



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



ANDERSON DOS SANTOS RAMOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DO PRODUTO DO
PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO EUCARIÓTICA CODIFICANTE DE scFv anti-IL-1 β
CARREADO POR UMA LINHAGEM INVASIVA DE *Lactococcus lactis* NA DOENÇA
DE CROHN EXPERIMENTAL INDUZIDA POR TNBS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

JOÃO PESSOA – PB

2020



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



ANDERSON DOS SANTOS RAMOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DO PRODUTO DO
PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO EUCARIÓTICA CODIFICANTE DE scFv anti-IL-1 β
CARREADO POR UMA LINHAGEM INVASIVA DE *Lactococcus lactis* NA DOENÇA
DE CROHN EXPERIMENTAL INDUZIDA POR TNBS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular do Centro de Ciências Exatas e
da Natureza, da Universidade Federal da
Paraíba, como parte dos requisitos para
obtenção do título de **MESTRE EM
BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Franco Almeida

JOÃO PESSOA – PB

2020

Catálogo na publicação
Divisão de Processos Técnicos

R175a Ramos, Anderson dos Santos.
Avaliação dos efeitos anti-inflamatórios do produto do plasmídeo de expressão eucariótica codificante de scFv anti-IL-1 β carreado por uma linhagem invasiva de *Lactococcus lactis* na doença de Crohn experimental induzida por TNBS / Anderson dos Santos Ramos. - João Pessoa, 2020.
84 f. : il.

Orientação: Juliana Franco Almeida.
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN.

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Doença de Crohn - Tratamento. 3. Bactérias ácido lácticas. 4. Interleucina-1 β . 5. Colite. 6. TNBS. I. Almeida, Juliana Franco. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.34(043)



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



ANDERSON DOS SANTOS RAMOS

Dissertação de Mestrado avaliada em 18 / 12 / 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof.ª. Dr.ª. Juliana Franco Almeida
DBCM/ Cbiotec/UFPB
Orientadora

Prof.ª. Dr. Marcelo de Macedo Brígido
DBC/ICB/UnB
Examinador Externo

Prof.ª. Dr. Cláudio Roberto Bezerra dos Santos
DFP/CCS/UFPB
Examinador Interno

Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima
DBM/ CCEN/ UFPB
Suplente Interno

Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves
DNUT/CCS/ UFPB
Suplente Externo

À minha querida avó Maria do Socorro (in memoriam), que em seus últimos anos de vida acompanhou e apoiou minha trajetória acadêmica, dedico.

“Afinal, o que é um cientista, então? Ele é um homem curioso que olha através dos olhos de uma fechadura, a fechadura da natureza, tentando saber o que está acontecendo”.
Jacques Yves Cousteau

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por sempre me apoiar e acreditar nas minhas escolhas, pelo apoio emocional e por todo o acolhimento e amor, que foram cruciais para a finalização dessa etapa.

À orientadora Juliana Franco Almeida, por ter me dado a oportunidade de fazer parte de seu grupo e ter partilhado tanto conhecimento. Agradeço por sua atenção e paciência, por todos os conselhos nos momentos complicados, pelo acolhimento e confiança. Levarei todo o aprendizado para as próximas etapas da minha jornada profissional.

À Universidade Federal da Paraíba, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, ao coordenador Prof. Eleonidas Moura por todo o apoio e atenção durante todo o curso de mestrado. À todos professores que compartilharam comigo conhecimentos essenciais para minha formação. À Regina Emy, secretária do programa, por todo carinho e empenho em resolver e orientar toda parte burocrática e por toda atenção dedicada.

Ao professor Marcelo Brígido e sua equipe do Laboratório de Imunologia Molecular da UnB pela colaboração para a realização desta pesquisa na produção das bactérias recombinantes.

À professora Giciane Vieira e aos técnicos de laboratório, Nemilzia e Aulus, pelo apoio técnico para as colaborações histológicas.

Aos membros da banca examinadora por toda a atenção e dedicação na cuidadosa avaliação deste trabalho.

À grande parceira de bancada e amiga Giovana Cristina, que foi crucial para a realização deste trabalho, auxiliando a realização dos protocolos experimentais e pela incrível recepção no grupo. Muito obrigado pelo empenho, dedicação, carinho e pela linda amizade construída. Te desejo sucesso e sabedoria em sua trajetória.

Ao professor Valdir Braga e técnicos do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA) por todo suporte oferecido para realização do trabalho.

À professora Tatjana Keesen por todo o encorajamento, dedicação e partilha de conhecimento. Por me receber de forma tão acolhedora em suas disciplinas de Imunologia. Foram valiosos ensinamentos e contribuições para o meu crescimento.

Aos grandes amigos que conquistei durante minha passagem pelo LACONCHA, em especial a Giovana Cristina, Mickael Luz, Camila de Castro, Micaelle Oliveira, Danilo Duarte, Patrícia Rocha, Ivynna Suellen, Roxane Carvalho e Luciana Nascimento. Obrigado por tanto!

À todos os parceiros de sala de aula, em especial a Pâmela Gabriela, Marta Muniz, Micaela Melo, Kharla Nayara e Rafael Xavier pela linda amizade construída e por todo o apoio durante os seminários e atividades.

Aos meus amigos de longa data, Betsy Dantas, Ellynes Amancio, Karla Luna, Ana Paula Dias, Marcos Júnior, Eduardo Benedito, Larissa Benevides e muitos outros por apoiarem minhas decisões, pelos sábios conselhos e por serem tão acolhedores, obrigado.

À CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro essencial para a execução do presente trabalho.

À todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional nos últimos anos, meu muito obrigado!

RESUMO

A doença de Crohn é uma doença inflamatória intestinal caracterizada por inflamação crônica exacerbada que resulta em dano grave no intestino. O tratamento dessa doença objetiva reduzir a inflamação e promover cicatrização da mucosa. A interleucina-1 β (IL-1 β) é uma citocina pró-inflamatória que desencadeia a inflamação intestinal e participa da patogênese da doença, tornando-se candidata para abordagem terapêutica. Contudo, a falta de sucesso de inibidores de IL-1 β no tratamento dessa doença pode estar associado à via de administração intravenosa que causa inibição sistêmica dessa citocina e efeitos colaterais. Para contornar estas limitações, a entrega local de biofármacos poderia mudar o cenário atual, restringindo a terapia no sítio inflamatório. O desenvolvimento de linhagens de *Lactococcus lactis* capazes de entregar um vetor de expressão eucariótica que codifique um fragmento variável de cadeia única (scFv) de anticorpo representa uma estratégia promissora para a elaboração de uma terapia efetiva, capaz de garantir uma expressão do anticorpo diretamente na mucosa intestinal inflamada. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos anti-inflamatórios de *L. lactis* (FnBPA) carreadora do plasmídeo pValac codificador do scFv anti-IL-1 β em um modelo experimental de doença de Crohn induzido quimicamente por TNBS. Para tanto, camundongos BALB/c fêmeas foram submetidos à colite experimental induzida por TNBS por quatro semanas. A cultura de *L. lactis* foi administrada oralmente nos 5 últimos dias do protocolo experimental. No dia seguinte ao último dia de tratamento, os animais foram eutanasiados e os parâmetros macroscópicos, histopatológicos e histoquímicos avaliados. Observou-se uma melhora nos parâmetros macroscópicos da doença no grupo tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-IL-1 β) em relação aos demais grupos submetidos à colite induzida. Na análise histopatológica, o efeito benéfico do tratamento mostrou-se melhor na região proximal do cólon, com redução do escore de dano histológico, devido a redução do infiltrado inflamatório e manutenção da camada da mucosa. Contudo, o tratamento com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-IL-1 β) promoveu redução de células produtoras de mucinas, indicando um efeito prejudicial da inibição de IL-1 β no modelo. Em suma, os resultados sugerem benefícios de *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-IL-1 β) na redução de alguns parâmetros da colite, mas efeitos colaterais na produção de mucinas reforçam a ação pleiotrópica de IL-1 β no modelo experimental de doença de Crohn.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas; pValac; Interleucina-1 β ; Colite; TNBS.

Abstract

Crohn's disease is an inflammatory bowel disease characterized by exacerbated chronic inflammation that results in severe damage to the intestine. The treatment of this disease aims to reduce inflammation and promote healing of the mucosa. IL-1 β is a pro-inflammatory cytokine that triggers intestinal inflammation and participates in the pathogenesis of the disease, becoming a candidate for a therapeutic approach. However, the lack of success of IL-1 β inhibitors in the treatment of this disease may be associated with the intravenous administration route that causes systemic inhibition of this cytokine and side effects. To overcome these limitations, the local release of biopharmaceuticals can change the current scenario, restricting therapy at the inflammatory site. The development of *Lactococcus lactis* strains capable of providing a eukaryotic expression vector that encodes a single-chain variable fragment (scFv) of the antibody represent a promising strategy for the development of an effective therapy, capable of guaranteeing the expression of the antibody directly in the mucosa tract inflamed intestinal tract. Thus, the objective of this work was to evaluate the anti-inflammatory effects of *L. lactis* (FnBPA) carrying the pValac plasmid that encoding anti-IL-1 β scFv in an experimental model of chemically TNBS induced Crohn's disease by. For that, female BALB/c mice were submitted to experimental colitis induced by TNBS for four weeks. The *L. lactis* culture was administered orally in the last 5 days of the experimental protocol. The day after the last treatment day, the animals were euthanized and the macroscopic, histopathological and histochemical parameters were evaluated. An improvement in the macroscopic parameters of the disease was observed in the group treated with *L. lactis* FnBPA + (pValac::anti-IL-1 β) in relation to the other groups submitted to induced colitis. In the histopathological analysis, the beneficial effect of the treatment was better in the proximal region of the colon, with a reduction in the score of histological damage, due to the reduction of the inflammatory infiltrate and maintenance of the mucous layer. However, treatment with *L. lactis* FnBPA + (pValac::anti-IL-1 β) reduced mucin-producing cells, indicating a detrimental effect of IL- β inhibition in the model. In summary, the results suggest the benefits of *L. lactis* FnBPA + (pValac::anti-IL-1 β) in reducing some colitis parameters, but the side effects on mucins production reinforce the pleiotropic action of IL-1 β in the experimental model of disease of Cronh.

Keywords: Lactic acid bacteria; pValac; Interleukin-IL-1 β ; Colitis; TNBS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC - *Antigen-presenting cell* (Célula apresentadora de antígeno)

BAL - Bactéria ácido láctica

CU - Colite Ulcerativa

DC - Doença de Crohn

DII - Doença Inflamatória Intestinal

DSS - *Dextran sulfate sodium* (Sulfato de sódio dextrana)

EPM - Erro padrão da média

FDA - *Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Medicamentos)

FnBPA - *Fibronectin Binding Protein A* (Proteína A de Ligação à Fibronectina)

GALT - *Gut associated lymphoid tissue* (tecido linfoide associado ao intestino)

GRAS - *Generally Recognized As Safe* (Geralmente reconhecidos como seguros)

GWAS - *Genome-wide association study* (Estudos de associação ampla do genoma)

IAD - Índice de atividade da doença

IFN - Interferon

IL- Interleucina

IL-1R - Receptor de interleucina-1

LAF - *Lymphocyte activating factor* (fator de ativação de leucócitos)

mAbs - *Monoclonal antibodies* (Anticorpos monoclonais)

MAdCAM - Molécula de adesão celular da mucosa

MCS - *Multiple Cloning Site* (Sítio de Clonagem Múltipla)

MEC - Matriz extracelular

MMP - Metaloproteinase de matriz

NET - *Neutrophil extracellular trap* (armadilha extracelular de neutrófilo)

OMS - Organização Mundial da Saúde

ORF - *Open Reading Frame* (Fase de Leitura Aberta)

PAS - Ácido Periódico de Schiff

pCMV - Promotor do Citomegalovírus

pValac - Plasmídeo – *Vaccination Using Lactic Acid Bacteria* (vacinação usando bactéria ácido láctica)

RNA_m - RNA mensageiro

RRP - Receptor de reconhecimento de padrão

scFv - *Single-chain variable fragment* (Fragmento Variável de Cadeia Única)

TGF- Fator de crescimento transformador

TGI - Trato Gastrointestinal

Th - *T helper* (T auxiliar)

TJ - *Tight Junctions* (junções estreitas)

TNBS - Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico

TNF - *Tumor necrosis factor* (Fator de Necrose Tumoral)

TSLP - *Thymic stromal lymphopoietin* (Linfopoiética estromal tímica)

UFC - Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura conceitual para a patogênese da DII.	16
Figura 2: Representação esquemática da transferência de um plasmídeo vacinal de uma bactéria invasiva atenuada para uma célula eucariótica.	36
Figura 3: Estrutura do plasmídeo pValac.	36
Figura 4: Cronograma da indução colite TNBS e aplicação dos tratamentos.....	42
Figura 5: Variação do peso corporal dos camundongos ao longo do experimento.....	50
Figura 6: Variação de peso corporal durante o período de tratamento	51
Figura 7: Peso do cólon (mg)	52
Figura 8: Comprimento do cólon (cm).	53
Figura 9: Índice de atividade da doença (IAD).	54
Figura 10: Fotomicrografias representativas da região proximal do cólon dos grupos experimentais coradas em H&E, obtidas em objetiva de 4x.	55
Figura 11: Fotomicrografias representativas de cólon da região proximal do cólon dos grupos experimentais coradas em H&E, obtidas em objetiva de 10x.	56
Figura 12: Score de dano histológico da região proximal do cólon.....	57
Figura 13: Fotomicrografias representativas da região distal do cólon dos grupos experimentais coradas em H&E, obtidas em objetiva de 4x.	58
Figura 14: Fotomicrografias representativas de cólon da região distal do cólon dos grupos experimentais coradas em H&E, obtidas em objetiva de 10x.	59
Figura 15: Score de dano histológico da região distal	60
Figura 16: Fotomicrografias representativas da região proximal do cólon dos grupos experimentais coradas em PAS, obtidas em objetiva de 10x.	61
Figura 17: Análise histoquímica de mucinas neutras da região proximal do cólon.....	62
Figura 18: Fotomicrografias representativas da região distal do cólon dos grupos experimentais coradas em PAS, obtidas em objetiva de 10x.....	63
Figura 19: Análise histoquímica de mucinas neutras da região distal do cólon	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características da doença de Crohn e colite ulcerativa.	21
Tabela 2: Linhagens bacterianas utilizadas neste estudo	433
Tabela 3: Plasmídeos utilizados neste estudo.....	43
Tabela 4: Parâmetros analisados no escore histológico de colite.....	48

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	Doenças inflamatórias intestinais	15
1.2	Etiologia da DII	15
1.3	Aspectos clínicos da DII	20
1.4	Imunopatogênese da DII	22
1.5	O papel de IL-1 β na patogênese da DII	25
1.6	Tratamentos para DII: do convencional à terapia biológica	26
1.7	Terapia anti-IL-1 β como potencial tratamento para DII	29
1.8	Modelos experimentais utilizados na pesquisa das DIIs	30
1.9	Bactérias lácticas: alternativa promissora para terapêutica das DIIs	32
1.10	Bactérias lácticas recombinantes na terapêutica das DIIs	33
1.11	<i>Lactococcus lactis</i> recombinantes como potencial tratamento das DIIs	34
1.12	Fragmentos de anticorpos monoclonais como abordagem promissora na terapia da DII	37
1.13	Justificativa da proposta	38
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo Geral	39
2.2	Objetivos específicos	39
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	Animais	41
3.2	Indução da colite experimental por TNBS	41
3.3	Desenho experimental dos grupos	41
3.4	Linhagens bacterianas, plasmídeos, condições de cultivo e estocagem	42
3.5	Preparação das bactérias para administração	43
3.6	Administração das bactérias	43
3.7	Índice de atividade da doença (IAD)	44
3.8	Coleta do material biológico	44
3.9	Análise histológica	45
3.9.1	Preparação das lâminas para análise histológica	45
3.9.2	Coloração Hematoxilina Eosina (H&E)	46
3.9.3	Coloração P.A.S. (Ácido Periódico de Schiff)	46
3.9.4	Fotomicrografias e análises histológicas	47
3.10	Análises Estatísticas	47
4	RESULTADOS	50
4.1	Avaliação clínica e macroscópica	50
4.2	Avaliação histopatológica do cólon	53
4.2.1	Análise das alterações histológicas na região proximal do cólon	53
4.2.2	Análise das alterações histológicas na região distal do cólon	57
4.3	Avaliação histoquímica de mucinas	60
4.3.1	Análise do conteúdo de mucinas na região proximal do cólon	60
4.3.2	Análise do conteúdo de mucinas na região distal do cólon	62
5	DISCUSSÃO	66
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças inflamatórias intestinais

O trato gastrointestinal (TGI) executa o papel central de manter a homeostase imunológica, isto é, ser capaz de tolerar a microbiota comensal não patogênica, antígenos próprios e antígenos alimentares, além de ser capaz de responder de forma adequada a microorganismos e antígenos nocivos através de uma resposta inflamatória (AHLUWALIA; MAGNUSSON; ÖHMAN, 2017). Quando esse refinado equilíbrio entre tolerância e inflamação do aparato imune gastrointestinal é desregulado, o resultado é o surgimento de eventos inflamatórios persistentes (YADAV et al., 2016).

As doenças inflamatórias intestinais (DII), incluindo doença de Crohn (DC) e colite ulcerativa (CU), são desordens inflamatórias crônicas e complexas caracterizadas por inflamação patogênica intestinal que promove lesões pelo trato gastrointestinal, que apresentam fases alternadas de remissão e recidiva clínica. As DIIs são caracterizadas por diarreia grave, sangramento, dor abdominal, perda de líquido, e em alguns casos, complicações decorrentes do processo inflamatório sustentado (RANDHAWA et al., 2014). A DC e a CU são os tipos de DII mais estudados devido à relevância clínica e maior prevalência na população mundial (DE MATTOS et al., 2015; NEURATH, 2014).

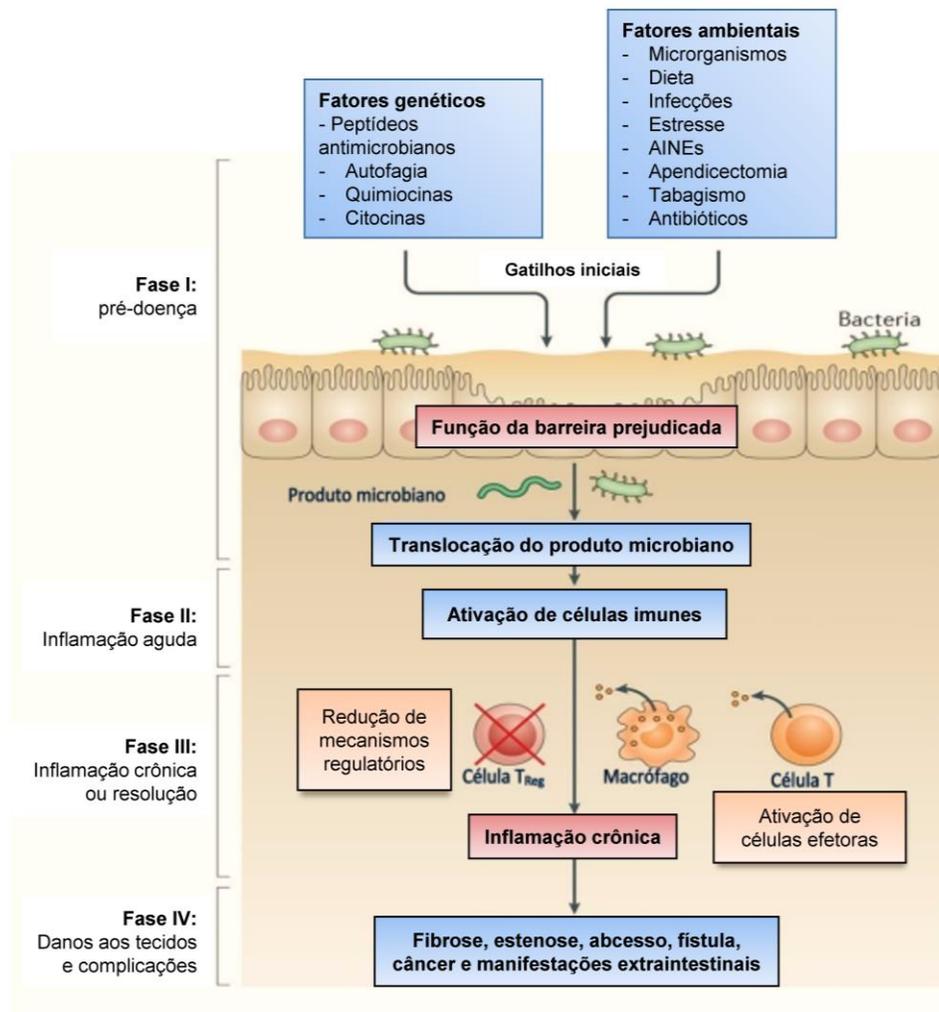
As DIIs afetam cerca de 1,5 milhões de indivíduos na América do Norte e 2 milhões na Europa. Embora a incidência da CU e DC esteja aumentando em países ocidentais, há uma dificuldade na disponibilização destes dados sobre outras partes do mundo (NG et al., 2017). Os dados epidemiológicos do Brasil apontam uma incidência de 13,49 casos para as DIIs, sendo 5,58 para a doença do Crohn e 8,00 para colite ulcerativa, para cada 100.000 indivíduos/ano (GASPARINI; SASSAKI; SAAD-HOSSNE, 2018). Ainda de acordo com Ng et al. (2017), a DII torna-se uma doença global com incidência acelerada em países recém-industrializados cujas sociedades se tornaram mais ocidentalizadas.

1.2 Etiologia da DII

A etiologia precisa das DIIs ainda não está clara, contudo, parece ser complexa, ao ponto que envolve: 1) a suscetibilidade genética do hospedeiro; 2) resposta imune desregulada; 3) comprometimento da função da barreira epitelial e 4) fatores ambientais (Figura 1)

(AHLUWALIA et al., 2018; KIM; CHEON, 2017; NEURATH, 2014). Logo, ao invés de um único agente etiológico, esse conjunto de doenças possuem vários agentes mantenedores do processo patológico. Acredita-se que a interação destes componentes resultam na ruptura da função da barreira epitelial que promove translocação do conteúdo luminal e resulta em hiperresponsividade do aparato imunológico frente aos componentes da microbiota comensal intestinal em resposta a fatores ambientais, como infecções, dieta, estresse, uso de medicamentos, entre outros (AHLUWALIA et al., 2018; KIM; CHEON, 2017; NEURATH, 2014).

Figura 1. Estrutura conceitual para a patogênese da DII.



