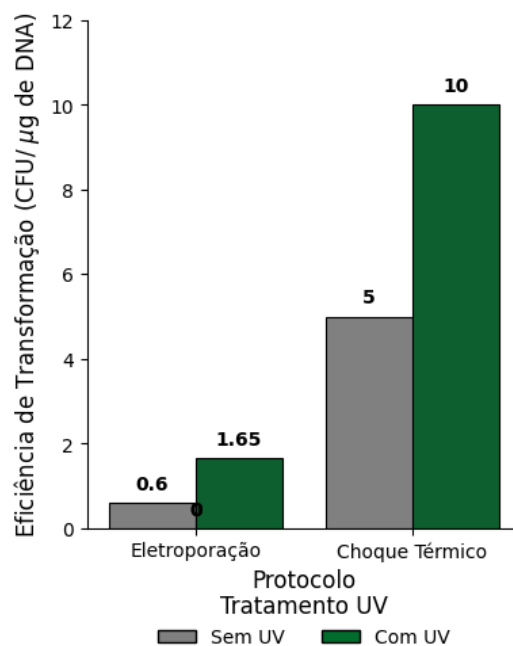


Figura 3 - Efeito da luz ultravioleta na eficiência de transformação de *S. boulardii*. A incidência de luz UV na célula foi avaliada nos protocolos de eletroporação e de choque térmico.

5.1.3 Confirmação molecular dos transformantes com o vetor 2μ

Colônias resistentes à geneticina foram submetidas à confirmação molecular por PCR de colônia utilizando iniciadores específicos para o gene do scFv (Tabela 2). A amplificação do fragmento esperado de 260 pb foi obtida em alguns dos clones testados, confirmando a presença do vetor (Figura 4).

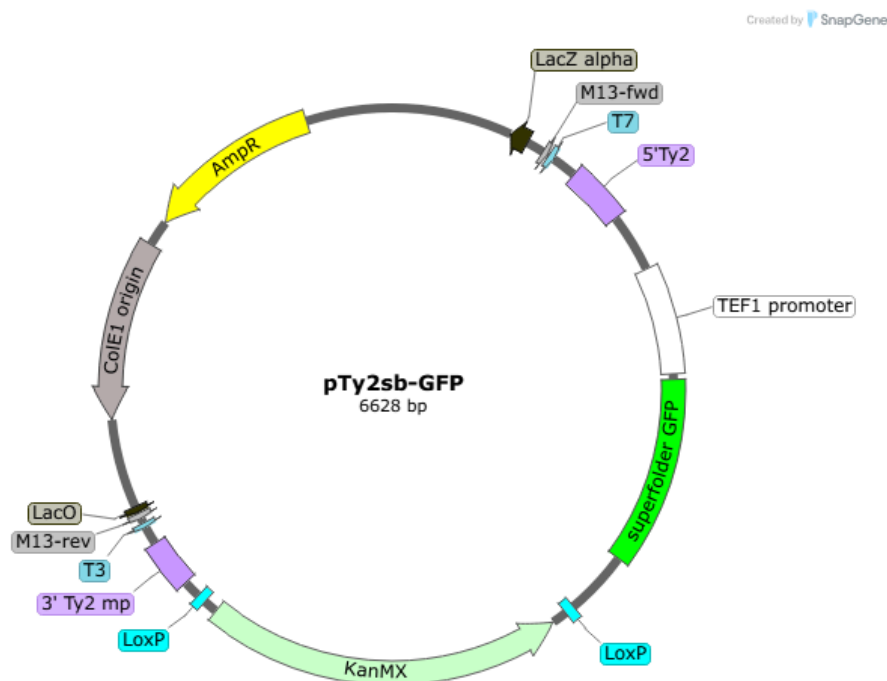


Figura 4 - Confirmação de transformantes de *S. boulardii* por PCR de colônia. Eletroforese em Gel de Agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio. (M) Marcador 1kb Plus Ladder; (C1 a C6) clones transformantes; (C-) cepa selvagem (controle negativo).

5.1.4 Desenvolvimento de vetores integrativos baseados em elementos Ty

Com o intuito de caracterizar a melhor estratégia de expressão e clonagem em *Saccharomyces boulardii*, também exploramos o uso de vetores integrativos. Em comparação com vetores episomais, os vetores integrativos costumam ter uma maior estabilidade ao longo de gerações; porém, um menor nível de expressão da proteína de interesse, frequentemente associado a um número reduzido de cópias. Para compensar, exploramos uma estratégia alternativa baseada em integração cromossomal dirigida a elementos repetitivos da família Ty. Retroelementos Ty são abundantes no genoma de leveduras, ou seja, esta abordagem permite obter múltiplas integrações independentes e estáveis.

Inicialmente, foram construídos três vetores-teste contendo o gene repórter GFP (proteína verde fluorescente) para facilitar a triagem e comparação de eficiência entre diferentes elementos Ty: (i) Regiões de homologia ao elemento Ty1.2; (ii) Regiões de homologia ao elemento Ty2 nativo de *S. cerevisiae*; (iii) Ty2 com região 3' modificada para otimizar alinhamento com sequências LTR endógenas de *S. boulardii* (Figura 5). O sucesso da clonagem foi confirmado por digestão com NotI, liberando fragmentos de aproximadamente 3600 pb e 3000 pb (Figura 6).



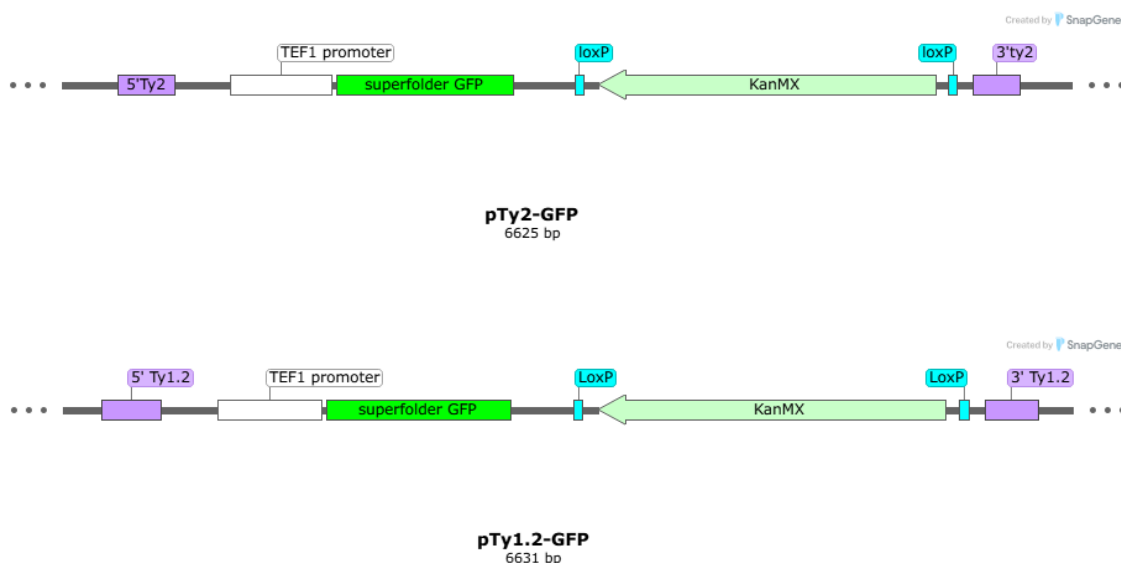


Figura 5 - Mapas dos plasmídeos pTy2sb-GFP, pTy2-GFP e pTy1.2-GFP. Os esquemas mostram o *backbone* do plasmídeo e o cassete de expressão do GFP com regiões flangeadoras Ty, promotor TEF e gene de resistência à geneticina.

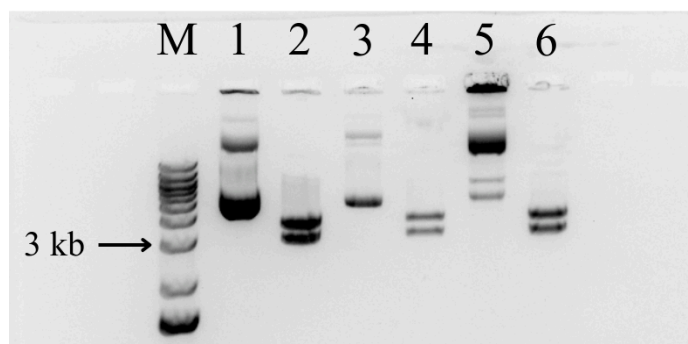


Figura 6 - Confirmação dos vetores Ty por análise de restrição enzimática. Eletroforese em Gel de Agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio. (M) marcador 1kb Plus Ladder. (1), (3) e (5) pTy1.2-GFP, pTy2-GFP e pTy2sb-GFP intactos, respectivamente. (2), (4) e (6) pTy1.2-GFP, pTy2-GFP e pTy2sb-GFP, respectivamente, digeridos com NotI.

5.1.4.1 Eficiência de transformação

O vetor integrativo contendo a região Ty2 adaptada para *S. boulardii* (Ty2sb) apresentou eficiência de transformação 23 vezes superior ao vetor com o Ty2 e 5 vezes superior ao 2 μ (Figura 7). Este resultado mostra que a estratégia de integração pode superar o gargalo de clonagem dessa cepa; contudo, há necessidade de mais testes a fim de conferir a

reprodutibilidade desses resultados. Outro achado foi a adaptação da sequência flanqueadora: há funcionalidade do Ty nativo de *S. cerevisiae* em *S. boulardii*, porém a compatibilidade para a espécie-alvo influencia o sucesso da transformação. Ademais, não foi possível obter clones transformantes utilizando o vetor Ty1, resultado esperado considerando a baixa conservação deste retroelemento em *S. boulardii*.

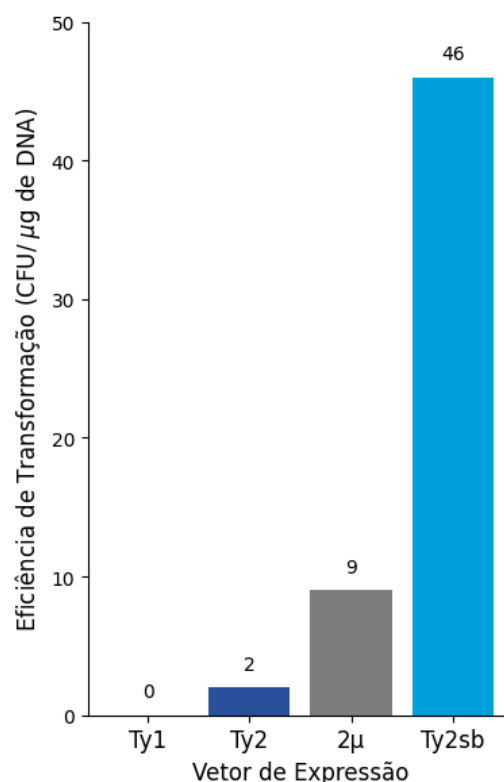


Figura 7 - Eficiência de transformação em função de diferentes vetores. A figura compara a CFU/μg de DNA da *S. boulardii* para cada plasmídeo (Ty2sb, Ty2, Ty1 e 2μ).

5.1.4.2 Confirmação molecular da integração do cassete

A presença do cassete integrado foi confirmada por PCR de colônia (Figura 8), com amplificação do fragmento esperado de 456 pb (gene kanMX) em múltiplos clones testados.

