

GIOVANA CRISTINA SANTANA VIANA

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

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

João Pessoa – PB
2020

GIOVANA CRISTINA SANTANA VIANA

**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**

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

Giovana Cristina Santana Viana

Dissertação de Mestrado avaliada em ____/ ____/ ____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Daniela Santos Pontes
CCBSA/ UEPB
Examinadora Externo

Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos
DBCM/ Cbiotec/UFPB
Examinador Interno

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

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

V614a Viana, Giovana Cristina Santana.

Avaliação dos efeitos terapêuticos de *Lactococcus lactis* carreadora do vetor de expressão eucariótica que codifica para scFv anti-TNF α em modelo de colite induzida por TNBS / Giovana Cristina Santana Viana. - João Pessoa, 2020.
74 f. : il.

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

1. Doenças gastrointestinais. 2. Doença de Crohn - Tratamento. 3. Anticorpos monoclonais - Anti-TNF α . 4. Intestinos - Doenças. 5. Colite. 6. *Lactococcus lactis*. I. Almeida, Juliana Franco. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.34(043)

*A Nosso Senhor Jesus Cristo
E à Virgem Santíssima, auxílio dos cristãos.*

“Até aqui nos ajudou o Senhor” (I Sm 7,12)

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Uno e Trino, por conceder o dom da vida, força e capacidade intelectual sem a qual me teria sido impossível a execução deste trabalho.

À Universidade Federal da Paraíba, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular e a todos professores que ao longo desses anos compartilharam comigo seus conhecimentos e contribuíram na minha formação.

À Prof^a. Dr^a. Juliana Franco Almeida, minha orientadora, pela oportunidade, confiança, paciência, competência e auxílio em todas as etapas de realização deste trabalho, como também por todas as correções e sugestões. Muito obrigada pelo carinho e por todos os ensinamentos que levarei para a vida.

À Prof^a. Dr^a. Giciane Vieira e aos técnicos de laboratório, Nemilzia e Aulus, pela colaboração nas análises histológicas.

Ao Prof. Dr. Marcelo Brígido pela colaboração para a realização desta pesquisa na produção das bactérias recombinantes.

Aos membros da banca examinadora a Prof^a. Dr^a. Daniela Santos Pontes e o Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos pela disponibilidade e cuidadosa avaliação deste trabalho.

Aos meus amigos de bancada, Anderson Santos que foi essencial para a realização desta pesquisa, agradeço demais pela parceria em todos os momentos e pela amizade construída; e a Aline França e Laisa Macedo, que foram fundamentais no início deste trabalho.

Ao Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA) na pessoa do Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga, por todo suporte oferecido para realização do trabalho.

Aos meus amigos queridos do LACONCHA, Anderson, Patrícia, Mickael, Micaelle, Camila, Danilo, Ivynna, Roxane, Sara e Clênia, com vocês todos os percalços ficavam mais alegres e leves.

Às minhas amigas queridas, Thamires, Ithamara, Thais, Raquel e Maria Izabel, pela compreensão nos momentos de ausência e acima de tudo pelo apoio, encorajamento e oração depositados a mim.

À minha família, em especial, Andréia Cristina e Antônio Geovane, meus amados pais, e Arthur e Gabriella, meus irmãos, por tudo que fizeram e fazem por mim, pelo amor, pelo apoio que sempre me dedicaram e por nunca cessarem esforços em favor da minha felicidade e dos meus sonhos.

Ao meu noivo, Ângelo, pelo apoio sem fim na busca dos meus sonhos, paciência nos momentos de ausência, força nos momentos de fraqueza e amor

À CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma marcaram, contribuíram e, assim, são também, merecidamente, participantes neste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

A doença de Crohn (DC) pertence ao grupo das Doenças inflamatórias intestinais (DIIs), e é caracterizada por ser uma inflamação intestinal crônica que leva à destruição grave da mucosa, não curável por tratamento clínico ou cirúrgico e que pode acometer todo trato gastrointestinal. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que desencadeia a inflamação intestinal em indivíduos com DC, sendo considerado como o melhor alvo terapêutico. Entretanto, a via de administração intravenosa de imunoterapias convencionais causa imunogenicidade e efeitos colaterais sistêmicos. Para contornar estas limitações, a entrega local destes medicamentos poderia beneficiar os pacientes, restringindo a terapia no sítio inflamatório. O desenvolvimento de linhagens de *Lactococcus lactis* capazes de fornecer um vetor de expressão eucariótico que codifique um fragmento variável de cadeia única (scFv) de anticorpo representa uma nova estratégia para a elaboração de uma terapia alternativa mais efetiva, capaz de garantir uma expressão do anticorpo diretamente na mucosa intestinal, contra a DC. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos terapêuticos dos fragmentos de anticorpos scFv *anti-TNF- α* produzidos localmente na mucosa intestinal utilizando *L. lactis* como veículo para a entrega de vetores, em modelo de doença de Crohn experimental induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Assim, foi analisado o efeito da produção desses anticorpos diretamente sobre a mucosa intestinal. Foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas, com indução da colite experimental por TNBS por quatro semanas. A cultura de *L. lactis* foi administrada oralmente nos 5 últimos dias de protocolo. No dia seguinte ao último dia de tratamento, os animais foram eutanasiados e os parâmetros macroscópicos e histopatológicos avaliados. Observou-se uma melhora no grupo tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-TNF α) nos parâmetros macroscópicos da doença em relação aos grupos não tratados com a bactéria recombinante. Na análise histológica, o efeito benéfico do tratamento foi melhor observado na região proximal com redução do infiltrado inflamatório e manutenção da camada da mucosa. Com esses resultados, foi mostrado que o tratamento com pValac::anti-TNF α reduziu a inflamação em um modelo de colite experimental com TNBS, sendo que mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos moleculares responsáveis por este efeito e assim, demonstrar a eficácia desta nova estratégia baseada na entrega de DNA.

Palavras-chave: *Lactococcus lactis*. Entrega na mucosa. Anti-TNF α . Colite. TNBS.

ABSTRACT

Crohn's disease (CD) belongs to the group of infectious intestinal diseases (IBD), and is characterized by an intestinal infection caused by severe infections of the mucosa, which cannot be cured by clinical or surgical treatment and which can affect the entire gastrointestinal tract. TNF- α plays a fundamental role in the disease, being considered the best therapeutic target. However, an intravenous route of immunotherapies causes immunogenicity and systemic effects. To circumvent these restrictions, local delivery of these drugs could benefit patients, restrict therapy to the inflammatory site. The development of *Lactococcus lactis* cephas is capable of providing a eukaryotic expression vector that encodes a single chain variable fragment (scFv) of antibody represents a new strategy for the analysis of a more effective alternative therapy for isolated expression in the intestine, against CD. In this way, the objective of this work was to evaluate the therapeutic effects of fragments of scFv use anti-TNF- α used locally in the intestinal mucosa using *L. lactis* as a vehicle for delivery of vectors in the intestinal mucosa, in the experimental Crohn's disease model induced by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS). Thus, the effect of producing these filters directly on the intestinal mucosa was analyzed. Female BALB c mice were used, with experimental colitis induction by TNBS for four weeks. The *L. lactis* culture was administered orally in the last 5 days of the protocol. No day after the last day of treatment, the animals were sacrificed and with different temperature variations. He observed an improvement in the group treated with *L. lactis* FnBPA + (pValac :: anti-TNF α) in the macroscopic parameters of the disease in relation to the unused groups. In the histological analysis, the beneficial effect of the treatment was better observed in the proximal region, with reduction of the inflammatory infiltrate and maintenance of the mucous layer. With these results, we conclude the treatment with pValac :: anti-TNF α has a mitigating effect on the experimental collection model, and the most recent studies are adequate to elucidate the molecular mechanisms used by the effect and, thus demonstrating a strategy based on in delivering DNA.

Keywords: *Lactococcus lactis*. Mucosal delivery. Anti-TNF α . Colitis. TNBS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BL- Bactéria Láctica

CU – Colite Ulcerativa

DC – Doença de Crohn

DII – Doença Inflamatória Intestinal

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

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

HACA- *Human Anti-Chimeric Antibodies* (Anticorpos humanos anti-químicos)

IBD – *Inflammatory Bowel Disease*

IgA – Imunoglobulina A

mAbs - *Monoclonal Antibodies* (Anticorpos monoclonais)

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

MLCK – *Myosin Light Chain Kinase* (Cadeia Leve de Miosina Quinase)

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

pCMV – Promotor do Citomegalovírus

pValac – Plasmídeo –*Vaccination Using Lactic Acid Bacteria*

scFv- *single chain Fv* (Fragmento Variável de Cadeia Única)

TGI – Trato Gastrointestinal

TJ – *Tight Junctions*

TNBS- Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno Sulfônico

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor alpha* (Fator de Necrose Tumoral Alfa)

UFC – Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da transferência de um plasmídeo vacinal de uma bactéria invasiva atenuada para uma célula eucariótica.	34
Figura 2: Estrutura do plasmídeo pValac.	35
Figura 3: Cronograma da indução com TNBS da colite experimental e tratamento com bactérias.	39
Figura 4: Variação do peso corporal dos grupos CN e TNBS.	48
Figura 5: Comprimento do cólon (cm) dos grupos CN e TNBS.	48
Figura 6: Fotomicrografias representativas de cólon dos animais dos grupos experimentais CN e TNBS.	49
Figura 7: Score histológico dos grupos CN e TNBS.	50
Figura 8: Variação do peso corporal dos camundongos ao longo do experimento.	51
Figura 9: Variação de peso corporal durante o período de tratamento.	52
Figura 10: Peso do cólon (mg).	53
Figura 11: Comprimento do cólon (cm).	54
Figura 12: Índice de atividade da doença (IAD).	54
Figura 13: Fotomicrografias representativas da região proximal do cólon dos grupos experimentais.	56
Figura 14: Fotomicrografias representativas de cólon da região proximal do cólon dos grupos experimentais.	57
Figura 15: Score histológico da região proximal.	58
Figura 16: Fotomicrografias representativas da região distal do cólon dos grupos experimentais.	59
Figura 17: Fotomicrografias representativas da região distal do cólon dos grupos experimentais.	60
Figura 18: Score histológico da região distal.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características da doença de Crohn e colite ulcerativa.	22
Tabela 2: Parâmetros analisados no escore histológico de colite.....	42
Tabela 3: Linhagens bacterianas utilizadas neste estudo	43
Tabela 4: Plasmídeos utilizados neste estudo.....	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS	18
2.1 Geral	19
2.2 Específicos	19
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
3.1 Doenças Inflamatórias Intestinais	21
3.2 Modelos de indução da colite	23
3.3 Barreira epitelial intestinal	25
3.4 Resposta imunológica da Doença de Crohn.....	26
3.5 Tratamento para a Doença de Crohn – Anticorpos monoclonais.....	27
3.6 Bactérias lácticas	30
3.7 <i>Lactococcus lactis</i> como veículo de entrega de DNA na mucosa.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Animais	38
4.2 Experimento 1: Desenho experimental para otimização do protocolo de indução da colite crônica experimental com TBNS em camundongo	38
4.3 Indução da colite experimental por TNBS	38
4.4 Coleta do colón intestinal	39
4.5 Análise Histológica	40
4.5.1 Preparação das lâminas para análise histológica.....	40
4.5.2 Coloração Hematoxilina Eosina (H&E).....	40
4.5.3 Fotomicrografias	41
4.7 Linhagens bacterianas, plasmídeos, condições de cultivo e estocagem.....	42
4.8 Preparação das bactérias para administração	43
4.9 Administração das bactérias	43
4.10 Índice de Atividade da Doença (IAD).....	44
4.11 Coleta de tecidos e órgãos	44
4.12 Análises Estatísticas	45
RESULTADOS	46
5.1 O protocolo experimental otimizado induz colite crônica semelhante a doença de Crohn.....	47
5.2 O tratamento com <i>L. lactis</i> FnBPA+ (pValac:: <i>anti-TNFα</i>) melhora os aspectos macroscópicos da colite induzida por TNBS.....	50

5.3 A arquitetura intestinal é restabelecida e a inflamação intestinal é reduzida na região proximal do cólon após o tratamento com <i>L. lactis</i> FnBPA+ (pValac::anti-TNF α).....	55
DISCUSSÃO	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
REFERÊNCIAS	69

INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs), no inglês *Inflammatory Bowel Disease* (IBD), são condições inflamatórias crônicas que acometem o trato gastrointestinal (TGI) e resultam em dores abdominais, diarreia, presença de sangue nas fezes e perda de peso, o que reduz substancialmente a qualidade de vida. A etiopatogênese dessas doenças não foi completamente elucidada, sendo considerada como multifatorial, e atualmente é presumida como resultado de interação complexa entre predisposições genéticas, fatores ambientais, microbianos e respostas imunes exacerbadas (PODOLSKY, 2002; KASER et al., 2010; ZHANG et al., 2018).

A Doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerativa (CU) são as duas principais formas de DII. Apesar dessas doenças apresentarem características em comum, algumas diferenças podem ser observadas. A colite ulcerativa primariamente atinge a camada mucosa do cólon e do reto, enquanto que a doença de Crohn usualmente afeta toda a parede intestinal e potencialmente pode comprometer outros sítios do trato gastrintestinal, com predileção na região ileocecal (KASER et al., 2010).

Mesmo diante de diversas lacunas no que diz respeito a etiologia da doença, a comunidade científica se utiliza de vários modelos experimentais, induzidos quimicamente, que imitam algumas características imunológicas e histopatológicas importantes das DIIs em seres humanos. Quando escolhidos adequadamente, esses modelos podem, portanto, ser ferramentas valiosas na investigação de aspectos fisiopatológicos importantes e oferecem a oportunidade de testar estratégias terapêuticas (WIRTZ et al., 2017). Consequentemente, os modelos animais desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das DIIs, minimizando seus sintomas no organismo (RANDHAWA et al., 2014).

Dada a importância dessas doenças no mundo inteiro, atualmente estão sendo realizadas inúmeras pesquisas tentando desenvolver novas terapias para tratar estas condições inflamatórias, uma dessas terapias são as biológicas, que atuam na neutralização de citocinas pró-inflamatórias. Entre as moléculas biológicas, o uso de anticorpos monoclonais (mAbs) específicos contra o fator de necrose tumoral- alfa (TNF- α), são os mais promissores, uma vez que desempenham um papel crucial na manutenção da inflamação crônica da mucosa intestinal (DE MATTOS et al., 2015).

No entanto, o uso prolongado de maneira sistêmica dos mAbs pode gerar efeitos colaterais nos pacientes. Por este motivo, formas alternativas de administrações que forneçam a molécula terapêutica diretamente no local da inflamação, devem ser estudadas. Destaca-se a utilização de bactérias lácticas recombinantes para a entrega de

moléculas de interesse biotecnológico no tratamento das DIIs, como *L. lactis* carreadoras de plasmídeos de expressão eucariótica codificantes para citocinas anti-inflamatórias, produção de proteínas heterólogas (ZURITA-TURK et al., 2014; SOUZA et al., 2016) e *L. lactis* carreando plasmídeo de expressão eucariótica que expressa fragmentos de anticorpos monoclonais anti-TNF, por meio da entrega de DNA ou vacinação gênica (CHIABAI et al., 2019). Ambas estratégias de utilização garantem a entrega da molécula de interesse ou do DNA diretamente na mucosa intestinal (CARVALHO et al., 2017).

Neste contexto, a hipótese preliminar deste trabalho é que a linhagem bacteriana *L. lactis* invasiva, que expressa proteína ligante de fibronectina A (FnBPA) em sua superfície para aumentar a interação com as células eucarióticas, carreadora do plasmídeo de expressão eucariótica para expressão local de fragmentos do anticorpo monoclonal anti-TNF- α , é uma alternativa para o tratamento convencional da DC baseado em anticorpos monoclonais endovenosos. Assim, o bloqueio da citocina TNF- α pode minimizar a condição inflamatória em um modelo experimental em camundongos semelhante à DC, com redução da resposta inflamatória e a diminuição dos sinais clínicos da doença.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento utilizando *L. lactis* como veículo para entrega de um plasmídeo de expressão eucariótica expressando fragmentos de anticorpos monoclonais anti-TNF- α na colite induzida por TNBS em modelo animal. A presente proposta visa contribuir para o avanço da compreensão sobre o tratamento utilizando fragmentos do anticorpo monoclonal anti-TNF- α na doença de Crohn experimental, além de auxiliar no entendimento dos impactos provocados pela utilização das linhagens recombinantes de *L. lactis* para entrega do plasmídeo.

OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar os efeitos terapêuticos dos fragmentos de anticorpos scFv *anti-TNF- α* produzidos localmente na mucosa intestinal em modelo de doença de Crohn experimental, utilizando *Lactococcus lactis* como veículo para a entrega de vetores na mucosa intestinal.

2.2 Específicos

- Otimizar o modelo de indução de colite crônica com o 2,4,6 – ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS);
- Avaliar o efeito das bactérias recombinantes sobre os parâmetros macroscópicos associados a inflamação intestinal;
- Verificar o impacto terapêutico das bactérias na manutenção da arquitetura intestinal;
- Avaliar os efeitos do tratamento com a bactéria recombinante na diminuição do processo inflamatório intestinal.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Doenças Inflamatórias Intestinais

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs), do inglês *Inflammatory Bowel Disease* (IBD), são um conjunto de distúrbios inflamatórios de natureza crônica, idiopáticas, imunológicas e recidivantes que podem acometer todo trato gastrointestinal (TGI). Clinicamente, as DIIs são caracterizadas por diarreia grave, sangramento, dor abdominal e perda de líquido, refletindo o processo inflamatório subjacente, sendo necessários exames como colonoscopia ou enteroscopia para um diagnóstico mais preciso (RANDHAWA et al., 2014; WALLACE et al., 2014).

Embora os fatores etiológicos envolvidos no desenvolvimento e fisiopatologia das DIIs permaneçam incertos, é sabido que vários fatores: genéticos, ambientais e imunológicos contribuem para a inflamação intestinal. Segundo Carvalho e cols. (2017), a razão para o surgimento de colites é multifatorial, e um dos fatores é a disfunção na interação entre a microbiota intestinal e o sistema imunológico do hospedeiro, conhecido como disbiose. Além disso, outros fatores como a susceptibilidade genética individual, somados às interações ambientais, alimentação, uso de drogas e o estresse ambiental podem influenciar o bom funcionamento do sistema gastrointestinal.

As DIIs afetam aproximadamente cinco milhões de pessoas em todo o mundo e não há tratamento de cura (KAPLAN, 2015). Os dados epidemiológicos do Brasil apontam uma incidência de 13.49 das 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). Mesmo não sendo uma doença que afeta um grande número de pessoas, a sua incidência é crescente ao longo dos anos devido aos hábitos cada vez menos saudáveis adotados pela população (PONDER; LONG, 2013).

A colite ulcerativa (CU) e doença de Crohn (DC) compõem o grupo das DIIs. Ambos os transtornos têm certas características imunológicas, histopatológicas e clínicas distintas e sobrepostas (Tabela 1). A CU é caracterizada por lesões inflamatórias que geralmente afetam o intestino grosso, envolvendo o cólon. Por outro lado, a DC pode ser manifestada em todo o TGI podendo afetar desde a boca ao ânus, mas frequentemente acomete o íleo, deixando zonas normais entre áreas lesionadas, além de comprometer a espessura completa da parede intestinal, conhecido como lesão transmural. Além disso, a CU é caracterizada por espessamento significativo e infiltração densa de neutrófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos T CD4⁺ tipicamente na camada mucosa da parede intestinal. Enquanto a DC é caracterizada por espessamento significativo, bem como

infiltração de macrófagos, monócitos e células T na camada submucosa da parede intestinal (ELLRICHMANN et al., 2014). Ambas doenças podem apresentar uma sintomatologia semelhante, desde dor abdominal, vômitos, diarreia, sangramento retal e perda de peso, além de serem observadas manifestações extra intestinais, incluindo artrite e manifestações cutâneas (PARK et al., 2017).

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
Fatores de risco	Genótipo e ambiental (por exemplo, tabagismo)	Genótipo e ambiental (por exemplo, tabagismo)
Início da doença	Geralmente entre 15 a 40 anos	Geralmente entre 15 a 40 anos
Localização	A inflamação frequentemente afeta o íleo distal e cólon	A inflamação afeta apenas o cólon
Patologia	Inflamação intestinal descontínua e irregular com lesões salteadas	Inflamação contínua do reto para as partes proximais do cólon
Histologia	Inflamação transmural (todas as camadas da parede intestinal)	Inflamação superficial (mucosa e submucosa)
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
Manifestações extra-intestinais	Vários órgãos e sistemas podem ser afetados, por exemplo, articulações, pele, fígado, olhos, boca e sangue (coagulação).	Vários órgãos e sistemas podem ser afetados, por exemplo, articulações, pele, fígado, olhos, boca e sangue (coagulação).
Complicações	Abcessos; anemia; artrite; febre; fístulas; estenose, alterações da pele e câncer de cólon.	Sangramento grave, megacólon tóxico e ruptura do cólon.

Fonte: Adaptado de Neurath (2014)

Quanto às citocinas atuantes no processo inflamatório, na DC há um aumento da produção de IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-2, que indica ativação predominante da resposta imune do fenótipo Th1 e Th17. Por outro lado, a CU retrata a resposta imune impulsionada por Th2 como indicado pelo aumento acentuado dos níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (PODOLSKY, 2002; RANDHAWA et al., 2014).

Dada a morbidade significativa associada às DIIs, os pesquisadores estão trabalhando para desvendar a patogênese da doença com a esperança de identificar terapias novas e eficazes. Uma ferramenta importante para decifrar a patogênese das DIIs tem sido o uso em pesquisa de modelos animais de colite nos quais pode-se estudar tanto os mecanismos moleculares para desvendar a patogênese da doença, como testar a eficácia de novas terapias (ANTONIOU et al., 2016).

3.2 Modelos de indução da colite

Os modelos animais são importantes ferramentas para investigar os mecanismos moleculares e celulares que levam ao desenvolvimento de uma doença, como elas se iniciam e se perpetuam. Por isso, os modelos animais de inflamação intestinal têm se tornado fundamentais para se entender vários aspectos da patogênese das DIIs e são frequentemente usados para desenvolver e avaliar a eficácia de novas drogas anti-inflamatórias (WIRTZ et al., 2017).

Diversos modelos de colite em camundongos foram gerados para investigar a etiologia e testar terapias para as doenças inflamatórias da mucosa intestinal. Esses modelos podem ser categorizados em quatro grandes grupos: modelos geneticamente modificados, imunomodulados, espontâneos e erosivos/induzidos quimicamente. Cada modelo de camundongo 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., 2014; WIRTZ et al., 2017).

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. 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 experimental (WIRTZ et al., 2017).

O modelo murino que se assemelha à colite ulcerativa aguda é induzido pelo DSS. Normalmente, 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 inflamação e ulceração na

análise histopatológica, como visto na colite ulcerativa em humanos (OKAYASU et al., 1990; KITAJIMA et al., 2001).

As primeiras alterações relacionadas ao DSS podem começar a serem observadas após um dia de tratamento e incluem a diminuição da expressão das *tight junctions* (TJs), aumentando a permeabilidade intestinal e o aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-10 e IL-12) no cólon (KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 1999). 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 (COOPER et al., 1993).

Por outro lado, a administração intra-retal do TNBS induz uma colite erosiva e mimetiza a DC. Neurath e cols. (1995) foram os primeiros a descreverem este procedimento, induzindo colite em camundongos BALB/c ou SJL/J com 2 a 4 meses de idade. O mecanismo de ação se dá por meio da ruptura da barreira mucosa pelo etanol, permitindo o acesso do TNBS às células epiteliais intestinais. O TNBS é um hapteno, dessa forma precisa interagir com alguns grupos de aminoácidos da mucosa intestinal e/ou bacterianos para induzir uma resposta imunológica (JONES-HALL, GRISHAM, 2014; WIRTZ et al., 2017).

Os animais tratados com 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. Histologicamente, 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 (NEURATH et al., 2017; JONES-HALL, GRISHAM, 2014).

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 (ALEX et al., 2009). Diferentes linhagens de camundongos apresentam graus variáveis de inflamação no modelo TNBS, os camundongos SJL/J e BALB/c são altamente suscetíveis, enquanto que os camundongos C57BL/6 e C57BL/10 são mais resistentes ao seu desenvolvimento (JONES-HALL, GRISHAM, 2014; RANDHAWA et al., 2014). Assim sendo, o modelo de indução por TNBS é o mais indicado para estudos relacionados à DC, além das vantagens de ser de fácil manipulação, barato e relativamente reprodutível.

3.3 Barreira epitelial intestinal

O intestino humano depende de vários mecanismos celulares e moleculares para manter uma barreira intestinal intacta e dinâmica. Normalmente, apenas pequenas quantidades de conteúdo luminal passam pela mucosa; no entanto, se o controle for interrompido, pode haver um aumento na permeabilidade intestinal, podendo danificar a mucosa, e consequentemente a condições patológicas, como as DIIs (SHOULTZ, KEITA, 2019).

A mucosa intestinal é uma das barreiras mais importantes para a comunicação com o ambiente externo, representando a interface entre o mundo externo e o meio interno humano. A função da barreira intestinal é mantida pelo mecanismo de defesa física associado à superfície da mucosa, pelo revestimento de células epiteliais que incluem enterócitos, células caliciformes, células Paneth e células M, e pelas células do sistema imunológico inato e adaptativo presentes na lâmina própria (BISCHOFF et al., 2014; SHOULTZ, KEITA, 2019).

Para proteger a mucosa, uma camada de muco cobre a superfície epitelial externa. Essa camada é composta por mucinas glicosiladas produzidas pelas células caliciformes, bem como defensinas secretadas pelas células Paneth e células epiteliais intestinais, além da imunoglobulina IgA secretada por plasmócitos da lamina própria. Um componente principal da mucina é codificado pelo gene *Muc2* e camundongos *knockout* para esse gene desenvolvem colite espontânea (VAN DER SLUIS et al., 2006). Além da mucina, a camada de muco é composta por peptídeos antimicrobianos, em que as células de Paneth secretam as α -defensinas, enquanto a maioria das células epiteliais intestinais produzem β -defensinas. Sabe-se que as células de Paneth desempenham um papel importante na homeostase do epitélio intestinal e que pacientes com DC frequentemente apresentam redução na produção de defensinas (WEHKAMP et al., 2013; KASER et al., 2010). Alterações na expressão das mucinas somadas à depleção de células caliciformes e de Paneth resultam em disbiose da microbiota comensal e aumento da suscetibilidade à inflamação intestinal (KASER et al., 2010; ANTONI et al., 2014).

A monocamada de células epiteliais intestinais constitui estruturalmente as criptas e vilosidades, e secretam muco contendo peptídeos antimicrobianos; essas células separam patógenos intra-luminais da lâmina própria subepitelial (CADER, KASER, 2013; VAN DER FLIER et al., 2009; GEREMIA et al., 2014). A coesão mecânica dessas células e a regulação da permeabilidade paracelular de íons e pequenas moléculas são

garantidas por três tipos de complexos juncionais: as junções apertadas, junções de aderência e desmossomos (ANTONI et al., 2014; STREMMEL et al., 2013; SILVERBERG et al., 2009).

De modo geral, as mucosas possuem um conjunto de células e moléculas capazes de desempenhar funções essenciais de prevenir a invasão microbiana e as separam do ambiente externo, representando o maior portal de entrada para patógenos no organismo. Sendo assim, as mucosas são protegidas por um importante e especializado sistema imune inato e adaptativo, o sistema imune de mucosas, eficaz para suprimir respostas a bactérias comensais que colonizam a mucosa intestinal, bem como substâncias estranhas de alimentos, e com menor frequência responder a bactérias patogênicas (KASER, ZEISSING, BUMBERG, 2010; AL-SADI et al., 2014).

Evidências crescentes sugerem que a permeabilidade intestinal pode ser crucial para o desenvolvimento das DIIs, devido a isso, alguns autores a consideram como uma doença de barreira intestinal prejudicada. Uma ativação imune inadequada pode levar à inflamação da mucosa, com secreção elevada de citocinas pró-inflamatórias que podem afetar o epitélio e promover uma barreira mais permeável (JÄGER et al., 2013; ANTONI et al., 2014; NEURATH, 2017).

3.4 Resposta imunológica da Doença de Crohn

Uma barreira epitelial intestinal perturbada permite a entrada desenfreada de antígenos e o reconhecimento, frente a esse cenário, do sistema imune provoca na DC, uma resposta imune exacerbada marcada por inflamação crônica. Estudos de associação genômica identificaram loci de suscetibilidades que, desencadeados por fatores ambientais, resultam em uma resposta imune inata perturbada, caracterizada por uma barreira intestinal perturbada, disfunção das células de Paneth, estresse do retículo endoplasmático, resposta proteica defeituosa e autofagia, comprometimento do reconhecimento de micróbios pelos receptores de reconhecimento padrão, como domínio de ligação a nucleotídeos e receptores *Toll like* em células dendríticas e macrófagos; uma e resposta imune adaptativa, isto é, desequilíbrio de células T efectoras e regulatórias e citocinas, além da migração e retenção de leucócitos (NEURATH, 2017).

As citocinas têm um papel crucial na patogênese das DIIs, onde controlam vários aspectos da resposta inflamatória. A produção de diversas citocinas inflamatórias aumenta de forma considerável nas DIIs, e o desequilíbrio entre citocinas pró-

inflamatórias e anti-inflamatórias impede a resolução da inflamação, levando à perpetuação da doença e destruição dos tecidos (NEURATH, 2017). A ativação via receptor do *Toll like* de macrófagos e células dendríticas da lâmina própria estimula a resposta pró-inflamatória pela secreção de citocinas como o TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-18 (AHLUWALIA et al., 2018; CORRIDONI; ARSENEAU; COMINELLI, 2014; SHOULTZ, KEITA, 2019).

O TNF- α é um dos principais efetores da inflamação das DIIs, produzido principalmente por linfócitos e macrófagos, e em menor quantidade por células dendríticas, neutrófilos e mastócitos, além de células não imunes como células neuronais, fibroblastos e queratinócitos. É uma citocina que tem sido alvo de inúmeras pesquisas que buscam compreender os eventos que resultam na cronicidade da inflamação. Essa citocina possui efeitos biológicos pleiotrópicos, é considerada responsável por estimular as células do endotélio e os leucócitos a aumentarem a expressão de selectinas e seus ligantes e de integrinas e seus ligantes, estimulam também o aumento da produção de quimiocinas e citocinas e, conseqüentemente, diapedese, que caracteriza o infiltrado inflamatório (DE MORENO DE LEBLANC et al., 2012; DE ZOETEN; FUSS, 2013; NEURATH, 2017).

Além disso, o TNF- α pode modular a transcrição das proteínas de junções, as TJs, contribuindo para uma permeabilidade alterada, induzindo apoptose de enterócitos, dificultando a redistribuição das junções que devem selar as lacunas deixadas e na ativação da MLCK (“*Myosin light chain kinase*” - cadeia leve de miosina quinase) que atua na contração celular permitindo o afastamento das junções apertadas (SUENAERT et al., 2002; AL-SADI et al., 2014; COSKUN et al., 2014, SE et al., 2013; WATSON et al., 2012; NEURATH, 2017; XIONG et al., 2017).

Sabendo da existência de uma rede de citocinas reguladoras que tem implicações importantes para a progressão das DIIs, uma promissora estratégia de tratamento seria neutralizar os efeitos das citocinas pró-inflamatórias no organismo, com o objetivo de minimizar a inflamação e por consequência diminuir os sintomas da doença (NEURATH, 2017).