Fatores genéticos e ambientais contribuem para redução da integridade da mucosa intestinal, provocando interação entre produtos da microbiota e células do sistema imune e resposta inflamatória. A não resolução da resposta inflamatória acaba por tornar o processo crônico, ocasionando danos aos tecidos e complicações. Extraído e adaptado de Neurath (2014).

A quebra tolerância imunológica do hospedeiro frente aos antígenos comensais e alimentares resultam em uma inflamação sustentada e descontrolada que leva ao dano tecidual e, por consequência, alterações nas funcionalidades fisiológicas do TGI que podem resultar em complicações associadas à DII, como fibrose, estenose, fistula, câncer e manifestações extra intestinais (AHLUWALIA et al., 2018; NEURATH, 2014).

O intestino executa diversas funções essenciais que vão além de sua propriedade absorptiva, secretora e digestiva, pois é neste compartimento o local em a microbiota comensal produz vitaminas, auxilia o hospedeiro na metabolização de nutrientes, bem como fornece um conjunto de moléculas moduladoras. Um outra importante propriedade é a sua capacidade de tolerar esses microorganismos benéficos e de responder frente a patógenos e toxinas nocivas (AHLUWALIA et al., 2018). Para tanto, o tecido linfoide associado ao intestino (do inglês, *gut associated lymphoid tissue* - GALT), constituído pelas placas de Peyer, folículos linfoides e linfonodos mesentéricos, somado às células imunes presentes na lamina própria (camada subjacente ao epitélio intestinal) devem ser capazes de reagir de forma diferenciada, ou seja, iniciar uma resposta inflamatória aos antígenos potencialmente nocivos e reconhecer e tolerar os inofensivos através dos mecanismos de imunotolerância (DE MATTOS et al., 2015; KIM; CHEON, 2017).

O epitélio intestinal é composto por uma única camada de células epiteliais colunares polarizadas constituído por diversos tipos celulares: 1) enterócitos absorptivos; 2) células caliciformes produtoras de muco; 3) células enteroendócrinas produtoras de hormônios e neuropeptídeos, e 4) células de Paneth produtoras de fatores de crescimento e peptídeos antimicrobianos (GRONDIN et al., 2020; WALLACE et al., 2014). Tais células são fixadas lateralmente às células adjacentes por junções apertadas (do inglês, *tights junctions* - TJs), junções aderentes e desmossomos, que juntos atuam promovendo a integridade da barreira epitelial e seletividade, impedindo a entrada da maioria das substâncias e permitindo a entrada de outras (CAPALDO; POWELL; KALMAN, 2017; WALLACE et al., 2014). A camada epitelial é induzida a renovação a cada 2-3 dias, com um equilíbrio de proliferação de células epiteliais nas criptas e migração dessas células ao longo da vilosidade do intestino (MARTINI et al., 2017). A integridade da barreira mucosa, portanto, é um determinante chave do início, progressão e gravidade da DII, pois a interrupção da organização física e funcional do epitélio resulta em

aumento da adesão de potenciais antígenos ao epitélio e maior permeabilidade intestinal, resultando, conseqüentemente, em inflamação intestinal (MARTINI et al., 2017).

A superfície do intestino é continuamente protegida por uma grande quantidade de muco, que é composto de modificações complexas e extensas de oligossacarídeos ligados na estrutura da proteína da mucina (PETERSON; ARTIS, 2014; SHENG et al., 2012). As mucinas são glicoproteínas que formam grandes macromoléculas ligadas por pontes dissulfeto e, após a liberação dos grânulos de células caliciformes para o lúmen, tornam-se hidratadas e se expandem para formar um gel semelhante a uma rede (JOHANSSON; SJÖVALL; HANSSON, 2013). Vale ressaltar que as células caliciformes e sua biologia secretória são fortemente influenciadas por interações com o sistema imunológico (KIM; KHAN, 2013). No intestino, MUC2 é a mucina formadora de gel predominante que contribui para a formação da barreira de muco (GRONDIN et al., 2020), participando do esqueleto estrutural da camada interna de muco (HANSSON, 2012). A camada interna de muco, isto é, a que está mais íntima do epitélio intestinal, tem aproximadamente 100µm de espessura, é firmemente aderente, rica em peptídeos antimicrobianos e mucinas, além de apresentar baixa densidade de microrganismos (WALLACE et al., 2014). A camada externa do muco, gerada pela proteólise da camada interna, é composta por mucinas, peptídeos antimicrobianos em menor quantidade e apresenta alguns microrganismos aderidos (MCCOLE, 2014). No cólon, a camada externa de muco é gerada através da clivagem da protease endógena de MUC2, resultando em uma expansão de 4 a 5 vezes em volume (MCCOLE, 2014). A mucina MUC5B também pode ser expressa em níveis baixos no cólon (GRONDIN et al., 2020). É importante ressaltar que os peptídeos antimicrobianos, incluindo catelicidinas, defensinas e lectinas bactericidas, como as proteínas RegIII são produtos das células de Paneth que atuam no controle da densidade de populações microbianas do intestino (WALLACE et al., 2014).

Dessa forma, a secreção luminal de mucinas e peptídeos antimicrobianos estabelece uma importante barreira física e química frente ao contato de microrganismos com a superfície epitelial. Contudo, tem sido observado que defeitos na barreira epitelial, relacionados a produção prejudicada de muco e peptídeos antimicrobianos, podem representar um mecanismo primário na patogênese da DII (CAPALDO; POWELL; KALMAN, 2017; GRONDIN et al., 2020; JÄGER; STANGE; WEHKAMP, 2013), uma vez que o contato íntimo dos componentes luminiais estimulam a células epiteliais intestinais a partir de seus receptores de reconhecimento de padrões

(RRP) e incitam respostas inflamatórias (PETERSON; ARTIS, 2014). Evidências apontam perturbações em níveis de mucinas e peptídeos antimicrobianos na DII. Uma variante do gene *MUC2* confere suscetibilidade à DII em humanos e camundongos deficientes em *Muc2* desenvolvem colite espontânea (VAN DER SLUIS et al., 2006). Adicionalmente, a depleção de células caliciformes e uma camada de muco prejudicada está presente em alguns grupos de pacientes com DC, o que permite maior adesão de bactérias sobre as células epiteliais, podendo contribuir para a progressão da doença (LARSSON et al., 2011). Alterações em outras mucinas também foram observadas na CU e DC (SHENG et al., 2012). A expressão defeituosa de peptídeos antimicrobianos também foi observada em biopsias intestinais de pacientes com DII (ARIJS et al., 2009; KLAG; STANGE; WEHKAMP, 2013; WEHKAMP et al., 2003).

Outras anormalidades na função da barreira epitelial, como alterações nas TJs e erosões no epitélio decorrentes de apoptose, lesões mucosas graves e parada de restituição epitelial, são importantes contribuintes para início e progressão da inflamação intestinal (LANDY et al., 2016; LEE, 2015). Os estudos de associação ampla do genoma (GWAS) e estudos de genes candidatos também detectaram loci de suscetibilidade para DII em genes codificantes para proteínas de junção celular, como E-caderina, proteína alfa 12 de ligação ao nucleotídeo guanina e junção de oclusão 1 (ANDERSON et al., 2011; BARRETT et al., 2009), bem como em genes associados à montagem dos complexos de TJs, como *MAGI3* (NORÉN; ALMER; SÖDERMAN, 2017). Adicionalmente, mudanças na expressão de proteínas de junção celular, incluindo E-caderina, β -catenina e claudinas têm sido observadas em biopsias intestinais de pacientes com DII (WEBER et al., 2008). A regulação positiva da expressão da claudina 2 e a regulação negativa da claudina 5 e 8 correlacionam-se com a disfunção da barreira e DC ativa (ZEISSIG et al., 2007). Tais evidências suportam o papel do comprometimento da barreira na patogênese da DII. Uma apreciação mais abrangente sobre o papel das TJs pode ser encontrada em outros trabalhos (LANDY et al., 2016; LEE, 2015; SCHULZKE et al., 2009).

Vale destacar que a desregulação imune é também um fator intrinsecamente relacionado a genes de suscetibilidade, que implica na presença de variantes de genes da imunidade inata, tornando o indivíduo exageradamente responsivo do ponto de vista imunológico. Dentre os fatores genéticos que estão implicados na DII, destaca-se as alterações em genes relacionados aos processos na autofagia, processamento de antígenos, regulação de eventos de sinalização celular e de citocinas (DE LANGE; BARRETT, 2015). Entre alguns, os genes que controlam o

reconhecimento da imunidade inata e o processamento de componentes bacterianos, incluindo *NOD2*, *TLR4*, *TLR5*, *ATG16L1* e *IRGM* apresentam variantes importantes nos pacientes acometidos por DII (SEUNG HOON LEE, JEONG EUN KWON, 2016). Cho (2008) detectou mutações no gene *ATG16L1*, um membro de uma família de genes envolvidos na autofagia, em pacientes com DC. Adicionalmente, mutações no gene da proteína 15 contendo o domínio de recrutamento de caspases (CARD-15) que codifica a proteína NOD-2, também foram associadas com a ocorrência de DII, especialmente na DC (HUGOT, 2006). A proteína NOD2 atua como um sensor microbiano intracelular, ativando e regulando a inflamação. Portanto, a deficiência dessa proteína promove importantes alterações na resposta imune à lâmina própria, produzindo uma inflamação crônica no tecido (NEGRONI et al., 2018).

A disfunção da barreira epitelial e a resposta inflamatória sustentada na DII, além de estarem vinculadas um eixo genético, sofrem influências por fatores ambientais, contribuindo para iniciação e progressão da patogênese. Esses estímulos, incluindo estilos de vida e higiene, cirurgias, exposições a drogas, dieta e exposição a microrganismos (PIOVANI et al., 2019). Uma revisão abrangente de meta-análises identificou fatores ambientais que são comuns a DC e CU, ou restritos a uma dessas condições. São eles: tabagismo (DC), vida urbana (DII), apendicectomia (DC), amigdalectomia (DC), exposição a antibióticos (DII), uso de anticoncepcional oral (DII), consumo de refrigerantes (CU), deficiência de vitamina D (DII) e espécies enterohepáticas de *Helicobacter* não semelhantes ao *Helicobacter pylori* (DII) (PIOVANI et al., 2019).

1.3 Aspectos clínicos da DII

Sob um ponto de vista clínico, a DC e a CU compartilham de sintomas semelhantes, incluindo diarreia, hematoquezia e dor abdominal. Contudo, sob um aspecto fisiopatológico é possível distingui-las, uma vez que a localização, profundidade do dano decorrente da inflamação, além de complicações e prevalência podem diferir (ABRAHAM; CHO, 2009). A DC geralmente envolve a inflamação do íleo e o colón, mas pode afetar qualquer região do intestino, em que geralmente adquire uma forma descontínua. Na CU, o reto e o cólon, ou parte dele sofre lesão em um padrão ininterrupto. Uma característica intrínseca da DC é a inflamação transmural, isto é, afeta todas as camadas da parede do intestino, enquanto na CU o processo inflamatório tipicamente encontra-se confinado à mucosa (ABRAHAM; CHO, 2009; FEUERSTEIN;

CHEIFETZ, 2017; KIM; CHEON, 2017).

Ambas as doenças podem apresentar uma sintomatologia semelhante, desde dor abdominal, vômitos, diarreia, sangramento retal e perda de peso (Tabela 1), além de serem observadas manifestações extra intestinais, incluindo artrite e manifestações cutâneas (PARK et al., 2017). Um conjunto de complicações decorrentes da inflamação crônica é observado na DC, mas não na CU, incluindo o aparecimento de granulomas, fistulas e estenoses intestinais (FEUERSTEIN; CHEIFETZ, 2017), sendo as duas últimas intimamente relacionadas a uma piora grave do quadro do paciente, devido ao remodelamento drástico do tecido em decorrência da deposição desorganizada de uma nova matriz extracelular (MEC), que culmina na redução do espaço luminal do intestino (LENTI; DI SABATINO, 2018).

Tabela 1. Características da doença de Crohn e colite ulcerativa.

Principais características	Doença de Crohn	Colite ulcerativa
Incidência	3,1 a 20,2 casos a cada 100.000 indivíduos por ano	2,2 a 19,2 casos a cada 100.000 indivíduos por ano
Início da doença	Geralmente entre 15 a 40 anos	Geralmente entre 15 a 40 anos
Local de origem	Íleo terminal, envolve o cólon ascendente	Reto, envolve cólon sigmoide e descendente
Padrão de progressão	Lesões descontínuas (salteadas)	Lesões contínuas
Achados histológicos	Inflamação transmural; presença de granulomas	Inflamação mucosa e submucosa
Perfil da resposta imune predominante	Th1 e Th17	Th2 atípica
Sintomas	Dor abdominal; cólicas ou inchaço; anemia; febre; sangramento gastrointestinal; dor nas articulações; má absorção; náusea; vômitos e sangramento retal; diarreia persistente ou recorrente; úlceras estomacais; vômito; perda de peso	Dor ou desconforto abdominal; anemia; diarreia com sangue; desidratação; fadiga; febre; dor nas articulações; perda de apetite; má absorção; sangramento retal; movimentos intestinais urgentes; ulceração; perda de peso
Potenciais complicações	Abcessos; anemia; artrite; febre; fístulas; estenose e alterações da pele	Doenças hepáticas, hemorragia, megacólon tóxico

Fonte: Adaptado de Neurath (2014), Park et al. (2017) e Rohr et al. (2018).

1.4 Imunopatogênese da DII

A imunidade da mucosa intestinal é um componente criticamente importante para a manutenção da saúde e do bom funcionamento dos demais sistemas. Surpreendentemente, é na mucosa intestinal que está localizado a mais ampla densidade de células imunológicas e seus produtos, que juntos atuam na promoção da tolerância oral (AHLUWALIA; MAGNUSSON; ÖHMAN, 2017). Em um contexto desregulado, o eixo imune tem seu papel no comprometimento da função da barreira intestinal e na inflamação intestinal, uma vez que as células imunológicas atuam secretando produtos que estão ativamente envolvidos no início e na manutenção da fisiopatogênese das DIIs, provocando danos ao tecido intestinal e promovendo alterações clínicas severas ao paciente (AHLUWALIA et al., 2018). Amostras de lesões do cólon de pacientes com DII mostram intenso infiltrado de células imunes e alterações na arquitetura intestinal (SEUNG HOON LEE, JEONG EUN KWON, 2016). Outros estudos apontam para uma intensa produção de mediadores inflamatórios solúveis, como citocinas, que orquestram os processos inflamatórios na DII (PARK et al., 2017).

As respostas imunes inatas oferecem a primeira linha de defesa contra qualquer agente agressivo e são mediadas por células imunes clássicas, como neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas, além de células não imunes, tais como as células epiteliais, endoteliais e mesenquimais (SOUZA; FIOCCHI, 2015).

Em resposta a sinais de dano, os neutrófilos são as primeiras células a infiltrar na mucosa intestinal, persistindo durante o curso da DII, desde que haja inflamação ativa. Os neutrófilos contribuem para a patogênese da DII por meio de uma variedade de eventos que incluem comprometimento da função barreira epitelial, destruição de tecidos por danos oxidativos e proteolíticos, além da perpetuação da inflamação pela liberação de citocinas e quimiocinas associadas ao perfil pró-inflamatório (PARK et al., 2017; WALLACE et al., 2014). Dados mais recentes sugerem que os neutrófilos também contribuem na patogênese da DII através da produção de armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês, *neutrophil extracellular traps* – NETs), que parecem estar implicados no comprometimento da barreira epitelial, produção de mediadores inflamatórios, dano a MEC e a disfunções trombóticas associadas à DII (BENNIKE et al., 2015; DINALLO et al., 2019; HE et al., 2016; LI et al., 2020; LIN et al., 2020).

Os macrófagos da mucosa intestinal saudável exibem uma assinatura anérgica, não produzindo citocinas pró-inflamatórias, mas mantém ativo seu potencial fagocítico e bactericida, exercendo suas funções de eliminação frente a microorganismos e outros antígenos invasores (PARK et al., 2017). Contudo, o acúmulo de macrófagos é observado na lamina própria de pacientes com DII e em modelos experimentais de colite (ZAEEM CADER; KASER, 2013). Na mucosa de pacientes com DC, por exemplo, foram relatados macrófagos CD14+ que exibem marcadores de macrófagos (CD14, CD33, CD68) produtores abundantes de citocinas pró-inflamatórias (PARK et al., 2017).

As células dendríticas monitoram o microambiente circundante, apresentam antígenos e medeiam eventos imunes subsequentes, isto é, induzem tolerância ou incitam uma resposta pró-inflamatória da defesa do hospedeiro. Essa dualidade funcional coloca esse grupo de células na posição única de mediar a interação entre imunidade inata e adaptativa (SHANAHAN; KARP, 2010). Na mucosa intestinal, as células dendríticas apresentam propriedades únicas que lhe conferem interagir com as células T e B, o epitélio intestinal e o estroma, contribuindo assim para a manutenção da homeostase da mucosa ou induzindo inflamação (ZAEEM CADER; KASER, 2013). Há relatos de que as células dendríticas se acumulam na mucosa de pacientes com DII (RAMOS; PAPADAKIS, 2019). A polarização das células dendríticas para um fenótipo tolerogênico e anti-inflamatório é promovida por outras células circundantes, como as células epiteliais intestinais que produzem ácido retinóico, linfopietina estromal tímica (TSLP) e fator de crescimento transformador- β (TGF- β) que estimula o desenvolvimento de células dendríticas produtoras de IL-10, que por sua vez, exerce efeitos regulatórios (PETERSON; ARTIS, 2014; SOUZA; FIOCCHI, 2015). Na DC, níveis reduzidos a indetectáveis de RNA mensageiro (RNAm) de TSLP parecem estar implicados num condicionamento inadequado das células dendríticas que podem promover inflamação (SOUZA; FIOCCHI, 2015).

Na DC e CU, defeitos na resposta imune inata e adaptativa estão relacionados à resposta excessiva gerada frente à microbiota comensal. A ativação de células dendríticas e macrófagos da lamina própria estimulam uma resposta inflamatória pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18 e IFN- γ , contribuindo para a instalação e manutenção de uma alça inflamatória (YADAV et al., 2016). Tais citocinas são cruciais para a ativação de outras células imunes, inclusive a montagem de respostas adaptativas.

Enquanto o sistema imune inato induz respostas inflamatórias, o sistema imune adaptativo, mediado principalmente por linfócitos, desempenha um papel central na progressão dos eventos inflamatórios crônicos observados na DII (AHLUWALIA et al., 2018; SOUZA; FIOCCHI, 2015). Os linfócitos T CD4 naïve ativados por sinais específicos do antígeno apresentado por células apresentadoras de antígeno (APCs) e influenciadas pelo meio de citocinas, diferenciam-se em células T auxiliares efetoras do tipo: T-helper 1 (Th1), T-helper 2 (Th2), T-helper 17 (Th17) células, T-helper 9 (Th9) ou células T reguladoras (Tregs) (AHLUWALIA et al., 2018). Tais perfis imunes adaptativos participam de forma particular na DC e CU, produzindo diferentes citocinas que regulam uma miríade de efeitos biológicos na patogênese da DII.

Na DC, a liberação localizada de certas citocinas, como IL-12, IL-17, TNF- α e IFN- γ , foram implicados na inflamação intestinal crônica observada em pacientes (DE MATTOS et al., 2015). A produção de IL-12, IL-18 e IL-23 por APCs e macrófagos gera uma diferenciação polarizada em direção ao linfócito Th1, levando a um aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e IFN- γ (DE MATTOS et al., 2015; YADAV et al., 2016). Respostas mediadas por linfócitos Th17 produtores de IL-17 também são predominantemente observadas na patogênese da DC (YADAV et al., 2016). Adicionalmente, as citocinas secretadas por células Th1 estimulam as células apresentadoras de antígenos a secretarem um espectro mais amplo de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e IL-18, resultando em um ciclo auto-sustentado (DE MATTOS et al., 2015; NEURATH, 2014).

A patogênese da CU tem sido mais associada a uma resposta Th2 atípica caracterizada pela produção de TGF- β e IL-5 (CORRIDONI; ARSENEAU; COMINELLI, 2014; YADAV et al., 2016). Além disso, há um aumento substancial na secreção de IL-13 por uma população de células T assassinas naturais invariáveis na lâmina própria, apontada como a principal interleucina responsável pela inflamação e cronicidade dessa condição (DE MATTOS et al., 2015; YADAV et al., 2016). Apesar do envolvimento de Th1, os pacientes com CU também apresentam uma resposta Th2 com aumento da secreção de IL-4, IL-5 e IL-9. Assim como na DC, as citocinas relacionadas com o perfil Th17 também estão aumentadas na CU (DE MATTOS et al., 2015; WALLACE et al., 2014).

Na DII, as citocinas apresentam diversos alvos e funções pleiotrópicas que podem regular diversos eventos ou tipos celulares, desde a função dos fagócitos, a função de células residentes

do tecido, a modulação de respostas mediadas por linfócitos, síntese de componentes na MEC, bem como a expressão e montagem de junções celulares, sugerindo um amplo espectro de efeitos que esta classe de moléculas podem executar em diversos componentes associados à DII (LEPPKES; NEURATH, 2020). Uma discussão mais ampla sobre os efeitos das citocinas na DII pode ser encontrada em outros trabalhos (BEVIVINO; MONTELEONE, 2018; LEPPKES; NEURATH, 2020; NEURATH, 2014).

1.5 O papel de IL-1 β na patogênese da DII

A IL-1 β é uma citocina pleiotrópica que foi anteriormente denominada de fator de ativação de linfócito (LAF) devido à sua ampla gama de efeitos a jusante. Além de ser uma citocina-chave envolvida na inflamação aguda e crônica, também é capaz de modular a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, promover a maturação de células dendríticas e conduzir o recrutamento de diversas células imunes, neutrófilos, macrófagos e linfócitos, além de atuar como um pirógeno endógeno com potencial para causar febre (MCENTEE; FINLAY; LAVELLE, 2019). Além dessas funções pró-inflamatórias clássicas, IL-1 β é capaz de conduzir a diferenciação de linfócitos para um perfil Th17, na qual apresenta importante implicação na cronicidade da inflamação na DII (MCENTEE; FINLAY; LAVELLE, 2019).

Como já mencionado, a IL-1 β é uma das citocinas que estão implicadas na patogênese da DII. Um conjunto de evidências sustentam essa ideia dado que níveis elevados desta citocina são observados em amostras de pacientes com DC e CU (DUCLOS, 1996; MAHIDA; JEWELL, 1989; MCALINDON; HAWKEY; MAHIDA, 1998; SHOUVAL et al., 2016; STEFFEN et al., 1993). Adicionalmente, achados obtidos em modelos experimentais de DII reforçam o potencial papel de IL-1 β na progressão da inflamação intestinal e em complicações associadas, como distúrbios trombóticos extra intestinais (IMPELLIZZERI et al., 2018; KWON et al., 2005; SHOUVAL et al., 2016; YOSHIDA et al., 2010). Do ponto de vista mecanístico, as células mononucleares, predominantemente macrófagos de origem monocítica, residindo na lâmina própria são a fonte primária de concentrações aumentadas de IL-1 β encontradas em biópsias de tecido inflamado durante a DII ativa, com uma correlação dos seus níveis com a gravidade geral da doença (JONES et al., 2018).