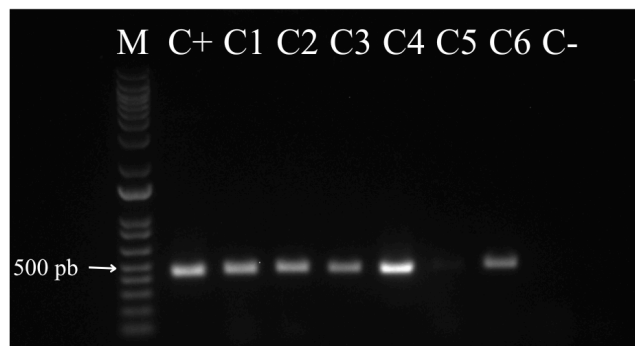


Figura 8 - Confirmação de transformantes de *S. boulardii* por PCR de colônia. Eletroforese em Gel de Agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio. Ensaio feito a partir de três colônias (C1, C2 e C3) de *Saccharomyces boulardii* da linhagem Ty2sb e três colônias (C4, C5 e C6) da linhagem Ty2. (M) Marcador 1 kb Plus Ladder; (C-) cepa *S. boulardii* selvagem como controle negativo; (C+) DNA puro contendo o gene de interesse como controle positivo.

5.1.4.3 Caracterização celular dos clones

Apesar do vetor episomal 2μ ter demonstrado eficiência de transformação intermediária (Figura 7), as colônias desta linhagem eram notavelmente menores e exibiram uma curva de crescimento inferior quando comparadas às demais (Figura 9 e Figura 22), sugerindo um custo metabólico. A literatura não indica custo fisiológico decorrente da manutenção do plasmídeo 2μ , uma vez que é um sistema altamente adaptado à célula hospedeira (Rizvi et al., 2017). Em vez disso, o gasto energético está predominantemente associado à expressão heteróloga em múltiplas cópias, especialmente quando promotores fortes são utilizados (Karim et al., 2013; Chen et al., 2018). Consequentemente, pode haver redistribuição de recursos celulares, sobrecarga da maquinaria transcricional e traducional, estresse do retículo endoplasmático e ativação de respostas ao estresse. Em cepas menos domesticadas, como *S. boulardii*, esse custo pode ser ainda mais evidente, uma vez que mecanismos de tolerância à alta carga de expressão recombinante são menos selecionados em comparação com cepas laboratoriais clássicas de *S. cerevisiae*.

Em contraste, as linhagens transformadas com vetores integrativos apresentaram perfil de crescimento similar à linhagem selvagem, demonstrando a ausência de impacto metabólico. Para compreender melhor essa diferença entre as linhagens, poderiam ser conduzidos experimentos de qPCR e de sequenciamento a fim de quantificar o número de cópias do cassete de expressão em cada transformante.

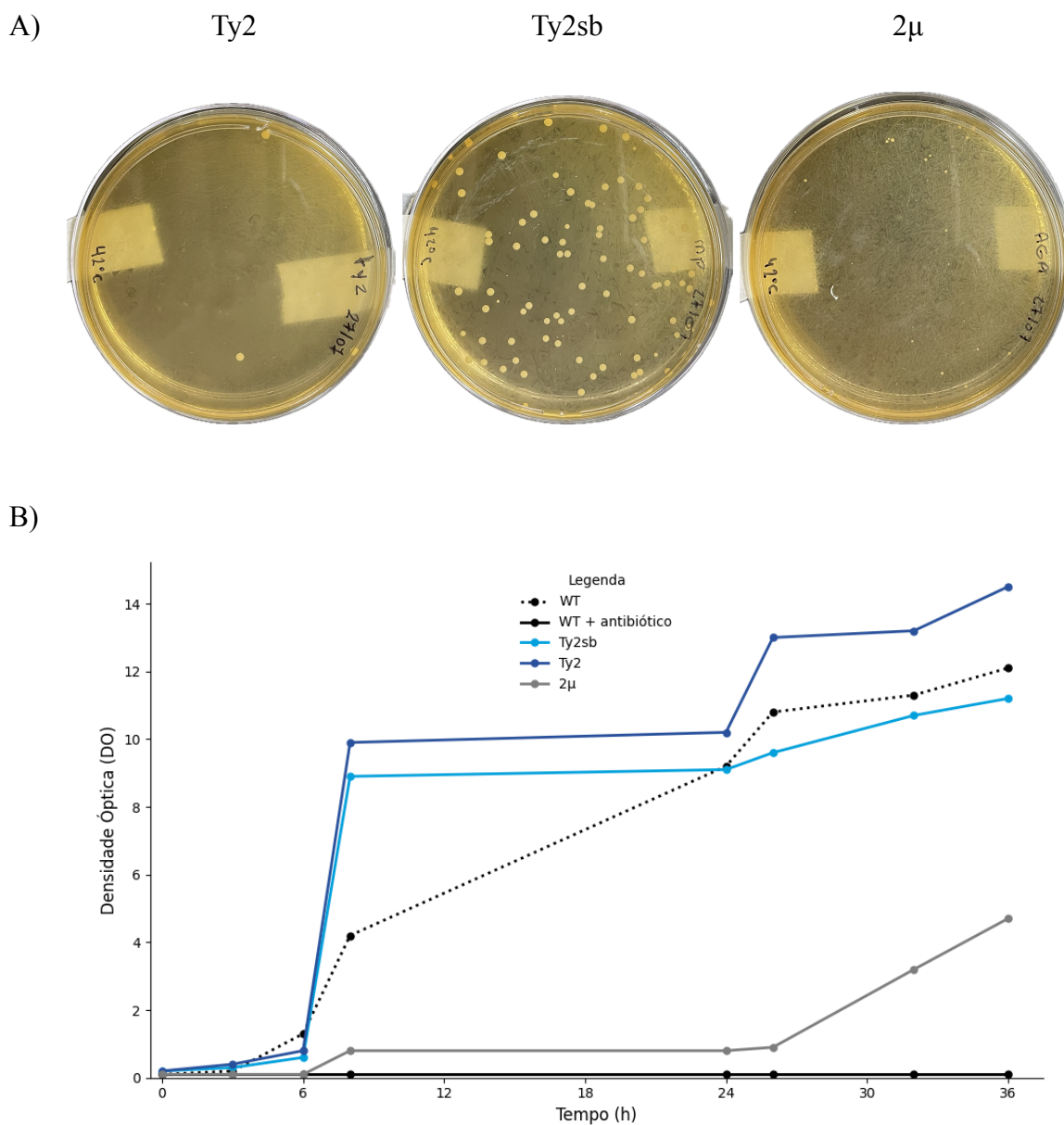
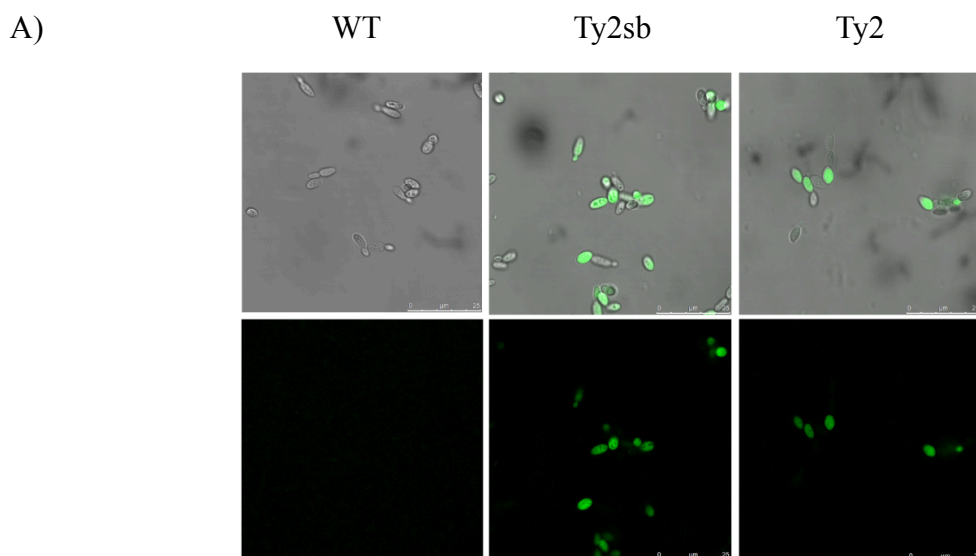


Figura 9 - Caracterização celular dos clones de *S. boulardii*. (A) Comparação do tamanho e quantidade das linhagens Ty2, Ty2sb e 2 μ respectivamente, 48 horas após o choque térmico. (B) Curva de crescimento da *Saccharomyces boulardii* das linhagens WT (com e sem antibiótico), Ty2, Ty2sb e 2 μ .

A análise por microscopia de fluorescência confocal revelou perfil celular qualitativamente similar entre as linhagens Ty2sb, Ty2 e WT, sem alterações morfológicas evidentes (Figura 10). Este resultado reforça a ausência de comprometimento da atividade metabólica pela expressão heteróloga de GFP nos clones transformados com os vetores integrativos.



B)

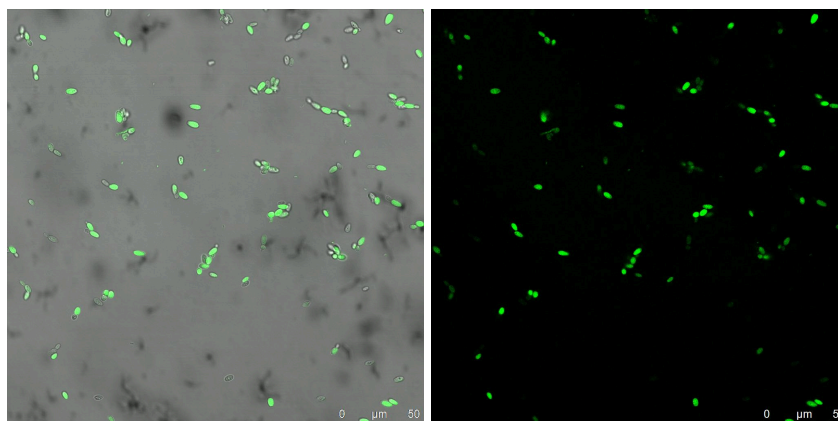


Figura 10 - Análise por microscopia confocal da expressão de GFP nos clones Ty. (A) Análise da expressão de GFP em *S. boulardii* transformado com os vetores Ty2sb e Ty2. A levedura WT está como controle negativo. (B) Expressão de GFP em *S. boulardii* transformado com o vetor Ty2sb.

Paralelamente, a análise por citometria de fluxo (Figura 11) evidenciou elevada proporção de células produtoras de GFP em ambas as linhagens transformadas (média do Ty2sb: 97.63%; média do Ty2: 98.27%), sem diferença estatisticamente significativa entre elas ($p\text{-value} = 0,483$).

Em conclusão, o vetor integrativo Ty2sb foi selecionado como plataforma para desenvolvimento dos vetores finais de expressão de scFv anti-CD3, pois os resultados demonstraram alta eficiência de transformação, estabilidade genética, ausência de custo metabólico e expressão robusta.

