



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

**ANÁLISE COMPARATIVA DE MODELOS DE INDUÇÃO
DE COLITE POR TNBS EM ANIMAIS TRATADOS COM
LACTOCOCCUS LACTIS FNBPA+ (PVALAC:ANTI-TNF-A)**

CHRISTIANNE EMMANUELLE ANDRADE PIRES BRILHANTE

Orientadora: Juliana Franco Almeida

JOÃO PESSOA - PB

2018

CHRISTIANNE EMMANUELLE ANDRADE PIRES BRILHANTE

Análise comparativa de modelos de indução de colite por TNBS em animais tratados com *Lactococcus lactis* FnBPA+ (pValac:anti-TNF- α)

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Superior em Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Juliana Franco Almeida

JOÃO PESSOA - PB

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B857a Brilhante, Christianne Emmanuelle Andrade Pires.
Análise comparativa de modelos de indução de colite por
TNBS em animais tratados com Lactococcus lactis FnBPA+
(pValac:anti-TNF-a) / Christianne Emmanuelle Andrade
Pires Brilhante. - João Pessoa, 2018.
66 f. : il.

Orientação: Juliana Franco Almeida Almeida.
Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Doença de Crohn. 2. Lactococcus Lactis. 3.
Anticorpos Monoclonais. 4. Fator de Necrose Tumoral
Alfa (TNF-a). I. Almeida, Juliana Franco Almeida. II.
Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos trinta e um dias do mês de outubro de 2018, às 16:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professora Dra. Juliana Franco Almeida e composta pelos avaliadores: 1. Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves (CCS/UFPB); 2. Profa. Dra. Daniela Santos Pontes (DCB/UEPB), a discente Christianne Emmanuelle Andrade Pires Brilhante, matrícula 11312736, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“Análise comparativa de modelos de indução de colite por TNBS em animais tratados com Lactococcus lactis FnBPA+ (pValac:anti-TNF-a)”**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a discente e demais presentes e eu, Juliana Franco Almeida, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.

Juliana Franco Almeida
Presidente da Banca Examinadora

José Luiz de Brito Alves
Avaliador 1

Christianne E A P Brilhante
Discente

Daniela Santos Pontes
Avaliador 2

João Pessoa/PB, 31 de outubro de 2018.

Dedico este trabalho à minha família, pois em cada parte de mim existe uma parte deles.

Agradecimentos

À Deus, por ter me permitido completar mais esta fase da minha vida, sempre me dando coragem e força pra vencer todas as dificuldades, até quando não parecem ter mais solução. Agradeço pelas bênçãos que recaíram, não só em mim, mas também sobre todos que amo.

À UFPB e a cada membro do corpo docente, administração e direção desta instituição, que me recebeu de braços abertos e me proporcionou dias de muita aprendizagem em um ambiente de estudo agradável.

Ao Centro de Biotecnologia, que foi minha segunda casa por todos estes anos e às pessoas com quem convivi neste espaço ao longo desses anos.

À todos os professores que passaram pela minha jornada nesta universidade, por toda dedicação e amor que vocês colocam em cada aula. Vocês contribuíram não só para minha formação acadêmica, mas também na minha formação pessoal e do meu caráter.

À professora Sildivane Valcácia Silva, à quem eu gostaria de deixar registrado um agradecimento especial. Você é muito mais do que uma professora para mim. O carinho e respeito que sinto por você ultrapassa as barreiras desta vida. Você é pra mim um exemplo de profissional e ser humano. Obrigada por todas as conversas, conselhos e por todos os conhecimentos compartilhados comigo desde o primeiro dia.

Ao Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA) por todo suporte oferecido para realização deste trabalho. E um agradecimento especial à todos que fazem parte desse time, e que de alguma forma estiveram presentes na minha vida, contribuindo com um sorriso, palavras de conforto, risadas e energias positivas.

Aos colaboradores da Universidade de Brasília, pela disponibilização das linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho e que foram de suma importância para realização deste estudo.