Níveis elevados de IL-1 β na mucosa do cólon e em macrófagos peritoniais foram encontrados na DII experimental, o que pode representar um gatilho inicial da inflamação intestinal (KWON et al., 2005). Curiosamente, IL-1 β induz a expressão de quimiocinas e metaloproteinases de matriz (MMPs), além de promover aumento da permeabilidade intestinal por alterar a biologia das TJs (AL-SADI et al., 2007; ANDOH, 2002). Como a integridade da barreira epitelial é crucial para separar o conteúdo luminal para os tecidos subepiteliais, provavelmente IL-1 β seja importante nas alterações iniciais da cascata inflamatória que leva à inflamação do cólon. Além disso, quase todas as células da mucosa intestinal expressam receptor de IL-1 (IL-1R) e, portanto, têm a capacidade de responder à estimulação de IL-1 β (MCENTEE; FINLAY; LAVELLE, 2019). Dessa forma, levando em consideração esse conjunto de achados, é possível sugerir a amplitude de respostas promovidas pela sinalização a jusante de IL-1 β no contexto inflamatório da DII, com potencial papel dessa citocina na iniciação e progressão da inflamação associada à lesão intestinal.

1.6 Tratamentos para DII: do convencional à terapia biológica

O objetivo do tratamento das DIIs é reduzir a inflamação que desencadeia seus sinais e sintomas, uma vez que não há cura clínica ou cirúrgica conhecida. O tratamento da doença envolve o uso de medicamentos, tais como anti-inflamatórios, imunossupressores, antibióticos e anticorpos monoclonais, além de suporte nutricional e cirurgias, que podem reduzir significativamente os sintomas da doença e ajudar a manter a remissão a longo prazo e a redução dos riscos de complicações (ROHR et al., 2018).

As terapias convencionais baseadas em medicamentos anti-inflamatórios, são frequentemente o primeiro passo no tratamento da inflamação intestinal. Dentro desta classe estão os corticosteroides como prednisolona, metilprednisolona, budesonina, e aminosalicilatos, como mesalazina, balsalazida, olsalazina. Os aminosalicilatos são compostos anti-inflamatórios contendo ácido-5-aminosalicílico (5-ASA) e possuem formulações orais e retais para tratar as DIIs e são a escolha de primeira linha para o tratamento. Na ausência de melhora no quadro clínico frente aos aminosalicilatos, há substituição ou complementação com corticosteroides ou imunossupressores. A escolha também é direcionada pela área do cólon afetada (BRYANT; BRAIN; TRAVIS, 2015; ROHR et al., 2018).

Os medicamentos imunossupressores funcionam de várias maneiras para suprimir a resposta imune, principalmente por inibir a proliferação e a ativação dos linfócitos, responsáveis por liberar substâncias químicas indutoras de inflamação no revestimento intestinal, levando ao dano tecidual. Alguns exemplos de drogas imunossupressoras incluem azatioprina, mercaptopurina, ciclosporina e metotrexato (BRYANT; BRAIN; TRAVIS, 2015; OMAR et al., 2019).

Os antibióticos podem ser usados em conjunto com outros medicamentos ou quando a infecção é uma preocupação - em casos de DC perianal, por exemplo. Os antibióticos prescritos com frequência incluem ciprofloxacina e metronidazol. Para o tratamento da DC luminal ativa, os antibióticos podem ter um efeito modesto na diminuição da atividade da doença e alcance da remissão, sendo mais eficazes em pacientes com doença envolvendo o cólon (NITZAN et al., 2016). Nesta abordagem, a proposta de modular a microbiota é tida como alvo e parece mostrar melhora no score clínico do paciente com DII.

Embora a administração oral com os medicamentos supracitados possa ser eficaz para suprimir inflamação intestinal e induzir remissão sintomática, essa abordagem apresenta várias limitações quando administrada em altas doses, além de não reduzir a incidência de complicações a longo prazo (OMAR et al., 2019). Os corticosteroides, por exemplo, têm sido empregados para o tratamento de crises moderadas e graves, contudo são inadequados para o longo prazo devido aos seus efeitos colaterais e incapacidade de manter remissão clínica. Adicionalmente, esta classe terapêutica não tem induzido efeito em pacientes com DC que desenvolvem fistulas, pois tem sido mostrado que tais pacientes, ao receberem prednisona, apresentam piora e tiveram maior necessidade de intervenção cirúrgica quando comparado com pacientes que não receberam corticoides (NIELSEN et al., 2009).

Neste sentido, nos últimos anos, com aumento na compreensão da imunopatogênese das DIIs, vários foram os avanços obtidos no tratamento. Tais avanços terapêuticos visam mecanismos moleculares importantes, alterando o percurso da doença e trazendo esperança aos indivíduos acometidos por DII (LEE; PARK; PARK, 2018). Esses tratamentos são pautados no uso de agentes biológicos, dentre estes, anticorpos monoclonais e inibidores, que possuem maior especificidade para vias moleculares envolvidas na patogênese das DIIs (AHLUWALIA et al., 2018; PARK et al., 2017).

A terapia biológica, baseada no uso de anticorpos monoclonais, possui como alvo citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , por exemplo), moléculas de adesão e proteínas de sinalização intracelular (JAK) (LEE; PARK; PARK, 2018). Estes tratamentos estão intimamente relacionados a uma melhora significativa na redução da resposta inflamatória e melhora na cicatrização da mucosa.

Como já mencionado, a citocina TNF- α desempenha um papel importante na imunopatogênese das DIIs, onde a produção de TNF solúvel e ligado à membrana é significativamente aumentada por macrófagos CD14+, fibroblastos e células T. Os anticorpos monoclonais que inibem esta citocina foram um dos primeiros tratamentos biológicos aprovados para o tratamento da CU e DC. Neste grupo estão o infliximabe, adalimumabe e certolizumabe, sendo este último aprovado para uso clínico apenas para DC (SCHREINER; NEURATH; NG, 2019). O ustekinumabe, um anticorpo monoclonal que apresenta como alvo a IL-23, foi aprovado para o tratamento da DC, tendo sido vinculado a uma melhora significativa do quadro clínico dos pacientes (SCHREINER; NEURATH; NG, 2019).

No que tange aos inibidores de sinalização intracelular, os inibidores de JAK são pequenas moléculas que diferem de anticorpos ou outros agentes biológicos de várias maneiras, sendo moléculas pequenas com meia-vidacurta, eficientes em baixa dose, de baixa imunogenicidade e serem utilizadas por via oral. O tofacitinibe, um fármaco desta classe, inibe a proteína de sinalização JAK1 e o JAK3, bem como, em menor grau, o JAK2 e o TYK2. A dimerização JAK1 JAK3 controla a sinalização das citocinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 (CLARK; FLANAGAN; TELLIEZ, 2014). Ao bloquear essas vias de sinalização, a troca da classe de células B e a diferenciação de células T e células NK podem ser suprimidas (NEURATH, 2017). Esse medicamento é utilizado no tratamento da CU, não apresentando efeito significativos sobre a DC (SCHREINER; NEURATH; NG, 2019).

Uma outra abordagem explorada na terapia biológica é a inibição de moléculas de adesão, no intuito de modular o tráfego celular. Basicamente, o mecanismo proposto é o de inibir a migração dos leucócitos, em especial os linfócitos e monócitos, para o sítio da inflamação através do bloqueio da interação entre integrinas e moléculas de adesão na interface leucócito-endotélio vascular. As integrinas $\alpha 4\beta 7$ na superfície dos leucócitos e a molécula de adesão celular da mucosa (MAdCAM) no endotélio vascular desempenham um papel central na migração de leucócitos intestinais e são importantes na patogênese das DIIs. Para inibir a inflamação local, o

anticorpo monoclonal Vedolizumabe atua bloqueando as integrinas $\alpha4\beta7$, e atualmente é utilizado no tratamento da CU e da DC (SCHREINER; NEURATH; NG, 2019).

Em suma, as terapias biológicas supracitadas revolucionaram o cenário geral no tratamento das DIIs. Contudo, algumas destas terapias apresentam limitações, incluindo efeitos adversos vinculados a efeitos sistêmicos, pois muitas destas utilizam a via parenteral. Além disso, a adesão ao tratamento por parte do paciente tem sido negativamente relacionada a tais terapias, uma vez que é necessário intervenção hospitalar para sua aplicação.

1.7 Terapia anti-IL-1 β como potencial tratamento para DII

As citocinas da família IL-1 estão tipicamente associadas a respostas pró-inflamatórias e a IL-1 β foi identificada como um mediador chave da patologia induzida por inflamação em várias condições autoimunes e autoinflamatórias. Dessa forma, a inibição terapêutica de IL-1 β ou de sua sinalização mostra-se eficaz em um conjunto de doenças imunomediadas, incluindo artrite reumatoide, gota, diabetes, entre outras (DINARELLO; VAN DER MEER, 2013). O bloqueio terapêutico do IL-1R via administração subcutânea de anakinra, um IL-1Ra- recombinante (Kineret[®]), está licenciado para o tratamento da artrite reumatoide em pacientes que não respondem ao anti-TNF e em indivíduos afetados por síndromes periódicas associadas à criopirina (MCENTEE; FINLAY; LAVELLE, 2019). Além disso, o canakinumabe (Ilaris[®]), é um anticorpo monoclonal direcionado à IL-1 β , que demonstrou eficácia no tratamento da artrite idiopática juvenil de início sistêmico (MCENTEE; FINLAY; LAVELLE, 2019).

Interromper o ciclo de feedback inflamatório é um objetivo fundamental da terapia para DIIs. A IL-1 β , como já mencionado, executa um papel importante na iniciação e manutenção do processo inflamatório crônico observado nas DIIs. Contudo, até a presente data, não há nenhum anticorpo monoclonal anti-IL-1 β aprovado pela FDA para o tratamento de DIIs. Além disso, após consulta na plataforma ClinicalTrials.gov, não foram encontrados ensaios clínicos para o bloqueio de IL-1 β na DII, embora estudos pré-clínicos sugiram um papel desta citocina na imunopatogênese das DIIs (IMPELLIZZERI et al., 2018; KWON et al., 2005; SHOUVAL et al., 2016; YOSHIDA et al., 2010). Dados anteriores reportam que, embora a anakinra demonstre um grau de eficácia na inflamação sistêmica, ela se mostrou ineficaz para o tratamento das DIIs, com

agravamento da DC após seu uso (CARTER; VALERIANO; VASEY, 2003; HÜGLE; SPETH; HAAS, 2017).

Dessa forma, considerando a resposta clínica positiva da inibição de IL-1 β no tratamento de outras condições inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide e artrite idiopática juvenil (DINARELLO; VAN DER MEER, 2013; MCENTEE; FINLAY; LAVELLE, 2019), pode-se sugerir que o bloqueio de IL-1 β precisa ser mais explorado na pesquisa pré-clínica, no objetivo de compreender seus efeitos na inflamação intestinal e com a finalidade de apontá-lo como um promissor alvo terapêutico para a DII. Para tal, investigar rotas alternativas de neutralização dessa citocina é crucial para compreender as limitações ou falta de sucesso dos inibidores de IL-1 β já disponíveis.

1.8 Modelos experimentais utilizados na pesquisa das DIIs

A utilização de modelos animais tornaram-se cruciais ferramentas para compreender os mecanismos moleculares e celulares que levam ao desenvolvimento de doenças, como elas se iniciam e se perpetuam, além de permitir investigar o efeito de potenciais tratamentos. Por isso, os modelos animais de inflamação intestinal têm se tornado essenciais no estudo das DIIs, pois fornecem uma ferramenta útil para: (1) caracterizar a base mecânica da doença; (2) identificar novos alvos para intervenção terapêutica; e (3) testar novos tratamentos (BANG; LICHTENBERGER, 2016; WIRTZ et al., 2017).

Uma variedade de modelos animais foi estabelecida para investigar a patogênese e testar terapias para DIIs. Esses modelos podem ser categorizados em quatro grandes grupos: modelos geneticamente modificados, imunomodulados, espontâneos e erosivos/induzidos quimicamente. Cada modelo experimental possui pontos fortes e fracos exclusivos no estudo de doenças inflamatórias intestinais sem nenhum modelo de camundongo que replique completamente a patologia clínica característica das DIIs (PADUA et al., 2016; WIRTZ et al., 2017). A ampla variedade de opções permite aos pesquisadores escolher um modelo que atenda os objetivos de seus estudos com base nas características e aspectos únicos de cada modelo (BANG; LICHTENBERGER, 2016).

Os modelos de indução química são os mais utilizados para estudar a inflamação intestinal devido ao início imediato da inflamação, facilidade de aplicação e custos relativamente

baixos, além da importante semelhança nos aspectos imunológicos às DIIs humanas (GADALETA; GARCIA-IRIGOYEN; MOSCHETTA, 2017). Os modelos de colite com dextrano sulfato de sódio (DSS) e ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) estão entre os modelos químicos mais utilizados na pesquisa da DII (WIRTZ et al., 2017). Ambos envolvem um insulto químico ao epitélio intestinal, permitindo que bactérias e moléculas imunogênicas entrem na mucosa que, por sua vez, induzem a resposta inflamatória (BANG; LICHTENBERGER, 2016). Além disso, como com todos os modelos animais disponíveis, as colites DSS e TNBS, mesmo apresentando limitações, se assemelham a aspectos diferentes e importantes da na patogênese da DII humana (GADALETA; GARCIA-IRIGOYEN; MOSCHETTA, 2017).

O modelo de colite induzida por DSS apresenta achados imunohistológicos semelhantes à CU (CHASSAING et al., 2014). As primeiras alterações relacionadas ao DSS podem começar a serem observadas após um dia de tratamento e incluem a diminuição da expressão das TJs, aumento a permeabilidade intestinal e o aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-10 e IL-12) no cólon (CHASSAING et al., 2014; GADALETA; GARCIA-IRIGOYEN; MOSCHETTA, 2017). As lesões histológicas observadas no modelo de colite induzida por DSS revelam destruição das criptas, ulcerações e erosões, seguidos por edema da mucosa, depleção de mucina, abscessos e infiltrado inflamatório (CHASSAING et al., 2014). Para indução da colite, os animais recebem concentrações de 2-10% do DSS por breves períodos de 4-14 dias. Os animais ingerem os polímeros de DSS na água levando à colite caracterizada por diarreia, sangue nas fezes, perda de peso e alterações histopatológicas, como visto na colite ulcerativa em humanos (CHASSAING et al., 2014; GADALETA; GARCIA-IRIGOYEN; MOSCHETTA, 2017).

Por outro lado, o modelo de colite TNBS apresenta características imunohistológicas semelhantes à DC humana (ANTONIOU et al., 2016). Os animais que recebem a instilação retal de TNBS desenvolvem diarreia, sangramento retal, prolapso retal e perda de peso acentuada. As manifestações clínicas tipicamente atingem o pico em 2 a 4 semanas e podem ser seguidas por recuperação parcial ou morte (ANTONIOU et al., 2016; JONES-HALL; GRISHAM, 2014). Em relação aos achados histológicos, observa-se um exacerbado infiltrado inflamatório transmural de células imunes, composto por macrófagos, linfócitos T CD4+ e neutrófilos. Ulceração, edema e perda de células caliciformes também são observados (ANTONIOU et al., 2016; JONES-HALL; GRISHAM, 2014; NEURATH, 2017). O modelo induzido por TNBS possui um perfil

característico de citocinas de células Th1 e Th17. Foi observado que células T CD4+ da lâmina própria produzem altos níveis de IL-12, IL-17, TNF- α , IFN- γ , IL-2, proteína-1 inibidora de macrófagos e níveis mais baixos de IL-4 (ANTONIOU et al., 2016; JONES-HALL; GRISHAM, 2014).

É importante ressaltar que, independente do modelo usado, características como linhagem do animal, peso e sexo devem ser considerados para obter um modelo mais apropriado e que reproduza corretamente os achados das DIIs humanas (BANG; LICHTENBERGER, 2016; GADALETA; GARCIA-IRIGOYEN; MOSCHETTA, 2017; WIRTZ et al., 2017).

1.9 Bactérias lácticas: alternativa promissora para terapêutica das DIIs

O grupo de bactérias ácido lácticas (BALs) inclui um amplo e heterogêneo grupo de microrganismos onipresentes que obtêm energia através da conversão de açúcares em ácido láctico. Quanto à morfologia, as BALs podem assemelhar-se a cocos, bastonetes ou bacilos. São microrganismos Gram-positivos com um baixo teor de conteúdo genômico G-C (54%) e são anaeróbios facultativos não formadores de esporos, imóveis e não produzem catalase (BERMÚDEZ-HUMARÁN et al., 2013; CARVALHO et al., 2017a; PESSIONE, 2012). Quanto à distribuição, as espécies deste grupo podem ser encontradas naturalmente em diferentes ambientes que são ricos em nutrientes como a decomposição de vegetais e frutas, e até mesmo nos tratos orais, urogenitais e intestinais de mamíferos e outros animais. Adicionalmente, podem ser encontrados em vários tipos de laticínios, já que algumas linhagens são usadas para produzi-los (CARVALHO et al., 2017a; HANNIFFY et al., 2004).

As espécies de BALs encontradas no TGI humano podem ser autóctones como aquelas que compõem a microbiota, a exemplo daquelas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*, ou alóctones como transientes do TGI, como *Lactococcus* sp. e algumas cepas de *Lactobacillus* usadas para produção de iogurtes (BERMÚDEZ-HUMARÁN et al., 2013; WHELAN, 2011). Tais características inerentes a esse vasto grupo os destacam no que tange ao impacto positivo na saúde humana e são geralmente consideradas como seguras (GRAS – *Generally Recognized As Safe*) pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (BERMÚDEZ-HUMARÁN et al., 2013; CARVALHO et al., 2017b; WANG et al., 2016; WHELAN, 2011).

Diversas espécies deste grupo apresentam propriedades benéficas, atuando como probióticos e prevenindo quadros infecciosos, promovendo a saúde e longevidade humana. Nesse contexto, a comunidade científica vem ampliando os estudos referentes ao papel destes microorganismos na modulação de respostas benéficas em diversos distúrbios intestinais, no intuito de promover a aplicação terapêutica desses microrganismos (DE AZEVEDO et al., 2014; MIYOSHI et al., 2014).

1.10 Bactérias lácticas recombinantes na terapêutica das doenças inflamatórias intestinais

No intuito de otimizar as propriedades probióticas, diversos grupos de pesquisa vêm se concentrando em desenvolver linhagens de BALs geneticamente modificadas capazes de expressar proteínas heterólogas e como carreadoras de plasmídeos de interesse médico, como aqueles que codificam moléculas anti-inflamatórias (CARVALHO et al., 2017).

Diante deste contexto, diferentes linhagens recombinantes de BALs com propriedades anti-inflamatórias aumentadas têm sido produzidas. Relatos recentes incluem a construção de cepas de *L. casei*, *L. plamtarum*, *S. thermophilus* e *L. lactis* capazes de expressar moléculas anti-inflamatórias, aumentando os efeitos benéficos destas bactérias (DEL CARMEN et al., 2014; LEBLANC et al., 2011).

Assim, vários estudos têm focado no uso de BALs recombinantes com propriedades anti-inflamatórias como alternativa de tratamento para as doenças inflamatórias do TGI (CARVALHO et al., 2017a; DANIEL et al., 2011; DE MORENO DE LEBLANC et al., 2016; HANNIFFY et al., 2004; LEBLANC et al., 2011; LEVIT et al., 2017; MOTTA et al., 2012; WANG et al., 2016). Tais tratamentos utilizam a via oral, o que torna ainda mais viável quando comparado a terapias sistêmicas, as quais utilizam a via parenteral, em que muitas vezes está associada a efeitos colaterais. De fato, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que imunização ou tratamento para diversas doenças seja por via oral devido a razões econômicas, logísticas e de segurança. Um outro ponto de destaque é que essa via de administração oferece vantagens importantes sobre a administração sistêmica, como a redução dos efeitos adversos, pois as moléculas são administradas localmente e têm a capacidade de estimular as repostas imunes do GALT (CARVALHO et al., 2017).

1.11 *Lactococcus lactis* recombinantes como potencial tratamento das DIIs

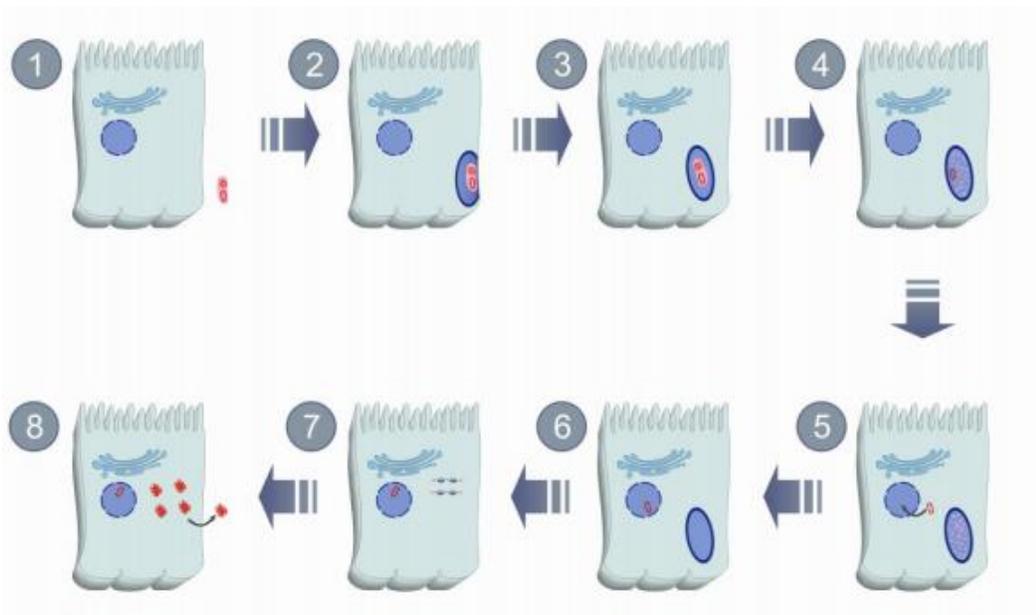
Como mencionado anteriormente, as terapias baseadas em anticorpos monoclonais tornaram-se populares no tratamento de CU e DC em humanos. Contudo, os efeitos terapêuticos têm sido avaliados, dado que a imunoterapia convencional requer uma exposição sistêmica e, conseqüentemente, efeitos colaterais drásticos, além dos elevados custos que esta abordagem requer (LICHTENSTEIN et al., 2015).