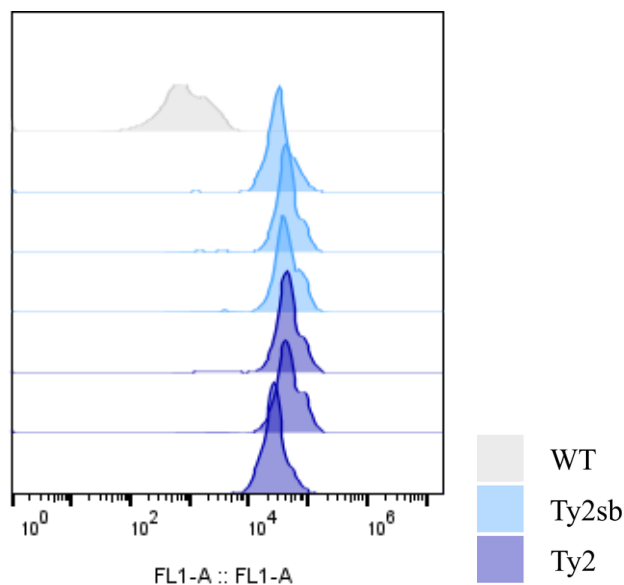
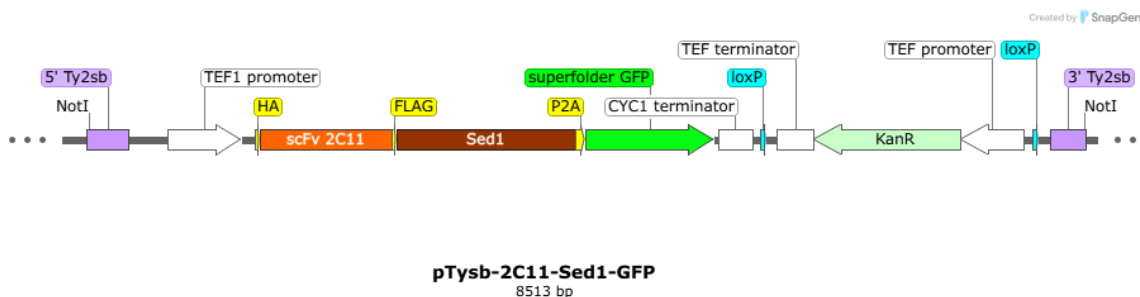


Figura 11 - Análise por citometria de fluxo da expressão de GFP nos clones Ty. Foram comparadas as linhagens Ty2sb e Ty2, e linhagem selvagem (WT) como controle negativo.

5.1.4.3 Vetores integrativos para a expressão de anticorpo

Com base nos resultados da caracterização dos vetores-teste, foram desenvolvidos dois vetores integrativos Ty2sb para expressão do fragmento scFv anti-CD3: (i) pTyCD3GFP produz tanto o scFv anti-CD3 e o GFP a partir da clivagem do peptídeo P2A, permitindo rastreamento por citometria e por fluorescência intracelular; (ii) pTyCD3 versão sem GFP, destinada à aplicação terapêutica final (Figura 12). A confirmação estrutural foi realizada por digestão com NotI, liberando fragmentos de 5500 pb + 3000 pb (TyCD3GFP) e 4700 pb + 3000 pb (TyCD3) (Figura 13).



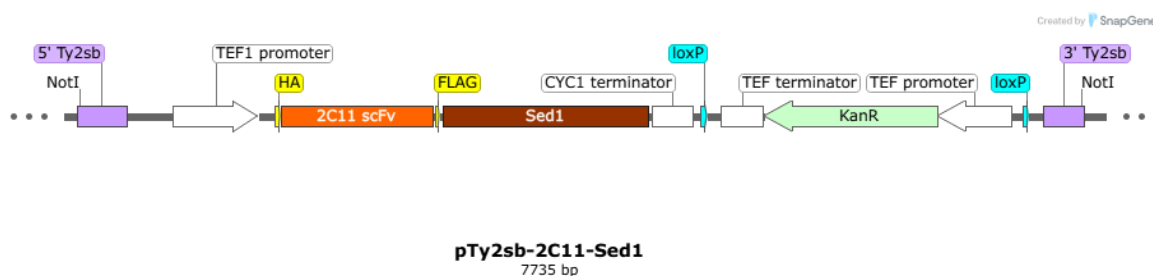


Figura 12 - Mapa dos plasmídeos pTy2sb-2c11-Sed1-GFP e pTy2sb-2c11-Sed1. Os esquemas mostram o cassete de expressão com regiões flangeadoras Ty2, promotor TEF, gene de expressão de scFv anti-CD3, proteína de ancoragem SED1, as *tags* HA e FLAG, gene de resistência à geneticina e gene de expressão de GFP.

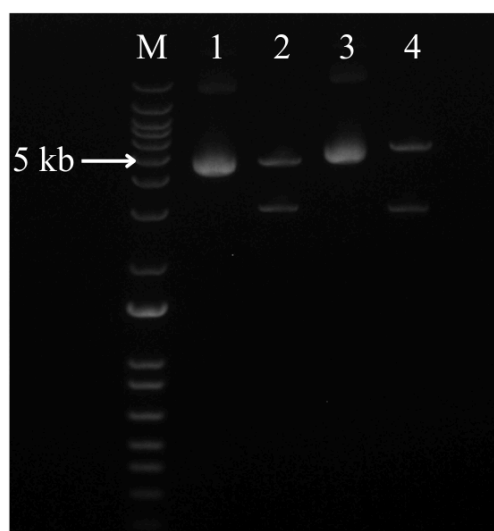


Figura 13 - Confirmação dos vetores Ty anti-CD3 por restrição enzimática. Eletroforese em Gel de Agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio. (M) Marcador 1 kB Ladder. (1) e (3) pTy2sb-2C11-Sed1 e pTy2sb-2C11-Sed1-GFP intactos, respectivamente. (2) e (4) pTy2sb-2C11-Sed1 e pTy2sb-2C11-Sed1-GFP respectivamente, digeridos com NotI.

5.2 Caracterização dos clones produtores de anticorpo

5.2.1 Estabilidade genética: comparação entre sistemas episomal e integrativo

Os resultados revelaram perda completa do vetor episomal após seis gerações sem pressão seletiva: nenhuma colônia com o vetor pSEDsa-CD3 sobreviveu à re-exposição ao antibiótico. Em contraste, todos os três clones pTyCD3 mantiveram a resistência (Figura 14).

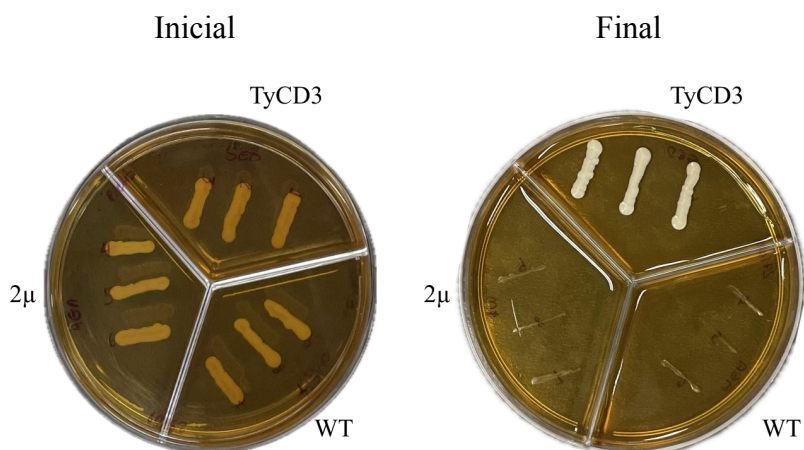


Figura 14 - Estabilidade genética dos vetores 2 μ e TyCD3 por plaqueamento. Três clones de cada linhagem (WT, TyCD3 e 2 μ) foram crescidos (placa inicial), subcultivados por seis gerações sem pressão seletiva e, subsequentemente, reexpostos ao antibiótico (placa final).

Paralelamente, as PCRs de colônia realizadas ao início e ao final do experimento corroboraram esta observação (Figura 15). Apesar do sistema 2 μ ser altamente estável em leveduras, o custo metabólico promovido pela expressão desse vetor pode ter proporcionado uma desvantagem seletiva, e células não transformantes se sobressaíram nas colônias. A linhagem TyCD3, por sua vez, demonstrou ser geneticamente estável, característica vantajosa para o desenvolvimento de uma bioterapia ao viabilizar o uso dessa linhagem no ambiente *in vivo*, onde a administração contínua do agente seletivo (G418) não é possível. Além disso, a estabilidade do vetor é particularmente atrativa em cepas de difícil clonagem, como a *S. boulardii*, pois reduz a necessidade de repetir o processo de transformação frente à perda plasmidial.

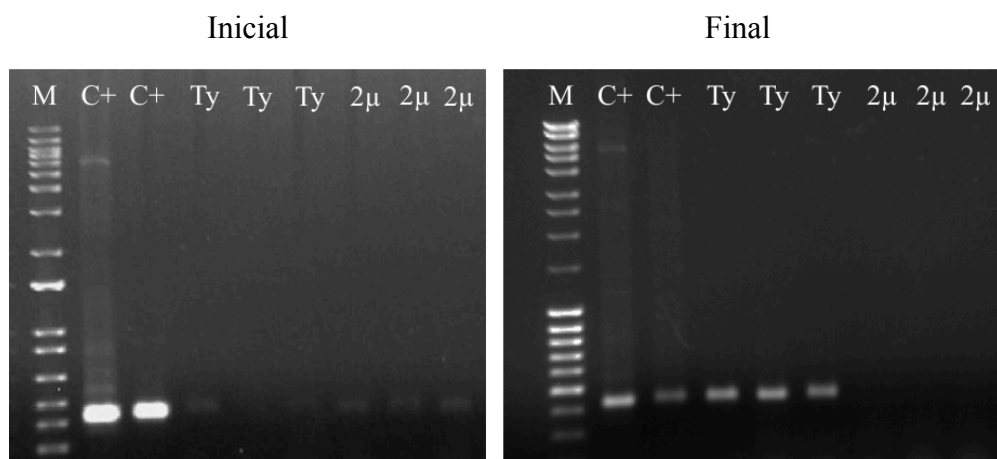


Figura 15 - Estabilidade genética dos vetores 2μ e TyCD3 por PCR. Eletroforese em Gel de Agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio. Clones foram crescidos inicialmente em meio seletivo (PCR Inicial), subcultivados por seis gerações sem geneticina, e replaqueados em meio seletivo (PCR Final).

5.2.2 Expressão heteróloga

A análise por citometria de fluxo para detecção de HA-tag fusionada ao anti-CD3 revelou diferenças significativas entre as linhagens (Figura 16). A linhagem 2μ apresentou média de 16,47% de células positivas, significativamente inferior à linhagem TyCD3, com média de 33,73% (p-value = 0,002022).