À minha orientadora, Juliana Franco Almeida, pela oportunidade e suporte para realização deste trabalho. Obrigada por toda paciência e confiança que você teve comigo ao longo deste último ano. Você me inspira a ser uma profissional melhor a cada dia.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite e pelo tempo dedicado à leitura deste trabalho.

À Giovana Viana, por todo apoio, carinho e dedicação. Sem você os dias no laboratório não eram os mesmos, afinal, com quem mais eu iria jogar conversa fora e morrer de rir entre um experimento e outro?! Você só me fez ter mais certeza de que, independente da área de estudo ou trabalho, ter uma equipe que te faz bem é o essencial.

À todos os familiares, que acompanham meu percurso ao longo da vida, obrigada pela torcida, orações e apoio.

À minha mãe, Severina de Andrade Pires, por nunca ter medido esforços na realização

dos meus sonhos. Você me mostrou desde cedo o que é ser uma mulher forte e guerreira. Ao mesmo tempo que me ensinou que é possível ser estas duas coisas e ainda ser amorosa, carinhosa, divertida, alegre e engraçada. Se hoje posso dizer que tenho alguma destas qualidades, foi porque primeiro as vi em você.

Ao meu pai, Edvaldo Brilhante da Silva Filho, por sempre acreditar em mim e por, apesar de todas as dificuldades, se fez presente na minha vida. Você é um exemplo de dedicação, inteligência, alegria e alto astral.

Aos meus irmãos, Nadezhda Brilhante e Jonathan Brilhante, que são os meus melhores amigos e estão sempre ao meu lado nos dias bons e dias não tão bons assim. Obrigada pelo apoio e força nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Por fim, quero expressar minha mais pura gratidão à todos que de alguma forma fizeram parte da minha formação e crescimento pessoal, o meu muito obrigada.

“If you can dream it, you can do it.” - Walt Disney

Resumo

As Doenças Inflamatórias Intestinais (*Inflammatory Bowel Diseases*, IBD) são um grupo de doenças crônicas que acometem o trato gastrointestinal (TGI). Duas doenças estão compreendidas no grupo das IBDs, são elas: a doença de Crohn (*Crohn's disease*, CD) e a colite ulcerativa (*Ulcerative Colitis*, UC). A etiologia destas doenças não é completamente conhecida. Todavia, sabe-se que a patogênese das IBDs está relacionada a fatores genéticos, ambientais e alterações na microbiota intestinal. A doença de Crohn é caracterizada por uma inflamação transmural, níveis altos do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e destruição da mucosa intestinal, afetando principalmente a região terminal do íleo, ceco, cólon e região perianal. A CD não tem cura e os tratamentos tradicionais visam o controle dos sintomas. Neste contexto, o desenvolvimento de novas estratégias e agentes terapêuticos para combater as IBDs é essencial. A utilização de anticorpos monoclonais (mAbs) na terapêutica das IBDs têm crescido expressivamente na última década, mostrando ótimos resultados em ambas CD e UC. Todavia, quando analisadas em escala industrial, a produção, e principalmente as etapas de purificação destes anticorpos, são processos caros e complexos. As bactérias ácido lácticas, destacando a *Lactococcus lactis*, são micro-organismos seguros para uso em humanos. Além da sua função probiótica, elas atuam na produção de proteínas recombinantes exógenas, como também na entrega destas às mucosas intestinais. Neste trabalho utilizou-se uma linhagem invasiva de *Lactococcus lactis* capaz de entregar um plasmídeo que codifica o fragmento de anticorpo anti-TNF- α . O objetivo deste estudo foi comparar dois modelos de indução da colite pelo ácido 2,4,6- trinitrobenzenosulfônico (TNBS) (modelos simultâneo e fracionado) a partir de dados de peso dos animais e comprimento do cólon dos grupos saudáveis, doentes e tratados com a linhagem de *Lactococcus Lactis* FnBPA+ (pValac:anti-TNF- α). Visando determinar se a alteração no número e da distribuição dos grupos no protocolo de indução da colite levaria a resultados diferentes. Foram utilizados camundongos Balb/C, fêmeas, com indução da colite pelo TNBS. Foi feita inicialmente uma sensibilização com TNBS 1% e um Mix de acetona:azeite (4:1) seguida de 3 aplicações de TNBS 5%. O protocolo têm uma duração de 25 dias e a cultura de *L. lactis* foi administrada pela via oral entre os dias 19 e 23. Após eutanásia, foi feita a retirada e medida do cólon. Observou-se que a média do peso entre os dois modelos analisados não se alterou. Quanto ao comprimento do cólon, observou-se uma diferença entre a média de comprimento entre os dois modelos, em que o modelo fracionado de indução da colite por TNBS apresentou resultados mais próximos ao esperado neste protocolo. Não houve diferenças negativas entre os dois modelos de indução da colite por TNBS (simultâneo e fracionado) quanto à variação do peso e comprimento do cólon dos animais. Com esses resultados, conclui-se que o modelo de indução fracionado pode ser utilizado para estudo da doença de Crohn.