As linhagens recombinantes de *L. lactis* vêm sendo amplamente exploradas na pesquisa, principalmente na obtenção de proteínas de interesse terapêutico. Vários trabalhos confirmam a capacidade de *L. lactis* em apresentar antígenos e expressar moléculas terapêuticas na mucosa, gerando efeitos imunomoduladores significativos (ALMEIDA et al., 2016; BERMÚDEZ-HUMARÁN et al., 2008; DE AZEVEDO et al., 2015; LIU et al., 2016; TAGHINEZHAD-S et al., 2019; VANDENBROUCKE et al., 2010). Contudo, o maior desafio desta aplicação consiste principalmente na expressão de genes eucarióticos nesta bactéria, uma vez que diferenças observadas entre maquinaria molecular dos sistemas eucarióticos e procarióticos podem ser cruciais para construção de moléculas bioativas. Por exemplo, o processamento pós-traducional em *L. lactis*, algumas vezes não é correto, pois modificações tais como glicosilações e formação de pontes dissulfeto são limitadas devido à falta da enzima dissulfeto isomerase, resultando em uma quantidade muito baixa da forma ativa da proteína de interesse (PONTES et al., 2011).

A descoberta de que as bactérias são capazes de transferir material genético para células de mamíferos *in vitro* impulsionou o campo da engenharia genética em construir vetores eficientes para a entrega de DNA (AZIZPOUR et al., 2017). Assim, alguns estudos já utilizam uma estratégia alternativa para contornar este problema, que se baseia no uso destas bactérias para a entrega de plasmídeos com cassetes de expressão eucariótica, onde as modificações pós-traducionais da proteína de interesse sejam realizadas pelas células eucarióticas hospedeiras (GUIMARÃES et al., 2005; PONTES et al., 2011). Nestes mecanismos de transferência, após a invasão celular, a *L. lactis* provavelmente é internalizada por vesículas fagolisossomais e sofre lise, liberando o DNA plasmidial. Em seguida, o DNA plasmidial pode escapar da vesícula para o citoplasma e por fim, ser translocado para o núcleo da célula onde ocorre a expressão da ORF (“*Open Reading Frame*”- Fase de Leitura Aberta) de interesse, ou seja, da informação genética inserida no plasmídeo, com posterior síntese da proteína de interesse (Figura 2). Neste sistema de entrega, as bactérias atravessam a membrana plasmática da célula alvo ou são fagocitadas,

entregando o plasmídeo vacinal diretamente no interior da célula, além de proteger o DNA plasmidial de degradação por nucleases (PONTES et al., 2011; SCHOEN et al., 2004).

Figura 2: Representação esquemática da transferência de um plasmídeo vacinal de uma bactéria invasiva atenuada para uma célula eucariótica.



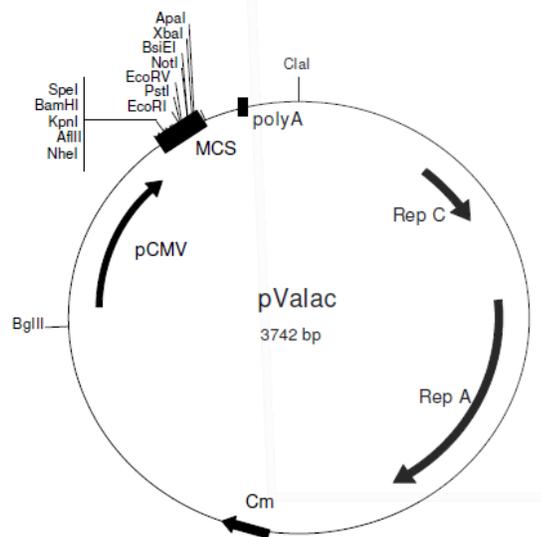
(1) Célula eucariótica e bactéria contendo o plasmídeo vacinal; (2 e 3) Entrada da bactéria em uma vesícula primária na célula hospedeira; (4) Fusão da vesícula primária com o compartimento lisossômico e lise bacteriana; (5) Escape do plasmídeo de DNA da vesícula para o citoplasma; (6) a vacina de DNA alcança o núcleo da célula; (7 e 8) Transcrição e tradução do antígeno de interesse e apresentação deste ao sistema imune (Adaptado de Pontes et al., 2011).

Atualmente, existem vários sistemas de expressão disponíveis para *L.lactis*, possibilitando diferentes de aplicações de proteínas anti-inflamatórias que podem ser aplicadas na terapêutica da inflamação intestinal. Dentre estes, destaca-se o uso do plasmídeo denominado pValac (*vaccination using lactic acid bactéria*), um vetor de expressão eucariótica que visa otimizar a estratégia de entrega de DNA plasmidial (GUIMARÃES et al., 2009).

O plasmídeo pValac, representado esquematicamente na figura 3, foi criado através da fusão de: (1) do promotor do citomegalovírus (pCMV), que permite a expressão da ORF de interesse em células eucarióticas; (2) um sítio de clonagem múltipla (MCS); (3) a sequência sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH poliA) para estabilizar o transcrito do RNA mensageiro (RNAm); (4) as origens de replicação que permitem a propagação do

plasmídeo em *Escherichia coli* e *L. lactis* ; e (5) um gene de resistência ao cloranfenicol para a seleção de estirpes recombinantes (GUIMARÃES et al., 2009).

Figura 3: Estrutura do plasmídeo pValac.



Estrutura do plasmídeo pValac. As caixas indicam: local de clonagem múltipla (MCS) e região de poliadenilação da BGH (poli A). As setas indicam: promotor de citomegalovírus (pCMV); origem de replicação de *L. lactis* (Rep A) e *E. coli* (Rep C) e cloranfenicol gene de resistência (Cm). São mostrados os locais de restrição ClaI e BglII usados para ligar regiões eucarióticas e procarióticas (Adaptado de Guimarães et al., 2009).

Diante da possibilidade da manipulação genética de *L. lactis*, a administração oral de tais cepas recombinantes se mostra promissora no tratamento da inflamação do TGI e outro fato é que a possibilidade de codificação da informação contida na ORF de interesse pela célula eucariótica torna ainda maior a possibilidade de obtenção de boas respostas terapêuticas. Além disso, com o propósito de otimizar a eficiência de entrega do cassete de expressão eucariótico às células eucarióticas e as interações entre as BALs com as células hospedeiras, uma nova linhagem invasiva de *L. lactis* que expressa a proteína de ligação a fibronectina A (FnBPA), uma adesina de membrana de *Staphylococcus aureus*, foi desenvolvida. A expressão de FnBPA melhora e facilita a entrega do DNA em células eucarióticas, devido à capacidade da FnBPA em mediar a adesão da bactéria ao epitélio intestinal, aumentando a entrada dessas bactérias em células não fagocíticas. Estudos reportam o aumento da invasividade de *L. lactis* FnBPA+ em células *in vitro* a níveis comparáveis a *S. aureus* (INNOCENTIN et al., 2009).

A utilização de uma linhagem da *L. lactis* invasiva foi testada em um experimento com o modelo de câncer de camundongo induzido pelo papilomavírus humano (HPV-16) tratados com uma linhagem de *L. lactis* exibindo em sua superfície celular o antígeno E7 (LL-E7) e o FnBPA (LL-E7 + FnBPA), em que foi observado uma resposta imune Th1 sistêmica mais eficiente nos animais imunizados com a bactéria recombinante invasiva. Além disso, os camundongos vacinados com LL-E7 + FnBPA foram melhor protegidos quando desafiados com tumores induzidos por HPV-16 (ALMEIDA et al., 2016).

Somando as duas estratégias que consistem na utilização de uma linhagem invasiva e veículo para entrega do plasmídeo de expressão eucariótica, foi desenvolvida uma linhagem de *L. lactis* capaz de expressar em sua superfície o FnBPA e de entregar o pValac para a expressão eucariótica de proteínas de interesse (PONTES et al., 2012). Estudos anteriores reportam o potencial terapêutico de tais linhagens no tratamento da inflamação intestinal em modelos de colite experimental. A aplicação terapêutica de *L. lactis* MG1363 FnBPA+ carreando o plasmídeo pValac codificador de citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-4 e IL-10 resultaram na redução de marcadores inflamatórios e dano histológico intestinal e promoveram melhora da colite experimental (SOUZA et al., 2016; ZURITA-TURK et al., 2014).

Recentemente, uma linhagem de *L. lactis* MG1363 FnBPA+ carreando o vetor de expressão eucariótica pValac codificando fragmentos de anticorpos monoclonais anti-TNF- α foi construída (CHIABAI et al., 2019). Quando testada no tratamento de colite induzida por DSS e TNBS, a linhagem *L. lactis* MG1363 FnBPA+ pValac::anti-TNF α demonstrou ser capaz de entregar o plasmídeo localmente a partir da expressão do fragmento de anticorpo monoclonal anti-TNF e de promover melhora nos aspectos inflamatórios da colite, avaliado através níveis de citocinas pró-inflamatórias e dano histopatológico (CHIABAI et al., 2019; VIANA, 2020).

1.12 Fragmentos de anticorpos monoclonais como abordagem promissora na terapia das DIIs

Com o avanço da tecnologia do DNA recombinante, várias formas de anticorpos recombinantes foram geradas através da manipulação dos genes codificadores para cada uma das cadeias do anticorpo, tornando possível alterar a estrutura e função do anticorpo (AHMAD et al., 2012). Fragmentos de anticorpos como Fab (fração ligante ao antígeno), scFv (fragmento variável de cadeia única) e outros podem ser gerados pela remoção de parte ou toda cadeia

constante, ou toda porção Fc dos anticorpos (AHMAD et al., 2012). Esse grupo de fragmentos de anticorpos monoclonais tem emergido no campo da pesquisa básica e aplicada e se tornou promissor para a construção de tratamentos imunoterapêuticos (KEIZER et al., 2010; XENAKI; OLIVEIRA; VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, 2017). Diferente dos anticorpos monoclonais bifuncionais (constituídos da porção Fc e Fab), os fragmentos de anticorpos monoclonais, considerados mAbs de nova geração, apresentam algumas características que os tornam bons candidatos para construção de terapias, incluindo tamanho, uma meia-vida menor no soro do indivíduo em comparação ao anticorpo bifuncional, além de apresentar melhor penetrabilidade nos tecidos (KEIZER et al., 2010).

1.13 Justificativa da proposta

A crescente utilização de terapias biológicas, principalmente aquelas pautadas no uso de anticorpos monoclonais que visam neutralizar citocinas relacionadas à progressão da doença, tem trazido benefícios clínicos destacáveis, porém, apresentam algumas limitações no que tange aos efeitos colaterais devidos ao uso sistêmico. Além disto, as tecnologias necessárias para produção de tais anticorpos estão vinculadas a elevados custos que refletem diretamente na sua utilização. Assim, a proposta vinculada a este projeto buscou avaliar formas alternativas de produzir mAbs recombinantes utilizando rotas alternativas que podem propiciar melhores efeitos terapêuticos.

No que tange ao contexto da terapêutica da DC, a abordagem explorada no presente estudo representa uma potencial estratégia terapêutica inovadora, pois o uso por via oral de tais bactérias está associado à vantagens da imunidade da mucosa, evitando os efeitos indesejáveis associados à administração sistêmica dos mAbs. Um outro fato a destacar é a simplicidade da técnica e o baixo custo da terapia com DNA.

Além disso, explorar a imunomodulação local da mucosa torna-se interessante no contexto da DC, visto que o microambiente intestinal é o local afetado pela doença, mas também é nele encontrado um sistema imune robusto que pode ser alvo de manejo utilizando moduladores biológicos. Portanto, as linhagens MG1363 de *L. lactis* expressando FnBPA se mostram promissoras e compatíveis com a proposta deste trabalho em utilizar essa linhagem recombinante com fenótipo invasivo como carreadora do plasmídeo pValac que carrega a informação para codificar fragmentos de anticorpos monoclonais do tipo scFv do anticorpo monoclonal

Gevokizumabe, que neutraliza a citocina pró-inflamatória IL-1 β , importante na patogênese da inflamação intestinal.

Logo, partindo dos pressupostos acima, nossa proposta baseia-se em avaliar os efeitos da linhagem de *L. lactis* MG1363+ (FnBPA) carreadora do plasmídeo pValac codificador do fragmento de anticorpo monoclonal anti::IL-1 β em um modelo de inflamação intestinal induzido quimicamente por TNBS.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos anti-inflamatórios do produto do plasmídeo de expressão eucariótica codificante de fragmentos de anticorpos scFv anti-IL-1 β carreado por uma linhagem invasiva de *Lactococcus lactis* na doença de Crohn experimental induzida por TNBS.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da entrega do plasmídeo pelas bactérias recombinantes sobre os parâmetros macroscópicos associados à inflamação intestinal no modelo de colite crônica, induzida por TNBS.
- Verificar o impacto da entrega do plasmídeo pelas bactérias recombinantes na manutenção da arquitetura intestinal;
- Avaliar os efeitos do tratamento com a bactéria recombinante na diminuição do dano histopatológico.
- Mensurar o percentual de células produtoras de mucinas neutras no colón em resposta ao tratamento com as bactérias recombinantes.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c fêmeas com 6-8 semanas de idade (20-24g) provenientes do biotério do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os animais receberam água filtrada e ração sem restrições durante todo o experimento e foram mantidos em micro-isoladores. O biotério utilizado tem instalações próprias, com uma sala para acomodação dos animais, contando com temperatura controlada (22-24°C), controle de luz de 12 horas e exaustor tanto para redução do odor como para a circulação de ar. Todos os procedimentos aqui descritos com animais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (protocolo 1840030418).

3.2 Indução da colite experimental por TNBS

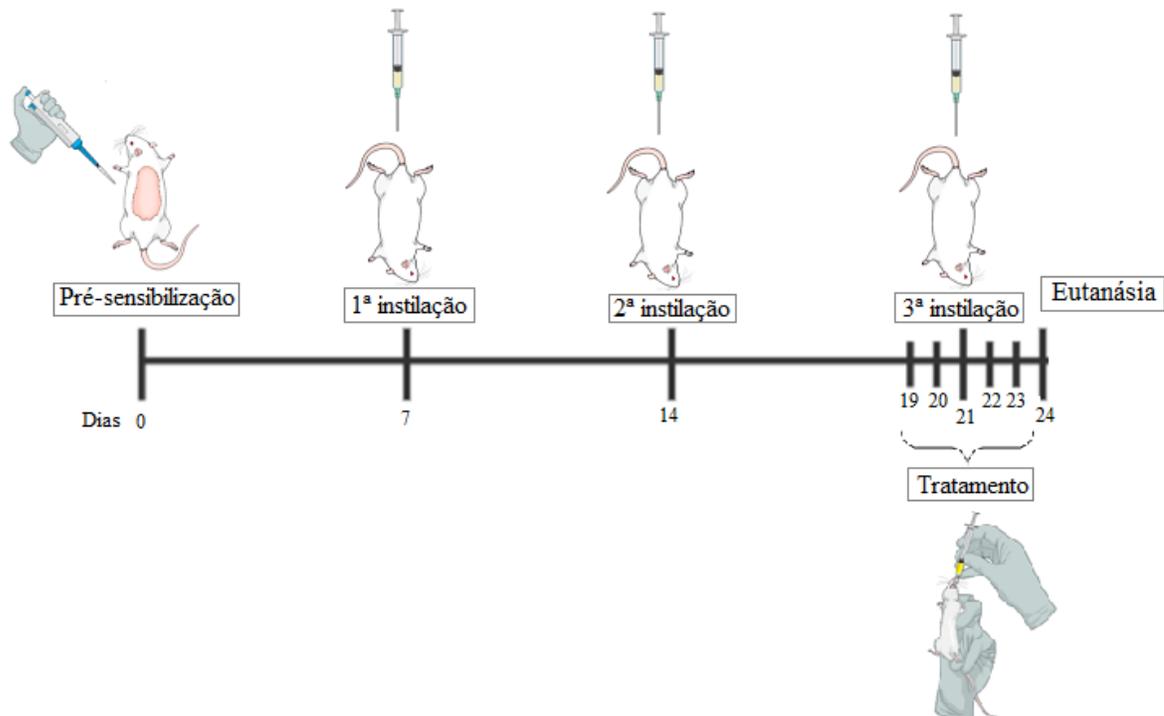
Para indução da colite crônica experimental, o método usado foi o descrito por Wirtz e colaboradores (2017) com modificações. Os camundongos foram expostos a administrações intracolônicas de doses crescentes de TNBS em etapas. Sete dias antes da primeira administração intra-retal de TNBS, os camundongos foram pré-sensibilizados com uma única aplicação de 150 µL de um mix contendo acetona e azeite numa proporção de 4:1 com 1% TNBS (Sigma-Aldrich) na pele da região dorsal após a raspagem dos pelos. Nos dias 7, 14 e 21, os camundongos foram anestesiados com solução cetamina/xilazina via intraperitoneal e foi administrado 0.75, 1.5 e 2.5 mg de TNBS diluído em etanol 40% via intra-retal (respectivamente nos dias 7, 14 e 21) com ajuda de um cateter com diâmetro de 2 mm conectado a uma seringa de 1.0 ml e introduzido até uma distância de aproximadamente 4 cm do ânus. Foi administrado 100 µL da solução de TNBS, e os animais foram mantidos em posição vertical (cabeça para baixo) por 60 segundos para distribuição completa e igual do hapteno. Nos dias 19 a 23 foram realizadas as gavagens intragástricas com os diferentes tratamentos. (Figura 4).

3.3 Desenho experimental dos grupos

Os animais foram divididos em quatro grupos: (i) CN: tratamento oral com salina e aplicação intra-retal de etanol; (ii) TNBS: tratamento oral com salina e aplicação intra-retal de

etanol/TNBS; (iii) LL-F: tratamento oral com *L. lactis* MG1363 FnBPA+ e aplicação intra-retal de etanol/TNBS; (iv) LL-FI: tratamento oral com *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac:*anti-IL-1 β*) e aplicação intra-retal de etanol/TNBS. Os animais dos grupos passaram pelo protocolo de indução com TNBS e no dia 24 foram eutanasiados, como ilustrado na figura 4.

Figura 4: Cronograma da indução da colite induzida por TNBS e aplicação dos tratamentos



No dia 0 foi realizada a pré-sensibilização, nos dias 7, 14 e 21 os camundongos receberam, respectivamente, a instilação de 0,75, 1,5 e 2,5 mg de TNBS em etanol 40% por via intra-retal. O tratamento oral aconteceu entre os dias 19 e 23. No dia seguinte a última gavagem os camundongos foram eutanasiados (Fonte: VIANA, 2020).

3.4 Linhagens bacterianas, plasmídeos, condições de cultivo e estocagem

As linhagens bacterianas foram cedidas pela Universidade de Brasília e as culturas foram mantidas em uma solução estéril de glicerol 80% (1 parte de glicerol 80%:4 partes da cultura bacteriana) e acondicionadas em um ultrafreezer a -80°C . O cultivo foi feito utilizando meio de cultura M17 acrescido de 0,5% de Glicose a 30°C sem agitação por aproximadamente 16 horas ($\text{DO}=1$). As linhagens bacterianas empregadas neste trabalho estão listadas na tabela 2 e os plasmídeos utilizados na tabela 3.

Tabela 1: Linhagens bacterianas utilizadas neste estudo

Linhagem	Características	Fonte
<i>Lactococcus lactis</i> MG1363 FnBPA+	<i>L. lactis</i> MG1363 expressando FnBPA de <i>S. aureus</i> (Eryr)	(QUE et al., 2001)
<i>Lactococcus lactis</i> MG1363 FnBPA+ (pValac:anti-IL- 1 β)	<i>L. lactis</i> expressando FnBPA de <i>S. aureus</i> carregando o plasmídeo pValac:anti-IL-1 β (anti-IL-1 β / Cmr / Eryr)	(CHIABAI, 2019)

Tabela 2: Plasmídeos utilizados neste estudo

Plasmídeos	Características relevantes	Fonte
pOri23-FnBPA	Shuttle vetor: (FnBPA / ori ColE1/ P23 / Eryr) ^a	(QUE et al., 2001)
pValac	Vetor de expressão eucariótica (pCMV / Cmr / RepA / RepC) ^b	(GUIMARÃES et al., 2009)
pValac:anti-IL-1 β	pValac contendo ORF anti-IL- 1 β (pCMV / Cmr / RepA / RepC / anti- -IL-1 β) ^b	(CHIABAI, 2019)

a: Plasmídeo contendo o gene codificador da proteína FnBPA de *Staphylococcus aureus*; Eryr: resistência a Eritromicina; ori ColE1: origem de replicação; P23: promotor cromossômico de *L. lactis* MG1363.

b: pValac: *Vaccination using Lactic acid bacteria*; pCMV: promotor do citomegalovírus; RepA e RepC: origens de replicação procariótica; Cmr: gene de resistência ao cloranfenicol; gfp: ORF do gene codificador da proteína verde fluorescente; anti-IL-1 β : ORF do gene codificador da proteína scFv anti- IL-1 β .

3.5 Preparação das bactérias para administração

As doses a serem administradas foram preparadas a partir das culturas bacterianas congeladas. As doses foram centrifugadas 4.000 rpm, a 4°C por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as bactérias foram ressuspensas em salina 0,9% estéril (NaCl 0,9%). Esse processo foi repetido 2 vezes, e em seguida as bactérias foram incubadas com soro fetal bovino a 4°C por 1 hora (10% de SFB em solução salina), com objetivo de disponibilização de fibronectina. Em seguida foram realizadas mais 3 lavagens com salina seguidas da centrifugação como descrito acima. Por fim, o sedimento foi ressuspensado em salina, de modo que cada 100 μ L contivesse 10⁹ UFC (unidades formadoras de colônias).

3.6 Administração das bactérias

A administração de bactérias se deu pela via intragástrica com a técnica de gavagem utilizando uma cânula específica de aço inox, sem causar qualquer prejuízo para o tecido animal,

uma vez que possuía a ponta arredondada. Os camundongos dos grupos LL-F e LL-FI receberam 10^9 UFC de cada uma das linhagens recombinantes ressuspendidas em um volume de 100 μ L de solução salina 0,9% estéril. As inoculações foram realizadas por cinco dias consecutivos (dias 19, 20, 21, 22 e 23) (Figura 4). Os camundongos dos grupos CN e TNBS receberam o inóculo de salina 0,9% estéril, para que estivessem expostos às mesmas condições de estresse que os animais submetidos ao tratamento com a bactéria. Um dia após o término do tratamento, os animais foram eutanasiados (dia 24).