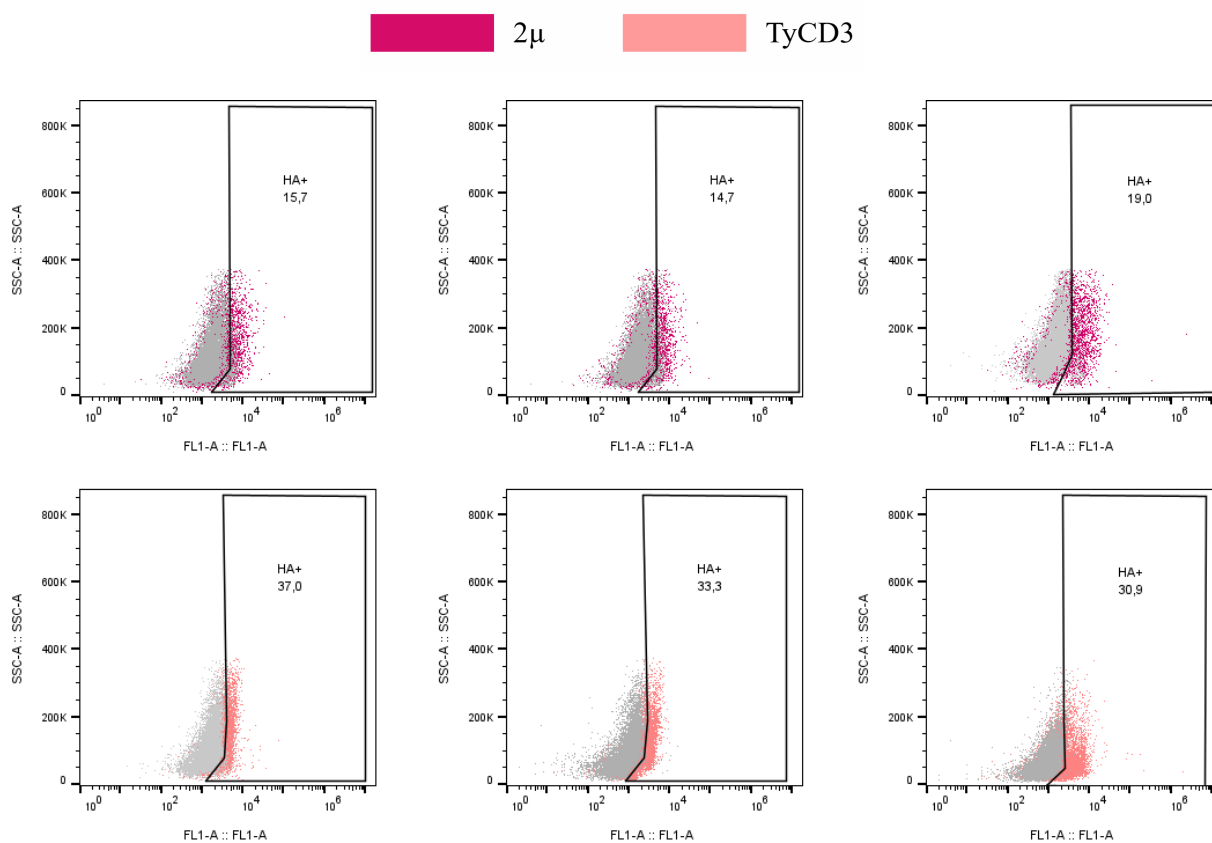


Figura 16 - Análise por citometria de fluxo da expressão de anti-CD3. As linhagens 2μ e TyCD3 foram marcadas com HA-tag conjugado a FITC. Os transformantes não marcados foram usados como controle negativo.

A linhagem TyCD3GFP teve uma porcentagem de células GFP+ próxima a 100% mensurada pela citometria de fluxo (Figura 17). Essa discrepância na expressão heteróloga entre os vetores integrativos TyCD3GFP e TyCD3 foi inesperada, pois a correta transcrição

do cassete estabelecida pela detecção do GFP, localizado a jusante do gene codificante do anticorpo, implicaria em uma eficiência similar para a expressão do anti-CD3. Diversas hipóteses podem explicar este resultado: (i) ineficiência traducional ou dobramento inadequado da proteína mais complexa; (ii) falhas no direcionamento do anticorpo para a parede celular; (iii) oclusão do anti-CD3 por estruturas nativas da parede celular da levedura; ou (iv) inadequação do protocolo de marcação do anticorpo para citometria de fluxo.

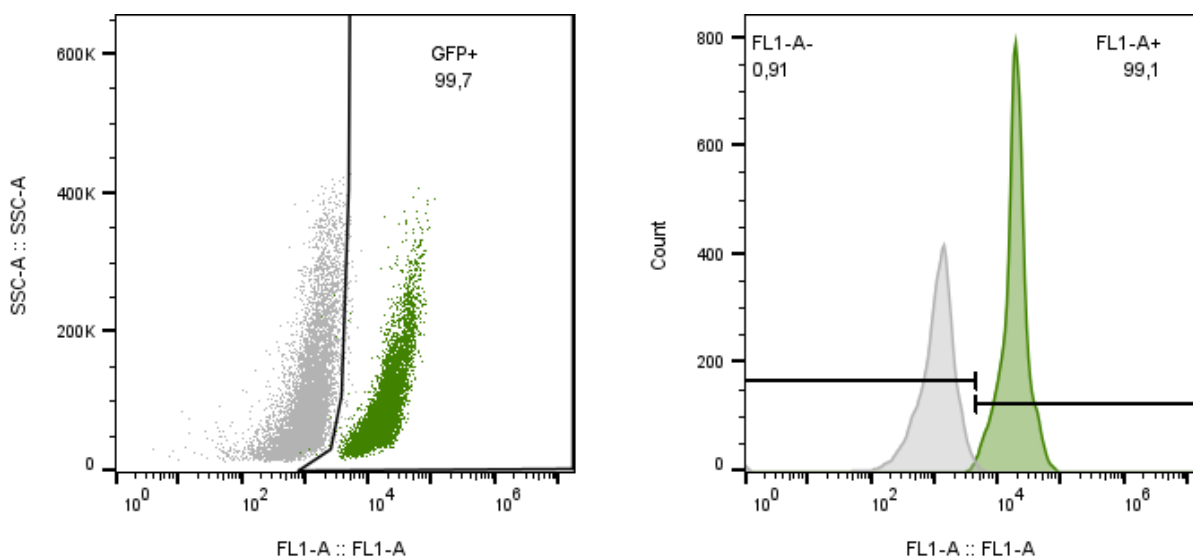


Figura 17 - Análise por citometria de fluxo da expressão de GFP na linhagem TyCD3GFP. A linhagem selvagem foi utilizada como controle negativo.

Diante destes resultados, procedeu-se à investigação sistemática da expressão. Primeiramente, observamos redução da viabilidade celular quando PBS 1× era utilizado, solução padrão para lavagem e ressuspensão celular em protocolos de citometria, em comparação com outras soluções (Tabela 8). A substituição do PBS por água durante o procedimento de marcação para citometria elevou a percentagem de células positivas para 58,1% na linhagem TyCD3 e 27,2% na linhagem 2μ em 30°C.

Tabela 8 - Avaliação da viabilidade celular por contagem de unidades formadoras de colônia de *S. boulardii* incubada em diferentes soluções.

	Água	PBS 1x	Sorbitol 2M	Salina
n ^o CFU	>1000	36	>1000	450

Adicionalmente, avaliamos o efeito da temperatura de cultivo sobre a expressão do anticorpo. A temperatura influencia diretamente o metabolismo celular, a taxa de tradução e a eficiência do dobramento proteico no retículo endoplasmático (Gasser et al., 2008). Assim, para proteínas complexas como anticorpos, temperaturas reduzidas podem favorecer a expressão, sobretudo em casos de custo metabólico como visto na linhagem 2 μ . A 28°C, a porcentagem de células positivas aumentou para 62,7% (TyCD3) e 39,1% (2 μ). Em 25°C, observou-se aumento ainda mais expressivo, com 88% de células positivas na linhagem TyCD3 e 58% na linhagem 2 μ (Figura 18).

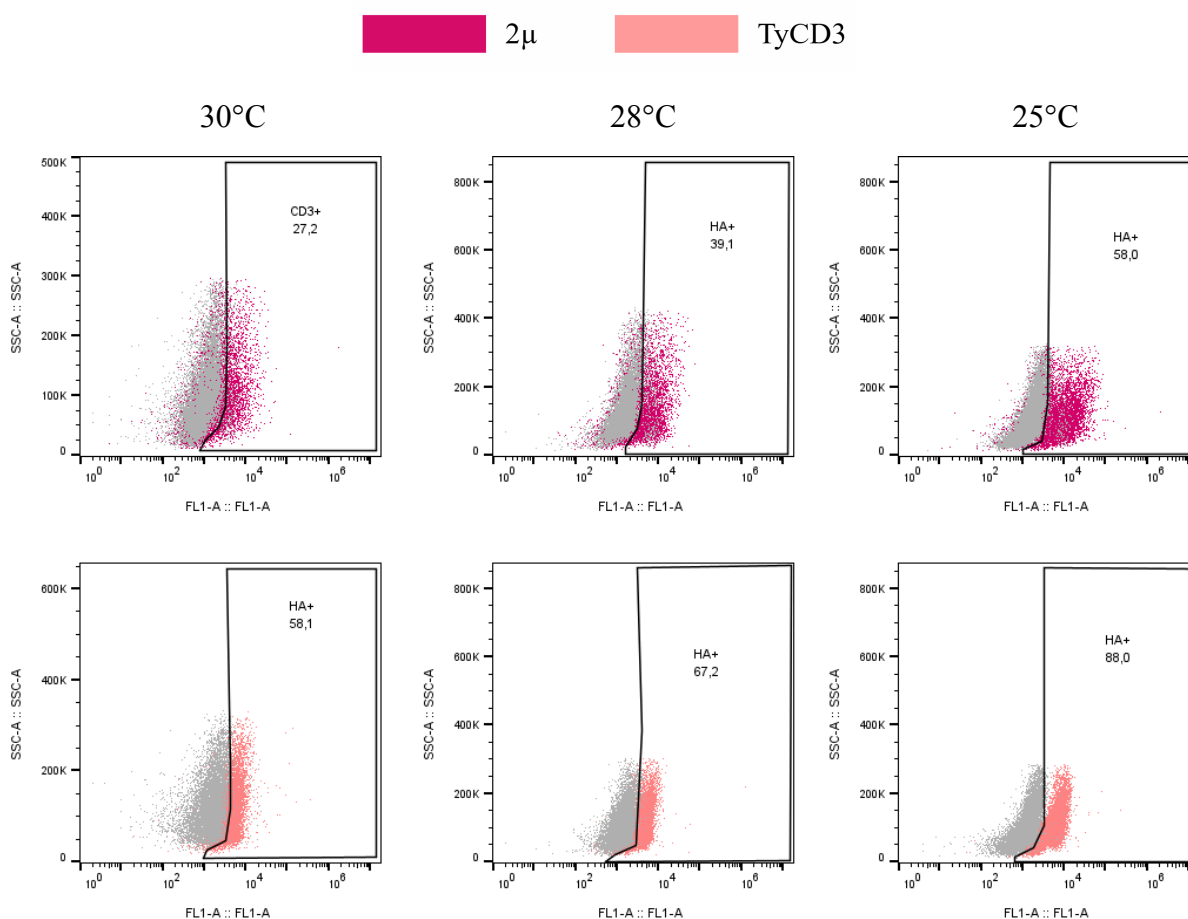


Figura 18 - Efeito da temperatura na expressão heteróloga do anticorpo. As linhagens 2 μ e TyCD3 foram submetidas a diferentes temperaturas de cultivo (30°C, 28°C e 25°C). Os transformantes não marcados estão como controle negativo.

Para validar a reprodutibilidade do protocolo otimizado, os clones foram submetidos a replicatas independentes e os resultados mostraram a constância dos altos níveis de detecção (Figura 19), com diferença significativa entre as linhagens (p-value = 0,002790).