Palavras-chave: Doença de Crohn; *Lactococcus Lactis*; Anticorpos Monoclonais; Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α).

Abstract

Inflammatory Bowel Diseases (IBD) is a group of chronic diseases that affect the gastrointestinal tract (GIT). Two diseases are included in the IBD group, they are: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). The etiology of these diseases is not fully known. However, it is known that the pathogenesis of IBDs is related to genetic and environmental factors, added to intestinal microbiota changes. Crohn's disease (CD) is characterized by transmural inflammation, high levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and destruction of the intestinal mucosa, affecting mainly the terminal region of the ileum, cecum, colon and perianal region. CD has no cure and traditional treatments aim the symptoms control. In this context, the development of new strategies and therapeutic agents for IBDs is essential. The use of monoclonal antibodies (mAbs) in the treatment of IBDs has grown significantly in the last decade, showing excellent results in both CD and UC. However, when analyzed on an industrial scale, the production, and mostly the purification steps of these antibodies, are expensive and complex processes. Lactic acid bacteria, specially *Lactococcus lactis*, are safe microorganisms to use in humans. Besides their probiotic function, they act in the production of exogenous recombinant proteins, as well as in the delivery of these proteins to intestinal mucosa. In this work we used an invasive *Lactococcus lactis* lineage capable of delivering a plasmid encoding the anti-TNF- α antibody fragment. The objective of this study was compare two models of colitis induction by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) (simultaneous and fractional's model) from animal weight data and colonic length of groups healthy, and treated with the *Lactococcus Lactis* FnBPA + (pValac: anti-TNF- α) lineage. The aim was to determine whether the change in number and distribution of the groups in the colitis induction protocol would lead to different results. Female Balb/C mice were used with colitis disease induction with TNBS. Sensibilization was initially done with 1% TNBS and a mixture of acetone: olive oil (4: 1) followed by 3 applications of 5% TNBS. The protocol lasted 25 days and the *L. lactis* culture was orally administered between days 19 and 23. After euthanasia, the colon was removed and measured. It was observed that the weight average of the animals did not change between the two models analyzed. Regarding to colonic length, it was observed a difference between the mean length in the two models, in which the fractional TNBS colitis induction model presented results closer to those expected for this protocol. There weren't any negative differences between the two models of TNBS colitis induction (simultaneous and fractional) as to the weight variation and colon's length of the animals. With these results, it can be concluded that the fractionated induction model can be used for the study of Crohn's disease.

Palavras-chave: Crohn's disease; *Lactococcus Lactis*; Monoclonal Antibodies; Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α).