3.7 Índice de atividade da doença (IAD)

O índice de atividade da doença (IAD) foi calculado usando um sistema de pontuação previamente estabelecido por Kasinathan et al. (2018). O IAD consistiu na média das pontuações combinadas para perda de peso, consistência das fezes e sangramento retal. As características que foram classificadas incluíram o seguinte: perda de peso corporal (0, nenhuma; 1, 1–5% de perda; 2, 5–10 % de perda; 3, 10-20% de perda e 4, > 20% de perda), consistência das fezes (0, normal; 2, fezes moles e 4, diarreia) e sangramento retal (0, ausente; 2, moderado e 4, grave). Os animais tiveram seu peso acompanhado diariamente, a perda de peso corporal foi definida pela diferença entre o peso inicial e final e expresso em porcentagem. A consistência das fezes e o sangramento retal foram observados durante a secção do cólon no dia da eutanásia.

3.8 Coleta do material biológico

A eutanásia dos animais se deu por exsanguinação realizada por punção cardíaca após anestesia geral. Logo em seguida, o cólon foi cuidadosamente retirado e os parâmetros peso e o comprimento do cólon foram mensurados. O comprimento do colón obtido se deu considerando a extensão desde a junção com o ceco até o reto. Em seguida, o cólon foi dividido em uma porção proximal (próximo do ceco) e outra distal (próxima do reto). As porções de tecidos do colón foram então utilizadas para a análise histológica. Os tecidos foram mantidos em formaldeído tamponado 4% por 48 horas e posteriormente mantidos em etanol 70%, para realização das técnicas de colorações. A fixação das amostras em formalina tamponada em um volume superior no mínimo a 10x o volume da peça anatômica garantiu a integridade do tecido, evitando a sua

degradação por enzimas presentes no interior das células ou por bactérias, além de preservar a estrutura e a composição celular.

3.9 Análise histológica

3.9.1 Preparação das lâminas para análise histológica

Inicialmente, cada órgão foi inserido em um cassete devidamente identificado para facilitar o manuseio durante o processo evitando possíveis trocas. O material coletado em formalina tamponada foi então desidratado por imersões sucessivas de 1 hora numa série crescente de álcool etílico a 70, 80, 90 e 100%. A imersão em álcool absoluto foi realizada duas vezes. A etapa de desidratação evita a retração do tecido e, conseqüentemente, as lesões estruturais da célula de caráter irreversíveis.

Após a desidratação foi feita a diafanização, na qual o material foi imerso duas vezes em xilol com duração de 1 h cada imersão. O xilol funciona nesta etapa como desalcolizante. Em sequência foi realizada a diafanização, com a impregnação do material realizada em parafina. Na impregnação, as amostras foram submetidas a dois banhos sucessivos em parafina, cada banho com duração de 1 h.

Então, o material histológico foi emblocado em fôrmas de parafina. Quando o material foi totalmente imerso na parafina, cada fôrma foi deixada ao ar livre à temperatura ambiente para solidificação da parafina. Os blocos formados foram retirados das formas e, em seguida, foram realizados os cortes histológicos no micrótomo.

Os cortes histológicos foram realizados com espessura de 5 μm . Após a microtomia, as fitas de parafina obtidas foram colocadas em banho-maria (38 – 40 ° C). Com auxílio de lâminas, os cortes foram “pescados” do banho-maria e as lâminas foram reservadas para secagem do material.

Como os cortes do material biológico aderido as lâminas apresentam-se transparentes e não sendo possível identificar as estruturas que o compõem ao microscópio, foram realizadas colorações. Os protocolos de coloração são executados com banhos sequenciais de vários corantes e reagentes. Com os cortes aderidos às lâminas foi realizado a coloração hematoxilina & eosina (H&E) para visualização e análise geral do corte histológico e da migração celular. Em seguida, foi realizada a montagem das lâminas com inserção de lamínulas. Como meio de montagem (selante) foi utilizado o balsamo do Canadá (VIEIRA, 2008).

3.9.2 Coloração Hematoxilina Eosina (H&E)

As lâminas foram inicialmente desparafinadas por imersão no xilol, em um banho duplicado durante 10 minutos, cada imersão. Em seguida, as lâminas foram hidratadas em álcool com concentrações decrescentes até o álcool 70°. Posteriormente, as amostras foram lavadas de forma rápida em água destilada. Então, foram imersas na hematoxilina de Harris por 30s, e mergulhadas rapidamente em água destilada até a observação do tom azul nos cortes. Em seguida, as lâminas foram colocadas no corante eosina, por 5 minutos, desidratadas com álcool a 80, 90 e 95% com duração de 2 minutos, cada imersão. Após isso, as lâminas foram colocadas na estufa por 5 minutos para secagem tornando possível sua imersão no xilol durante 10 minutos, duas vezes, a fim de clarificar o material.

Após coloração, foi realizada a selagem das lâminas para torná-las permanentes. O bálsamo do Canadá foi colocado sobre o corte e coberto por uma lamínula. Depois, com auxílio de uma pinça, foram retiradas as bolhas entre lâmina e lamínula e comprimida com firmeza sobre o corte para o espalhamento do selante. Após 24 h, foram retirados os excessos do bálsamo para acabamento e finalização do preparo das lâminas (VIEIRA, 2008).

3.9.3 Coloração P.A.S. (Ácido Periódico de Schiff)

A coloração pelo ácido periódico de Schiff revela mucinas neutras intracelulares. A reação do ácido periódico seletivamente oxida os resíduos de glicose, produzindo aldeídos que reagem com o reagente de Schiff e produzem uma cor púrpura.

As lâminas foram inicialmente desparafinadas por imersão no xilol, em um banho duplicado durante 10 min, cada banho. Em seguida, as lâminas foram hidratadas em álcool absoluto, 90%, 80%, e 70% por 5 min, cada imersão e posteriormente as amostras foram lavadas de forma rápida em água destilada. Depois foram colocadas no ácido periódico a 0,5% por 10 min, na água destilada por 1 min, no reativo de Schiff por 25 min e lavadas em água destilada. Quando retiradas foram colocadas em 3 banhos sulfurosos de 3 min cada e mergulhadas em água. Em seguida, as lâminas foram imersas na hematoxilina por 3 min e lavadas em água. Prosseguiu-se com a desidratação com álcool 80%, 90% e 95%, por 2 min cada. Para clareamento foi utilizado xilol, as lâminas foram imersas no xilol I e II por 10 min cada. A montagem das lâminas

foi feita com auxílio da lamínula contendo o bálsamo do Canadá, a lâmina foi sobreposta no centro da lamínula de modo que o corte estivesse coberto.

Nas lâminas coradas por P.A.S. é observado: em vermelho a presença de glicogênio ou polissacarídeos neutros (contendo grupos 1,2 glicol) e mucina (glicoproteína, principal constituinte do muco). Os proteoglicanos não se coram; os núcleos e os citoplasmas se coram em rosa claro. O método PAS permite identificar a produção de mucinas pelas células caliciformes.

3.9.4 Fotomicrografias e análises histológicas

As fotografias digitais foram capturadas pela câmera Moticam 5.0 MP acoplada ao microscópio óptico calibradas em definições específicas conforme a objetiva utilizada: 4x (A.T. 40 x), 10x (A.T. 100 x) ou 40x (A.T. 400x). A análise histológica foi realizada por um operador capacitado, o qual analisava qualitativamente os parâmetros histológicos para em seguida quantificá-los estatisticamente através de score histológico.

Os parâmetros considerados na coloração H&E para o cálculo da pontuação (escore histológico) estão descritos na tabela 4 (VIEIRA, 2008). Para a coloração PAS, a análise do percentual (%) de área (células caliciformes produtoras de muco marcadas por PAS) no campo microscópico foi realizado utilizando o programa *Image J*.

Além disso, todas as análises histológicas foram realizadas às cegas no intuito de evitar qualquer viés na obtenção dos resultados.

3.2 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguindo o teste post-hoc de comparação de Tukey, utilizando o software GraphPad Prism® versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, E.U.A.). Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Tabela 4: Parâmetros analisados no escore histológico de Colite

Grau de Colite	Alterações histológicas
0	Achados histológicos idênticos aos camundongos normais
1	Infiltrado inflamatório leve em mucosa e /ou submucosa e edema. Erosões de mucosa pontual frequentemente associada à proliferação capilar. Muscular da mucosa intacta
2	Alterações de grau 1 envolvendo 50% da amostra
3	Infiltrado inflamatório proeminente e edema frequentemente com áreas de ulceração estendidas além da muscular da mucosa na submucosa. Raras células inflamatórias invadindo a muscular externa, mas sem necrose muscular.
4	Alterações de grau 3 envolvendo 50% da amostra
5	Extensa ulceração com necrose coagulativa limitada inferiormente por numerosas células mononucleares. A necrose se estende profundamente na muscular externa
6	Alterações de grau 5 envolvendo 50% da amostra.

Fonte: Vieira (2008).

RESULTADOS

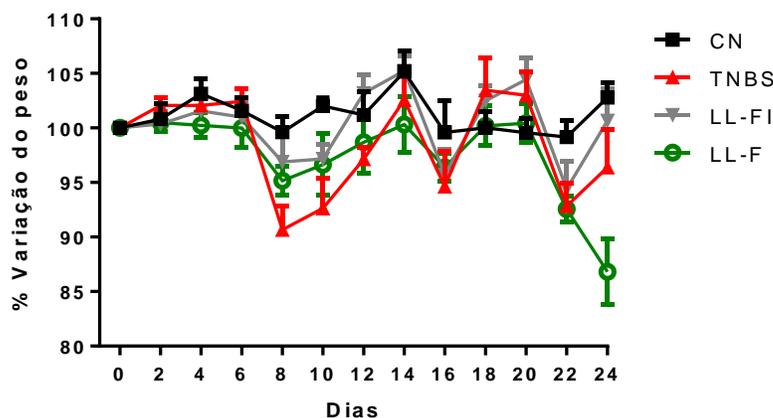
4 RESULTADOS

Neste estudo foi realizado um conjunto de ensaios experimentais para avaliar o efeito da produção de fragmentos de anticorpos monoclonais de anti-IL-1 β diretamente na mucosa intestinal de camundongos com colite induzida por TNBS, utilizando *Lactococcus lactis* como carreador de plasmídeo de expressão eucariótica (pValac:anti-IL-1 β). Os camundongos foram divididos nos seguintes grupos: CN; TNBS; LL-F, grupo que serviu como controle positivo da inflamação, pois a colite foi induzida e foram tratados somente com *L. lactis* transformada expressar a invasina FnBPA e LL-FI, grupo instilado por TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:anti-IL-1 β).

4.1 Avaliação clínica e macroscópica

O primeiro parâmetro observado para a avaliar os efeitos lesivos resultantes pela administração do TNBS/etanol intra-retal foi a observação diária do peso corporal dos camundongos, calculada em porcentagem, considerando 100% do peso no dia 0 do experimento (Figura 5). Os animais tinham 8 semanas de idade e o peso inicial variou de 20 a 23 gramas.

Figura 5: Variação do peso corporal dos camundongos ao longo do experimento.

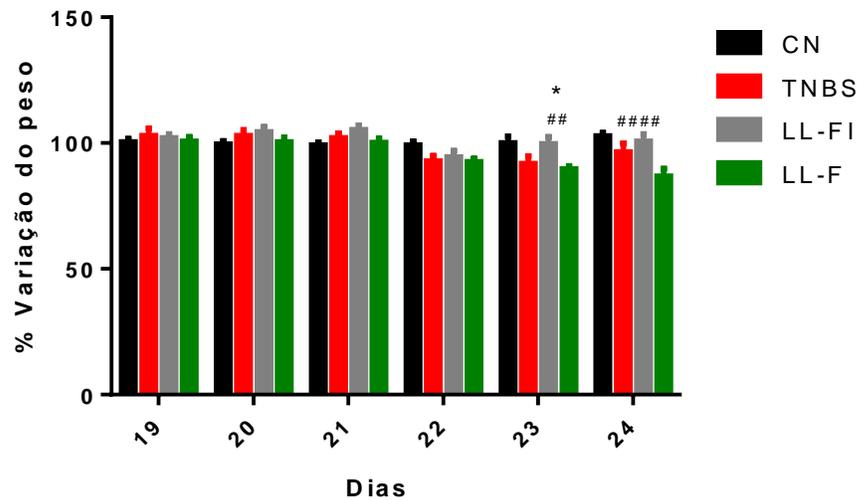


Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina; LL-FI, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:anti-IL-1 β); LL-F, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+. Os pontos no gráfico de curva representam as médias \pm EPM do peso dos animais obtidos em gramas (g) dos diferentes grupos durante os 24 dias de experimento (n = 6-8 animais/grupo).

Durante a indução da colite, o grupo CN apresentou ganho de peso corporal e manteve um peso constantemente elevado ao longo do experimento. Em contraste, os grupos que receberam TNBS apresentaram redução do peso no período de dois dias após as aplicações do TNBS (dia 9, 16 e 23) (Figura 5).

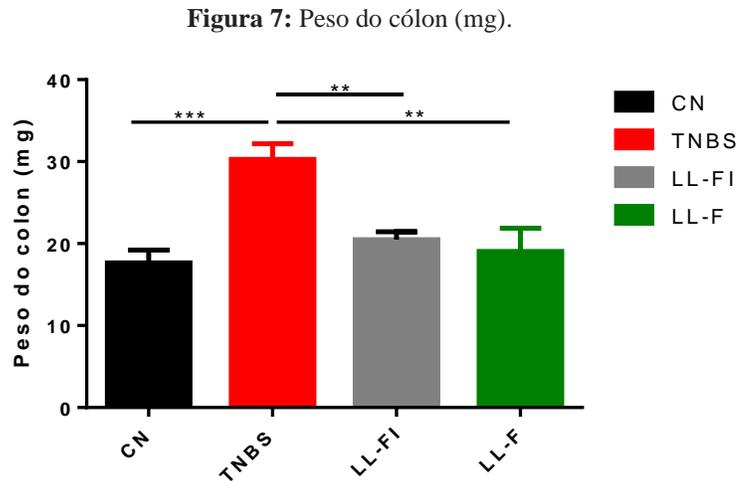
Nos últimos dois dias do período de experimento, equivalente aos dias em que ocorreram as aplicações dos tratamentos (dias 23 e 24), os animais tratados com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1 β*) apresentaram uma recuperação do peso corporal, em que no dia 23 (99,72 \pm 2,67) foi verificada diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo TNBS (91,78 \pm 3,05), bem como no dia 23 e 24 (100,66 \pm 2,92) foi verificada diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo tratado com LL-F (89,66 \pm 2,10 e 86,82 \pm 3,00, respectivamente). Nos dias finais do experimento o grupo LL-F apresentou significativa perda de peso (Figura 6).

Figura 6: Variação de peso corporal durante o período de tratamento.



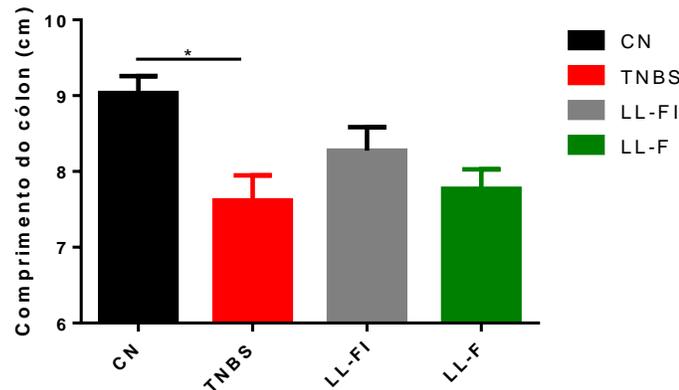
Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina; LL-FI, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1 β*); LL-F, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+. As barras representam as médias \pm EPM do peso dos animais expressos em gramas (g) dos diferentes grupos durante o período dos tratamentos (n = 6-8 animais/grupo). A análise estatística foi realizada com o teste Anova e pós-hoc Tukey. Os asteriscos (*) do gráfico representam a diferença estatística entre os grupos TNBS e LL-FI. As cerquilhas (#) do gráfico representam a diferença estatística entre os grupos LL-F e LL-FI. */# p < 0,05, **/## p < 0,01, ***/### p < 0,0001 e ****/#### p < 0,00001.

Após a eutanásia dos animais, o cólon foi retirado e pesado para obtenção dos dados referente ao peso do cólon (Figura 7). Apenas o grupo TNBS apresentou um cólon mais pesado (30,26 mg \pm 1,92), com diferença significativa com os demais grupos (CN: 17,65 mg \pm 1,55; LL-F: 19,06 mg \pm 2,8; LL-FI: 20,49 mg \pm 0,96).



Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina; LL-FI, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*anti-IL-1 β*); LL-F, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+. As barras representam as médias \pm EPM do peso do cólon dos animais expressos em miligramas (mg) dos diferentes grupos obtidos no final do experimento (n = 6-8 animais/grupo). A análise estatística foi realizada com o teste Anova e pós-hoc Tukey. * p < 0,05 e ** p < 0,01.

Na análise do comprimento do cólon observamos que os grupos TNBS e LL-F, apresentaram médias de 7,61 cm \pm 0,33 e 7,77 \pm 0,25 respectivamente, mostrando um encurtamento do cólon significativamente maior quando comparado ao grupo CN (9,03 cm \pm 0,22). O grupo que recebeu o tratamento com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1 β*) (LL-FI), expressando média de 8,27 cm \pm 0,30, apresentou um cólon maior em comparação ao grupo TNBS e LL-F, porém sem expressar diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos. Foi verificada diferença significativa (p<0,05) entre os grupos CN e TNBS (Figura 8).

Figura 8: Comprimento do cólon (cm).

Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina; LL-FI, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*anti-IL-1β*); LL-F, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+. As barras representam as médias \pm EPM do comprimento do cólon dos animais expressos em centímetros (cm) dos diferentes grupos obtidos no final do experimento (n = 6-8 animais/grupo). A análise estatística foi realizada com o teste Anova e pós-hoc Tukey. * p < 0,05.

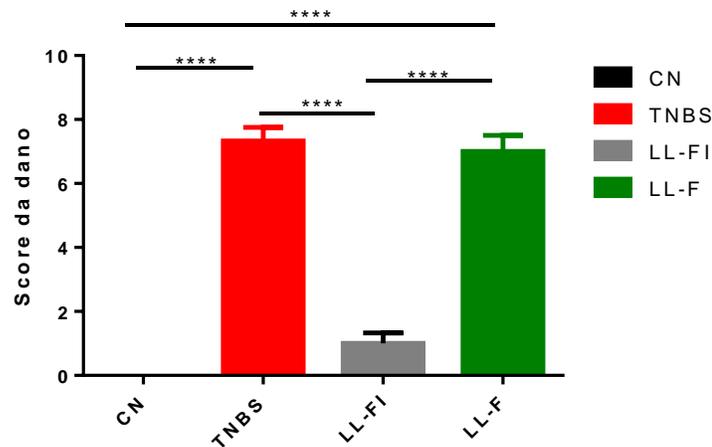
Foi calculado o índice de atividade da doença (IAD), o qual reflete os sintomas macroscópicos da colite e auxilia na avaliação da funcionalidade do tratamento. O IAD (Figura 9) mostrou-se aumentado nos grupos TNBS e LL-F, uma vez que o grupo CN apresentou o score zerado, visto que não foi induzida nenhuma inflamação nesses animais. O grupo LL-FI apresentou melhora significativa, com média de $1,00 \pm 0,32$, em relação aos controles positivos da doença (TNBS = $7,33 \pm 0,42$; LL-F = $7,00 \pm 1,0$).

4.2 Avaliação histopatológica do cólon

4.2.1 Análise das alterações histológicas na região proximal do cólon

As análises histopatológicas da porção proximal dos cólons de camundongos do grupo CN apresentaram achados histológicos idênticos ao normal com preservação das camadas mucosa, submucosa e muscular externa. A camada mucosa com criptas de Lieberkühn (criptas intestinais), lâmina própria e muscular da mucosa bem preservadas, a camada submucosa delgada com presença de vasos sanguíneos e a muscular externa com as camadas circular interna e longitudinal externa com características conservadas (Figura 10A e 11A).

Figura 9: Índice de atividade da doença (IAD).



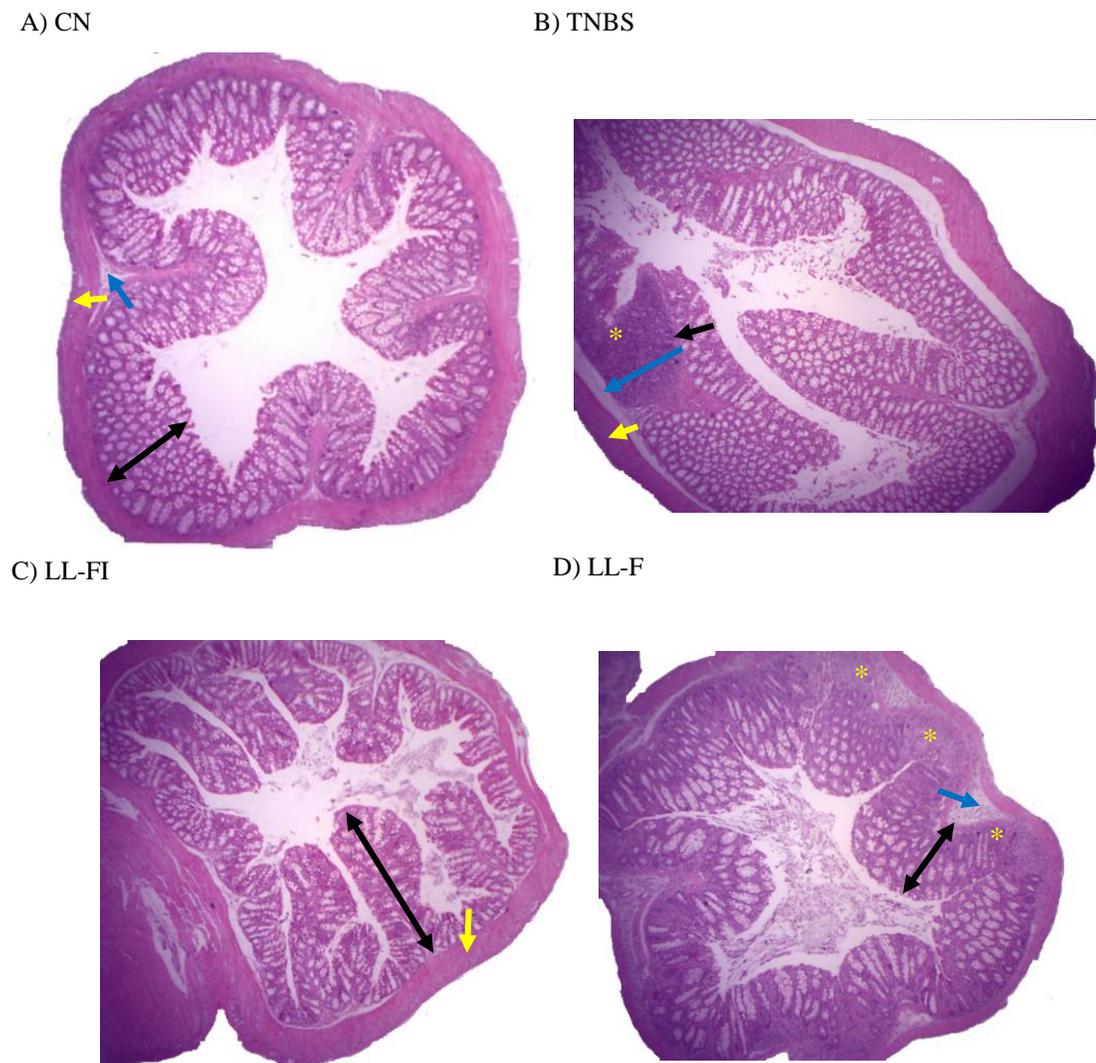
Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina; LL-FI, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*anti-IL-1β*); LL-F, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+. As barras representam as médias ± EPM do score de dano macroscópico dos diferentes grupos experimentais (N = 6-8 animais/grupo). O índice de atividade da doença (IAD) foi pontuado para perda de peso corporal, consistência das fezes e sangramento retal. A análise estatística foi realizada com o teste Anova e pós-hoc Tukey. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,0001 e **** p < 0,00001.