3.5 Tratamento para a Doença de Crohn – Anticorpos monoclonais

Os tratamentos atuais utilizados para as DIIs envolvem o uso de anti-inflamatórios, imunossupressores, antibióticos e anticorpos monoclonais, além do suporte nutricional e cirurgias. Como não existe cura para as DIIs, tais abordagens visam reduzir

os sintomas da doença, ajudar a manter a remissão a longo prazo e a reduzir os riscos de complicações (ROHR et al., 2018).

Dentre as classes de terapias utilizadas, a biológica por meio dos anticorpos monoclonais têm potencial significativo como agentes terapêuticos devido à sua capacidade de se ligar a antígenos específicos, possuindo maior especificidade para vias moleculares envolvidas na patogênese das DIIs. Atualmente, o setor farmacêutico e da biotecnologia está investindo recursos no desenvolvimento de produtos terapêuticos baseados em anticorpos. Novos anticorpos monoclonais (mAbs) têm entrado no estudo clínico a uma taxa superior a 40 por ano desde 2007 e novos produtos vêm sendo aprovados. Atualmente são 33 anticorpos aprovados para terapia ou sendo revistos para aplicação clínica, a maioria anticorpos recombinantes, muitos deles humanizados e alguns totalmente humanos (REICHERT et al., 2011; NEURATH, 2017).

Com o avanço da tecnologia do DNA recombinante, várias formas de anticorpos recombinantes foram geradas. Por meio da manipulação dos genes codificadores para cada uma das cadeias do anticorpo, é possível alterar a estrutura e função, inclusive incluir um caráter humano no anticorpo murino (MORRISON et al., 1984). A molécula de anticorpo possui uma estrutura em domínios, devido a isso, é possível a sua divisão em subunidades funcionais que podem ser utilizadas separadamente, ou combinadas com as de outros anticorpos para formar novas moléculas com propriedades específicas (HAYDEN et al., 1997). 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. Estes fragmentos de anticorpos são conhecidos por apresentarem uma meia-vida menor no soro do indivíduo do que o anticorpo inteiro, além de apresentar melhor penetrabilidade em tumores e tecidos (COLCHER et al., 1998; WU; YAZAKI, 2000).

Dentre os tratamentos mais utilizados para as DIIs estão os anticorpos anti-TNF, uma vez que os níveis desta citocina estão elevados na doença (NEURATH, 2014). Atualmente, existem no mercado vários agentes anti-TNF- α , como Infliximabe, Adalimumabe, Golimumabe e Certolizumabe para o tratamento das DIIs, sendo o último aprovado para uso clínico apenas para DC (HOLLERAN, et al., 2017; CHUDY-ONWUGAJE et al., 2018). Os anticorpos específicos para o TNF- α suprimem a inflamação intestinal crônica e podem induzir a cicatrização da mucosa nas DIIs. O efeito do tratamento é principalmente devido à neutralização do TNF- α , após a ligação ao anticorpo a ativação do receptor TNF- α é impedida, resultando na redução da

permeabilidade intestinal, principalmente devido a uma redução na apoptose das células epiteliais intestinais, bem como uma diminuição da permeabilidade paracelular devido a manutenção das TJs (KOCH; NUSRAT, 2012; NEURATH, 2014; OLESEN, et al., 2016).

De fato, os anticorpos monoclonais que neutralizam TNF são mais eficazes para o tratamento dos pacientes. No entanto, a via intravenosa de administração dessa classe de terapêuticos causa imunogenicidade e efeitos colaterais sistêmicos (SCOTT CROWE et al., 2018). Dentre os efeitos colaterais, destacam-se que alguns pacientes desenvolvem resposta com anticorpos humanos anti-químéricos “*human anti-chimeric antibodies*” (HACA), que faz com que estes anticorpos anti-químéricos se liguem ao anticorpo terapêutico, encurtando sua de meia-vida e consequentemente, limitando a resposta ao tratamento (DREESSEN et al., 2018).

Uma das complicações graves de terapias com anti-TNF é a ativação de tuberculose latente. Outra preocupação é o risco aumentado de contrair doenças bacterianas, virais e fúngicas (ZHOU et al., 2018). Além disso, deve ser levado em consideração é que a terapia com anti-TNF é relativamente nova e pouco se sabe sobre o seu uso a longo prazo (GUBERNATOROVA; TUMANOV, 2016). Além disso é uma terapia de alto custo, e estima-se que seja arrecado com as vendas dos anticorpos monoclonais, cerca de 25 milhões de dólares por ano (KAPLON; REICHERT, 2018).

Desse modo, novas formas de administração dos anticorpos monoclonais estão sendo consideradas, como a via oral, uma vez que pode diminuir significativamente o custo de produção e principalmente, reduzir os efeitos colaterais graves provenientes da utilização sistêmica de mAbs por via parenteral. Uma estratégia alternativa para entrega do mAb diretamente na mucosa intestinal seria a entrega de DNA, que consiste na administração de plasmídeos contendo um cassete de expressão eucariótica, no qual sequências codificadoras de proteínas imunogênicas ou imunomoduladoras são inseridas, sendo possível a síntese destas proteínas pelo próprio hospedeiro, com consequente apresentação das mesmas ao sistema imune (GURUNATHAN et al., 2000).

A entrega de DNA via superfície das mucosas apresenta a possibilidade de geração de ambas as respostas imunes, a sistêmica e de mucosas (NEUTRA, KOZLOWSKI, 2006; WELLS, 2011). Ademais, a administração de vacinas por esta via é relativamente simples, o que permite maior aceitação por parte dos indivíduos a serem vacinados (BAHEY-EL-DIN; GAHAN; GRIFFIN, 2010). Dentro do contexto da imunização por via de mucosas, a utilização de bactérias geneticamente modificadas

representa uma alternativa promissora para a entrega dos plasmídeos vacinais (BERMÚDEZ-HUMARÁN et al., 2003).

Atualmente, as bactérias utilizadas para entrega de vacinas de DNA são, em sua maioria enteropatogênicas atenuadas, dentre as quais pode-se citar *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* e *E. coli*, elas são capazes de interagir com a superfície das mucosas e infectar células de mamíferos, facilitando a entrega do plasmídeo (DAUDEL; WEIDINGER; SPRENG, 2007; BECKER, NOERDER; GÚZMAN, 2008). Tais bactérias têm sido empregadas como transportadoras de plasmídeo de DNA para profilaxia de várias doenças infecciosas e tumores, contudo, o risco de reversão a seu fenótipo patogênico existe, fato que deve ser levado em consideração principalmente quando se trata de sua administração em crianças e indivíduos imunocomprometidos (DUNHAM, 2002; SCHOEN et al., 2004). Sendo assim, alguns grupos de pesquisa, visando estratégias mais seguras para a entrega das vacinas de DNA, têm explorado o potencial de bactérias não patogênicas para esta finalidade, cenário no qual as bactérias lácticas se destacam como alternativa promissora (WELLS; MERCENIER, 2008).

3.6 Bactérias lácticas

As Bactérias lácticas (BLs) são microrganismos gram-positivos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, não móveis e não produtoras de catalase, que obtêm energia a partir da conversão de açúcar em ácido láctico. Morfologicamente, as bactérias lácticas podem ter a forma de cocos, hastes ou bacilos. Esse grupo de bactérias é bastante utilizado pela indústria alimentícia e farmacêutica, principalmente como probiótico, sendo *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Lactococcus* os gêneros do grupo que mais se destacam (CARVALHO et al., 2017).

As BLs são um dos mais importantes grupos de bactérias utilizadas industrialmente. Estes organismos são usados em uma variedade de processos, incluindo produção de alimentos (iogurtes, queijos, leites acidófilos, pães, vinhos, manteigas, carnes, pickles, embutidos e silagem), atuando na formação do sabor, na preservação e na produção de suplementos ou aditivos, além de atuarem na produção de bacteriocinas e exopolissacarídeos. Estas bactérias também são utilizadas para a produção de grandes quantidades de produtos químicos e biológicos, como o próprio ácido láctico e vitamina B. Diversas espécies de bactérias lácticas, por serem utilizadas em processos de fermentação de alimentos, já foram consideradas seguras e adquiriram o status de GRAS

(*Generally Recognized As Safe*), isto é, geralmente reconhecido como seguro, pela FDA (*Food and Drug Administration*) (KWON et al., 2001; WELMAN, MADDOX, 2003; BURGESS et al., 2004; LEROY, DE VUYST, 2004; WANG et al., 2016).

A estes microrganismos ainda é atribuído um importante papel na manutenção da saúde e da prevenção de infecções (REID et al., 2003; KLAENHAMMER et al., 2005) sendo referidos como probióticos, ou seja, microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, mantêm a saúde e o equilíbrio da microbiota intestinal (SANDERS, 2003). A exclusão de agentes patogênicos e a redução de agentes cancerígenos são alguns dos efeitos benéficos dos probióticos que podem ser citados (REID et al., 2003). Outros efeitos bem estabelecidos destas bactérias é a propriedade imunoestimulatória, com efeitos anti-inflamatórios capazes de prevenir e tratar certas doenças inflamatórias intestinais e alérgicas. Atualmente, uma série de produtos lácteos contendo probióticos está disponível no mercado, sendo os leites fermentados os produtos mais difundidos (PONTES et al., 2011).

Essas bactérias podem ocupar vários nichos diferentes, por causa da sua grande diversidade, como superfícies de plantas, animais e o trato gastrointestinal (TGI) de animais; em algum período da vida todo ser vivo entrará em contato com estas bactérias, seja através da alimentação ou do meio ambiente. Acredita-se que as BLs se encontram em estado latente na superfície de plantas e podem se multiplicar no TGI de animais após sua ingestão (BOLOTIN et al., 2001; WANG et al., 2016).

Quando as BLs são consumidas por via oral, podem sobreviver à exposição ao ácido gástrico e ao contato com a bile, permitindo sua absorção nos tecidos linfoides associados à mucosa, como as placas de Peyer (WANG et al., 2014). Além disso, sua administração na mucosa por vias orais, intranasais ou genitais pode estimular respostas imunológicas tanto a nível local quanto sistêmico (MACPHERSON et al., 2015).

As BLs também possuem um grande potencial de utilização na produção de biomoléculas. Recentemente, o potencial para as novas aplicações das BLs, tais como vacinas orais e produção de proteínas heterólogas vem sendo explorado por vários grupos de pesquisa. Neste contexto, por meio da engenharia genética, estas bactérias são utilizadas como “biofábricas” para a produção de moléculas de interesse biotecnológico e médico, como citocinas, enzimas, alérgenos e antígenos, bem como são também utilizadas como veículo para a apresentação de antígenos exógenos na superfície de mucosas (MERCENIER et al., 2000; STEIDLER et al., 2000; NOUAILLE et al., 2003; WANG et al., 2016).

Desse modo, o uso das BLs recombinantes como veículo para entrega de DNA em células eucarióticas surgiu como uma abordagem para aumentar a imunogenicidade, proteger o plasmídeo contra degradação antes da absorção e permitir uma administração oral na perspectiva de induzir respostas imunes tanto locais na mucosa quanto sistêmicas (WANG, 2016).

Dentre todas as BLs, a *Lactococcus lactis* é a espécie mais bem caracterizada devido ao seu interesse industrial e por serem excelentes modelos para o estudo do metabolismo, fisiologia, genética e biologia molecular das BLs. A espécie *L. lactis* tem sido intensivamente utilizada na produção de proteínas heterólogas. Isto se deve ao fato de que poucas proteínas são secretadas por esta espécie, sendo que apenas a Usp45 (*Unknown Secreted Protein of 45 kDa*) é secretada em quantidades suficientes para ser detectada em gel de poliacrilamida desnaturante (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Esta característica facilita a purificação e análise das proteínas heterólogas de interesse. Além disso, as linhagens laboratoriais de *L. lactis* não produzem nenhuma protease extracelular (AZIZPOUR et al., 2017; SONG et al., 2017).

3.7 *Lactococcus lactis* como veículo de entrega de DNA na mucosa

A *L. lactis* é caracterizada por (i) ser um microrganismo de fácil manipulação; (ii) ser um microrganismo seguro, possuindo o status GRAS (*Generally Recognized As Safe*); (iii) ter sido a primeira BL cujo genoma foi sequenciado e (iv) possuir um grande número de ferramentas genéticas já desenvolvidas, como protocolos de transformação, vetores de clonagem e de expressão (MILLS et al., 2006). Além disto, durante as duas últimas décadas, avanços significativos na área da genética e sistemas de expressão de proteínas em *L. lactis* (NOUAILLE et al., 2003; MILLS et al., 2006) possibilitaram o aparecimento de novas áreas de aplicação desta bactéria, como a entrega de proteínas, genes, vacinas e drogas terapêuticas à superfície das mucosas (BRAAT et al., 2003; HANNIFFY et al., 2007; BAHEY-EL-DIN et al., 2010).

Neste sentido, *L. lactis* se destaca como um microrganismo alternativo para a produção de moléculas de interesse biotecnológico, em relação ao uso de modelos mais tradicionais como *Escherichia coli*. Além disso, inúmeras proteínas de origem eucariótica, bacteriana e viral já foram produzidas utilizando *L. lactis* (NOUAILLE et al., 2003; LE LOIR et al., 2005).

Um crescente número de estudos vem utilizando as BLs, com destaque para *L. lactis*, como veículo para a apresentação de antígenos e para entrega de DNA na superfície

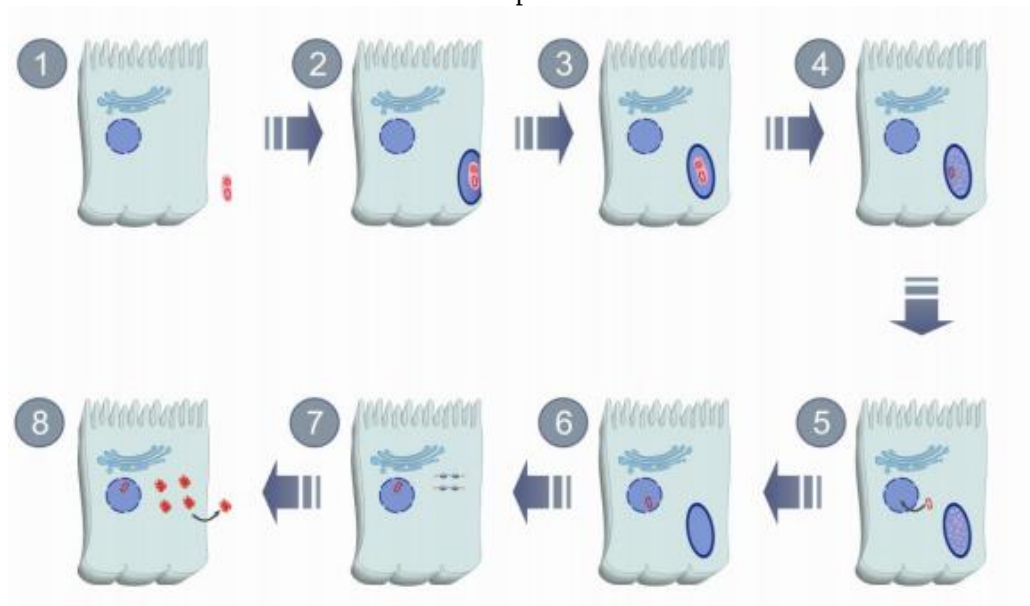
de mucosas. As BLs, ao contrário dos microrganismos patogênicos, podem ser continuamente utilizadas em programas de imunização. Além disso, são capazes de resistir ao ambiente ácido do estômago, alcançando o trato gastrointestinal, onde ocorre a estimulação temporária do sistema imune. Já que é uma bactéria transiente, a mesma não é capaz de colonizar a mucosa intestinal, não gerando tolerância oral (MERCENIER et al., 2000).

Vários trabalhos confirmam a capacidade de *L. lactis* em apresentar antígenos para a mucosa, gerando respostas imunes específicas. Contudo, o maior desafio desta aplicação consiste principalmente na expressão de genes eucarióticos nesta bactéria. E isso se deve às diferenças observadas na maquinaria molecular que constituem os sistemas eucarióticos e procarióticos. Neste contexto, 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).