Lista de ilustrações

Figura 1 – Estrutura do plasmídeo pValac	33
Figura 2 – Cronograma da indução da colite por TNBS e tratamento com bactérias . . .	37
Figura 3 – Variação do peso dos animais no protocolo simultâneo de indução de colite por TNBS	44
Figura 4 – Variação do peso dos animais no protocolo fracionado de indução de colite por TNBS	46
Figura 5 – Variação do peso dos animais entre os dias 19 e 24 no protocolo simultâneo de indução de colite por TNBS	47
Figura 6 – Variação do peso dos animais entre os dias 19 e 24 no protocolo fracionado de indução da colite por TNBS	47
Figura 7 – Comprimento do cólon no protocolo simultâneo de indução de colite por TNBS	48
Figura 8 – Comprimento do cólon no protocolo fracionado de indução da colite por TNBS	49

Lista de tabelas

Tabela 1 – Composição das soluções utilizadas na 1 ^a indução	38
Tabela 2 – Composição das soluções utilizadas na 2 ^a indução	39
Tabela 3 – Composição das soluções utilizadas na 3 ^a indução	39
Tabela 4 – Cronograma do protocolo fracionado de indução da colite por TNBS para o grupo Controle	40
Tabela 5 – Cronograma do protocolo fracionado de indução da colite por TNBS para o grupo TNBS	41
Tabela 6 – Cronograma do protocolo fracionado de indução da colite por TNBS para o grupo tratamento anti-TNF- α	42

Lista de abreviaturas e siglas

ANOVA	Análise de Variância
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BAL	Bactérias Ácido Láticas
BGH	Hormônio Bovino de Crescimento
°C	Graus Célsius
CD	Doença de Crohn
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSS	Sulfato de Sódio Dextrano
Ery	Eritromicina
FnBPA	Proteína de Ligação a Fibronectina
GRAS	Generally Recognized As Safe
GWAS	Genome-wide Association Study
IBD	Doenças Inflamatórias Intestinais
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular 1
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon-Gama
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina-17
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6

IL-8	Interleucina 8
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MCS	Sítio de Clonagem Múltipla
MDP	Muramil Dipeptídeo
PBS	Solução tampão fosfato-salina
pCMV	Promotor do Citomegalovirus
Poli-A	Sequencia Sinal de Poliadenilacao
pValac	Vacinação Usando Bactérias Ácido Lácticas
RNA	Ácido Ribonucleico
TGI	Trato Gastrointestinal
Th	T auxiliar
TLR	Receptores do tipo Toll
TNBS	Acido Trinitro Benzeno Sulfonico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Treg	Células T Regulatórias
UC	Colite Ulcerativa
UFC	Unidades Formadores de Colônia
USDA	United States Department of Agriculture

Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Microbiota Intestinal	17
2.2	Doenças Inflamatórias Intestinais	18
2.3	Fatores Genéticos das IBDs	20
2.4	Fatores Ambientais das IBDs	22
2.5	Modelos Animais Experimentais	22
2.6	Resposta Imune nas IBDs	24
2.6.1	TNF- α	26
2.7	Tratamentos das IBDs	28
2.8	Bactérias Lácticas	30
2.8.1	<i>Lactococcus lactis</i>	31
3	Objetivos	35
3.1	Objetivo Geral	35
3.2	Objetivos Específicos	35
4	METODOLOGIA	36
4.1	Animais	36
4.2	Linhagem Bacteriana	36
4.3	Preparação das Bactérias	36
4.4	Grupos Experimentais	36
4.5	Indução da colite por TNBS	37
4.5.1	Protocolo simultâneo de indução da colite por TNBS	37
4.5.2	Protocolo fracionado de indução da colite por TNBS	39
4.6	Tratamento	42
4.7	Retirada do Cólon	42
4.8	Análises Estatísticas	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Peso dos animais	44
5.2	Comprimento do cólon	48
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
	Referências	51

1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (*Inflammatory Bowel Disease*, IBD) são consideradas inflamações crônicas e remitentes que acometem o trato gastrointestinal. Duas doenças estão compreendidas no grupo das IBDs, que são: a doença de Crohn e a colite ulcerativa (STROBER; FUSS; MANNON, 2007). Seus sintomas apresentam-se de forma recidiva e podem variar de acordo com a gravidade e local da inflamação. Vários fatores, entre eles genéticos e ambientais, atuam no agravamento das doenças, no entanto, não é apresentada uma patogênese completamente elucidada para as IBDs (ANANTHAKRISHNAN et al., 2017).