Contudo, os grupos de animais submetidos ao protocolo de inflamação por TNBS mostram graus distintos de dano histológico. O grupo TNBS apresentou desorganização da mucosa, com perda da arquitetura intestinal, áreas de hemorragia e necrose (principalmente no epitélio), infiltrado inflamatório, com predomínio de células mononucleares, além do espessamento da parede, especialmente na camada submucosa, em que foi verificado redução do número de vasos sanguíneos. Adicionalmente, a muscular da mucosa apresentou destruição em algumas regiões como observado na figura 10B e 11B.

O tratamento com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1β*) (LL-FI) minimizou a gravidade do dano colônico, e as análises apontam para uma melhor conservação do tecido e células nas camadas da parede do cólon, diminuição do infiltrado celular inflamatório na mucosa e submucosa. Verificou-se, também, a diminuição da espessura e a presença de vasos sanguíneos na camada submucosa, além da reconstituição da integridade e espessamento da muscular da mucosa (Figura 10C e 11C). No grupo LL-F, a camada mucosa demonstrou presença de infiltrado inflamatório presente na lâmina própria e ultrapassando a muscular da mucosa

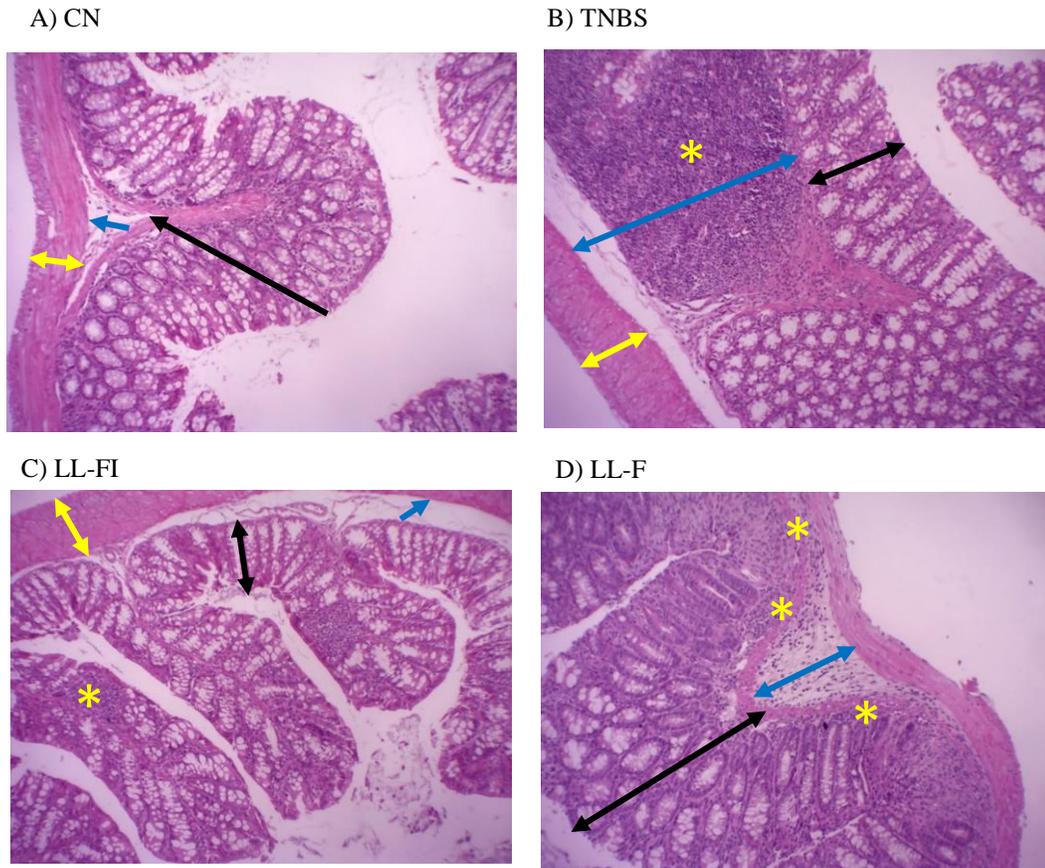
profundamente invadindo a camada submucosa. Infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares e camada muscular externa apresentando espessura reduzida (Figura 10D e 11D).

Figura 10: Fotomicrografias representativas da região proximal do cólon dos grupos experimentais coradas em H&E, obtidas em objetiva de 4x.



Grupos experimentais: grupo controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina (CN) (A) grupo instilado com TNBS e tratado com salina (B), grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*anti-IL-1 β*) (LL-FI) (C) e grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (LL-F) (D). Camada mucosa (seta preta), camada submucosa (seta azul), camada muscular externa (seta amarela) e infiltrado celular (asterisco amarelo). A, B, C e D – H&E, objetiva 4x, A.T. x40.

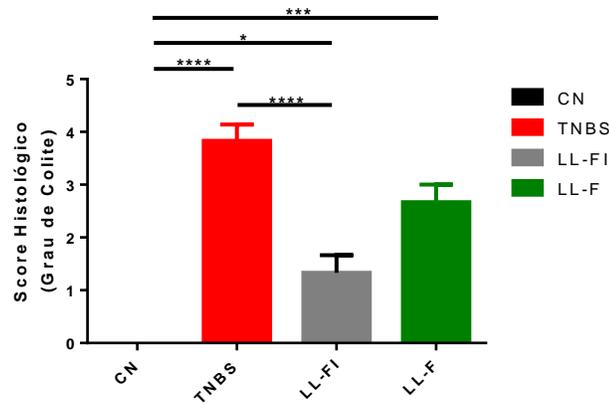
Figura 11: Fotomicrografias representativas da região proximal do cólon dos grupos experimentais coradas em H&E, obtidas em objetiva de 10x.



Grupos experimentais: grupo controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina (CN) (**A**) grupo instilado com TNBS e tratado com salina (**B**), grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*anti-IL-1 β*) (LL-FI) (**C**) e grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (LL-F) (**D**). Camada mucosa (seta preta), camada submucosa (seta azul), camada muscular externa (seta amarela) e infiltrado celular (asterisco amarelo). **A, B, C e D** – H&E, objetiva 10x, A.T. x100.

O score de dano histológico para a região proximal do cólon, que avalia o grau da colite demonstra que os grupos TNBS e LL-F apresentam um elevado dano tecidual, e que o tratamento com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1 β*) (LL-FI) melhorou significativamente o dano tecidual quando comparado ao grupo TNBS ($p < 0,00001$) (Figura 12).

Figura 12: Score de dano histológico da região proximal do cólon.



Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina; LL-FI, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*anti-IL-1β*); LL-F, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+. As barras representam as médias ± EPM do score de dano microscópico referente a região proximal do cólon dos diferentes grupos experimentais (N = 6-8 animais/grupo). O score de dano histológico foi pontuado utilizando os critérios descritos na metodologia. A análise estatística foi realizada com o teste Anova e pós-hoc Tukey. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,0001 e **** p < 0,00001.

4.2.2 Análise das alterações histológicas na região distal do cólon

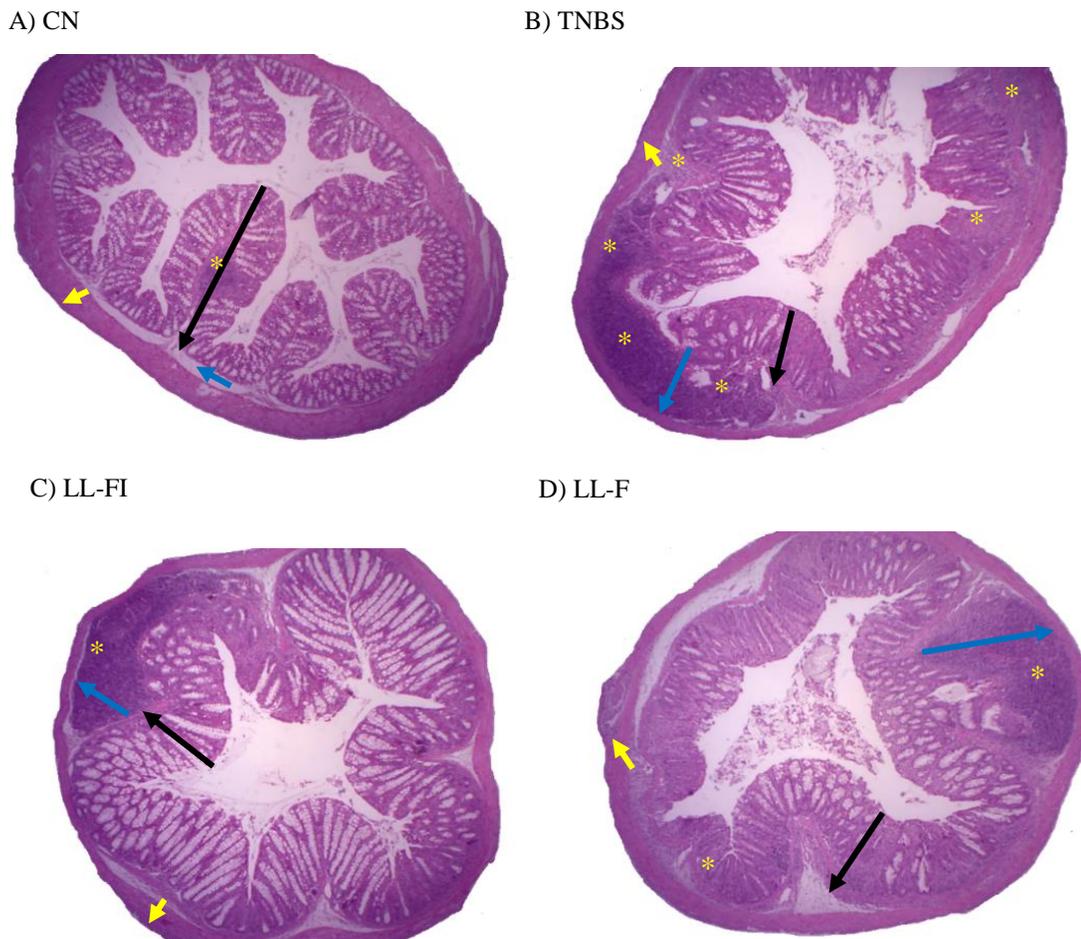
Os achados histopatológicos da região distal do cólon indicaram alterações importantes nos grupos em que a inflamação intestinal foi induzida pelo TNBS. Como já esperado, o grupo CN, em que não houve aplicação do TNBS, apresentou preservação das camadas da mucosa, submucosa e muscular externa. Na camada mucosa, as criptas, glândulas intestinais, lâmina própria e muscular da mucosa estavam bem preservadas, e a camada submucosa delgada com presença de vasos sanguíneos. Além disso, a muscular externa apresentou conservação na arquitetura das camadas circular interna e longitudinal externa (Fig. 13A e 14A).

O grupo TNBS apresentou infiltrado inflamatório intenso presente a nível de mucosa e submucosa, com predomínio de células mononucleares. A camada mucosa apresentou destruição a nível de epitélio de revestimento das glândulas intestinais, além de danos em algumas regiões da muscular da mucosa. Na camada submucosa, observou-se redução do número de vasos sanguíneos, bem como um aumento da espessura da camada promovido pela presença de infiltrado celular mononuclear (Fig. 13B e 14B).

No grupo LL-FI, foi visualizado infiltrado celular na mucosa, transpassando a muscular

da mucosa e se concentrando na submucosa, aumentando a espessura desta última. A camada muscular externa apresentou espessura diminuída e um leve infiltrado celular (Fig. 13C e 14C). O grupo LL-F, um segundo grupo controle do estudo, dado o potencial inflamatório que a cepa *L. lactis* FnBPA+ promove, apresentou características histológicas semelhantes ao grupo TNBS. Neste grupo foi visualizada descontinuidade da arquitetura da muscular da mucosa. A camada submucosa apresentou infiltrado inflamatório, com predomínio de células mononucleares. Além disso, a camada muscular externa apresentou espessura reduzida, decorrente do edema na submucosa (Fig. 13D e 14D).

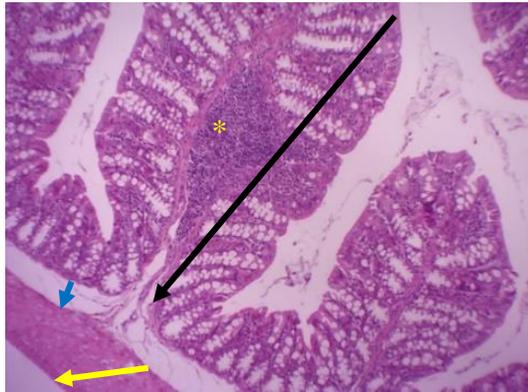
Figura 13: Fotomicrografias representativas de cólon da região distal do cólon dos grupos experimentais coradas em H&E, obtidas em objetiva de 4x.



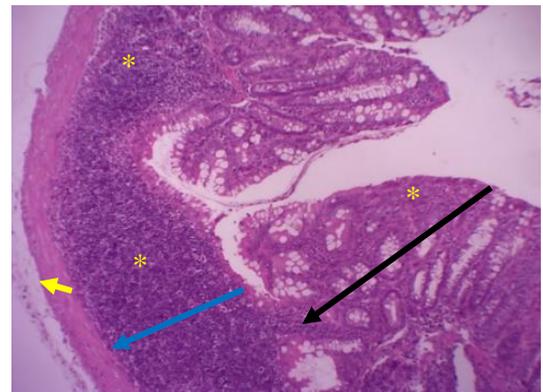
Grupos experimentais: grupo controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina (CN) (A) grupo instilado com TNBS e tratado com salina (B), grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:anti-IL-1 β) (LL-FI) (C) e grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (LL-F) (D). Camada mucosa (seta preta), camada submucosa (seta azul), camada muscular externa (seta amarela) e infiltrado celular (asterisco amarelo). A, B, C e D – H&E, objetiva 4x, A.T. x40.

Figura 14: Fotomicrografias representativas de cólon da região distal do cólon dos grupos experimentais coradas em H&E, obtidas em objetiva de 10x.

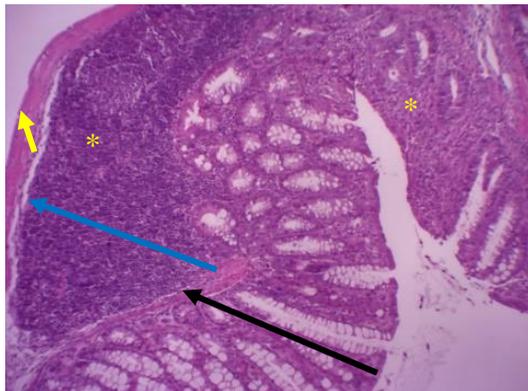
A) CN



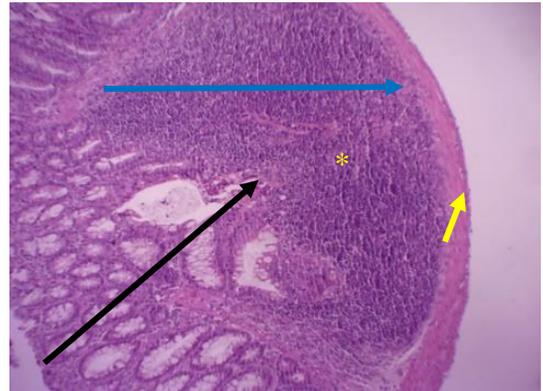
B) TNBS



C) LL-FI

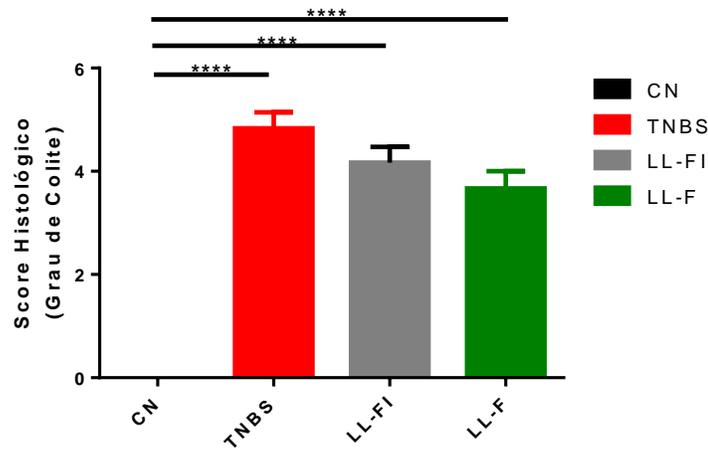


D) LL-F



Grupos experimentais: grupo controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina (CN) (A) grupo instilado com TNBS e tratado com salina (B), grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*anti-IL-1 β*) (LL-FI) (C) e grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (LL-F) (D). Camada mucosa (seta preta), camada submucosa (seta azul), camada muscular externa (seta amarela) e infiltrado celular (asterisco amarelo). A, B, C e D – H&E, objetiva 10x, A.T. x100.

O score de dano histológico para a região distal do cólon demonstra que os grupos TNBS, LL-F e LL-FI apresentam um elevado dano tecidual, mostrando que tratamento com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*anti-IL-1 β*) (LL-FI) não promoveu melhora no dano intestinal no cólon distal (Figura 15).

Figura 15: Score de dano histológico da região distal do cólon

Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina; LL-FI, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*anti-IL-1β*); LL-F, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+. As barras representam as médias ± EPM do score de dano microscópico referente a região distal do cólon dos diferentes grupos experimentais (N = 6-8 animais/grupo). O score de dano histológico foi pontuado utilizando os critérios descritos na metodologia. A análise estatística foi realizada com o teste Anova e pós-hoc Tukey. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,0001 e **** p < 0,00001.

4.3 Avaliação histoquímica de mucinas

O ensaio histoquímico com ácido periódico-reagente de Schiff (PAS) foi utilizado para determinar a produção das mucinas neutras intestinais que são coradas pelo PAS nos cortes histológicos de cólon dos grupos experimentais nas regiões proximal e distal. A avaliação histoquímica de mucinas foi expressa como percentual da área de células caliciformes produtoras de muco PAS-positivas no campo microscópico.

4.3.1 Análise do conteúdo de mucinas na região proximal do cólon

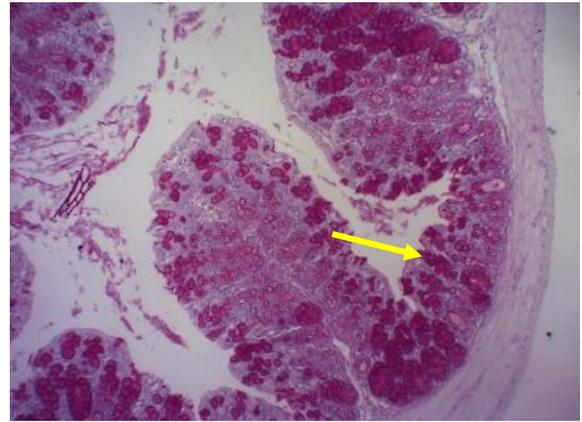
Na análise histológica dos cortes da região proximal, o grupo CN apresentou, em relação a produção de muco, achados histológicos idênticos ao normal com preservação do epitélio de revestimento simples colunar da camada mucosa, apresentando numerosas glândulas intestinais tubulares retas (criptas de Lieberkühn) se estendendo através de toda a espessura da mucosa. A produção de muco foi observada nas células caliciformes presentes no epitélio de revestimento

presentes em grande quantidade e distribuídas de forma uniforme pela mucosa (Figura 16A). No grupo TNBS (Figura 16B) foi possível observar presença de células produtoras de muco, mas com algumas regiões da mucosa apresentando produção diminuída quando comparado ao grupo CN. O grupo LL-FI (Figura 16C) demonstrou uma diminuição na produção de muco observada tanto no número de células marcadas quanto no tamanho das células caliciformes quando comparado ao grupo CN. No grupo LL-F (Figura 16D), a produção de muco foi normal com tamanho de células caliciformes semelhantes ao observado no grupo CN.

Figura 16: Fotomicrografias representativas de cólon da região proximal do cólon dos grupos experimentais coradas em PAS, obtidas em objetiva de 10x.

A) CN

B) TNBS



C) LL-FI

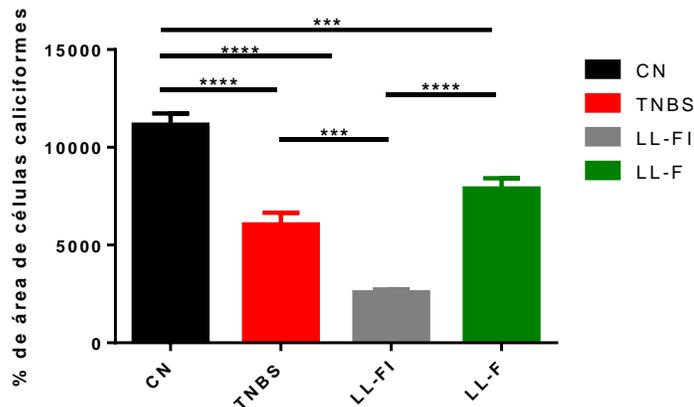
D) LL-F



Grupos experimentais: grupo controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina (CN) (A) grupo instilado com TNBS e tratado com salina (B), grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:anti-IL-1 β) (LL-FI) (C) e grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (LL-F) (D). Célula caliciforme (seta amarela). A, B, C e D – PAS, objetiva 10x, A.T. x100.