Estudos realizados por Walter Schaffner (1980) demonstraram que as bactérias são capazes de transferir material genético para células de mamíferos *in vitro*. Por esse motivo elas foram propostas como um novo vetor a ser utilizado para transferência de plasmídeos vacinais (SCHAFFNER, 1980; COURVALIN; GOUSSARD; GRILLOT-COURVALIN, 1995; SIZEMORE; BRANSTROM; SADOFF, 1995; VASSAUX et al., 2006). 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).

Nestes mecanismos de transferência, a bactéria invade a célula eucariótica em uma vesícula primária que é fundida a um compartimento lisossômico, ocorrendo a lise bacteriana. 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, para posterior apresentação ao sistema imune (Figura 1). Neste sistema de entrega, as bactérias atravessam a membrana plasmática da célula alvo, entregando o plasmídeo vacinal diretamente no interior da célula, além de proteger o DNA plasmidial de degradação por nucleases (SCHOEN et al., 2004; PONTES et al., 2011).

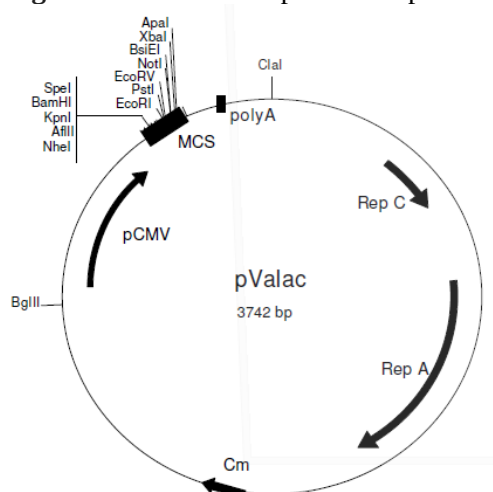
Figura 1: Representação esquemática da transferência de um plasmídeo vacinal de uma bactéria invasiva atenuada para uma célula eucariótica.



(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).

Para otimizar as estratégias de entrega de DNA, Guimarães e cols. (2009) construíram um plasmídeo denominado pValac (Figura 2). Esse vetor foi formado pela fusão do (i) promotor do citomegalovírus (pCMV), que permite a expressão do antígeno em células eucarióticas; (ii) sítio de clonagem múltipla (MCS, *Multiple Cloning Site*); (iii) sequência sinal de poliadenilação do Hormônio do Crescimento Bovino (bGH poli-A), para estabilizar o transcrito de RNA mensageiro; (iv) origens de replicação, que permitem a propagação do plasmídeo tanto em *E. coli* quanto em *L. lactis*, e (v) um gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol, para a seleção das linhagens recombinantes. Após a invasão celular, a *L. lactis* provavelmente é internalizado por vesículas fagolisossomais e sofre lise, liberando o DNA plasmidial que é transferido para o núcleo, resultando na expressão da ORF de interesse (GUIMARÃES et al., 2009).

Figura 2: Estrutura do plasmídeo pValac.



Estrutura do plasmídeo pValac. As caixas indicam: local de clonagem múltipla (MCS) e região de poliadenilação da BGH (poly 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).

Adicionalmente, com o objetivo de aumentar a eficiência de entrega do cassete de expressão eucariótico às células e as interações entre as BLs e as células hospedeiras, foi desenvolvido uma linhagem recombinante de *L. lactis* capaz de expressar a proteína A de ligação à fibronectina (FnBPA), uma adesina de membrana e um fator de virulência da bactéria *Staphylococcus aureus*, que melhora e facilita a entrega do DNA em células eucarióticas. A FnBPA é um mediador de adesão da bactéria ao tecido hospedeiro aumentando a entrada dessas bactérias em células não fagocíticas, sendo *L. lactis* FnBPA+ capaz de invadir 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).

Afim de utilizar as estratégias de invasivas e de 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 fragmentos de

anticorpos monoclonais anti-TNF α , utilizadas para o tratamento de colite induzida por DSS. A linhagem *L. lactis* MG1363 FnBPA+ pValac::anti-TNF α demonstrou ser capaz de entregar o plasmídeo localmente e a partir da expressão do anticorpo anti-TNF melhorar os aspectos inflamatórios da colite induzida, bem como os níveis de citocinas pró-inflamatórias (CHIABAI et al, 2019).

Nesse contexto, a utilização de uma linhagem geneticamente modificada *L. lactis* MG1363 FnBPA+ pValac::anti-TNF α poderia também representar uma nova estratégia eficiente para o tratamento da colite induzida por TNBS, mimetizando a DC, com a entrega de DNA diretamente na mucosa, visto que as moléculas de anticorpos seriam produzidas diretamente no sítio da inflamação, além de ser uma estratégia de baixo custo, comparado a tratamentos convencionais com uso de anticorpos monoclonais, com menor toxicidade e sem efeitos colaterais sistêmicos.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 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).

4.2 Experimento 1: Desenho experimental para otimização do protocolo de indução da colite crônica experimental com TNBS em camundongo

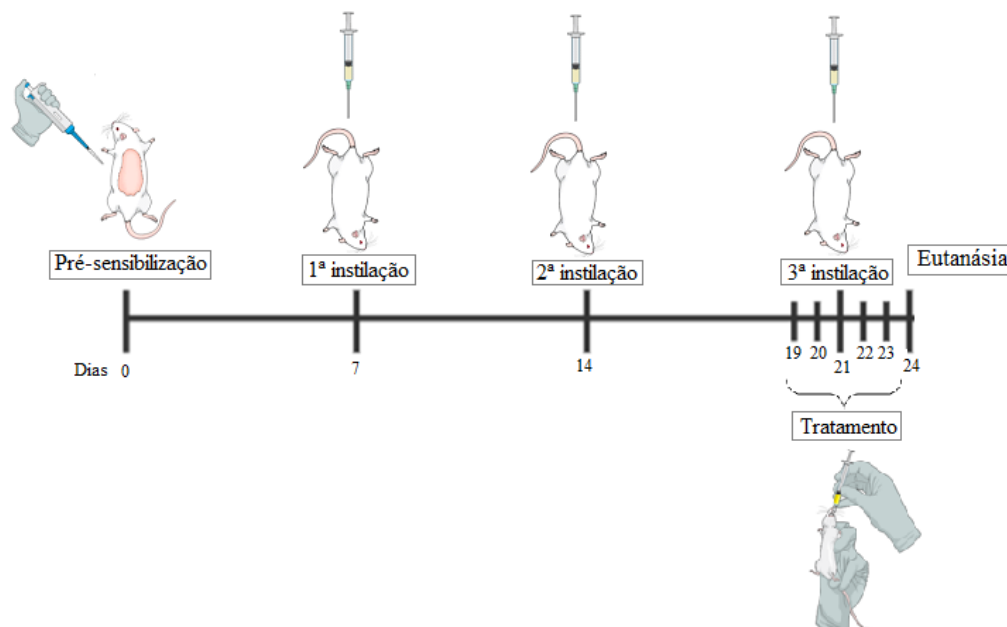
Foi realizado um experimento com adaptação do protocolo de Wirtz e cols. (2017), que consistiu na redução do período de indução da colite crônica induzida por TNBS, otimizando o protocolo de 44 para 25 dias. Os animais foram divididos em dois grupos: (i) CN: tratamento oral com salina e aplicação intra-retal de etanol e (ii) TNBS: tratamento oral com salina e aplicação intra-retal de etanol/TNBS.

4.3 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 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 foi realizado a gavagem intragástrica com salina. Os animais foram eutanasiados no dia 24 (Figura 2).

Figura 3: Cronograma da indução com TNBS da colite experimental e tratamento com bactérias



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%. O tratamento aconteceu entre os dias 19 e 23. No dia seguinte a última gavagem os camundongos foram eutanasiados.

4.4 Coleta do colón intestinal

Após a eutanásia dos animais, o cólon foi cuidadosamente retirado e o comprimento foi mensurado considerando sua extensão desde a junção com o ceco até o reto. Uma secção do cólon foi separada para a análise histológica das lesões intestinais, os tecidos foram mantidos em formaldeído 4% por 48 horas e posteriormente mantidos em etanol 70%, para seguir a coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE), foram executados cortes de 3 a 5 micrômetros de espessura.

A fixação das amostras em formalina tamponada em um volume superior no mínimo a 10x o volume da peça garante 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.

4.5 Análise Histológica

4.5.1 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).

4.5.2 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).

4.5.3 Fotomicrografias

As fotografias digitais foram capturadas pela câmera Moticom 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 para o cálculo da pontuação (escore histológico) estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros analisados no escore histológico de Colite

Grau de Colite	Alterações histológicas
0	Achados histológicos idênticos aos ratos 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.

4.6 Experimento 2: 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-FT: tratamento oral com *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac:anti- *TNF-α*) e aplicação intra-retal de etanol/TNBS. Os grupos passaram pelo protocolo de indução com TNBS descrito na figura 3.

4.7 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 (DO=1). As linhagens bacterianas empregadas neste trabalho estão listadas na Tabela 03 e os plasmídeos utilizados na Tabela 04.

Tabela 3: 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- <i>TNFα</i>)	<i>L. lactis</i> expressando FnBPA de <i>S. aureus</i> carreando o plasmídeo pValac:anti- <i>TNF-α</i> (anti- <i>TNF-α</i> / <i>Cmr</i> / <i>Eryr</i>)	(CHIABAI et al., 2019)

Tabela 3: 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- <i>TNF-α</i>	pValac contendo ORF anti-IL-1β (pCMV / Cmr / RepA / RepC / anti- <i>TNF-α</i>)b	(CHIABAI et al., 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-TNF: ORF do gene codificador da proteína scFv anti-TNF.

4.8 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, foi o sedimento foi ressuspensionado em salina, de modo que cada 100 µL contivesse 10⁹ UFC (unidades formadoras de colônias).

4.9 Administração das bactérias

A administração de bactérias se deu pela via intragástrica com a técnica de gavagem utilizando uma agulha 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-FT receberam 10⁹ UFC de cada uma das linhagens recombinantes ressuspensas em um volume de 100µL 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 tratamento os animais foram eutanasiados e todos os grupos passaram pelas mesmas análises do experimento 1, acrescentando os descritos nos próximos tópicos.

4.10 Índice de Atividade da Doença (IAD)

O índice de atividade da doença (IAD) foi calculado usando um sistema de pontuação previamente estabelecido por Kasinathan e colaboradores (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. A consistência das fezes e o sangramento retal foram observados durante a secção do cólon no dia da eutanásia.

4.11 Coleta de tecidos e órgãos

A eutanásia dos animais se deu por exsanguinação realizada por punção cardíaca após anestesia geral, foi coletado o sangue para a obtenção do soro, as amostras de sangue coletadas foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, centrifugadas a 4.000 x rpm a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante é coletado e armazenado em outro tubo no ultrafreezer -80°C. O baço do animal foi removido, pesado e armazenado em um tubo também no ultrafreezer -80°C.

O cólon foi cuidadosamente retirado, pesado e o comprimento foi mensurado considerando sua extensão desde a junção com o ceco até o reto. O cólon foi dividido em uma porção distal e outra proximal para a análise histológica das lesões intestinais, os tecidos foram mantidos em formaldeído 4% por 48 horas e posteriormente mantidos em etanol 70%, para seguir a coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE), foram executados cortes de 3 a 5 micrômetros de espessura.

A fixação das amostras em formalina tamponada em um volume superior no mínimo a 10x o volume da peça garante 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. A análise histológica foi a mesma apresentada no tópico 4.5.

4.12 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.). A significância das diferenças entre os grupos para o experimento 1 de otimização do protocolo de indução da colite foi avaliada pelo teste t não pareado. Para os resultados obtidos no experimento 2, em que se avaliou o efeito do tratamento com as bactérias, 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 $p < 0,05$.

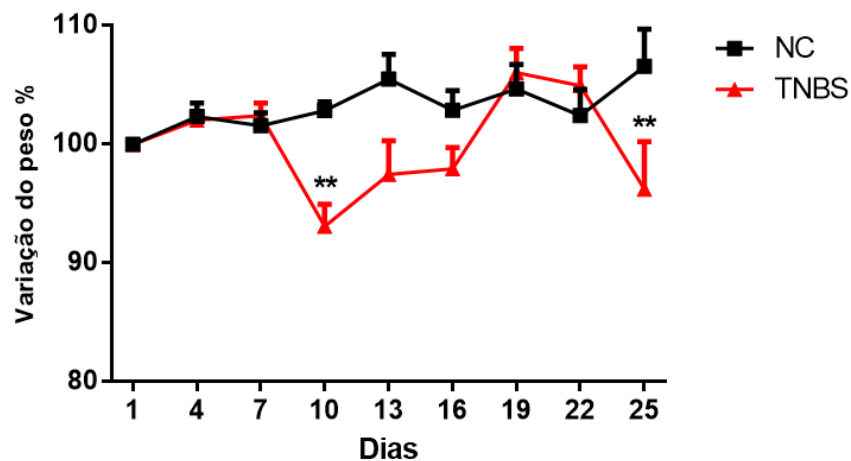
RESULTADOS

Neste estudo foram realizados dois experimentos, o primeiro para validar um protocolo adaptado de indução de colite crônica, e o segundo para avaliar o efeito da produção de fragmentos de anticorpos monoclonais de anti-TNF α diretamente na mucosa intestinal de camundongos com colite induzida por TNBS, utilizando *Lactococcus lactis* como carreador de plasmídeo de expressão eucariótica (pValac:anti-TNF α). Os camundongos foram divididos nos seguintes grupos, para o experimento 1: CN, controle negativo de animais saudáveis que não receberam TNBS e bactéria; TNBS, controle positivo de animais doentes cuja colite foi induzida por TNBS e que não recebeu nenhum tratamento com lactococos; e para o experimento 2 os 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* transformado com plasmídeo de FnBPA e LL-FT, grupo instilado por TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:anti-TNF α) (CHIABAI et al., 2019).

5.1 O protocolo experimental otimizado induz colite crônica semelhante a doença de Crohn

Para avaliar a gravidade das lesões causadas pela administração do TNBS intrarectal, foi calculada a variação de perda de peso dos camundongos em porcentagem, considerando 100% do peso no dia 0 do experimento (Figura 4). Durante a indução do processo inflamatório intestinal, o grupo CN apresentou ganho de peso corporal e manteve um peso constante e elevado ao do início do experimento. Em contraste, o grupo TNBS apresentou variação de peso, principalmente após as instilações de TNBS/etanol, mostrando uma diferença estatisticamente significativa nos dias seguintes à primeira e à última instilação, dias 10 e 25.

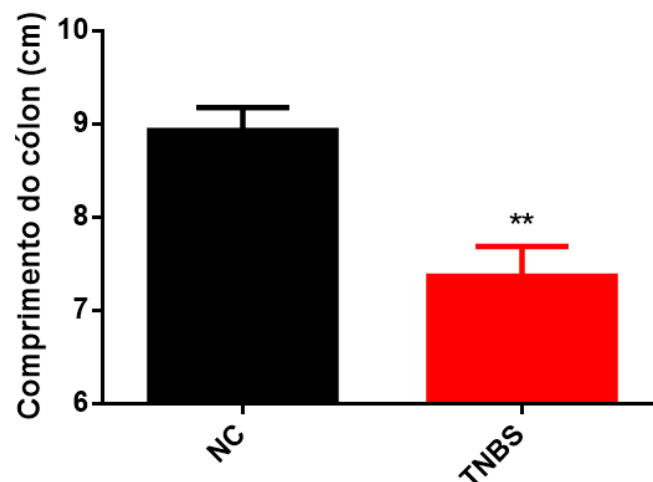
Figura 4: Variação do peso corporal dos grupos CN e TNBS



Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina. Os pontos no gráfico de curva representam as médias $\pm$ EPM do peso dos animais obtidos em gramas (g) dos diferentes grupos durante os 25 dias de experimento ($n = 10$ animais/grupo). A análise estatística foi realizada com a ANOVA e o teste post-hoc de Sidak's. ** $p < 0,01$.