A doença de Crohn (*Crohn's Disease*, CD) é caracterizada pela inflamação crônica intestinal que acomete principalmente a região terminal do íleo e o cólon, mas pode afetar outras partes do sistema digestório, desde a boca ao ânus. Surge tipicamente entre os 15 e 30 anos, mas pode aparecer em qualquer faixa etária. Na CD encontram-se níveis altos do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), esta citocina pró-inflamatória é fundamental na regulação do processo inflamatório nas IBDs. Os medicamentos utilizados no tratamento da CD têm como foco a diminuição e regulação do processo inflamatório na região, além de diminuir os sintomas e prevenir as recidivas (HA; KHALIL, 2015a).

Um dos medicamentos imunossupressores utilizados para a CD é o infliximabe, encontrado no mercado na forma de solução para uso injetável. Ele é um anticorpo monoclonal quimérico humano-murino que possui alta afinidade ao TNF- α , e quando ligado a este, forma um complexo estável e impede a ação do mesmo. Ou seja, atua como um bloqueador do TNF- α para que a inflamação seja reduzida (POGGIOLI et al., 2008).

Os anticorpos monoclonais (mAbs) são produzidos em sua maioria de forma recombinante em células eucarióticas, onde passam por etapas de produção e purificação. O produto final é sempre uma solução injetável que deve ser aplicada pela via intravenosa. Além de ser um método invasivo, a aplicação deve ser feita em hospitais e de maneira lenta (SHUKLA; THÖMMES, 2010).

Propõe-se então, que estes anticorpos monoclonais ou seus fragmentos sejam produzidos em bactérias, em especial, pela espécie *Lactococcus lactis*, que pertence ao grupo de bactérias ácido-láticas (BAL). As BALs são micro-organismos que têm como principal característica a conversão de açúcares, em especial as hexoses, em ácido lático. O amplo conhecimento do seu material genético, assim como técnicas de edição gênica, nos permite manipular e desenvolver linhagens recombinantes. Sua utilização em processos industriais já é feita de forma ampla, onde atuam como biofábricas na indústria de alimentos e de biofármacos. São de fácil manipulação, pouco imunogênicas e reconhecidas como seguras para uso em humanos, pois possuem o *status* GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (MAKAROVA; KOONIN, 2007).

Apesar da existência de métodos que permitem a introdução dos genes que codificam

para os anticorpos monoclonais eucarióticos na célula do hospedeiro, a expressão de genes eucarióticos é limitada nas bactérias de uma maneira geral. Isto se dá, pois, elas não possuem uma maquinaria celular capaz de fazer o processamento e as modificações pós-traducionais necessárias à expressão destes genes. Todavia, elas são capazes de entregar o produto, que geralmente é uma proteína recombinante, diretamente às mucosas presentes no organismo. As BALs, neste caso, estão sendo utilizadas como vetores, carreando plasmídeos que contêm a informação necessária para produção da sua molécula de interesse em células eucarióticas, para que esta seja então produzida pelas próprias células eucarióticas do organismo (CANO-GARRIDO; SERAS-FRANZOSO; GARCIA-FRUITÓS, 2015).

Para que as bactérias lácticas sejam internalizadas pelas células do organismo, foi proposta a utilização da linhagem invasiva *L. lactis* que expressa a proteína ligante de fibronectina A (FnBPA) (PONTES et al., 2012). Esta característica de ser invasiva não é comum para este grupo das bactérias. A FnBPA atua como uma adesina, que está localizada na superfície externa da célula ligando-se às moléculas de fibronectina e fibrinogênio, e também como invasina, facilitando os processos de internalização dessas células (QUE et al., 2001).

Em trabalhos anteriores as linhagens, contendo os genes dos fragmentos anti-TNF- α e anti-IL-1- β , foram capazes de interferir no processo inflamatório no intestino, diminuindo-o, melhorando assim o quadro clínico como também a estrutura anatômica deste órgão (FRANÇA, 2018; TAVARES, 2018).