A análise histoquímica de mucinas demonstrou uma redução significativa no percentual de células produtoras de mucinas no colón proximal de camundongos tratados com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1 β*). Curiosamente, níveis aumentados de células produtoras de mucinas foi observado nos grupos TNBS e LL-F (Figura 17).

Figura 17: Análise histoquímica de mucinas neutras da região proximal do colón.



Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina; LL-FI, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1 β*); LL-F, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+. As barras representam as médias \pm EPM do percentual da área de células caliciformes produtoras de muco positivas para PAS referente a região proximal do colón dos diferentes grupos experimentais (N = 6-8 animais/grupo). A análise estatística foi realizada com o teste Anova e pós-hoc Tukey. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,0001 e **** p < 0,00001.

4.3.2 Análise do conteúdo de mucinas na região distal do colón

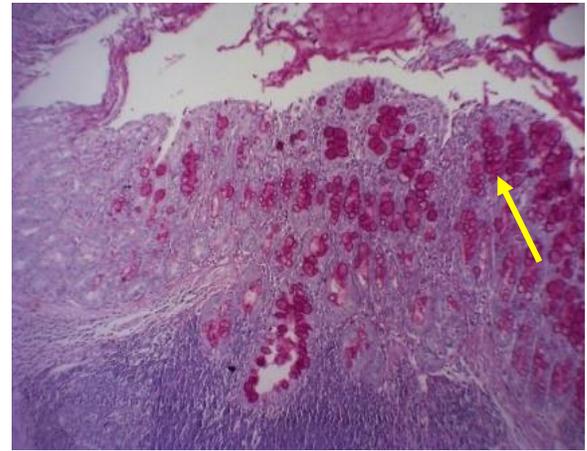
A análise histoquímica dos cortes da região distal do grupo CN apresentou acentuada produção de muco característica de normalidade com epitélio de revestimento simples colunar da camada mucosa preservado e células caliciformes presentes em grande número, distribuídas de forma uniforme e presença de criptas de Lieberkühn (Figura 18A). No grupo TNBS (Figura 18B) foi possível observar diminuição significativa do número de células caliciformes e consequente diminuição na produção de muco quando comparado ao grupo CN, característica também observada no grupo LL-FI (Figura 18C). Entretanto, no grupo LL-FI foi observada presença de um maior número de células produtoras de muco quando comparada ao grupo TNBS. No grupo LL-F (Figura 18D), a presença de células caliciformes apresentou diminuição quando comparada

ao grupo CN, mas apresentou um número maior de células produtoras de muco em relação aos grupos TNBS e LL-FI.

Figura 18: Fotomicrografias representativas de cólon da região distal do cólon dos grupos experimentais coradas em PAS, obtidas em objetiva de 10x.

A) CN

B) TNBS



C) LL-FI

D) LL-F

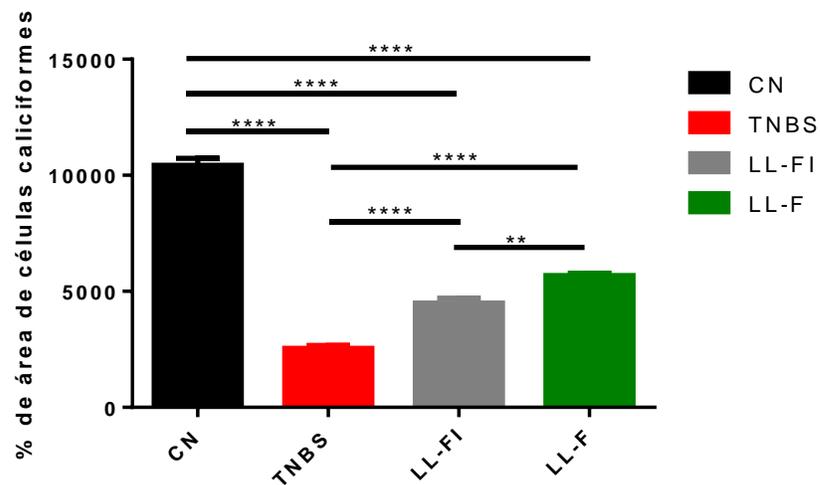


Grupos experimentais: grupo controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina (CN) (A) grupo instilado com TNBS e tratado com salina (B), grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*anti-IL-1 β*) (LL-FI) (C) e grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (LL-F) (D). Célula caliciforme (seta amarela). A, B, C e D – PAS, objetiva 10x, A.T. x100.

No colón distal, a análise histoquímica de mucinas demonstrou uma redução significativa no percentual de células produtoras de mucinas no grupo tratado com *L. lactis* FnBPA+

(pValac::*anti-IL-1 β*), porém superiores ao grupo TNBS. Níveis significativamente aumentados de células produtoras de mucinas foi observado no grupo LL-F (Figura 19).

Figura 19: Análise histoquímica de mucinas neutras da região distal do cólon



Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina; LL-FI, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1 β*); LL-F, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+. As barras representam as médias \pm EPM do percentual da área de células caliciformes produtoras de muco positivas para PAS referente a região distal do cólon dos diferentes grupos experimentais (N = 6-8 animais/grupo). A análise estatística foi realizada com o teste Anova e pós-hoc Tukey. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,0001 e **** p < 0,00001.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

As DIIs são um grupo de doenças inflamatórias que afetam o TGI, provocando inflamação crônica que resulta em dano tecidual. A DC e CU são as principais formas de DII conhecidas e amplamente estudadas em todo mundo, devido à severidade dos sintomas que acabam por prejudicar a qualidade de vida dos pacientes acometidos (AHLUWALIA et al., 2018; DE MATTOS et al., 2015; PARK et al., 2017). Sua prevalência é consideravelmente maior em países industrializados (NEURATH, 2014).

Embora a etiologia desse grupo de doenças permaneça incerto, recentes evidências tem sugerido que a patogênese das DIIs seja resultado da resposta inflamatória inapropriada aos microorganismos intestinais de um hospedeiro geneticamente suscetível, somado a fatores ambientais que atuam como promotores para a iniciação e progressão da doença (BEVIVINO; MONTELEONE, 2018; LEPPKES; NEURATH, 2020; NEURATH, 2014). O desequilíbrio da resposta imunológica na DII está associado à produção excessiva de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatórias, que regulam diversos eixos da resposta imune no organismo, podendo modular a resposta de diversas células, incluindo as imunes e não imunes devido às suas propriedades pleiotrópicas (BEVIVINO; MONTELEONE, 2018; LEPPKES et al., 2014).

O uso de modelos experimentais para DIIs são cruciais para a pesquisa básica e aplicada, pois permite ampliar o conhecimento das vias moleculares e celulares que coordenam a patogênese da DII, além de serem essenciais para o avaliar a eficácia de novas terapias (BANG; LICHTENBERGER, 2016; GADALETA; GARCIA-IRIGOYEN; MOSCHETTA, 2017; WIRTZ et al., 2017). O modelo de colite induzido por TNBS utilizado nesse trabalho permite induzir uma resposta inflamatória aguda ou crônica, a depender do desenho experimental, que resulta em achados histopatológicos e imunológicos semelhantes ao encontrado na DC humana (ANTONIOU et al., 2016; JONES-HALL; GRISHAM, 2014; NEURATH, 2017). Para promover a colite, o TBNS é diluído em etanol e posteriormente instilado por via retal, distribuindo o agente químico em todo o colón e reto do camundongo. O etanol presente na mistura é crucial para desestabilizar a camada de muco no colón, aumentando o acesso e permeabilidade do TNBS ao epitélio colônico. O TNBS atua haptinizando moléculas colônicas e bacterianas, promovendo resposta inflamatória na mucosa, caracterizada por uma infiltração densa de neutrófilos, células T e macrófagos em toda parede intestinal (JONES-HALL; GRISHAM, 2014; RANDHAWA et al.,

2014). Uma única administração do TNBS/etanol leva ao desenvolvimento de uma resposta imune excessiva mediada por células, refletida pela inflamação aguda do tipo Th1.

No presente estudo, a estratégia de utilização de repetidas administrações do TNBS com aumento de concentração foi utilizada para promover a colite crônica. Tal abordagem metodológica tem se mostrado eficaz em vários estudos para investigar a colite crônica por TNBS (WIRTZ et al., 2017). Dentro de 2 horas após a instilação com TNBS inicia-se a infiltração de células inflamatórias no tecido, e após 48 horas os sinais típicos de inflamação crônica começam a se desenvolver (CHEON et al., 2012; RANDHAWA et al., 2014). A administração intracolônica de TNBS / etanol em camundongos induz uma inflamação caracterizada por diarreia, podendo haver presença de sangue e uma drástica perda de peso corporal durante a primeira semana (ANTONIOU et al., 2016). Na colite induzida por TNBS, as citocinas, incluindo IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-1 β , são produzidas no tecido colônico após o desencadeamento do processo inflamatório (SILVA; PINTO; MATEUS, 2019). Além disso, a escolha da linhagem de camundongos BALB/c se deu devido a sua maior sensibilidade à inflamação intestinal por TNBS e sem potencial de evolução para a cura espontânea (RANDHAWA et al., 2014).

A partir da escolha do modelo experimental adequado, o presente estudo propôs avaliar o efeito terapêutico de uma linhagem recombinante com propriedades invasivas de *Lactococcus lactis*, seguramente utilizada para entrega de proteínas, para entregar um cassete de expressão eucariótica codificante de scFv anti-IL-1 β , com o objetivo de produzir os fragmentos de anticorpos neutralizantes localmente na mucosa intestinal e restringir a neutralização da citocina pró-inflamatória IL-1 β somente no sítio de inflamação, sem atingir níveis sistêmicos de ação e como consequência, minimizar os efeitos colaterais associados. Especificamente, a hipótese levantada nesse estudo foi que a neutralização local de IL-1 β pudesse promover efeitos significativos na inflamação intestinal, uma vez que até o presente momento não há nenhum tratamento baseado na inibição de IL-1 β licenciado pela FDA para o tratamento de DIIs, em especial a DC. Desta forma, propusemos inicialmente que tal falta de sucesso poderia ser devido a via de administração de tais drogas, baseadas na via parenteral, que promovem a neutralização da citocina alvo além do local da inflamação, resultando numa neutralização mais ampla e efeitos colaterais sistêmicos, incluindo imunossupressão e maior susceptibilidade a infecções.

Adicionalmente, um ponto crucial da atual proposta se baseou em produzir localmente os fragmentos de anticorpos no formato scFv, que possibilita uma melhor penetrabilidade no tecido.

Dessa forma, o presente estudo permitiu compreender como a neutralização da IL-1 β pode impactar nos achados clínicos, macroscópicos e microscópicos da colite crônica induzida por TNBS. Assim, os efeitos observados após tratamento com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-IL-1 β), no modelo TNBS usado, sugerem ação da bactéria recombinante na manutenção da integridade da mucosa, porém demonstrando possuir alguns efeitos limitantes.

As manifestações clínicas extra intestinais na DC e CU incluem a perda de peso corporal, diarreia com a presença ou não de sangue nas fezes e cólica abdominal (SILVA; PINTO; MATEUS, 2019). Semelhantemente, a inflamação intestinal induzida no modelo TNBS é caracterizada por diarreia, podendo haver presença de sangue e drástica perda de peso corporal (ANTONIOU et al., 2016; SILVA; PINTO; MATEUS, 2019). A partir dos dados macroscópicos, pudemos constatar que o modelo murino de colite induzida por TNBS utilizado no presente trabalho demonstrou semelhança com os sinais clínicos da doença observados em humanos. Todos os grupos experimentais que foram submetidos a instilações intracolônicas com TNBS apresentaram perda de peso, principalmente o grupo LL-F, em que, provavelmente, o agravamento da perda de peso se deve ao fato da utilização de *L. lactis* contendo FnBPA, que é uma invasina inflamatória (CHIABAI, 2019; VELOSO et al., 2013). Além disso, diarreia e presença de sangue nas fezes, avaliado macroscopicamente pela presença de conteúdo avermelhando nas fezes e reto durante a eutanásia foram observadas. A perda de peso corporal é uma característica clínica comum na colite TBNS e ocorre devido a dores abdominais e diarreia, que reduz a ingestão alimentar (ANTONIOU et al., 2016; SILVA; PINTO; MATEUS, 2019). Nosso resultados demonstraram que o tratamento com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-IL-1 β) reverteu significativamente a perda de peso corporal causada pela inflamação intestinal nos últimos dias (23 e 24) do protocolo experimental.

A diarreia, sintoma importante da doença tanto em animais como em seres humanos, indica perda da capacidade de absorção do cólon prejudicada na inflamação intestinal, e é decorrente do comprometimento epitelial, alteração da absorção e secreção de fluídos e eletrólitos e aumento da permeabilidade da mucosa (CHASSAING; DARFEUILLE-MICHAUD, 2011). A partir da avaliação da consistência das fezes, um dos pontos avaliados no escore de dano macroscópico, observou-se a presença de fezes características de diarreia nos grupos

experimentais com colite. Contudo, o tratamento com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-IL-1 β) promoveu melhora nesse parâmetros, com a maioria dos animais apresentando fezes em formato de pellets bem formados e consistentes.

O comprimento do cólon é considerado um marcador bem estabelecido para estimar a gravidade da colite, pois há uma tendência que cólons mais encurtados estão mais inflamados, devido a diversas modificações estruturais promovidas pela inflamação tecidual que alteram a espessura das camadas do tecido. O encurtamento do cólon é um parâmetro que reflete a progressão da DC, que leva ao espessamento da parede intestinal com fibrose, ocasionando uma tração da camada muscular e conseqüentemente o encurtamento do cólon (FOLIGNÉ et al., 2006). Estudos mostram que o TNBS causa inflamação grave, manifestada por cólons encurtados, espessados e eritematosos (JEONG et al., 2012). Nossos resultados demonstraram que os grupos que receberam TNBS apresentam cólons mais encurtados. Apesar de não ter apresentado diferença estatística significativa, o grupo experimental tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-IL-1 β) apresentou uma média de tamanho do cólon superior aos do grupo TNBS.

Um outro dado avaliado em nosso estudo foi o peso do cólon, que também é usado para avaliar a gravidade da colite e que reflete a inflamação intestinal, pois quanto maior o edema e infiltrado inflamatório maior o índice do parâmetro analisado. Contudo, apenas o grupo TNBS apresentou um aumento significativo no peso do cólon. Tal fato pode estar vinculado a variável tratamento, pois o grupo LL-FI e LL-F recebem por via oral o tratamento com bactérias recombinante. Por alguma via, essas linhagens promovem efeitos sobre eventos da inflamação, como o edema. Contudo, não é possível apontar quais vias com o conjunto de resultados obtidos.

Com o propósito de analisar o efeito do tratamento com a melhora dos sintomas da colite induzida, foi utilizado o IAD, que é um escore macroscópico que pontua consistência das fezes, presença de sangue e perda de peso. Dessa forma, quanto maior o IAD mais sintomático o animal se encontra e, conseqüentemente, maior inflamação intestinal presente. Nossos dados demonstram que o grupo LL-FI apresentou um menor IAD, estatisticamente significativo quando comparado com o grupo TNBS e LL-, indicando melhora no quadro clínico em resposta ao tratamento com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-IL-1 β). Dados macroscópicos semelhantes foram observados no estudo de Chiabai et al. (2019), em que foi observado melhoras nos parâmetros de

peso corporal, comprimento do colón e no IAD do grupo de animais com colite induzida por DSS que receberam o tratamento com as bactérias *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-TNF α).

No modelo de colite induzida por TNBS no presente estudo, o cólon proximal e distal dos animais não tratados (CN) apresentaram aspecto normal, com toda arquitetura histológica preservada. Por outro lado, o score histopatológico retratou danos histológicos observados nos animais dos grupos controle da colite (TNBS e LL-F) os quais tiveram características de inflamação induzida por TNBS em murinos, como infiltrado inflamatório, edema, diminuição das glândulas intestinais e lesões nas camadas na parede intestinal.

Os achados da região proximal do cólon apontam um efeito do tratamento com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-IL-1 β) (LL-FI) em minimizar os danos histológicos promovidos pela inflamação induzida por TNBS, dado que as análises histopatológicas apresentaram uma recuperação na arquitetura intestinal e manutenção da continuidade da barreira epitelial da mucosa. A manutenção da mucosa é necessária para que se mantenha a homeostase intestinal, qualquer alteração na função da barreira mucosa promove a exposição ao conteúdo luminal e desencadeia uma resposta imunológica (MICHIELAN; D'INCA, 2015; SANCHEZ DE MEDINA et al., 2014).

Além disso, a diminuição do infiltrado celular inflamatório na camada mucosa e submucosa no grupo LL-FI indica um efeito potencial papel imunomodulador de *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-IL-1 β) em inibir a migração de células inflamatórias para o sítio do dano, bem como regulação de mediadores inflamatórios que potencialmente participam da migração de células imunes para a mucosa inflamada. A IL-1 β é uma citocina pleiotrópica que promove diversos eventos imunes na resposta inflamatória, incluindo a indução da migração de células imunes para os sítios inflamatórios (MCENTEE; FINLAY; LAVELLE, 2019), por promover a síntese de quimiocinas que irão promover a migração e infiltração celular (ANDOH, 2002). Dessa forma, devido a inibição dessa citocina pelos fragmentos de anticorpos scFv anti-IL-1 β produzidos localmente na mucosa inflamada, a redução da infiltração de células imunes era esperada, apontando para efetividade do tratamento. Um estudo anterior demonstrou que a administração de *L. lactis* FnBPA+ (pValac:anti-TNF α), isto é, carreando um vetor pValac codificante para um fragmento svFv anti-TNF- α , no modelo de colite induzida por DSS foi capaz de diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-17A e

TGF- β), reduzindo assim, a inflamação intestinal e os danos resultantes ao epitélio intestinal (CHIABAI et al., 2019).

Na região distal do colón foi observado que os grupos TNBS e LL-F apresentaram achados histológicos semelhantes com os encontrados na região proximal. Curiosamente, a administração de *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1 β*) não foi capaz de causar uma melhora no dano histológico nessa região, com achados semelhantes ao observado no grupo TNBS e LL-F. Dessa forma, a partir dos achados histopatológicos e escore de dano histológico, observa-se que o tratamento com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1 β*) é mais eficaz na região proximal. Tal observação pode estar vinculada a possibilidade de maior interação de *L. lactis* com a camada de células da mucosa devido a camada de muco mais delgada com predomínio no colón ascendente (proximal) (AMIDON; BROWN; DAVE, 2015), pois os efeitos anti-inflamatórios de *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1 β*) dependem da sua internalização pelas células epiteliais ou fagocíticas e posterior expressão do plasmídeo terapêutico. Logo, pode-se propor que quanto mais espesso for a camada de muco, menor o potencial de interação e internalização de *L. lactis*.

A produção de mucinas por células caliciformes são cruciais para a formação das camadas interna e externa de muco que atuam como uma barreira física e química contra microrganismos, bem como impede o contato com desses com células epiteliais e intestinais e posterior ativação de resposta inflamatória (CORFIELD, 2018; CORNICK; TAWIAH; CHADEE, 2015; GRONDIN et al., 2020). Nossos dados demonstraram que a produção de mucinas neutras por células caliciformes no cólon proximal foi reduzida no grupo tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1 β*), tendo sido inferior ao grupo TNBS, no qual não recebeu qualquer tratamento (variável), apenas solução salina. Além disso, o número de células produzindo mucinas foi superior no grupo LL-F quando comparado com o grupo que recebeu a *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1 β*). No colón distal, o percentual de células produtoras de mucinas no grupo tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1 β*) foi significativamente inferior ao grupo LL-F, nosso segundo grupo controle da colite, dado que os animais recebem um linhagem bacteriana recombinante expressando a invasina FnBPA com potencial pró inflamatório. Tomando como base tais resultados, é possível sugerir um mecanismo colateral hipotético dependente da neutralização de IL-1 β pelos fragmentos de anticorpos produzidos localmente sobre a produção de mucinas por células caliciformes, indicando um potencial papel de IL-1 β

como regulador chave na expressão de genes de mucinas ou no processamento pós-traducional dessas glicoproteínas.

A regulação de mucinas por citocinas é um mecanismo já compreendido em outros contextos biológicos (CORNICK; TAWIAH; CHADEE, 2015). Como já mencionado, MUC2 é uma das principais mucinas formadoras de gel no intestino e produzidas por células caliciformes (CORNICK; TAWIAH; CHADEE, 2015). Além disso, expressão de MUC5AC, também formadora de gel, demonstrou ser importante em proteger a barreira do cólon na colite experimental (OLLI et al., 2020). Dessa forma, um conjunto de evidências anteriores obtidas em modelos *in vitro* e *in vivo* demonstram que IL-1 β exerce efeitos regulatórios sobre mucinas por induzir a expressão gênica e regular positivamente a síntese de mucinas formadoras de gel (ENSS et al., 2000; FUJISAWA et al., 2009; KIM et al., 2000, 2002; RAJA et al., 2012; WU et al., 2017). Assim, podemos sugerir que a neutralização de IL-1 β em resposta ao tratamento com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1 β*) tenha promovido efeitos regulatórios negativos, reduzindo a síntese de mucinas que compõem a camada muco que protege o epitélio intestinal na porção do cólon proximal.

Por fim, é crucial ressaltar que a administração da *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1 β*) mesmo não sendo capaz de reverter completamente a colite, foi fundamental para a recuperação dos animais, tendo em vista que a expressão local dos fragmentos de anticorpos anti-IL- β promoveram mudanças na resposta imune, promovendo uma miríade de efeitos que precisam ainda ser investigados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo avaliou os efeitos anti-inflamatórios da linhagem bacteriana recombinante *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1 β*) na colite induzida por TNBS, um modelo experimental que mimetiza os achados da doença de Crohn humana, fornecendo evidências macroscópicas e histológicas sobre o efeito da terapia proposta.

A abordagem terapêutica explorada neste trabalho apresenta um conjunto de potencialidades que as torna promissora, incluindo a produção de fragmentos de anticorpos no local da inflamação, reduzindo os efeitos adversos observados na terapia biológica atual. Contudo, como mostrado, há alguns efeitos indesejados que são gerados a partir da inibição da citocina IL-1 β , como a redução de células produtoras de mucinas, tornando mais claro a propriedade pleiotrópica da IL-1 β na patogênese da inflamação intestinal.

Além disso, os resultados do presente trabalho não são suficientes para direcionar ou não a eficácia de *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-IL-1 β*) como um potencial tratamento para DC, tornando crucial a continuação dos estudos com essa linhagem recombinante no modelo TNBS, a fim de entender as vias moleculares que estão associadas as repostas observadas em nossos resultados.