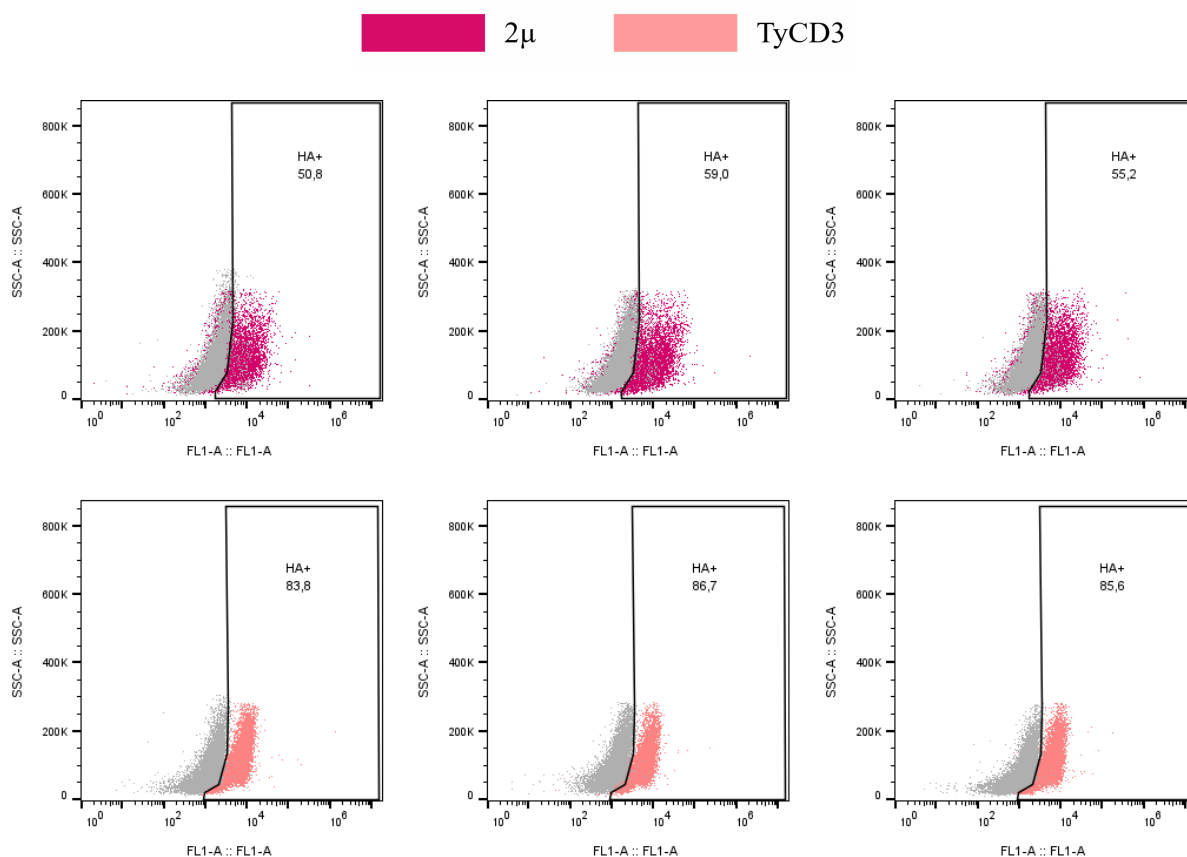


Figura 19 - Análise da estabilidade da expressão heteróloga. As linhagens 2μ e TyCD3 foram cultivadas em 25°C e marcadas com HA-tag conjugado a FITC, detectado por Citometria de Fluxo. Os transformantes não marcados estão como controle negativo.

Após os testes de estabilidade do vetor (seção 5.2.1), observamos aumento inesperado na detecção do scFv anti-CD3, com média de 95,6% de células positivas (Figura 20), estatisticamente superior à média de 85,4% obtida antes do teste de estabilidade genética (p -value = 0.001). É importante notar que essa quantificação foi realizada utilizando um sistema de detecção diferente: anti-FLAG primário seguido de anti-Rabbit IgG-FITC secundário (marcação em sanduíche), devido à indisponibilidade do reagente anti-HA-FITC utilizado nos experimentos anteriores. Essa mudança metodológica levantou três hipóteses para explicar o aumento observado:

(i) Artefato de amplificação de sinal: a marcação em sanduíche poderia gerar amplificação artificial do sinal fluorescente em comparação com a marcação direta, resultando em maior sensibilidade de detecção sem necessariamente refletir aumento real da expressão proteica;

(ii) Maior eficiência do epítipo FLAG: a *tag* FLAG poderia ser mais acessível ou apresentar maior afinidade pelo anticorpo correspondente em comparação com a *tag* HA, resultando em detecção superior da mesma quantidade de proteína expressa;

(iii) Seleção clonal por pressão metabólica: o subcultivo por seis gerações sem pressão seletiva, seguido de re-exposição ao antibiótico, poderia ter favorecido a sobrevivência de clones com maior número de integrações cromossômicas do cassete Ty2sb, os quais seriam mais capazes de expressar níveis elevados da proteína de resistência e, conseqüentemente, restabelecer crescimento em meio seletivo mais rapidamente e com mais densidade de produção de anticorpo.

Para discriminar entre essas hipóteses, submetemos a linhagem epissomal 2 μ ao mesmo protocolo de marcação sanduíche. Os resultados mostraram valores médios essencialmente similares entre os dois sistemas de marcação (58,1% com anti-FLAG e 55% com anti-HA), descartando artefatos metodológicos relacionados à amplificação de sinal ou à eficiência da *tag*. Portanto, este resultado demonstra que a estratégia Ty permite seleção natural de clones superprodutores, e essa propriedade pode ser explorada intencionalmente para aumentar a expressão heteróloga.

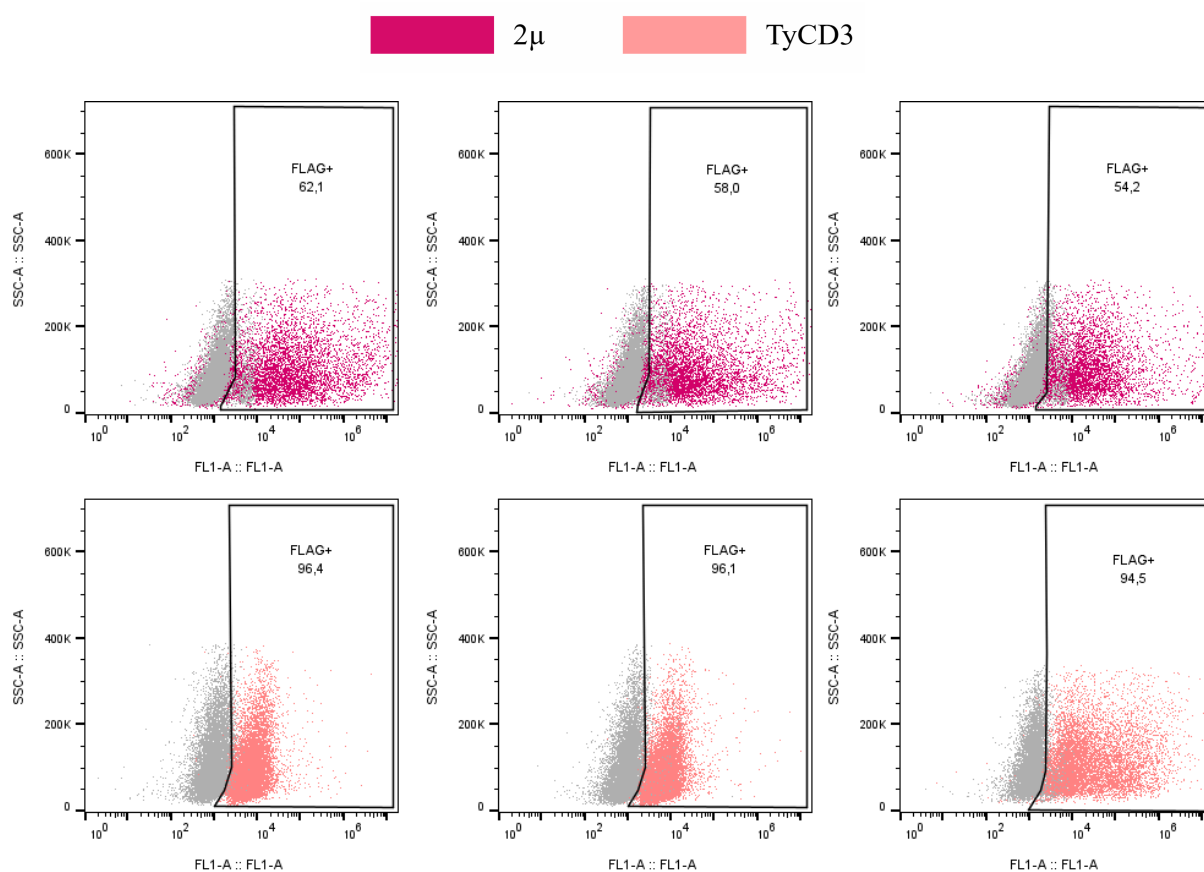


Figura 20 - Análise do clone superprodutor por citometria de fluxo. As linhagens 2 μ e TyCD3 foram marcadas com anti-FLAG + anti-Rabbit-FITC.

Em resumo, os dados revelam uma produção significativamente maior na linhagem TyCD3 em comparação com 2 μ (p-value = 0.002247 para o protocolo ajustado; p-value = 0.002022 para o protocolo padrão). É importante considerar que a diferença entre esses vetores não se restringe apenas à natureza epissomal ou integrativa, mas também em diferentes promotores, peptídeos sinal e espaçadores. Assim, com intuito de elucidar qual característica foi decisiva para a maior expressão, diferentes plasmídeos podem ser desenhados para uma investigação futura, permutando os componentes de ambos vetores.

Além disso, os resultados também mostram a metodologia como influenciadora nos níveis de expressão de cada clone de maneira significativa (Figura 21): após o ajuste do protocolo, a média de expressão de anticorpo da linhagem TyCD3 aumentou em 2,83 vezes (p-value= 0.000270) e se igualou à expressão de GFP observada no vetor TyCD3GFP; a média da linhagem 2 μ aumentou em 3,5 vezes (p-value = 0.000395).

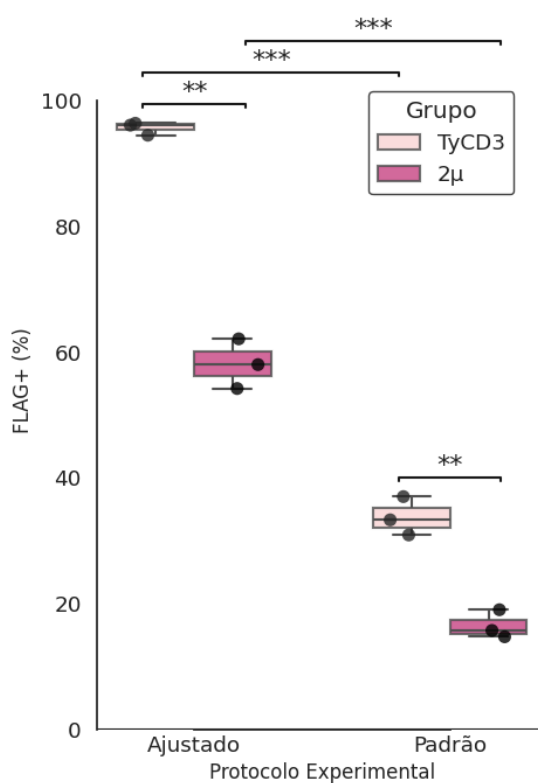


Figura 21 - Comparação de expressão em função da linhagem e do protocolo. Os níveis médios de expressão foram comparados entre os clones 2 μ e TyCD3 sob dois protocolos distintos. No protocolo padrão, os clones foram cultivados overnight a 30°C, lavados e

ressuspensos em PBS para análise por citometria de fluxo. No protocolo ajustado, os clones foram cultivados overnight a 25°C, lavados e ressuspensos em água para análise por citometria de fluxo.

5.2.3 Curva de crescimento

As linhagens TyCD3 e TyCD3GFP apresentaram perfil de crescimento similar à linhagem selvagem, demonstrando a ausência de impacto da expressão heteróloga sobre o comportamento fisiológico nativo da levedura, mesmo com alto nível de produção do anticorpo ou do GFP (Figura 22). Já a linhagem 2 μ teve um prejuízo devido ao custo metabólico gerado por esse sistema, assim como descrito na seção 5.1.4.3. Apesar do atraso no crescimento, o clone 2 μ consegue alcançar as demais linhagens; logo, a expressão não chega a ser letal para a célula.