Devido ao número limitado de animais e falta de estrutura laboratorial para realização dos experimentos conforme o protocolo simultâneo de indução da colite por TNBS, foram necessárias modificações no protocolo de indução. A maior diferença entre os experimentos é a distribuição dos grupos no período de indução. Ao invés de todos os animais de um grupo serem manipulados no mesmo dia, eles foram subdivididos em dias diferentes, para que em cada dia apenas dois animais fossem manipulados.

A hipótese deste trabalho é que, apesar da modificação na distribuição dos animais durante o processo de indução da colite, não resulte em diferença quanto à variação do peso e comprimento do cólon entre os animais dos dois protocolos murinos de indução da colite por TNBS (simultâneo e fracionado).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar uma análise comparativa entre os dois modelos de indução da colite por TNBS (simultâneo e fracionado) a partir de dados de peso dos animais e comprimento do cólon dos grupos saudáveis, doentes e tratados com a linhagem de *Lactococcus lactis* FnBPA+ (pValac:anti-TNF- α).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiota Intestinal

O trato gastrointestinal (TGI) humano representa uma das maiores interfaces de comunicação entre o organismo e o meio externo (250–400m²). É o principal local pelo qual o organismo entra em contato com fatores ambientais e antígenos externos (BENGMARK, 1998). Nele estão presentes vírus, fungos e bactérias, estas últimas compreendem, em sua maioria, espécies novas e que ainda não foram cultivadas em laboratório (ECKBURG et al., 2005). Estima-se que apenas 20-30% da microbiota intestinal é passível de ser cultivada em laboratório (ZHANG; LI, 2014).

A microbiota intestinal humana é formada por aproximadamente 1150 espécies bacterianas principais e cada indivíduo pode apresentar cerca de 160 destas espécies (QIN et al., 2010). Vários estudos feitos a partir do gene que codifica o RNA ribossomal 16S relatam a diversidade de espécies dentro de um mesmo indivíduo, como também entre indivíduos diferentes (HAYASHI; SAKAMOTO; BENNO, 2002). A microbiota é estabelecida a partir do nascimento e tende a se manter estável após os três anos de idade. A colonização do TGI de recém nascidos está diretamente relacionada a fatores como o tipo de parto, amamentação, genética e uso de antibióticos durante a gestação (YATSUNENKO et al., 2012; HOUGHTLING; WALKER, 2014).

Inicialmente, o número estimado de micro-organismos no TGI de um adulto era de 10¹⁴. Este valor excedia em 10 vezes o número de células que compõem o corpo humano (GILL et al., 2006). Contudo, um estudo recente afirma que o número de bactérias se encontram numa proporção de 1:1 em relação ao número de células humanas no organismo (SENDER; FUCHS; MILO, 2016).

Em condições normais, a microbiota intestinal saudável se encontra numa relação simbiótica com o hospedeiro. Esta relação é caracterizada pelo benefício mútuo dos envolvidos (BÄCKHED et al., 2005). Algumas das funções da microbiota que promovem o bem-estar do hospedeiro são: (i) modulação da barreira intestinal (NATIVIDAD; VERDU, 2012); (ii) digestão dos alimentos e metabolismo energético do hospedeiro (BESTEN et al., 2013); (iii) proteção contra patógenos (BÄUMLER; SPERANDIO, 2016); e (iv) regulação do sistema imune (GENSOLLEN et al., 2016).

A disfunção na interação entre a microbiota intestinal e o sistema imunológico do hospedeiro caracteriza um processo conhecido como disbiose. Ele pode ser causado por antígenos, micro-organismos patogênicos, agentes químicos ou radiações. Neste contexto, a composição, atividade metabólica e localização da microbiota do hospedeiro encontram-se alteradas. Com isso, alguns micro-organismos patogênicos podem colonizar o intestino, provocando diversas categorias de distúrbios (CHANG; LIN, 2016).