Os camundongos foram eutanasiados no dia seguinte ao término do tratamento e os cólons foram removidos e avaliados (Figura 5). O comprimento dos cólons dos grupos CN e TNBS apresentaram médias de $8,9 \text{ cm} \pm 0,24$ e $7,3 \pm 0,3$ respectivamente, apresentando um encurtamento significativo no grupo que recebeu TNBS/etanol.

Figura 5: Comprimento do cólon (cm) dos grupos CN e TNBS



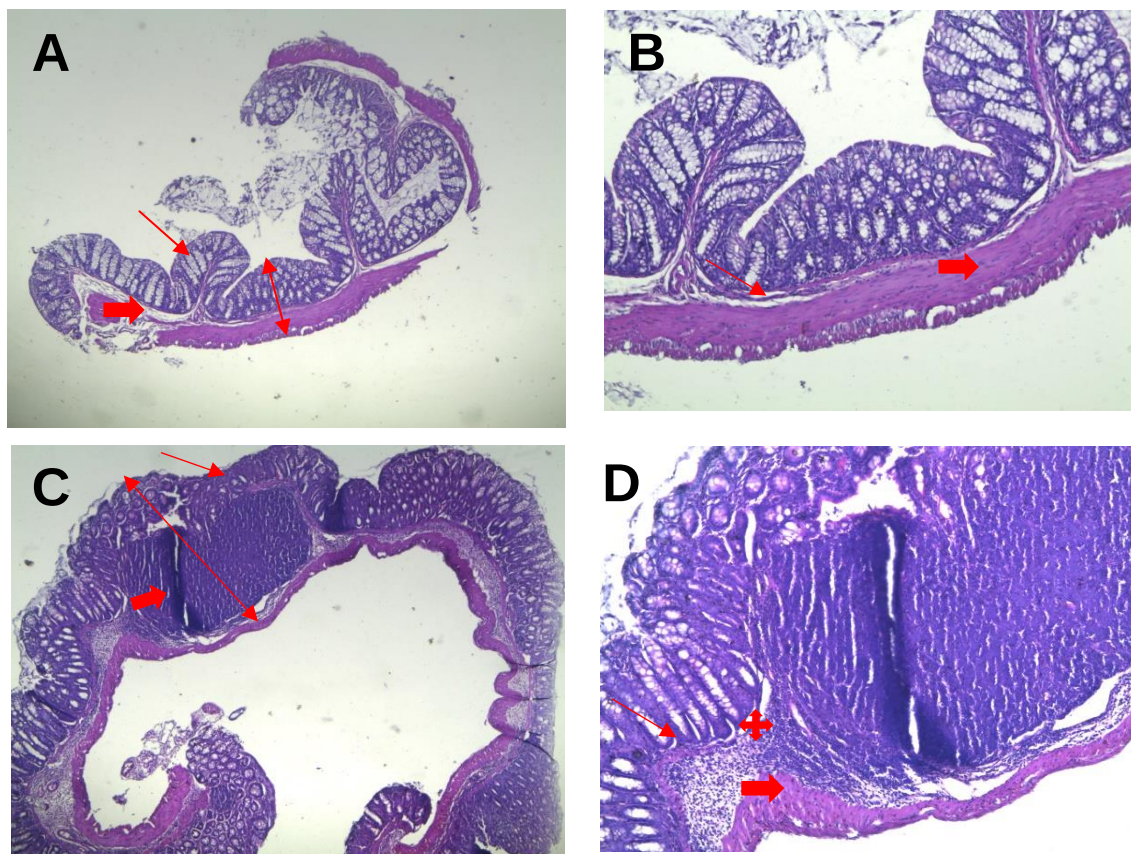
Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina. As barras representam as médias $\pm$ EPM do comprimento do cólon dos animais expressos em centímetros (cm) dos diferentes grupos obtidos no final do experimento ($n = 10$ animais/grupo). A análise estatística foi realizada usando o teste t não pareado. ** $p < 0,01$.

Na análise histológica foi observado que o grupo CN apresentou achados histológicos idênticos a animais normais, 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 (Figuras 6A e 6B).

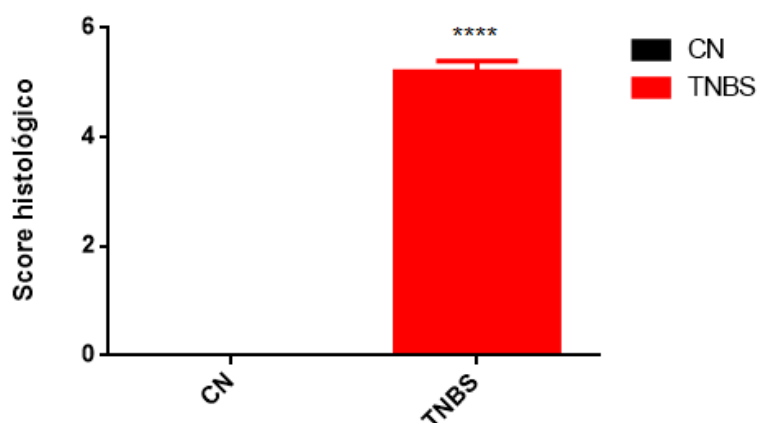
No grupo TNBS foi observado extensas áreas de destruição tecidual se estendendo profundamente até a muscular externa. Infiltrado inflamatório presente a nível de mucosa e submucosa com predomínio de células mononucleares e edema. A muscular da mucosa apresentando destruição. A camada muscular interna da muscular externa com espessura reduzida (Figura 6C e 6D). Esse processo inflamatório do epitélio intestinal justifica um agravamento dos sinais clínicos dos animais. O valor médio do score histológico do grupo TNBS foi significativamente diferente em comparação com o grupo CN (Figura 7).

Figura 6: Fotomicrografias representativas de cólon dos animais dos grupos experimentais CN e TNBS



Grupos experimentais: grupo controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina –CN (A e B) e grupo instilado com TNBS e tratado com salina - TNBS (C e D). Muscular da mucosa (seta fina), muscular externa (seta larga), infiltrado inflamatório (cruzeiro). A e B – H&E, objetiva 4x, A.T. x40. C e D H&E, objetiva 10x, A.T. x100.

Figura 7: Score histológico dos grupos CN e TNBS

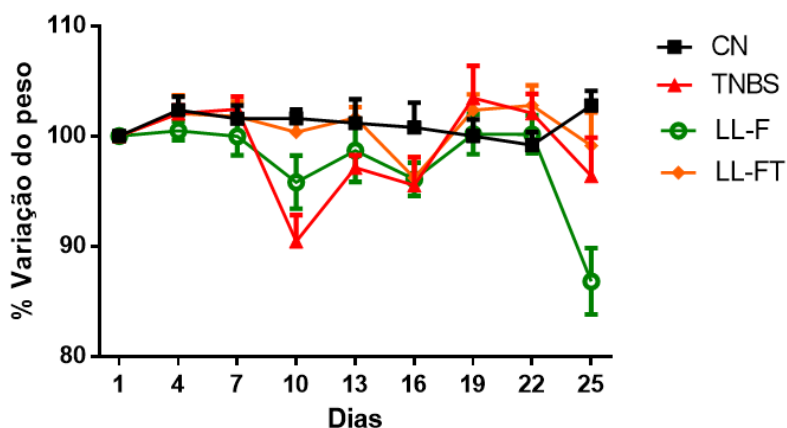


Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina. As barras representam as médias $\pm$ EPM do score de dano microscópico do cólon dos diferentes grupos experimentais (N = 6-8 animais/grupo). O índice de dano microscópico foi pontuado utilizando os critérios descritos na metodologia. A análise estatística foi realizada usando o teste t não pareado. **** $p < 0,00001$.

5.2 O tratamento com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-TNF α) melhora os aspectos macroscópicos da colite induzida por TNBS

A partir da validação do modelo de indução da colite crônica, os experimentos foram repetidos, desta vez fazendo uso do tratamento com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-TNF α). O primeiro parâmetro observado para avaliar as lesões causadas 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 8). Os animais tinham 8 semanas de idade e o peso inicial variou de 20 a 23 gramas. Durante a indução da colite, o CN apresentou ganho de peso corporal e manteve um peso constantemente elevado ao longo do experimento. Em contraste, os grupos que receberam TNBS apresentaram variação de peso por dois dias após as aplicações do hapteno (dia 7, 14 e 21).

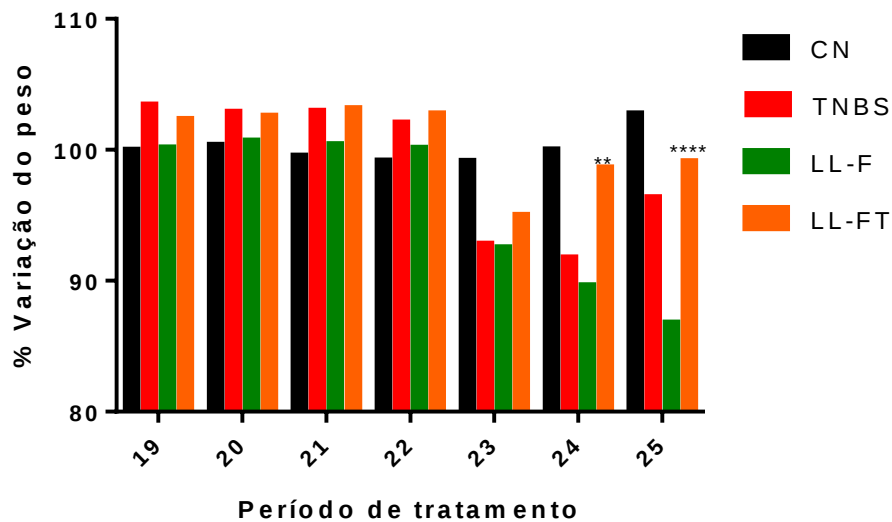
Figura 8: Variação do peso corporal dos camundongos ao longo do experimento



Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina; LL-F, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:anti-TNFα). Os pontos no gráfico de curva representam as médias $\pm$ EPM do peso dos animais obtidos em gramas (g) dos diferentes grupos durante os 25 dias de experimento (n = 6-8 animais/grupo).

Quando se iniciou o tratamento no dia 19, os animais tratados com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::anti-TNFα) apresentaram uma recuperação do peso corporal, em que nos dias 24 ($98,66 \pm 2,10$) e no dia 25 ($99,13 \pm 3,01$) foi verificado diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo que recebeu apenas a bactéria invasiva (LL-F) ($89,66 \pm 2,10$ e $86,82 \pm 3,00$, respectivamente). Nos dias finais do experimento o grupo LL-F apresentou uma elevada perda de peso (Figura 9).

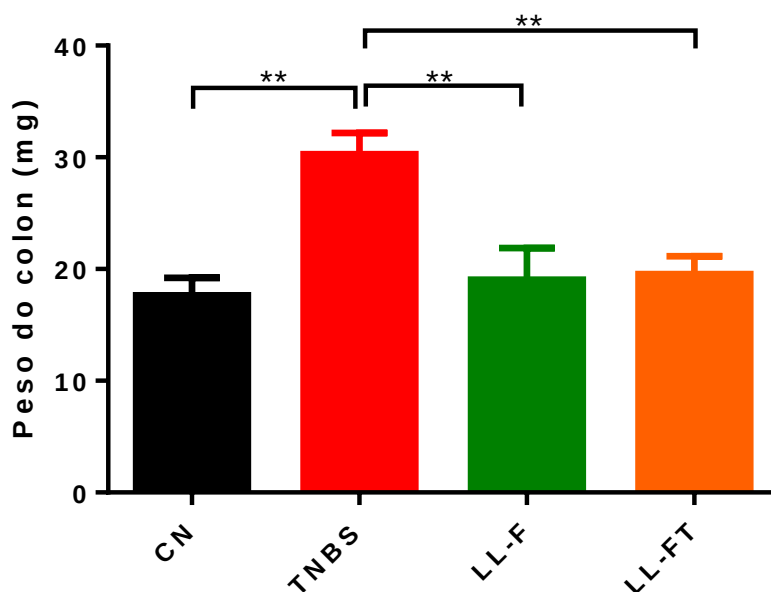
Figura 9: Variação de peso corporal durante o período de tratamento



Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina; LL-F, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:anti-TNF α). 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 LL-F e LL-FT. ** p < 0,01 e **** p < 0,00001.

Após a eutanásia, o cólon foi retirado e pesado para análise dos dados (Figura 10). Apenas o grupo TNBS obteve um cólon mais pesado (30,26 g $\pm$ 1,92), com diferença significativa com os demais grupos (CN: 17,65 g $\pm$ 1,55; LL-F: 19,06 g $\pm$ 2,8; LL-FT: 19,54 g $\pm$ 1,59).

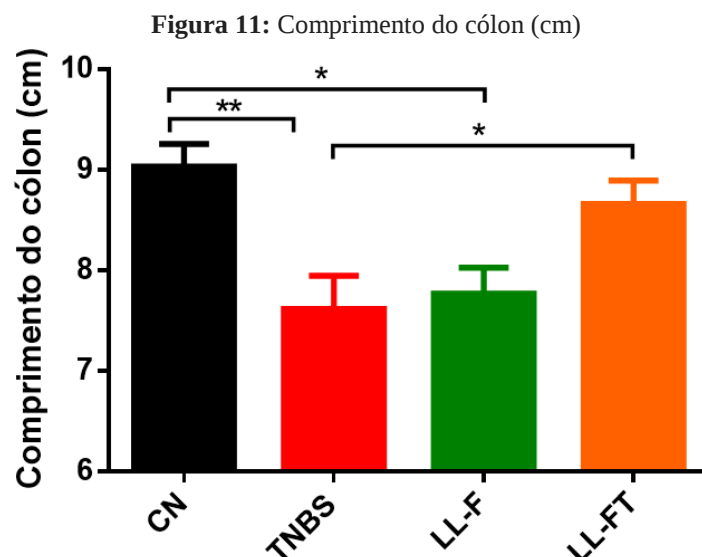
Figura 10: Peso do cólon (mg)



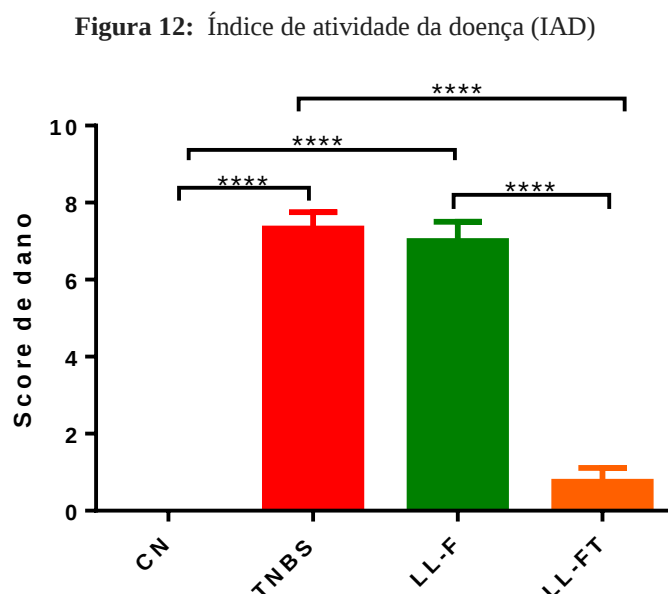
Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina; LL-F, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*anti-TNF* α). As barras 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 < 0,01.

Na análise do comprimento do cólon observamos que os grupos TNBS e LL-F, apresentaram médias de $7,61 \text{ cm} \pm 0,33$ e $7,77 \pm 0,25$ respectivamente, mostrando um encurtamento do cólon significativamente maior quando comparados ao grupo CN ($9,03 \text{ cm} \pm 0,22$). O grupo que recebeu o tratamento com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*anti-TNF* α) (LL-FT), expressando média de $8,66 \text{ cm} \pm 0,23$, apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo TNBS, assemelhando-se ao comprimento do cólon do grupo normal (CN), demonstrando uma melhora no parâmetro desses animais (Figura 11).