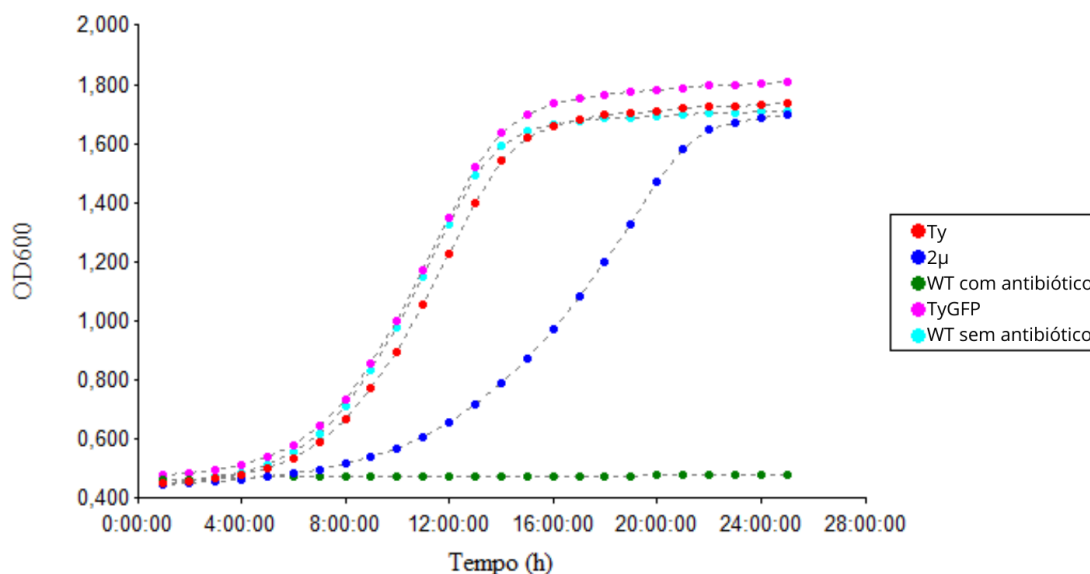


Figura 22 - Curva de crescimento dos clones de *S. boulardii*. A Densidade Ótica das linhagens WT, TyCD3, 2 μ e TyCD3GFP (Tabela 1) foi medida de hora em hora após o início do inóculo mantido à 25°C e acrescido de pressão seletiva. A linhagem WT foi monitorada com e sem antibiótico.

5.3 Revestimento lipídico

5.3.1 Detecção do revestimento lipídico

O processo de encapsulamento apresentou eficiência superior a 97% de células efetivamente encapsuladas, estável mesmo após 80 dias de armazenamento a -80°C . Esse resultado reforça a estabilidade da estrutura de revestimento a longo prazo, um achado interessante para considerar a estocagem do bioterápico (Figura 23).

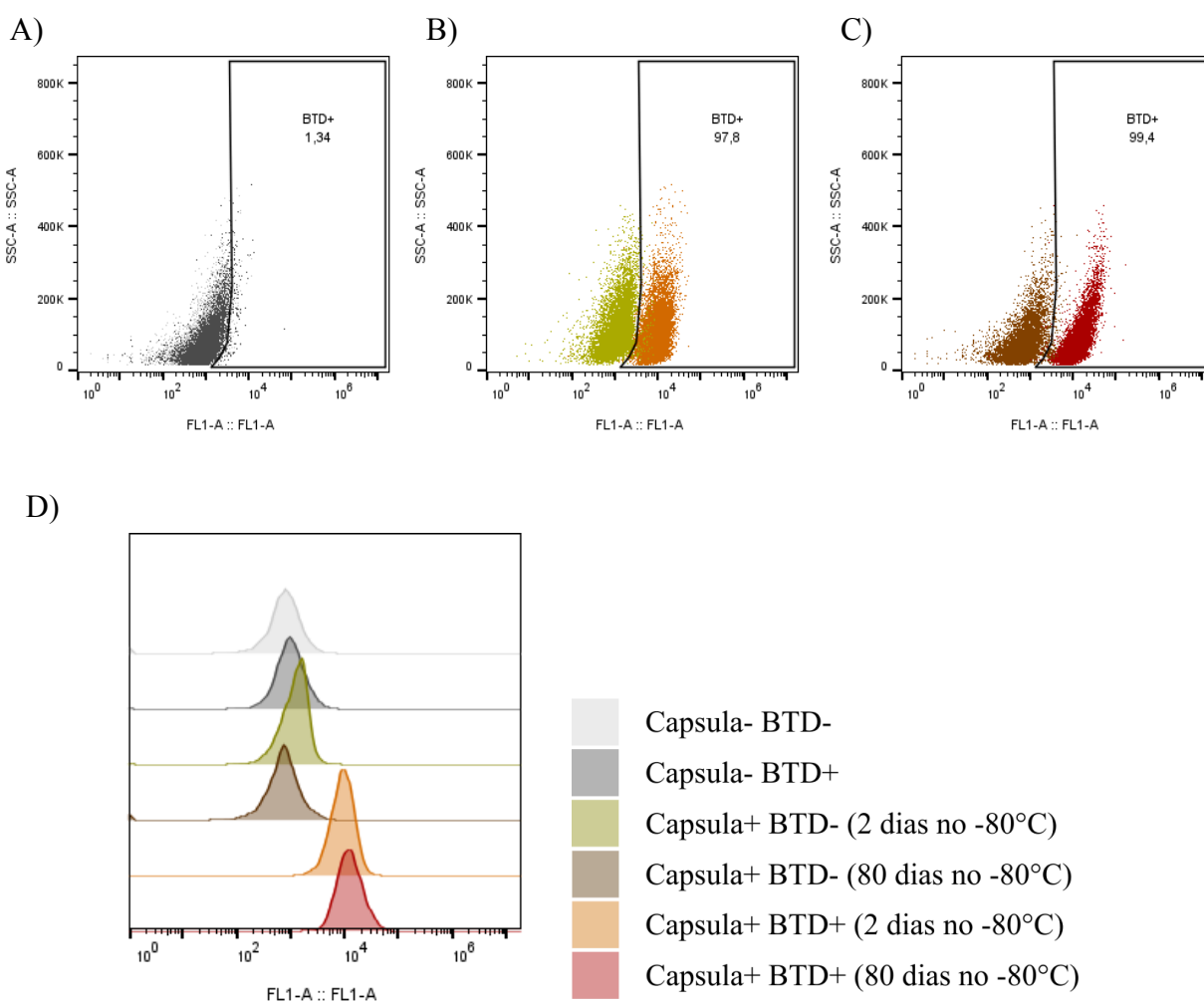


Figura 23 - Eficiência e manutenção do encapsulamento de *S. boulardii*. As células foram analisadas por citometria de fluxo por meio da marcação com o marcador fluorescente BTD-quinolina após dois dias (B) e 80 dias (C) de armazenamento a -80°C . As células não encapsuladas (A) marcadas e não marcadas estão como controle negativo, assim como as

células encapsuladas não marcadas em (B) e (C). (D) Distribuição da intensidade de fluorescência representada em histograma.

5.3.2 Análise do efeito do revestimento *in vitro*

Nos ensaios de viabilidade celular da levedura *in vitro*, o encapsulamento conferiu 1,4 vezes mais viabilidade em fluido gástrico simulado e 1,8 vezes mais viabilidade em fluido intestinal simulado em comparação com células não encapsuladas (Figura 24). No entanto, a levedura não encapsulada obteve 1,9 vezes mais colônias viáveis no controle (incubação em água) em comparação com a encapsulada.

Esse resultado pode indicar que a cápsula lipídica retarda o crescimento celular em boas condições, como na água. Já em condições adversas simuladas do TGI, o revestimento lipídico promoveu um efeito protetor para a levedura e promissor para o *delivery* da bioterapia via oral. Ainda assim, mais ensaios são necessários para conferir a reprodutibilidade desse resultado e para caracterizar com mais robustez o impacto do encapsulamento na integridade da célula e do anticorpo perante diferentes condições.

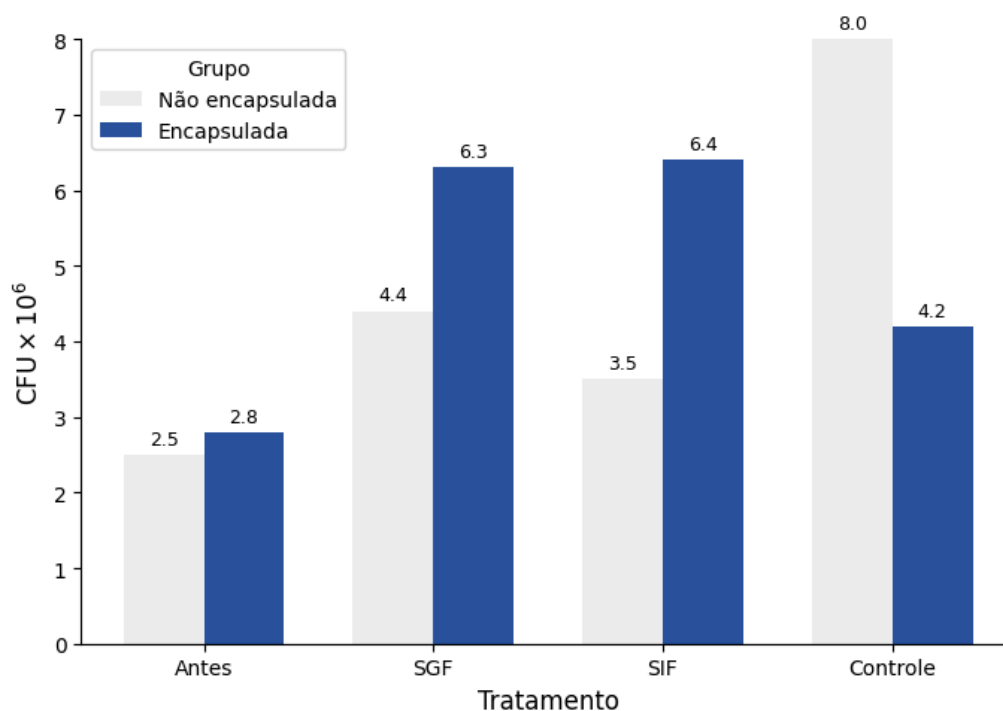


Figura 24 - Efeito do encapsulamento lipídico na viabilidade de *S. boulardii*. As células foram incubadas em fluido gástrico (SGF) e intestinal (SIF) simulados. A CFU foi quantificada antes e após a incubação. O controle é incubação em água.

5.3.3 Análise do efeito do revestimento *in vivo*

Nos ensaios *in vivo*, leveduras encapsuladas exibiram aumento mínimo de três vezes no tempo de detecção da proteína GFP ao longo do TGI (Figura 25). Embora não tenhamos detectado a fluorescência do grupo não encapsulado a partir de oito horas pós gavagem, ainda era possível isolar a levedura nas fezes dos camundongos desse grupo. As leveduras transformantes foram identificadas por plaqueamento de fezes em ambos os grupos até 48h após administração das células, mas o processamento dessa amostra não foi padronizado; logo, não foi possível quantificar a CFU para comparar os grupos. A partir de 72h, não havia mais colônias em placa.

Portanto, o perfil de detecção de GFP nas imagens dos camundongos pode indicar: (i) maior número de células produtoras no grupo encapsulado devido à proteção do revestimento durante o trânsito gastrointestinal ou (ii) menor produção da proteína heteróloga no grupo não encapsulado frente a um prejuízo metabólico, por conta de estresse celular.