E finalmente, a abordagem aqui explorada é promissora e complexa, merecendo uma elucidação mais ampla de diversos eixos fisiopatológicos vinculados à doença. Assim, como perspectivas e direções emergentes, a mensuração de citocinas, avaliação da expressão de genes relacionados a função da barreira, como junções celulares, mucinas e peptídeos antimicrobianos e avaliação da permeabilidade intestinal tornam-se parâmetros importantes para esclarecer lacunas que vão além do escopo da presente pesquisa.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, C.; CHO, J. H. Inflammatory Bowel Disease. **Bmj**, p. 2066–2078, 2009.
- AHLUWALIA, B. et al. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 0, n. 0, p. 379–389, 2018.
- AHLUWALIA, B.; MAGNUSSON, M. K.; ÖHMAN, L. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract : maintaining balance between the good and the bad. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2017.
- AHMAD, Z. A. et al. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, n. 2, p. 1–15, 2012.
- AL-SADI, R. M. et al. IL-1 β Causes an Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 4641–4649, 2007.
- ALMEIDA, J. F. et al. Expression of fibronectin binding protein A (FnBPA) from *Staphylococcus aureus* at the cell surface of *Lactococcus lactis* improves its immunomodulatory properties when used as protein delivery vector. **Vaccine**, v. 34, n. 10, p. 1312–1318, mar. 2016.
- AMIDON, S.; BROWN, J. E.; DAVE, V. S. Colon-Targeted Oral Drug Delivery Systems: Design Trends and Approaches. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 4, p. 731–741, 2015.
- ANDERSON, C. A. et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. **Nature Genetics**, v. 43, n. 3, p. 246–252, 2011.
- ANDOH, A. Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α Induce Chemokine and Matrix Metalloproteinase Gene Expression in Human Colonic Subepithelial Myofibroblasts. n. II, 2002.
- ANTONIOU, E. et al. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 11, p. 9–15, 2016.
- ARIJS, I. et al. Mucosal gene expression of antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease before and after first infliximab treatment. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, 2009.
- AZIZPOUR, M. et al. *Lactococcus lactis*: A new strategy for vaccination. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 163–168, 2017.
- BANG, B.; LICHTENBERGER, L. M. **Methods of inducing inflammatory bowel disease in mice**. [s.l.: s.n.]. v. 2016
- BARRETT, J. C. et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. **Nature Genetics**, v. 41, n. 12, p. 1330–1334,

2009.

BENNIKE, T. B. et al. Neutrophil extracellular traps in ulcerative colitis: A proteome analysis of intestinal biopsies. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 21, n. 9, p. 2052–2067, 2015.

BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G. et al. Current Prophylactic and Therapeutic Uses of a Recombinant *Lactococcus lactis* Strain Secreting Biologically Active Interleukin-12. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 1–3, p. 80–89, 2008.

BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G. et al. Engineering lactococci and lactobacilli for human health. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 278–283, 2013.

BEVIVINO, G.; MONTELEONE, G. Advances in understanding the role of cytokines in inflammatory bowel disease. **Expert Review of Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 9, p. 907–915, 2018.

BRYANT, R. V; BRAIN, O.; TRAVIS, S. P. L. Conventional drug therapy for inflammatory bowel disease. n. September 2014, p. 90–112, 2015.

CAPALDO, C. T.; POWELL, D. N.; KALMAN, D. Layered defense: how mucus and tight junctions seal the intestinal barrier. **Journal of Molecular Medicine**, v. 95, n. 9, p. 927–934, 2017.

CARTER, J. D.; VALERIANO, J.; VASEY, F. B. Crohn disease worsened by anakinra administration [1]. **Journal of Clinical Rheumatology**, v. 9, n. 4, p. 276–277, 2003.

CARVALHO, R. D. D. O. et al. Use of wild type or recombinant lactic acid bacteria as an alternative treatment for gastrointestinal inflammatory diseases: A focus on inflammatory bowel diseases and mucositis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 1–13, 2017a.

CARVALHO, R. D. D. O. et al. Use of wild type or recombinant lactic acid bacteria as an alternative treatment for gastrointestinal inflammatory diseases: A focus on inflammatory bowel diseases and mucositis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 1–13, 2017b.

CHASSAING, B. et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Current Protocols in Immunology**, n. SUPPL.104, p. 1–14, 2014.

CHEON, G. J. et al. Mechanisms of Motility Change on Trinitrobenzenesulfonic Acid- Induced Colonic Inflammation in Mice. v. 16, p. 437–446, 2012.

CHIABAI, M. J. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES, PRODUZIDOS POR MEIO DE UM SISTEMA DE ENTREGA DE DNA TENDO A BACTÉRIA *Lactococcus lactis* COMO VEÍCULO, NO TRATAMENTO DA

- COLITE EXPERIMENTAL. p. 1–177, 2019.
- CHIABAI, M. J. et al. Mucosal delivery of *Lactococcus lactis* carrying an anti-TNF scFv expression vector ameliorates experimental colitis in mice. **BMC Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 38, 25 dez. 2019.
- CHO, J. H. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 6, p. 458–466, 2008.
- CLARK, J. D.; FLANAGAN, M. E.; TELLIEZ, J. Discovery and Development of Janus Kinase (JAK) Inhibitors for Inflammatory Diseases. n. Figure 2, 2014.
- CORFIELD, A. P. The Interaction of the Gut Microbiota with the Mucus Barrier in Health and Disease in Human. **Microorganisms**, v. 6, n. 3, p. 78, 2018.
- CORNICK, S.; TAWIAH, A.; CHADEE, K. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. **Tissue Barriers**, v. 3, n. 1, p. 1–2, 2015.
- CORRIDONI, D.; ARSENEAU, K. O.; COMINELLI, F. Inflammatory bowel disease. **Immunology Letters**, p. 1–5, 2014.
- DANIEL, C. et al. Recombinant lactic acid bacteria as mucosal biotherapeutic agents. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 499–508, 2011.
- DE AZEVEDO, M. et al. Local and Systemic Immune Mechanisms Underlying the Anti-Colitis Effects of the Dairy Bacterium *Lactobacillus delbrueckii*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85923, 2014.
- DE AZEVEDO, M. et al. Recombinant invasive *Lactococcus lactis* can transfer DNA vaccines either directly to dendritic cells or across an epithelial cell monolayer. **Vaccine**, v. 33, n. 38, p. 4807–4812, set. 2015.
- DE LANGE, K. M.; BARRETT, J. C. Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics. **Journal of Autoimmunity**, v. 64, p. 91–100, 2015.
- DE MATTOS, B. R. R. et al. Inflammatory bowel disease: An overview of immune mechanisms and biological treatments. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.
- DE MORENO DE LEBLANC, A. et al. Evaluation of the biosafety of recombinant lactic acid bacteria designed to prevent and treat colitis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 1038–1046, 1 set. 2016.
- DEL CARMEN, S. et al. Protective effects of lactococci strains delivering either IL-10 protein or cDNA in a TNBS-induced chronic colitis model. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 48, n. December, p. S12–S17, 2014.

- DINALLO, V. et al. Neutrophil extracellular traps sustain inflammatory signals in ulcerative colitis. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 13, n. 6, p. 772–784, 27 maio 2019.
- DINARELLO, C. A.; VAN DER MEER, J. W. M. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 6, p. 469–484, 2013.
- DUCLOS, B. Mucosal Inflammatory Cytokine Production by Intestinal Biopsies in Patients with Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. **Journal of Clinical Immunology**, v. 16, n. 3, p. 1–3, 1996.
- ENSS, M. L. et al. Proinflammatory cytokines trigger MUC gene expression and mucin release in the intestinal cancer cell line LS180. **Inflammation Research**, v. 49, n. 4, p. 162–169, 2000.
- FEUERSTEIN, J. D.; CHEIFETZ, A. S. Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 92, n. 7, p. 1088–1103, 2017.
- FOLIGNÉ, B. et al. Recommendations for improved use of the murine TNBS-induced colitis model in evaluating anti-inflammatory properties of lactic acid bacteria: Technical and microbiological aspects. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 51, n. 2, p. 390–400, 2006.
- FUJISAWA, T. et al. Regulation of Airway MUC5AC Expression by IL-1 β and IL-17A; the NF- κ B Paradigm. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 10, p. 6236–6243, 15 nov. 2009.
- GADALETA, R. M.; GARCIA-IRIGOYEN, O.; MOSCHETTA, A. Exploration of Inflammatory Bowel Disease in Mice: Chemically Induced Murine Models of Inflammatory Bowel Disease (IBD). **Current protocols in mouse biology**, v. 7, n. 1, p. 13–28, 2017.
- GASPARINI, R. G.; SASSAKI, L. Y.; SAAD-HOSSNE, R. Inflammatory bowel disease epidemiology in São Paulo State, Brazil. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 11, p. 423–429, 2018.
- GRONDIN, J. A. et al. Mucins in Intestinal Mucosal Defense and Inflammation: Learning From Clinical and Experimental Studies. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. September, p. 1–19, 2020.
- GUIMARÃES, V. et al. A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. **Genetic Vaccines and Therapy**, v. 7, p. 1–7, 2009.
- GUIMARÃES, V. D. et al. Internalin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 5–6, p. 836–844, 2005.
- HANNIFFY, S. et al. Potential and opportunities for use of recombinant lactic acid bacteria in

- human health. **Advances in Applied Microbiology**, v. 56, n. February 2019, p. 1–64, 2004.
- HANSSON, G. C. Role of mucus layers in gut infection and inflammation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 57–62, 2012.
- HE, Z. et al. Phosphatidylserine exposure and neutrophil extracellular traps enhance procoagulant activity in patients with inflammatory bowel disease. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 115, n. 04, p. 738–751, 29 nov. 2016.
- HÜGLE, B.; SPETH, F.; HAAS, J. P. Inflammatory bowel disease following anti-interleukin-1-treatment in systemic juvenile idiopathic arthritis. **Pediatric Rheumatology**, v. 15, n. 1, p. 1–5, 2017.
- HUGOT, J. P. CARD15/NOD2 mutations in Crohn's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1072, p. 9–18, 2006.
- IMPELLIZZERI, D. et al. Therapeutic potential of dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS) - induced colitis in mice by targeting IL-1 β and IL-18. **Biochemical Pharmacology**, v. 155, n. May, p. 150–161, 2018.
- INNOCENTIN, S. et al. Lactococcus lactis expressing either Staphylococcus aureus fibronectin-binding protein A or Listeria monocytogenes internalin A can efficiently internalize and deliver DNA in human epithelial cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 14, p. 4870–4878, 2009.
- JÄGER, S.; STANGE, E. F.; WEHKAMP, J. Inflammatory bowel disease: An impaired barrier disease. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 398, n. 1, p. 1–12, 2013.
- JOHANSSON, M. E. V.; SJÖVALL, H.; HANSSON, G. C. The gastrointestinal mucus system in health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 6, p. 352–361, 2013.
- JONES-HALL, Y. L.; GRISHAM, M. B. Immunopathological characterization of selected mouse models of inflammatory bowel disease: Comparison to human disease. **Pathophysiology**, v. 21, n. 4, p. 267–288, 2014.
- JONES, G. et al. Dynamics of Colon Monocyte and Macrophage Activation During Colitis. v. 9, n. November, 2018.
- KEIZER, R. J. et al. Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 49, n. 8, p. 493–507, 2010.
- KIM, D. H.; CHEON, J. H. Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advances

- in Biologic Therapies. **Immune Network**, v. 17, n. 1, p. 25, 2017.
- KIM, J. J.; KHAN, W. I. Goblet cells and mucins: Role in innate defense in enteric infections. **Pathogens**, v. 2, n. 1, p. 55–70, 2013.
- KIM, Y. D. et al. Regulation of IL-1 β -mediated MUC2 gene in NCI-H292 human airway epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 274, n. 1, p. 112–116, 2000.
- KIM, Y. D. et al. Interleukin-1 β induces MUC2 and MUC5AC synthesis through cyclooxygenase-2 in NCI-H292 cells. **Molecular Pharmacology**, v. 62, n. 5, p. 1112–1118, 2002.
- KLAG, T.; STANGE, E. F.; WEHKAMP, J. Defective antibacterial barrier in inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases**, v. 31, n. 3–4, p. 310–316, 2013.
- KWON, K. H. et al. Interleukin-1 β targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, p. 647–654, 2005.
- LANDY, J. et al. Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 11, p. 3117–3126, 2016.
- LARSSON, J. M. H. et al. Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 11, p. 2299–2307, 2011.
- LEBLANC, J. G. et al. Use of superoxide dismutase and catalase producing lactic acid bacteria in TNBS induced Crohn's disease in mice. **Journal of Biotechnology**, v. 151, n. 3, p. 287–293, 2011.
- LEE, H. S.; PARK, S.; PARK, D. IL. Novel treatments for inflammatory bowel disease. p. 20–27, 2018.
- LEE, S. H. Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. **Intestinal Research**, v. 13, n. 1, p. 11, 2015.
- LENTI, M. V.; DI SABATINO, A. Intestinal fibrosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 65, n. October 2018, p. 100–109, 2018.
- LEPPKES, M. et al. Pleiotropic functions of TNF- α in the regulation of the intestinal epithelial response to inflammation. **International Immunology**, v. 26, n. 9, p. 509–515, 2014.

- LEPPKES, M.; NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel diseases – Update 2020. **Pharmacological Research**, v. 158, n. March, p. 104835, 2020.
- LEVIT, R. et al. Evaluation of the effect of soymilk fermented by a riboflavin-producing *Lactobacillus plantarum* strain in a murine model of colitis. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 2017.
- LI, T. et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Intestinal Damage and Thrombotic Tendency in Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 14, n. 2, p. 240–253, 10 fev. 2020.
- LICHTENSTEIN, L. et al. Infliximab-Related Infusion Reactions : Systematic Review. p. 806–815, 2015.
- LIN, E. Y. H. et al. Neutrophil extracellular traps impair intestinal barrier function during experimental colitis. **Biomedicines**, v. 8, n. 8, p. 275, 5 ago. 2020.
- LIU, S. et al. Recombinant *Lactococcus lactis* expressing porcine insulin-like growth factor I ameliorates DSS-induced colitis in mice. **BMC Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 25, 1 dez. 2016.
- MAHIDA, Y. R.; JEWELL, D. P. Enhanced production of interleukin 1- by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn ' s disease. **Gut**, v. 30, p. 835–838, 1989.
- MARTINI, E. et al. Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease. **Cmgh**, v. 4, n. 1, p. 33–46, 2017.
- MCALINDON, M. E.; HAWKEY, C. J.; MAHIDA, Y. R. Expression of interleukin 1 and interleukin 1 converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 42, p. 214–219, 1998.
- MCCOLE, D. F. **IBD candidate genes and intestinal barrier regulation**. [s.l: s.n.]. v. 20
- MCENTEE, C. P.; FINLAY, C. M.; LAVELLE, E. C. Divergent roles for the IL-1 family in gastrointestinal homeostasis and inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JUN, p. 1–23, 2019.
- MIYOSHI, A. et al. Anti-inflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. **Gut Pathogens**, v. 6, n. 1, p. 33, 2014.
- MOTTA, J.-P. et al. Food-Grade Bacteria Expressing Elafin Protect Against Inflammation and Restore Colon Homeostasis. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 158, p. 158ra144-158ra144, 31 out. 2012.

- NEGRONI, A. et al. NOD2 and inflammation: current insights. p. 49–60, 2018.
- NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 329–342, 22 maio 2014.
- NEURATH, M. F. Current and emerging therapeutic targets for IBD. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 5, p. 269–278, 2017.
- NG, S. C. et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **The Lancet**, v. 390, n. 10114, p. 2769–2778, 2017.
- NIELSEN, O. H. et al. Diagnosis and management of fistulizing Crohn’s disease. **Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology**, v. 6, n. 2, p. 92–106, 2009.
- NITZAN, O. et al. 2016 Inflammatory Bowel Disease : Global view Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease. v. 22, n. 3, p. 1078–1087, 2016.
- NORÉN, E.; ALMER, S.; SÖDERMAN, J. Genetic variation and expression levels of tight junction genes identifies association between MAGI3 and inflammatory bowel disease. **BMC Gastroenterology**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2017.
- OLLI, K. E. et al. Muc5ac Expression Protects the Colonic Barrier in Experimental Colitis. **Inflammatory bowel diseases**, v. 26, n. 9, p. 1353–1367, 2020.
- OMAR, A. et al. Conventional therapy for moderate to severe inflammatory bowel disease : A systematic literature review. v. 25, n. 9, p. 1142–1157, 2019.
- PADUA, D. et al. The Role of Neuropeptides in Mouse Models of Colitis. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 59, n. 2, p. 203–210, 8 jun. 2016.
- PARK, J. H. et al. IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules. **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 4, p. 416–426, 2017.
- PESSIONE, E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. June, p. 1–15, 2012.
- PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 141–153, 2014.
- PIOVANI, D. et al. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. **Gastroenterology**, v. 157, n. 3, p. 647- 659.e4, 2019.
- PONTES, D. et al. Production of Fibronectin Binding Protein A at the Surface of Lactococcus lactis Increases Plasmid Transfer In Vitro and In Vivo. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–6, 2012.

- PONTES, D. S. et al. Lactococcus lactis as a live vector: Heterologous protein production and DNA delivery systems. **Protein Expression and Purification**, v. 79, n. 2, p. 165–175, 2011.
- QUE, Y. A. et al. Reassessing the role of Staphylococcus aureus clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in Lactococcus lactis. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 10, p. 6296–6302, 2001.
- RAJA, S. B. et al. Differential expression of gastric MUC5AC in colonic epithelial cells: TFF3-wired IL1 β /Akt crosstalk-induced mucosal immune response against Shigella dysenteriae infection. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 3, p. 703–713, 2012.
- RAMOS, G. P.; PAPADAKIS, K. A. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 94, n. 1, p. 155–165, 2019.
- RANDHAWA, P. K. et al. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 18, n. 4, p. 279–288, 2014.
- ROHR, M. et al. Inflammatory Diseases of the Gut. v. 21, n. 2, p. 1–14, 2018.
- SCHOEN, C. et al. Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, n. 5, p. 319–335, 2004.
- SCHREINER, P.; NEURATH, F.; NG, S. C. Mechanism-Based Treatment Strategies for IBD : Cytokines , Cell Adhesion Molecules , JAK Inhibitors , Gut Flora , and More. p. 79–96, 2019.
- SCHULZKE, J. D. et al. Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1165, p. 294–300, 2009.
- SEUNG HOON LEE, JEONG EUN KWON, AND M.-L. the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. **Internation Journal of Inflammatory Bowel Disease**, v. 2, n. 3, p. 14–16, 2016.
- SHANAHAN, F.; KARP, L. C. **Inflammatory Bowel Disease**. [s.l: s.n.].
- SHENG, Y. H. et al. Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 27, n. 1, p. 28–38, 2012.
- SHOUVAL, D. S. et al. Interleukin 1 Beta Mediates Intestinal Inflammation in Mice and Patients with IL10 Receptor Deficiency. **Gastroenterology**, v. 151, n. 6, p. 1100–1104, 2016.
- SILVA; PINTO; MATEUS. Preclinical Study in Vivo for New Pharmacological Approaches in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review of Chronic Model of TNBS-Induced Colitis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 10, p. 1574, 2019.
- SOUZA, B. M. et al. Lactococcus lactis carrying the pValac eukaryotic expression vector coding

- for IL-4 reduces chemically-induced intestinal inflammation by increasing the levels of IL-10-producing regulatory cells. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–18, 2016.
- SOUZA, H. S. P. DE; FIOCCHI, C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. 1, p. 13–27, 2015.
- STEFFEN, H. R. M. et al. Enhanced secretion of tumour necrosis factor- α , IL-6, and 1β by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 94, p. 174–181, 1993.
- TAGHINEZHAD-S, S. et al. Protection against human papillomavirus type 16-induced tumors in C57BL/6 mice by mucosal vaccination with *Lactococcus lactis* NZ9000 expressing E6 oncoprotein. **Microbial Pathogenesis**, v. 126, n. 10, p. 149–156, jan. 2019.
- VAN DER SLUIS, M. et al. Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. **Gastroenterology**, v. 131, n. 1, p. 117–129, 2006.
- VANDENBROUCKE, K. et al. Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis. **Mucosal Immunology**, v. 3, n. 1, p. 49–56, 30 jan. 2010.
- VELOSO, T. R. et al. Use of a human-like low-grade bacteremia model of experimental endocarditis to study the role of staphylococcus aureus adhesins and platelet aggregation in early endocarditis. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 3, p. 697–703, 2013.
- VIANA, G. C. S. Avaliação dos efeitos terapêuticos de *Lactococcus lactis* carreadora do vetor de expressão eucariótica que codifica para scFv anti-TNF em modelo de colite induzida por TNBS. p. 77, 2020.
- WALLACE, K. L. et al. Immunopathology of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 1, p. 6–21, 2014.
- WANG, M. et al. Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles: a realistic therapeutic option. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5691–5701, 7 jul. 2016.
- WEBER, C. R. et al. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. **Laboratory Investigation**, v. 88, n. 10, p. 1110–1120, 2008.
- WEHKAMP, J. et al. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Inflammatory bowel diseases**, v. 9, n. 4, p. 215–223, 2003.
- WHELAN, K. Probiotics and prebiotics in the management of irritable bowel syndrome.

- Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 14, n. 6, p. 581–587, nov. 2011.
- WIRTZ, S. et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. **Nature Protocols**, v. 12, n. 7, p. 1295–1309, 2017.
- WU, S. et al. IL-1 β upregulates Muc5ac expression via NF- κ B-induced HIF-1 α in asthma. **Immunology Letters**, v. 192, n. July, p. 20–26, 2017.
- XENAKI, K. T.; OLIVEIRA, S.; VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, P. M. P. Antibody or antibody fragments: Implications for molecular imaging and targeted therapy of solid tumors. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. OCT, 2017.
- YADAV, V. et al. Inflammatory bowel disease: exploring gut pathophysiology for novel therapeutic targets. **Translational Research**, v. 176, p. 38–68, out. 2016.
- YOSHIDA, H. et al. Interleukin-1 α Mediates the Extra-Intestinal Thrombosis Associated with Experimental Colitis. **The American Journal of Pathology**, v. 177, n. 6, p. 2774–2781, 2010.
- ZAEEM CADER, M.; KASER, A. Recent advances in inflammatory bowel disease: Mucosal immune cells in intestinal inflammation. **Gut**, v. 62, n. 11, p. 1653–1664, 2013.
- ZEISSIG, S. et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. **Gut**, v. 56, n. 1, p. 61–72, 2007.
- ZURITA-TURK, M. et al. Lactococcus lactis carrying the pValac DNA expression vector coding for IL-10 reduces inflammation in a murine model of experimental colitis. **BMC Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 73, 2014.