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 12) estava 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-FT apresentou melhora significativa, com média de $0,75 \pm 0,36$, em relação aos controles positivos da doença (TNBS = $7,33 \pm 0,42$; LL-F = $7,00 \pm 1,0$).



Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina; LL-F, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:anti-TNF α). 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 e ** p < 0,01.



Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina; LL-F, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:anti-TNF α). As barras representam as médias $\pm$ 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 < 0,00001.

5.3 A arquitetura intestinal é restabelecida e a inflamação intestinal é reduzida na região proximal do cólon após o tratamento com *L. lactis* FnBPA+ (pValac::*anti-TNF α*)

Os cortes histológicos de cólon dos grupos experimentais nas regiões proximal e distal foram analisados pela coloração H&E, por meio dessa análise ao microscópico ótico, as amostras receberam notas para que se estabelecesse a realização de um score histológico da doença (Tabela 4).

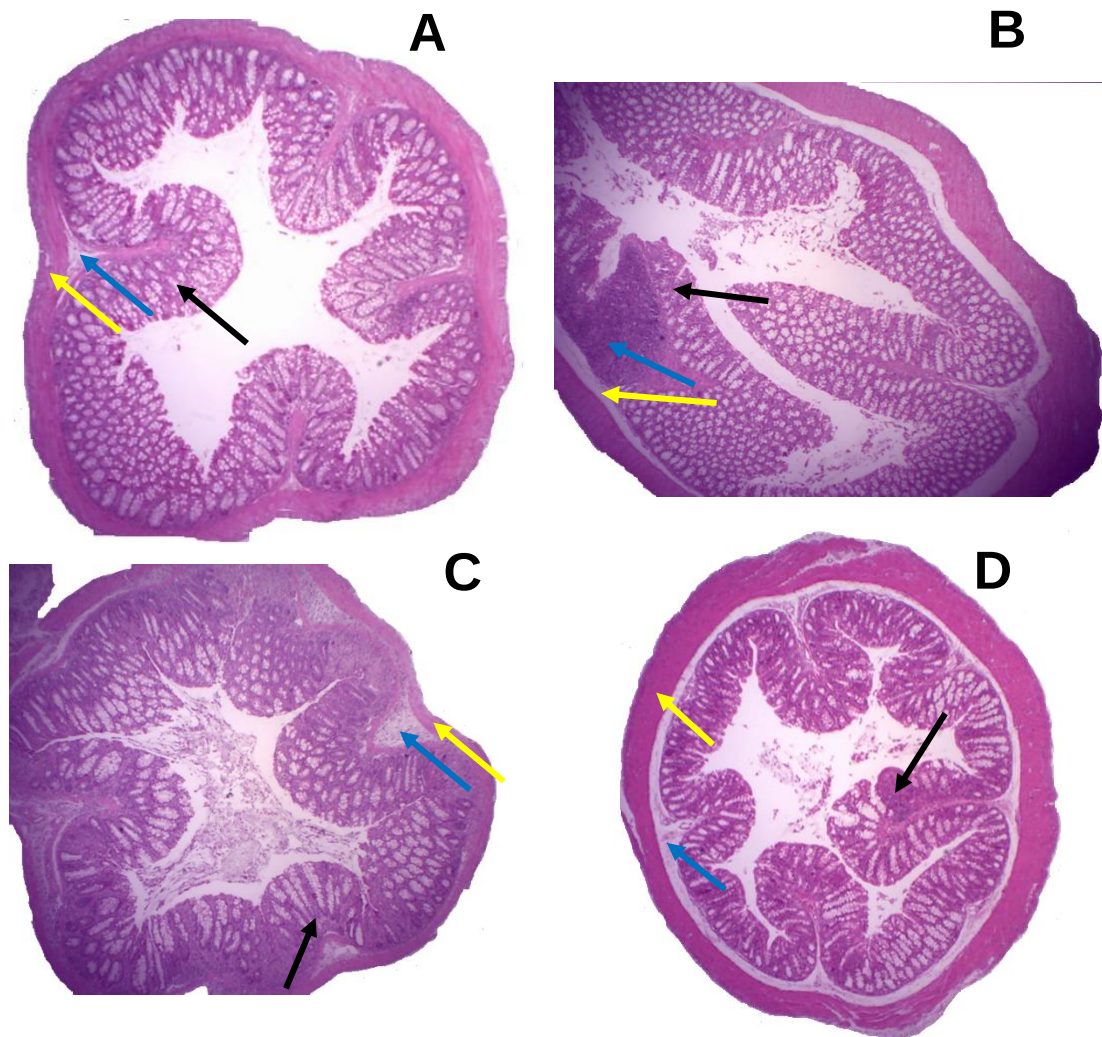
No corte da região proximal, o grupo CN apresentou achados histológicos idênticos ao normal com preservação das camadas mucosa, submucosa e muscular externa. A camada da mucosa manteve-se com criptas de Lieberkühn (criptas intestinais), lâmina própria e muscular da mucosa bem preservadas, a camada submucosa delgada com presença de vasos sanguíneos e a muscular externa com a camada circular interna e longitudinal externa com características conservadas (figuras 13A e 14A).

O grupo TNBS apresentou infiltrado inflamatório de células mononucleares presente a nível de mucosa e muscular da mucosa, a camada submucosa ocorreu redução do número de vasos sanguíneos e espessamento da camada. A camada muscular externa apresentou espessura reduzida (figura 13B e 14B).

No grupo LL-F a camada mucosa também demonstrou presença de infiltrado inflamatório de células mononucleares presente na lâmina própria, ultrapassando profundamente a muscular da mucosa e invadindo a camada submucosa. A camada muscular externa apresentou espessura reduzida (figura 13C e 14C).

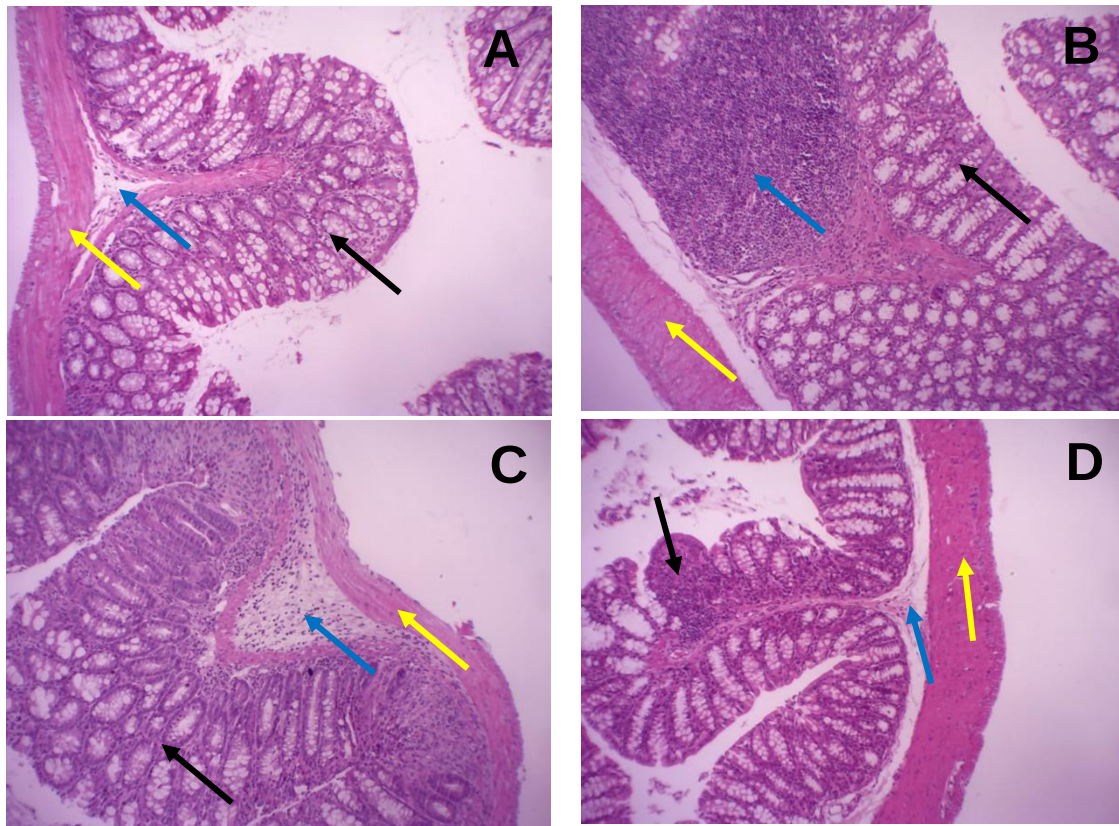
No grupo LL-FT a camada mucosa apresentou presença de pouco infiltrado inflamatório presente na lâmina própria com muscular da mucosa íntegra. A camadas submucosa e muscular externa preservadas (figura 13D e 14D). O score histológico da região proximal do cólon demonstra que os grupos TNBS e LL-F apresentam um elevado dano tecidual, e que o tratamento com LL-FT melhorou significativamente o dano tecidual quando comparado aos grupos TNBS e LL-F (Figura 15).

Figura 13: Fotomicrografias representativas da região proximal do cólon dos grupos experimentais



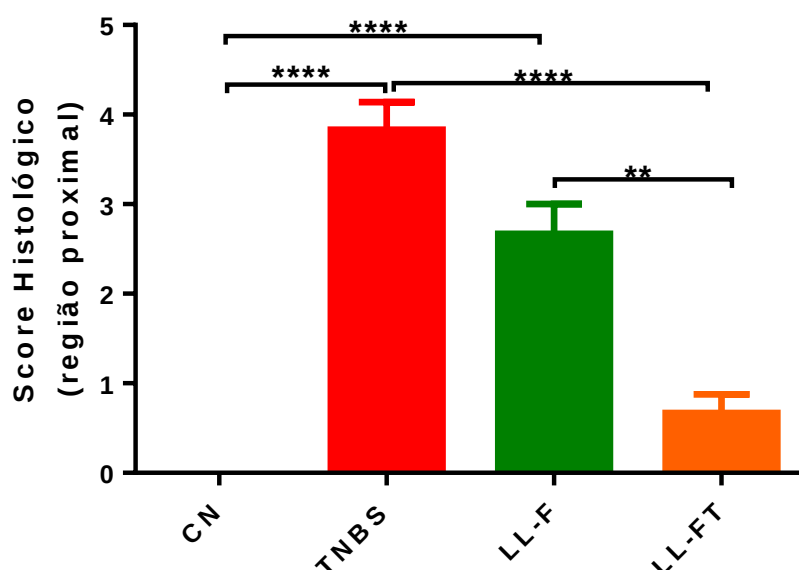
Grupos experimentais: grupo controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina (CN) (A) grupo instilado com TNBS e tratado com salina (B), grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (LL-F) (C) e grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:anti-TNF α) (LL-FT)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

Figura 14: Fotomicrografias representativas de cólon da região proximal do cólon dos grupos experimentais



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+ (LL-F) **(C)** e grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:anti-TNF α) (LL-FT) **(D)**. Camada mucosa (seta preta), camada submucosa (seta azul) camada muscular externa (seta amarela). **A, B, C e D** – H&E, objetiva 10x, A.T. $\times 100$.

Figura 15: Score histológico da região proximal



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

No corte da região distal do cólon, o grupo CN apresentou preservação das camadas mucosa, submucosa e muscular externa com características histológicas idênticas ao normal. Na camada mucosa, as criptas, glândulas intestinais, lâmina própria e muscular da mucosa estavam bem preservadas, a camada submucosa delgada com presença de vasos sanguíneos e a muscular externa com as camadas circular interna e longitudinal externa conservadas (Figuras 16A e 17A).

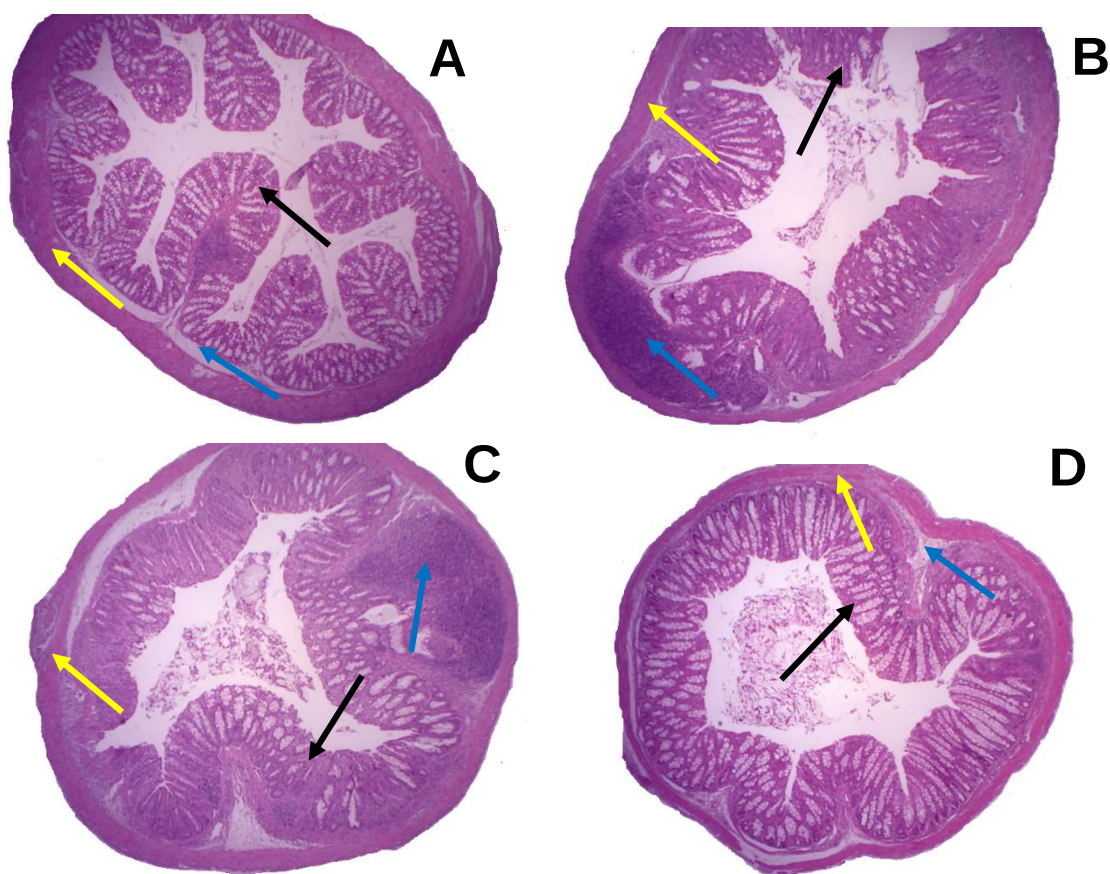
O grupo TNBS apresentou infiltrado inflamatório presente a nível de mucosa e submucosa com predomínio de células mononucleares. A camada mucosa demonstrou destruição do epitélio de revestimento das glândulas intestinais e muscular da mucosa destruída em algumas regiões. Na camada submucosa ocorreu redução do número de vasos sanguíneos e espessamento da camada promovido pela presença de infiltrado celular mononuclear. A camada muscular externa apresentou redução da espessura (figura 16B e 17B).

No grupo LL-F a camada mucosa apresentou criptas e glândulas intestinais preservadas, no entanto, uma muscular da mucosa descontínua em algumas regiões. Na

camada submucosa foi encontrado infiltrado inflamatório de células mononucleares. A camada muscular externa apresentou espessura reduzida (Figura 16C e 17C).