Independentemente, esses resultados sugerem que a estratégia de encapsulamento lipídico pode ser relevante para o *delivery* de anticorpos e reforçam a possibilidade de testar esse método em modelos experimentais de doenças inflamatórias que acometem o TGI, como Crohn e Colite.

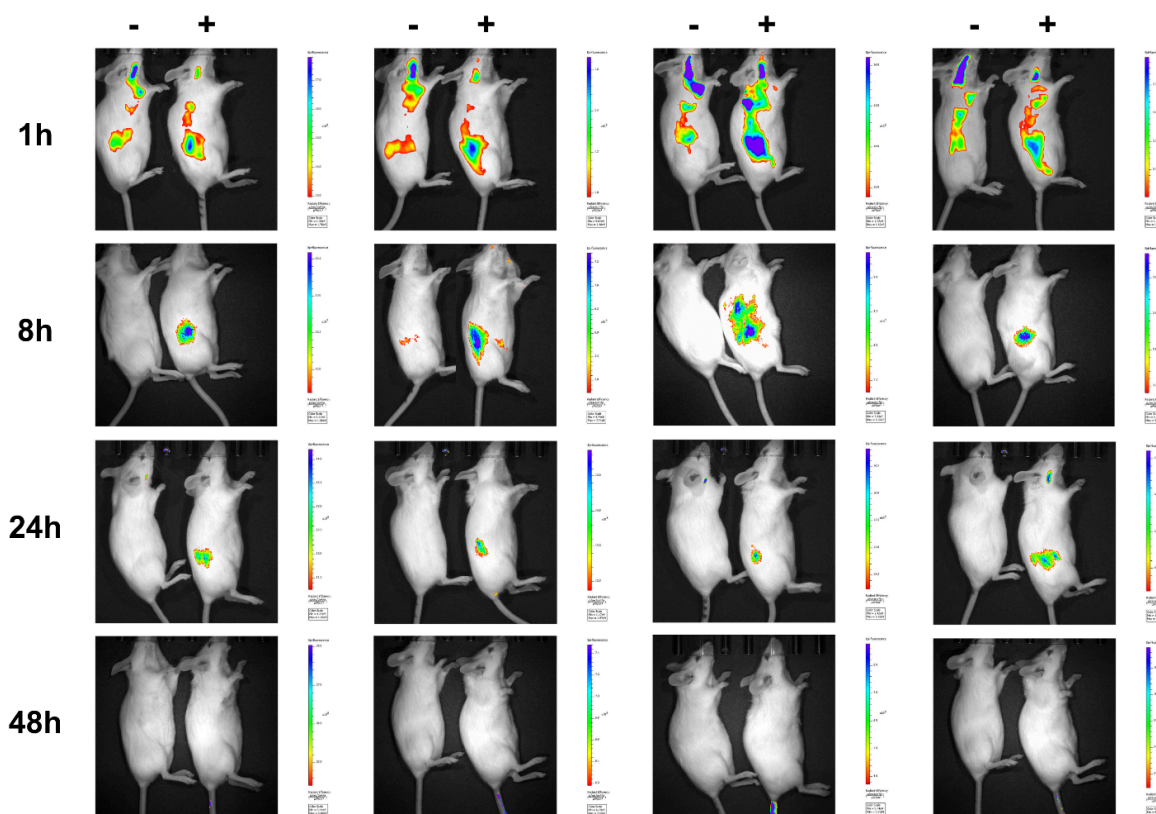


Figura 25 - Ensaio *in vivo* do *delivery* de *S. boulardii* com e sem cápsula. As células encapsuladas (+) e não encapsuladas (-) expressando GFP em camundongos foram detectadas por IVIS Lumina uma hora, oito horas, 24 horas e 48 horas após a administração oral da levedura transformante com o vetor Tysb.

5.3.4 Análise do efeito do revestimento *ex vivo*

A detecção de GFP no intestino *ex vivo*, entretanto, revelou um padrão incongruente com os dados do *in vivo*. Nos órgãos do grupo de levedura não encapsulada, duas horas após a administração da dose, a fluorescência média foi superior em comparação com a encapsulada (Figura 26), o oposto observado na imagem dos camundongos uma hora após a gavagem. Diante desse resultado, é crucial repetir o experimento com o intuito de averiguar a causa dessa discordância.

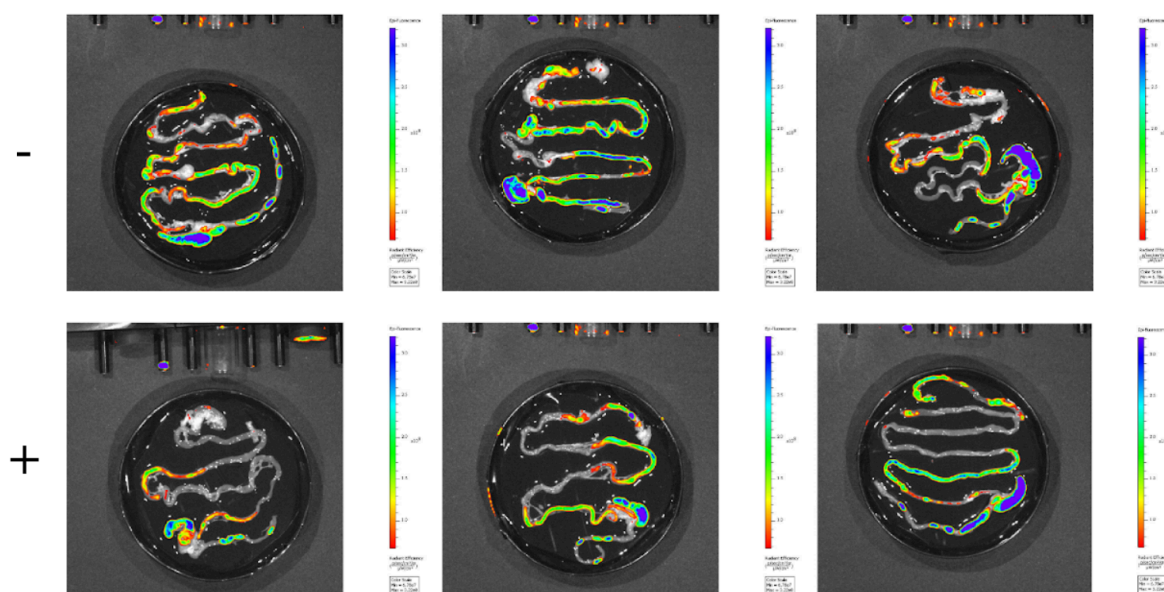


Figura 26 - Ensaio *ex vivo* do *delivery* de *S. boulardii* com e sem cápsula. Imagens do intestino de camundongos que receberam a levedura não encapsulada (-) e encapsulada (+) expressando GFP foram obtidas por IVIS Lumina duas horas após a administração oral da levedura transformante com o vetor Tysb.

5.3.5 Análise do perfil de estabilidade do scFv *in silico*

A instabilidade conformacional de proteínas terapêuticas ao longo do trato gastrointestinal está intimamente relacionada à variação da carga líquida da molécula em função do pH. Em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico (pI), ocorre protonação de resíduos ionizáveis, resultando em carga líquida positiva e aumento das interações eletrostáticas não específicas; acima do pI, a proteína adquire carga predominantemente negativa, o que também pode favorecer processos de desnaturação e agregação (Pace et al., 2009; Uversky, 2013). Os resultados de modelagem eletrostática indicaram que o scFv anti-CD3 é altamente vulnerável às condições fisiológicas do estômago, onde o pH significativamente abaixo do pI (5,16) promove um estado de protonação que compromete sua estabilidade conformacional (Figura 27), indicando que a administração do anticorpo isolado tende a resultar em perda estrutural e funcional antes de atingir o sítio terapêutico de interesse. Esse resultado reforça o potencial do revestimento lipídico para aumentar a eficácia da entrega de proteínas.

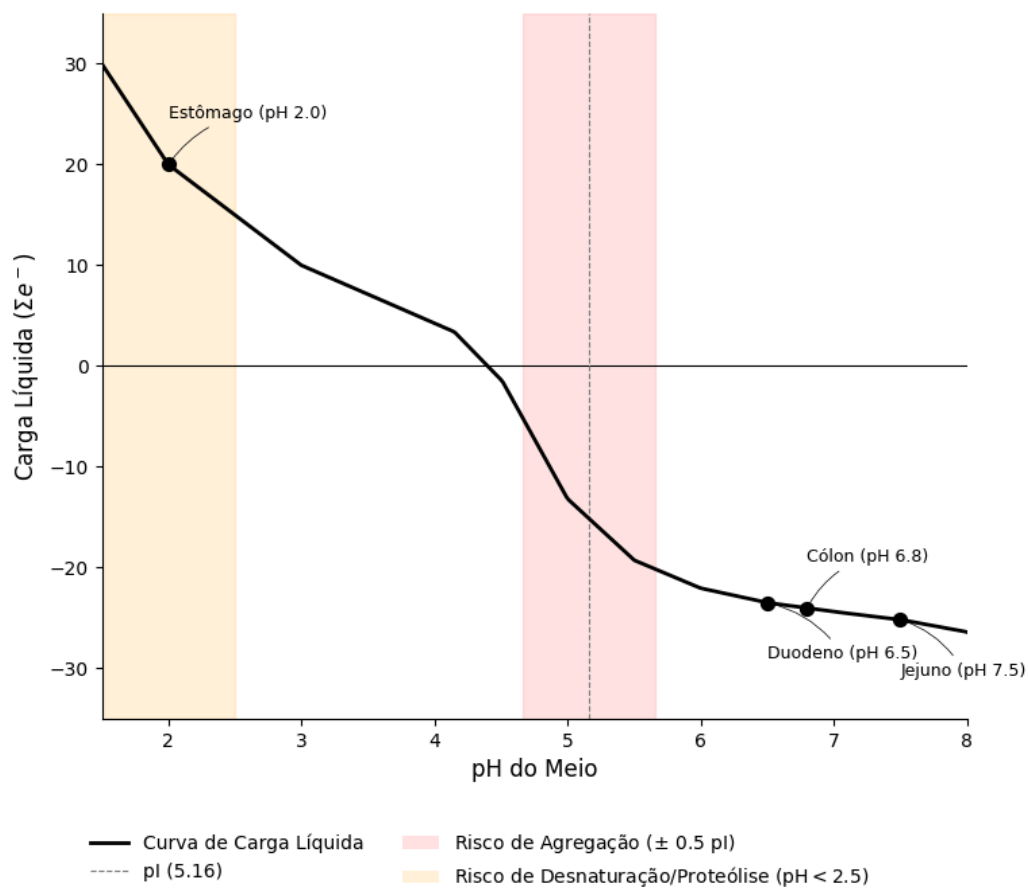


Figura 27 - Representação do ponto isoelétrico (pI) da proteína scFv anti-CD3. A figura mostra suscetibilidade à desnaturação e à agregação em diferentes parâmetros de pH, além de indicar os pontos sob condições do Trato Gastrointestinal (TGI). Fonte: elaboração da autora.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho caracterizou a expressão heteróloga de anticorpos em *S. boulardii* sob o controle de distintos sistemas de vetores plasmidiais, com o objetivo de estabelecer uma plataforma biotecnológica voltada a aplicações terapêuticas. A análise comparativa das construções avaliadas demonstrou o potencial do vetor TyCD3 para o estabelecimento do biofármaco devido ao desempenho consistentemente superior em todos os parâmetros investigados. Com o clone TyCD3, observou-se elevada estabilidade genética ao longo das gerações, reduzido custo metabólico imposto à célula hospedeira e níveis significativamente mais altos de expressão do anticorpo recombinante quando comparados ao sistema 2 μ . Para além da escolha do plasmídeo, os resultados evidenciaram que as condições de cultivo e de processamento celular constituem um fator determinante para a produção e para a detecção do anticorpo. Esse achado destaca a relevância do metabolismo e da viabilidade celular da levedura para modular os níveis de expressão heteróloga.