As disfunções intestinais estão diretamente relacionadas às doenças gastrointestinais, en-

tre elas estão as doenças inflamatórias intestinais (ROUND; MAZMANIAN, 2009). Diversos estudos já foram realizados de modo a analisar a composição da microbiota intestinal, em segmentos inflamados e não inflamados do intestino, de pacientes com a doença de Crohn e colite ulcerativa. Os pacientes afetados por estas doenças apresentavam uma microbiota significativamente diminuída, instável e menos diversa em relação aos adultos saudáveis (JOOSSENS et al., 2011; ANDOH et al., 2011).

2.2 Doenças Inflamatórias Intestinais

As doenças inflamatórias intestinais (IBD, do inglês, *Inflammatory Bowel Disease*) são inflamações crônicas do trato gastrointestinal (TGI). Duas doenças estão compreendidas no grupo das IBDs, são elas: a Doença de Crohn (CD, do inglês, *Crohn's Disease*) e a colite ulcerativa (UC, do inglês, *Ulcerative Colitis*). Seus sintomas apresentam-se de forma recidiva e podem variar de acordo com a gravidade e local da inflamação (STROBER; FUSS; MANNON, 2007). A patogênese destas doenças ainda não está completamente elucidada, contudo, diversos estudos epidemiológicos e genéticos demonstram a importância da microbiota, fatores genéticos e ambientais na influência do surgimento e gravidade das IBDs (ABRAHAM; CHO, 2009; ANANTHAKRISHNAN et al., 2017).

As IBDs afetam cerca de 1.5 milhões de americanos, 2.2 milhões de europeus e outras milhares de pessoas ao redor do mundo, sendo considerada hoje um problema de saúde pública mundial (ANANTHAKRISHNAN, 2015). A idade média para o aparecimento da doença de Crohn é entre os 20-30 anos, enquanto para colite ulcerativa é entre os 30-40 anos, porém estas doenças também podem aparecer em crianças. Os casos de IBD pediátrica abrangem 7% a 20% do total de casos de IBDs (COSNES et al., 2011).

A incidência é tradicionalmente maior na América do Norte e no Oeste Europeu, contudo, as IBDs mostram um rápido crescimento na África, Ásia e América do Sul, incluindo o Brasil. A partir de 1990 indentificou-se este aumento na incidência de continentes e países em desenvolvimento e em processo de industrialização (NG et al., 2017) (ANANTHAKRISHNAN, 2015).

Num processo inflamatório normal os antígenos presentes no lúmen desencadeiam uma resposta inflamatória controlada que rapidamente desaparece após a erradicação do patógeno. Nas IBDs, em contrapartida, ocorre um desbalanço no processo inflamatório, resultando em um estado crônico de inflamação (PODOLSKY, 2002).

A combinação de fatores genéticos e ambientais inicia alterações na função da barreira epitelial, permitindo que micro-organismos e antígenos migrem do lúmen para a parede do intestino. Caso o organismo não tenha sido capaz de resolver esta inflamação aguda, se desenvolverá uma inflamação crônica, envolvendo uma ativação mais ampla do sistema inflamatório. Alguns grupos celulares, como células apresentadoras de antígenos (APCs), macrófagos e células T

atuam produzindo citocinas que mantêm este processo inflamatório crônico do TGI (NEURATH, 2014).

Ambas doenças possuem um amplo espectro de sintomas que as caracterizam como condições debilitantes, tendo uma influência direta na qualidade de vida dos indivíduos que as possuem. Alguns destes sintomas são dores abdominais, vômitos, diarreias graves, sangramentos anais, anemia e perda de peso (RANDHAWA et al., 2014). Atualmente não existe uma cura para estas doenças, contudo existem tratamentos que amenizam os sintomas. Estes podem atuar na redução da inflamação, como o uso de anti-inflamatórios ou imunossupressores, e, além disso, estão incluídas mudanças na dieta, remoção de fatores de risco e em alguns casos mais graves a remoção cirúrgica de porções degradadas do intestino (LANGE; BARRETT, 2015).