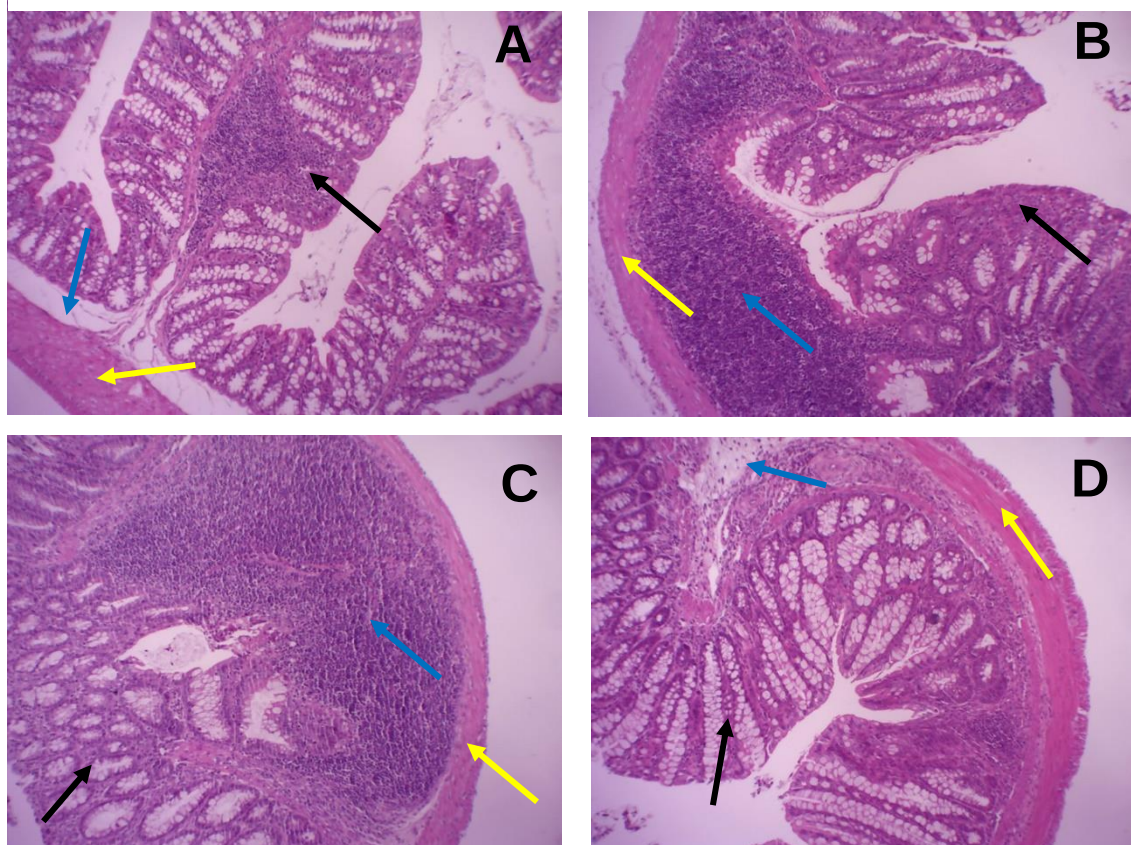
No grupo LL-FT a camada mucosa demonstrou presença de infiltrado inflamatório presente na lâmina própria ultrapassando a muscular da mucosa profundamente invadindo a camada submucosa. Infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares. As glândulas intestinais estavam conservadas. A camada muscular externa apresentou morfologia conservada (Figura 16D e 17D). O score histopatológico da região distal demonstra que não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 18).

Figura 16: Fotomicrografias representativas da região distal do cólon dos grupos experimentais



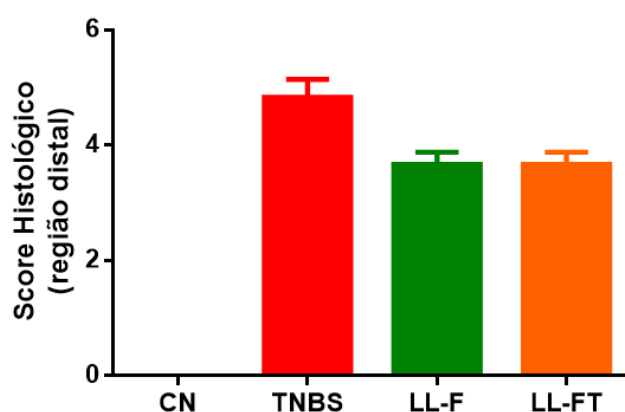
Grupos experimentais: grupo controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina (CN) (A) grupo instilado com TNBS e tratado com salina (B), grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (LL-F) (C) e grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:anti-TNF α) (LL-FT)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

Figura 17: Fotomicrografias representativas da região distal do cólon dos grupos experimentais



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+ (LL-F) (C) e grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:anti-TNF α) (LL-FT) (D). Camada mucosa (seta preta), camada submucosa (seta azul) camada muscular externa (seta amarela). A, B, C e D – H&E, objetiva 10x, A.T. $\times 100$

Figura 18: Score histológico da região distal



Grupos experimentais: CN, controle negativo não instilado com TNBS e tratado com salina; TNBS, grupo instilado com TNBS e tratado com salina; LL-F, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+; LL-FT, grupo instilado com TNBS e tratado com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:anti-TNF α). As barras representam as médias $\pm$ EPM do score de dano microscópico referente a região distal do cólon dos diferentes grupos experimentais (N = 6-8 animais/grupo). O índice de dano microscópico 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

DISCUSSÃO

As DIIs, que incluem a CU e a DC são doenças com incidência global, que vêm crescendo devido aos hábitos não saudáveis adotados pela população e são caracterizadas por uma inflamação crônica do trato gastrointestinal (NG et al., 2018; PODOLSKY, 2002). Apesar da etiologia das DIIs serem idiopáticas, sabe-se que a patogênese é multifatorial, englobando predisposição genética, defeitos na barreira epitelial, resposta imune alterada e fatores ambientais (DE MATTOS et al., 2015).

A DC geralmente é acompanhada por dor abdominal, vômitos, diarreia, sangramento retal e perda de peso, podendo ser observadas manifestações extra intestinais (PARK et al., 2017). A doença pode ser manifestada em todo trato gastrointestinal (TGI), mantendo uma alternância em regiões lesionadas e não inflamadas, além de comprometer a espessura completa da parede intestinal, conhecido como lesão transmural (ROHR et al., 2018).

Até o momento o TNF- α , é a citocina pró-inflamatória mais estudada como principal alvo nas terapias para DIIs em humanos. Dentre as terapias mais utilizadas, as que vêm ganhando maior destaque são as terapias biológicas, que apesar da alta eficácia a sua administração, majoritariamente por via intravenosa, causa imunogenicidade e efeitos colaterais graves, oriundos da aplicação sistêmica do anti-TNF α (GUBERNATOROVA; TUMANOV, 2016).

Neste trabalho, propusemos uso da bactéria *L. lactis*, uma bactéria láctica de classificação GRAS seguramente utilizada para entrega de proteínas, para entregar um cassete de expressão eucariótica da molécula de anti-TNF α na forma de *scFv*, com o propósito de restringir a terapia somente no sítio de inflamação, sem atingir níveis sistêmicos de ação e como consequência, minimizar os efeitos colaterais. A utilização de fragmentos de anticorpos no formato *scFv* possibilita uma melhor penetrabilidade e não demanda modificações pós-traducionais, como a glicosilação (BRIGIDO et al., 1993).

Para tanto, utilizamos o modelo de colite induzida por TNBS, em camundongos da linhagem BALB/c. Uma única administração do TNBS leva ao desenvolvimento de uma resposta imune excessiva mediada por células, refletida pela inflamação aguda do tipo Th1. Esse fenótipo da inflamação inclui uma infiltração densa de tecido colônico pelas células T CD4⁺ e a secreção de várias citocinas pró-inflamatórias atuantes na inflamação, incluindo o TNF- α , e, logo, esse modelo foi especificamente relacionado à doença de Crohn em humanos (DA SILVA, et al., 2010; RANDHAWA 2014; ANTONIOU et al., 2016). 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).

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 estratégia de utilização de repetidas administrações do TNBS com aumento de doses tem se mostrado eficaz em vários estudos para investigar a colite crônica por TNBS (WIRTZ et al., 2017). A linhagem de camundongos escolhida foi a BALB/c, por ser mais sensível à inflamação intestinal por TNBS e sem potencial de evolução para a cura espontânea (RANDHAWA et al., 2014).

Dada a importância dos estudos sobre as DIIs, é necessário desenvolver e otimizar protocolos que sirvam como ferramentas para estudar a doença em modelos animais, para isso optamos por testar um protocolo de indução de colite crônica com tempo de experimentação reduzido de 25 dias com três instilações de TNBS/etanol, dado que o protocolo na literatura utiliza um período de 45 dias com seis instilações de TNBS/etanol (WIRTZ et al., 2017).

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, como: perda de peso, diarreia, presença de sangue nas fezes e prolapso retal (JONES-HALL et al., 2014). Os camundongos do grupo TNBS tiveram uma grande variação do peso corporal ao longo do experimento, apresentando uma considerável perda de peso, como observado em outros trabalhos que estudaram a colite induzida por TNBS (LEBLANC et al., 2011; ÁVILA-ROMÁN et al., 2017). A perda de peso é um sintoma comum nos indivíduos com DC que é decorrente do comprometimento epitelial, alteração da absorção e secreção de fluídos e eletrólitos e aumento da permeabilidade da mucosa (CHASSAING; DARFEUILLE-MICHAUD, 2011).

O comprimento do cólon apresentou diferença significativa entre os grupos, como esperado pois 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 consequentemente o encurtamento do cólon (FOLIGNÉ et al., 2006).

O grupo TNBS apresentou achados histológicos semelhantes a mucosa intestinal inflamada dos pacientes com DC. O grupo CN apresentou aspecto saudável com toda arquitetura intestinal preservada, e em contraste, no grupo TNBS foi observado lesões

inflamatórias transmuralis que envolvem toda a parede intestinal com infiltração de células imunes, edema da parede intestinal, perda de células caliciformes, e erosões difusas, como também observados por Padua e cols. (2016).

O TNBS entrando em contato com as células epiteliais promove uma inflamação da mucosa, caracterizada por uma infiltração densa de células T e macrófagos em toda parede intestinal (NEURATH et al., 2017; WIRTZ et al., 2017). O infiltrado inflamatório encontrado nas nossas análises foi de células mononucleares e não de neutrófilos, confirmando que nosso modelo induziu uma colite crônica, dado que as células mononucleares, como macrófagos e linfócitos são atuantes na inflamação crônica.

No segundo experimento, desta vez com a inserção dos grupos tratados com as *L. lactis* recombinantes, observamos que os animais dos grupos que receberam as instilações com TNBS/etanol tiveram uma perda de peso considerável, principalmente o grupo LL-F, provavelmente o agravamento da perda de peso se deve ao fato da utilização de *L. lactis* contendo FnBPA, que é uma invasina inflamatória (VELOSO et al., 2013; CHIABAI et al., 2019).

Após o início do tratamento, os animais do grupo LL-FT demonstraram uma recuperação na perda de peso corporal significativa nos dias 24 e 25, comparados ao grupo LL-F. A perda de peso corporal é causada tanto pelos efeitos marcantes do próprio TNBS no intestino (diarreia e, talvez, redução adicional da absorção de líquidos), e também consequência da resposta inflamatória (ANTONIOU et al., 2016), dessa forma o nosso tratamento com (pValac:*anti-TNF α*) demonstrou diminuir essa inflamação local a ponto de melhorar os parâmetros de perda de peso.

O comprimento do cólon é um parâmetro que reflete a inflamação intestinal, ou seja, quanto mais encurtado o cólon, mais inflamado encontra-se o tecido. Os grupos LL-F e TNBS demonstraram um cólon significativamente mais curto comparado ao grupo CN, indicando o grau de inflamação dos animais destes grupos. Estudos mostram que o TNBS causa inflamação grave, manifestada por cólons encurtados, espessados e eritematosos (JEONG et al., 2012). O nosso tratamento com pValac::*anti-TNF α* foi capaz de recuperar o encurtamento do cólon (figura 6), corroborando com os achados obtidos por Chiabai e cols. (2019) utilizando a mesma bactéria em um modelo de colite induzida por DSS.

Outro parâmetro que reflete a inflamação intestinal é o peso do cólon, pois quanto maior o edema e infiltrado inflamatório maior o índice do parâmetro analisado, mas

apenas o grupo TNBS apresentou um aumento significativo no peso do cólon, tal fato pode acontecer devido a resposta individual de cada organismo e/ou tamanho do animal.

Compatível com a literatura, nossas observações realizadas ao longo dos 25 dias de experimento registraram que após dois dias das instilações de TNBS/etanol, os animais começam a apresentar piloereção, diarreia, perda de peso e diminuição dos movimentos, como descritos por Antoniou e cols. (2016), essas características apontam para um agravamento da doença nos animais e ficam mais evidentes após a última instilação, chegando a causar prolapso retal nos animais dos grupos TNBS e LL-F (dados não mostrados).

Com o propósito de analisar o efeito do tratamento com a melhora dos sintomas da colite induzida, foi utilizado o IAD, que é um score macroscópico que pontua consistência das fezes, presença de sangue e perda de peso, ou seja, quanto maior o IAD mais sintomático está o animal e, em teoria, mais inflamação intestinal o animal tem. Desse modo, o IAD mostrou que o grupo LL-FT teve uma melhora estatisticamente significativa, corroborando com os resultados encontrados em relação a recuperação do peso corporal e do comprimento do cólon, observado na figura 10 e 11.

No modelo de colite que reproduzimos, o cólon dos animais não tratados (CN) nas duas regiões estudadas apresentou-se com 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 na região proximal dos animais que receberam LL-FT (Figura 8D e 9D) apresentaram uma recuperação na arquitetura intestinal e manutenção da barreira 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).

A ação do TNF- α se dá a partir da ativação do fator de transcrição NF- κ B, que ativa a transcrição de vários genes envolvidos nas DIIs, inclusive o próprio TNF- α , e quando ativado de forma crônica induz a apoptose das células das criptas intestinais (WONG et al., 2020). Nesse contexto, a melhora nos achados histológicos do grupo que recebeu o tratamento com pValac::*anti-TNF α* está associada com a sobrevivência das

células da lâmina própria, e uma diminuição do infiltrado inflamatório, o mesmo foi observado por Vandenbroucke e cols. (2010) com a administração de nanocorpos anti-TNF α secretados por *L.lactis*. Além disso, Chiabai e cols. (2019) demonstraram que a administração de *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*anti-TNF α*) no modelo de colite por DSS foi capaz de diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias e regular a expressão de TJs, mantendo assim, a integridade da permeabilidade intestinal que impede a translocação de antígenos luminais para a lamina própria e consequentemente a destruição da camada da mucosa.

Na região distal foi observado que os grupos TNBS e LL-F apresentaram achados histológicos semelhantes com os encontrados na região proximal. Por outro lado, a administração de *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*anti-TNF α*) não foi capaz de causar uma melhora significativa nessa região, ainda assim o tratamento apresentou efeito protetor camada muscular externa devido à ausência de edema e preservação das glândulas intestinais.

Observamos que o nosso tratamento é mais eficaz na região proximal, pois o score histológico aponta melhora significativa no grupo de animais tratados com *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*anti-TNF α*). 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 cólon ascendente (proximal). Os efeitos anti-inflamatórios de *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*anti-TNF α*) dependem da sua internalização pelas células epiteliais ou fagocíticas. Logo, quanto mais espesso for a camada de muco, menor a interação e internalização de *L. lactis* (AMIDON; BROWN, DAVE, 2015).

Por fim, é interessante ressaltar que a administração da *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*anti-TNF α*) mesmo não sendo capaz de induzir a cura da colite, foi fundamental para a recuperação dos animais devido à expressão local do fragmento de anticorpo anti-TNF, visto que a administração da *L. lactis* FnBPA ocasionou em alguns parâmetros o agravamento da doença.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio deste trabalho, utilizamos um modelo adaptado de indução da colite experimental crônica com um período de experimentação reduzido comparado aos encontrados na literatura, que foi capaz de desenvolver as características histológicas de tecidos com colite crônica, para que fosse testado o tratamento com uma linhagem de *L. lactis* recombinante carreadora de um vetor de expressão eucariótica para anti-TNF- α .