Outro eixo central deste estudo foi o encapsulamento das células recombinantes como requisito para a entrega terapêutica. O revestimento lipídico conferiu proteção efetiva às leveduras em condições *in vitro*. Nos ensaios *in vivo*, essa proteção traduziu-se em maior tempo de detecção do GFP no trato gastrointestinal de camundongos, sugerindo que o encapsulamento amplia a janela terapêutica de atuação do sistema. De forma complementar, as análises *in silico* indicaram elevada suscetibilidade do anticorpo à degradação proteolítica em condições de pH ácido, reforçando a importância estratégica do encapsulamento não apenas para a proteção da célula produtora, mas também, potencialmente, para a preservação da integridade estrutural e funcional do anticorpo.

Apesar dos avanços obtidos, algumas lacunas experimentais permanecem e constituem oportunidades para investigações futuras. Embora tenha sido possível ampliar o número de clones obtidos por transformação, a taxa de sucesso do protocolo ainda é baixa, e isso representa uma limitação para a clonagem da *S. boulardii*. Ademais, o possível efeito modulador da radiação UV sobre a eficiência de transformação não foi amplamente explorado, mantendo em aberto uma variável que pode contribuir para a otimização do protocolo. No contexto do encapsulamento, faz-se necessária uma caracterização mais robusta, especialmente na capacidade da cápsula lipídica de proteger o anticorpo recombinante durante sua passagem pelo trato gastrointestinal.

Em conjunto, os resultados apresentados estabelecem bases consistentes para o desenvolvimento de uma rota biotecnológica inovadora de produção *in situ* de biofármacos, com potencial para superar limitações inerentes às terapias convencionais. Nesse cenário, a validação do eLBP em modelos experimentais configura-se como perspectiva futura. Propõe-se, portanto, a avaliação desta plataforma em modelos de colite crônica, de aloenxerto de pele, e de alergia alimentar, contextos no quais há resposta imunomediada passível de modulação por estratégias tolerogênicas baseadas em anticorpos anti-CD3.

REFERÊNCIAS

- Azevêdo, M. G. D. (2021). *Expressão heteróloga de fragmentos de anticorpos em Saccharomyces boulardii para tratamento da colite experimental* (Dissertação de mestrado). Universidade de Brasília.
- Barc, M. C., Charrin-Sarnel, C., Rochet, V., Bourlioux, P., Sandré, C., Boureau, H., & Doré, J. (2008). Molecular analysis of the digestive microbiota in a gnotobiotic mouse model during antibiotic treatment: Influence of *Saccharomyces boulardii*. *Anaerobe*, *14*(4), 229–233.
- Becker, D. M., & Guarente, L. (1991). High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods in Enzymology*, *194*, 182–187.
- Belghith, M., Bluestone, J. A., Barriot, S., Mégret, J., Bach, J. F., & Chatenoud, L. (2003). TGF- β -dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by anti-CD3 in autoimmune diabetes. *Nature Medicine*, *9*(9), 1202–1208.
- Ben-Horin, S., Kopylov, U., & Chowers, Y. (2014). Optimizing anti-TNF treatments in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity Reviews*, *13*(1), 24–30.
- Bermúdez-Humarán, L. G., & Langella, P. (2017). Use of traditional and genetically modified probiotics in human health: What does the future hold? *Microbiology Spectrum*, *5*(5), 363–370.
- Braat, H., Rottiers, P., Hommes, D. W., Huyghebaert, N., Remaut, E., Remon, J. P., van Deventer, S. J., Neiryck, S., Peppelenbosch, M. P., & Steidler, L. (2006). A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, *4*(6), 754–759.
- Brayden, D. J., & Mrsny, R. J. (2011). Oral peptide delivery: Prioritizing the leading technologies. *Therapeutic Delivery*, *2*(12), 1567–1573.
- Breinig, F., & Schmitt, M. (2002). Cell-wall-anchored fusion proteins with extended spacer improve surface display in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *58*, 637–644.
- Broach, J. R., Atkins, J. F., McGill, C., & Chow, L. (1979). Identification and mapping of the transcriptional and translational products of the yeast plasmid 2 μ circle. *Cell*, *16*, 827–839.

Buts, J. P., Bernasconi, P., Vaerman, J. P., & Dive, C. (1994). Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. *Digestive Diseases and Sciences*, *39*(1), 220–228.

Cao, Z., & Liu, J. (2024). Coated bacteria: Advanced living materials for microbial therapy. *Accounts of Materials Research*, *5*(7), 872–883.

Cao, Z., Wang, Y., Zhang, X., Zhao, J., & Zhao, Y. (2019). Biointerfacial self-assembly generates lipid membrane-coated bacteria for enhanced oral delivery and treatment. *Nature Communications*, *10*, 5783.

Chatenoud, L., & Bluestone, J. A. (2007). CD3-specific antibodies: A portal to the treatment of autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, *7*(8), 622–632.

Chatenoud, L., Ferran, C., Legendre, C., Thouard, I., Merite, S., Reuter, A., & Bach, J. F. (1990). In vivo cell activation following OKT3 administration. *Transplantation*, *49*(4), 697–702.

Chatenoud, L., Thervet, E., Primo, J., & Bach, J. F. (1994). Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(1), 123–127.

Chen, Y., Nielsen, J., & Liu, Z. (2018). Engineering yeast for high-level production of recombinant proteins. *Biotechnology Advances*, *36*(2), 510–523.

Chen, C., Garcia, Z., Chen, D., Liu, H., & Trelstad, P. (2025). Considerations on costs and supply of antibody therapies. *mAbs*, *17*(1).

Cole, S. P. C., et al. (1984). Human monoclonal antibodies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *62*, 109–120.

Coley, W. B. (1910). The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, *3*, 1–48.

Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, *162*(1), 56–67.

Cosimi, A. B., Colvin, R. B., Burton, R. C., Rubin, R. H., Goldstein, G., Kung, P. C., et al. (1981). Use of monoclonal antibodies to T-cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts. *New England Journal of Medicine*, *305*, 308–314.

Czerucka, D., Roux, I., Rampal, P., & Colombel, J. F. (2000). *Saccharomyces boulardii* preserves barrier function and modulates signal transduction pathways in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected cells. *Infection and Immunity*, *68*(10), 5998–6004.

Da Silva, N. A., & Srikrishnan, S. (2012). Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, *12*(2), 197–214.

Drews, J. (2000). Drug discovery: A historical perspective. *Science*, *287*, 1960–1964.

Edelman, G. M., & Benacerraf, B. (1962). Structural and functional relations between antibodies and proteins of the gamma-system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *48*(6), 1035–1042.

Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J. L., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories*, *8*, 17.

Food and Drug Administration. (2016). *Early clinical trials with live biotherapeutic products: Chemistry, manufacturing, and control information*. U.S. Department of Health and Human Services.

Food and Drug Administration. (2020). *Definition of the term “biological product”*. Federal Register.

Frossard, C. P., Steidler, L., & Eigenmann, P. A. (2007). Oral administration of IL-10-secreting *Lactococcus lactis* prevents food-induced IgE sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *119*(4), 952–959.

Futcher, A. B. (1988). The 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *4*(1), 27–40.

Futcher, A. B., & Cox, B. S. (1984). Copy number and the stability of 2-micron circle-based artificial plasmids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, *157*(1), 283–290.

Garcia Vilela, E., et al. (2008). Influence of *Saccharomyces boulardii* on intestinal permeability in Crohn's disease patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 43(7), 842–848.

Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., et al. (2008). Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: A host comparative overview. *Microbial Cell Factories*, 7, 11.

Gietz, R. D., & Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, 350, 87–96.

Goeddel, D. V., et al. (1979). Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), 106–110.

Graff, S., Chaumeil, J. C., Boy, P., Lai-Kuen, R., & Charrueau, C. (2008). Influence of pH conditions on the viability of *Saccharomyces boulardii* yeast. *Journal of General and Applied Microbiology*, 54(4), 221–227.

Hudson, L. E., et al. (2016). Transformation of probiotic yeast and recovery from gastrointestinal tissues. *Journal of Visualized Experiments*, (108), e53453.

Hudson, L. E., McDermott, C. D., Stewart, T. P., Hudson, W. H., Rios, D., Fasken, M. B., Corbett, A. H., & Lamb, T. J. (2014). Characterization of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in the healthy mucosal immune system. *PLOS ONE*, 9(8), e104414.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., & Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, 153(1), 163–168.

Jayaram, M., Li, Y. Y., & Broach, J. R. (1983). The yeast plasmid 2 μ circle encodes components required for its high copy propagation. *Cell*, 34, 95–104.

Kaplan, G. G., & Ng, S. C. (2025). The global burden of inflammatory bowel disease: From 2025 to 2045. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 22(10), 708–720.

- Karim, A. S., Curran, K. A., & Alper, H. S. (2013). Characterization of plasmid burden and copy number in *Saccharomyces cerevisiae* for optimization of metabolic engineering applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(8), 3689–3701.
- Kane, S., Huo, D., Aikens, J., & Hanauer, S. (2008). Medication nonadherence and the outcomes of patients with quiescent ulcerative colitis. *American Journal of Medicine*, 121(1), 39–44.
- Kupiec, M. (2025). Mutations and mitotic recombination events in nondividing cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 122(50), e2528526122.
- Maury, J., et al. (2016). EasyCloneMulti vectors for genomic integration. *PLoS ONE*, 11(3), e0150394.
- McFarland, L. V. (2010). Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology*, 16(18), 2202–2222.
- Mehta, S., Yang, X. M., Chan, C. S., Dobson, M. J., Jayaram, M., & Velmurugan, S. (2005). The 2 micron plasmid purloins the yeast cohesin complex. *Journal of Cell Biology*, 170(3), 381–392.
- Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., et al. (2019). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century. *Lancet*, 390(10114), 2769–2778.
- Ochi, H., et al. (2006). Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23), 8882–8887.
- Olinto, V. G. (2023). *Expressão heteróloga de fragmentos de anticorpos ancorados à parede de Saccharomyces boulardii* (Dissertação de mestrado). Universidade de Brasília.
- Pinhate, S. B. (2025). *Análise do efeito protetor da expressão heteróloga de fragmento scFv de anti-CD3 pela levedura Saccharomyces boulardii em modelo de colite experimental* (Dissertação de mestrado). Universidade de Brasília.

Renukuntla, J., Vadlapudi, A. D., Patel, A., Boddu, S. H. S., & Mitra, A. K. (2013). Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 447(1–2), 75–93.

Rizvi, S. M. A., Prajapati, H. K., & Ghosh, S. K. (2018). The 2 micron plasmid: A selfish genetic element with an optimized survival strategy within *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 64(1), 25–42.

Sastry, S. V., Nyshadham, J. R., & Fix, J. A. (2000). Recent technological advances in oral drug delivery—A review. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 3(4), 138–145.

Targownik, L. E., et al. (2020). Longitudinal trends in the direct costs and health care utilization ascribable to inflammatory bowel disease in the biologic era. *American Journal of Gastroenterology*, 115(1), 128–137.

Toruner, M., et al. (2008). Risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 134(4), 929–936.

Vandenplas, Y., Brunser, O., & Szajewska, H. (2009). *Saccharomyces boulardii* in childhood. *European Journal of Pediatrics*, 168(3), 253–265.

Verma, R., Boleti, E., & George, A. J. T. (1998). Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *Journal of Immunological Methods*, 216(1–2), 165–181.