As terapias anti-TNF- α estão sendo cada vez mais utilizadas no tratamento de DIIs em humanos, o que acarreta também elevados custos aos serviços de saúde e diminuição da qualidade de vida dos pacientes, que sofrem recorrentes efeitos colaterais decorrentes do uso sistêmico destes bloqueadores de anti-TNF- α . Por isso, estratégias baseadas na entrega local por *L. lactis*, que é resistente às grandes variações de pH do trato gastrointestinal, é uma boa estratégia para a produção de anticorpos terapêuticos diretamente no intestino destes pacientes.

Com base nos dados apresentados, podemos observar que o uso da *Lactococcus lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac:anti-TNF α) aparentemente realizou um papel imunomodulador na resposta à inflamação induzida por TNBS, visto que apresentou melhora nos parâmetros macroscópicos e histológicos, podendo ser considerada uma estratégia alternativa para manter o equilíbrio anti-inflamatório e pró-inflamatório do TGI de pessoas afetadas pela DC.

Portanto, essa linhagem demonstrou ser capaz de liberar o plasmídeo em quantidade adequada, de modo que a ORF da proteína scFv anti-TNF- α pudesse ser transcrita, traduzida e secretada pelas células hospedeiras em níveis suficientes para alterar o ambiente intestinal. Apesar disso, é necessário a continuação desse estudo para elucidar os perfis de citocinas e de expressão gênica envolvidas nos mecanismos do modelo experimental e tratamento proposto.

REFERÊNCIAS

AHLUWALIA, B. et al. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 53, n. 4, p. 379–389, 2018.

ALEX P, et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. **Inflamm Bowel Dis**. v.15, n.3, p.341–52, 2009.

AMIDON, Seth; BROWN, Jack E.; DAVE, Vivek S. Colon-targeted oral drug delivery systems: design trends and approaches. **Aaps Pharmscitech**, v. 16, n. 4, p. 731-741, 2015.

ANTONI L., NUDING S., WEHKAMP J., STANGE E. F. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**. v. 20, n.5, p.1165–1179, 2014.

ANTONIOU, E.; MARGONIS, G.A.; ANGELOU, A.; et al. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. **Ann Med Surg (Lond)** v.11, p.9–15, 2016

AVILA-ROMAN, J. et al. Anti-inflammatory effects of an oxylipin-containing lyophilised biomass from a microalga in a murine recurrent colitis model. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 12, p. 2044-2052, 2016.

BAHEY-EL-DIN M.; GAHAN C.G.; GRIFFIN B.T. *Lactococcus lactis* as a cell factory for delivery of therapeutic proteins. **Curr. Gene Ther.** v.10, p. 34-45, 2010.

BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.G. et al. Intranasal administration of recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine Interleukine-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production. **Infect. Immun.** v.71, p.1887–1896, 2003.

BISCHOFF S. C., BARBARA G., BUURMAN W., et al. Intestinal permeability—a new target for disease prevention and therapy. **BMC Gastroenterology**. v.14, n. 19, 2014.

BOLOTIN, A. et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp *lactis* IL1403. **Genome Research**, v. 11, n. 5, p. 731-753, 2001.

BRIGIDO, M.M.; POLYMENIS, M.; STOLLAR, B.D. Role of mouse VH10 and VL gene segments in the specific binding of antibody to Z-DNA, analyzed with recombinant single chain Fv molecules. **J Immunol.** 1993.

BURGESS, C. et al. Riboflavin production in *Lactococcus lactis*: Potential for in situ production of vitamin-enriched foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5769-5777, 2004.

CADER MZ, KASER A. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. **Gut**. V.62, p.1653–1664, 2013.

CHASSAING, B.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**. v.140, n.6, p.1720–1728, 2011

CHIABAI, M. J. et al. Mucosal delivery of *Lactococcus lactis* carrying an anti-TNF scFv expression vector ameliorates experimental colitis in mice. p. 1–12, 2019.

CHUDY-ONWUGAJE, K. O.; CHRISTIAN, K. E.; FARRAYE, F. A.; CROSS, R. K. A State-of-the-Art Review of New and Emerging Therapies for the Treatment of IBD. **Inflamm Bowel Dis**. 2018.

COLCHER, D. et al. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies. **Quarterly Journal of Nuclear Medicine**, v. 42, n. 4, p. 225-241, 1998.

COOPER HS, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. **Lab Invest**. v.69, n.2, p.238–49, 1993.

CORRIDONI, D.; ARSENEAU, K. O.; COMINELLI, F. Inflammatory bowel disease. **Immunology Letters**, p. 1–5, 2014.

COSKUN M. Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease. **Frontiers in Medicine**. v. 1, 2014

COURVALIN P, GOUSSARD S, GRILLOT-COURVALIN C. Gene transfer from bacteria to mammalian cells. **C R Acad Sci III**. 1995.

DA SILVA, M.S.; SANCHEZ-FIDALGO, S., TALERO, E., CARDENO, A., DA SILVA, M.A., VILLEGAS, W., SOUZA BRITO, A.R., DE LA LASTRA, C.A. Anti-inflammatory intestinal activity of *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes in TNBS colitis model. **J. Ethnopharmacol**. v.128, n.2, p.467-475, 2010.

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, DEL CARMEN S, ZURITA-TURK M, SANTOS ROCHA C, VAN DE GUCHTE M, AZEVEDO V, et al. Importance of IL-10 Modulation by Probiotic Microorganisms in Gastrointestinal Inflammatory Diseases. **ISRN Gastroenterol**. v.2011, p.1–11, 2011.

DE ZOETEN, E. F.; PASTERNAK, B. A.; MATTEI, P.; KRAMER, R. E.; KADER, H. Diagnosis and treatment of perianal Crohn disease: NASPGHAN clinical report and consensus statement. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**. v.57, n.3, p. 401–412. 2013

DREESEN E, VAN STAPPEN T, BALLEET V, PEETERS M, COMPERNOLLE G, TOPS S, et al. Antiinfluximab antibody concentrations can guide treatment intensification in patients with Crohn's disease who lose clinical response. **Aliment Pharmacol Ther**. 2018.

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.

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, 2018.

GASSON, M.J. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. **J Bacteriol.**v.154, p.1-9, 1983.

GEREMIA A., BIANCHERI P., ALLAN P., CORAZZA G.R., DI SABATINO A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmun Rev.** v.13, p.3–10, 2014.

GUBERNATOROVA E.O., TUMANOV A.V. Tumor necrosis factor and lymphotoxin in regulation of intestinal inflammation. **Biochem.** v.81, p.1309–25, 2016

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 Infect,** v. 7, n. 5-6, p. 836-44, 2005.

GUIMARAES, V.; INNOCENTIN, S.; CHATEL, J.M.; LEFEVRE, F.; LANGELLA, P.; AZEVEDO, V.; et al. A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. **Genet Vaccines Ther.** v.7, p.1–7, 2009.

GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D.M.; SEDER, R.A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. **Ann. Rev. Immunol.** v.18, p.927–974, 2000.

HANNIFFY, S. B. et al. Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection. **Journal of Infectious Diseases,** v. 195, n. 2, p. 185-193, 2007.

HAYDEN, M. S.; GILLILAND, L. K.; LEDBETTER, J. A. Antibody engineering. **Current Opinion in Immunology,** v. 9, n. 2, p. 201-212, 1997.

HOLLERAN, G.; LOPETUSO, L., PETITO V., GRAZIANI C., IANIRO G., MCNAMARA D., GASBARRINI A., SCALDAFERRI F. The Innate and Adaptive Immune System as Targets for Biologic Therapies in Inflammatory Bowel Disease. **Int. J. Mol. Sci.** v.18, p.2020, 2017.

INNOCENTIN, S.; GUIMARAES, V.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; LANGELLA, P.; CHATEL, J.M.; 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. **Appl Environ Microbiol.** v.75, p.4870–8, 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

JEONG, J. J. J. S. E. E. A. Kalopanaxsaponin B Ameliorates TNBS-Induced Colitis in Mice. **Biomolecules & Therapeutics,** p. 457-462, 2012.

JONES-HALL YL, GRISHAM MB. Immunopathological characterization of selected mouse models of inflammatory bowel disease: Comparison to human disease. **Pathophysiology.** v. 21, n.4, p.267–88, 2014.

KAPLAN G.G. The global burden of IBD: From 2015 to 2025. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.** v.12, p.720–727, 2015.

KAPLON H, REICHERT JM. Antibodies to watch in 2018. **MAbs**. v.10, p.183–203, 2018.

KASER A., ZEISSIG S., BLUMBERG R.S. Inflammatory bowel disease. **Annu Rev Immunol**. v.28, p.573–621, 2010.

KITAJIMA S, et al. Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IQI/Jic mice. **Exp Anim**. v.50, n.5, p.387–95, 2001.

KITAJIMA S, TAKUMA S, MORIMOTO M. Tissue distribution of dextran sulfate sodium (DSS) in the acute phase of murine DSS-induced colitis. **J Vet Med Sci**. v. 61, n.1, p.67–70, 1999

KLAENHAMMER, T. R. et al. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. **Fems Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 393-409, 2005.

KOCH S., NUSRAT A. The life and death of epithelia during inflammation: Lessons learned from the gut. **Annu. Rev. Pathol**. v.7, p.35–60, 2012.

KWON, S. et al. High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell-recycle bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 73, n. 1, p. 25-34, 2001.

LE LOIR, Y. et al. Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. **Microbial Cell Factories**, v. 4, p. 13, 2005.

LEROY, F.; DE VUYST, L. *L. lactis* acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.

MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 6, p. 478-485, 2004.

MERCENIER, A.; MÜLLER-ALOUF, H.; GRANGETTE, C. Lactic acid bacteria as live vaccines. **Curr Issues Mol Biol**, v. 2, n. 1, p. 17-25, 2000.

MICHIELAN, A.; D'INCÀ, R. Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. **Mediators Inflamm**. 2015.

MORRISON, S. L. et al. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 21, p. 6851-5, 1984.

NEURATH M.F., et al. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **J Exp Med**. v.182, n.5, p. 1281–90, 1995.

NEURATH, M. F. Current and emergind therapeutics targets for IBD. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, p. 269-278, 2017.

NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 329-342, 2014

NEURATH, M.F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nat Rev Immunol**. 2017.

NEUTRA, M.R.; KOZLOWSKI, P.A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. **Nat Rev. Immunol**. v.6, p.148-158, 2006.

NOUAILLE, S. et al. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. **Genet Mol Res**, v. 2, n. 1, p. 102-11, 2003.

OKAYASU I, HATAKEYAMA S, YAMADA M, OHKUSA T, INAGAKI Y, NAKAYA R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**. v.98, p.694–702, 1990.

OLESEN C.M., COSKUN M., PEYRIN-BIROULET L., NIELSEN O.H. Mechanisms behind efficacy of tumor necrosis factor inhibitors in inflammatory bowel diseases. **Pharmacol. Ther.** v.159, p.110–119, 2016.

PADUA, D. et al., The role of neuropeptides in mouse of colitis. **Journal of Molecular Neurosciente**. v. 59, n.2, p. 203-210, 2016.

PARK, J. H. et al. **IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules**Autoimmunity Reviews, 2017.

PODOLSKY D.K. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**.n.347, p.417–29, 2002.

PONDER, A.; LONG, M. D. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. **Clinical epidemiology**, v. 5, p. 237, 2013.

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.

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.

REICHERT, J. M. Antibody-based therapeutics to watch in 2011. **MAbs**, v. 3, p. 76-99, 2011.

REID, G. et al. Potential uses of Probiotics in clinical practice. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 658, 2003.

ROHR, M. et al. Inflammatory Diseases of the Gut. v. 21, n. 2, p. 1–14, 2018.

SADLER, T. et al. Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression defines molecular characteristics of Crohn's disease-associated fibrosis. **Clinical**

Epigenetics, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2016.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; ROMERO-CALVO, I.; MASCARAQUE, C.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O. Intestinal Inflammation and Mucosal Barrier Function. **Inflamm Bowel Dis**, v.20, n.12, p. 2394-2404, 2014.

SANDERS, M. E. Probiotics: Considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.

SCHAFFNER W. Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci**.1980.

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.

SCHOULTZ, I.; KEITA, A. V. Cellular and molecular therapeutic targets in inflammatory bowel disease – focusing on intestinal barrier function. **Cells**. v.8, n.2, p.193, 2019.

SCOTT CROWE J, ROBERTS KJ, CARLTON TM, MAGGIORE L, CUBITT MF, CLARE S, ET AL. Preclinical Development of a Novel, Orally-Administered Anti-Tumour Necrosis Factor Domain Antibody for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. **Sci Rep**. 2018.

SILVERBERG M.S., et al. Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. **Nat Genet**. v.41, p.216–220, 2009.

SOUZA, B. M. et al. *Lactococcus lactis* carrying the pValac eukaryotic expression vector coding for IL-4 reduces chemically-induced intestinal inflammation by increasing the levels of IL-10-producing regulatory cells. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–18, 2016.

STEIDLER, L. et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. **Science**, v. 289, n. 5483, p. 1352-1355, 2000.

STREMMEL W, GAUSS A. Lecithin as a therapeutic agent in ulcerative colitis. **Dig Dis**. v.31, p.388–390, 2013.

SUENAERT P., BULTEEL V., LEMMENS L., et al. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. **American Journal of Gastroenterology**. v. 97, n.8, p.2000–2004, 2002.

VAN DER FLIER LG, CLEVERS H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. **Annu Rev Physiol**. v.71, p.241–260, 2009.

VAN DER SLUIS M., et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. **Gastroenterology**. v.131, p.117–129, 2006.

VELOSO, T.R.; CHAOUCH, A.; ROGER. T.; GIDDEY, M.; VOUILLAMOZ, J.; MAJCHERCZYK,P.; 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. **Infect Immun.** 2013.

WALLACE, K. L.; ZHENG L-B, KANAZAWA Y, SHIH DQ et al. Immunopathology of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol.**v. 20, n. 1, p. 6–21, 2014.

WEHKAMP J., HARDER J., WEICHENTHAL M., 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.

WELLS, J. Mucosal vaccination and therapy with genetically modified lactic acid bacteria. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.** v.2, p. 423-445, 2011.

WELMAN, A. D.; MADDOX, I. S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. **Trends in Biotechnology,** v. 21, n. 6, p. 269-274, 2003.

WIRTZ S, NEUFERT C, WEIGMANN B, NEURATH MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* 2017.

WONG, Jerry et al. RIPK1 mediates TNF-induced intestinal crypt apoptosis during chronic NF- κ B activation. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology,** v. 9, n. 2, p. 295-312, 2020.

WU, A. M.; YAZAKI, P. J. Designer genes: recombinant antibody fragments for biological imaging. **Quarterly Journal of Nuclear Medicine,** v. 44, n. 3, p. 268-283, 2000.

XIONG, Y. et al., Myosin light chain kinase: a potential target for treatment of inflammatory diseases. **Frontiers in pharmacology.** v.8, p.292, 2017.

ZHANG, J. et al. Associations between STAT3 rs744166 Polymorphisms and Susceptibility to Ulcerative Colitis and Crohn ' s Disease : A Meta-Analysis. v. 9, n. 10, 2014.

ZHOU W, HUANG Y, LAI J, LU J, FEELY M, LIU X. Anti-Inflammatory Biologics and Anti-Tumoral Immune Therapies-Associated Colitis: A Focused Review of Literature. **Gastroenterol Res** 2018.

ZURITA-TURK M, DEL CARMEN S, SANTOS ACG, PEREIRA VB, CARA DC, LECLERCQ SY, et al. *Lactococcus lactis* carrying the pValac DNA expression vector coding for IL-10 reduces inflammation in a murine model of experimental colitis. **BMC Biotechnol.** v. 14, n. 1, p. 73, 2014.