Apesar de estarem incluídas no mesmo grupo clínico, a doença de Crohn e colite ulcerativa possuem diversas diferenças, que vão desde seu local de ação no intestino, histopatologia, endoscopia, sintomatologia, até o perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias envolvidas na imunopatogênese da doença (TONTINI et al., 2015). Estas diferenças sugerem que a CD e UC possuem vias patogênicas diferentes (WIJMENGA, 2005).

A colite ulcerativa é tipicamente associada à região do cólon, mas quase sempre acomete o reto (SANDS; KAPLAN, 2007). Sua análise histopatológica restringe a inflamação às camadas mucosa e submucosa do intestino grosso, com erosões e úlceras superficiais. Está relacionada a hematoquezia ou hemorragia retal e presença de muco e pus (DANESE; FIOCCHI, 2011; LANGE; BARRETT, 2015). Os sintomas mais comuns incluem dor abdominal e diarreia com sangue. Em aproximadamente 10% dos casos não é possível diferenciar a UC e CD no momento do diagnóstico (ABRAHAM; CHO, 2009).

A doença de Crohn, por outro lado, pode afetar o TGI inteiro, contudo, as áreas mais comumente afetadas são a região terminal do íleo, ceco, cólon e região perianal (HA; KHALIL, 2015b). A histopatologia da CD mostra uma inflamação transmural da parede intestinal que afeta o tecido de forma salteada, ou seja, com a presença de segmentos normais e regiões afetadas. Além disso, é caracterizada pelo espessamento da parede do cólon, assim como a presença de granulomas, ulcerações, fibrose e fissuras (ABRAHAM; CHO, 2009).

A CD surge tipicamente entre os 20-30 anos de idade, mas pode aparecer em qualquer faixa etária, com diversos casos já relatados em crianças e recém-nascidos (SILVEIRA et al., 2008). Está relacionada a complicações, como estenose, formação de abscessos, fístulas, estomatite, obstruções e câncer de cólon (ZHANG; LI, 2014). Sua incidência é de 3.1 a 20.2 casos na América do Norte, 12.7 na Europa, 5.0 na Ásia e no Oriente Médio a cada 100.000 indivíduos por ano (BAUMGART; SANDBORN, 2012).

Na doença de Crohn, há um aumento na população de *Escherichia coli* (*E.coli*) nas regiões do íleo e cólon (MARTINEZ-MEDINA et al., 2006). Foi encontrada também uma linhagem invasiva e aderente de *Escherichia coli* (AIEC). Esta, por sua vez, é uma bactéria

capaz de aderir e invadir as células epiteliais intestinais (IEC). Sua sobrevivência e replicação irão ocorrer dentro do fagolisossoma, organela que se forma da fusão de um fagossomo e lisossomo, de macrófagos. São bactérias patogênicas que atuam estimulando as vias imunológicas do hospedeiro (PALMELA et al., 2017). AIECs isoladas de pacientes desta doença foram capazes de induzir a formação de granulomas *in vitro* (MECONI et al., 2007).

2.3 Fatores Genéticos das IBDs

Estudos epidemiológicos e familiares apresentam resultados que comprovam o papel dos fatores genéticos na susceptibilidade das IBDs (SATSANGI et al., 1994). Um grande número de mutações genéticas podem levar ao desenvolvimento espontâneo de processos inflamatórios no intestino. Considera-se então, que a genética do indivíduo atua diretamente na susceptibilidade e predisposição do organismo a desenvolver esta doença (BONEN; CHO, 2003).

Diversos estudos foram realizados com linhagens de camundongos susceptíveis e resistentes à colite (MÄHLER; LEITER, 2002). A comparação do genoma destes dois modelos animais permitem a identificação de genes que atuam diretamente na patogênese da doença, ou que regulam a expressão de outros genes relevantes ao mecanismo da colite em camundongos. Uma vez identificados, o próximo passo é analisar se existe ocorrência destes genes em humanos e qual seu mecanismo dentro das IBDs (BOUMA; STROBER, 2003).

A base genética das IBDs é complexa, diversos genes e loci gênicos foram identificados a partir de estudos de associação do genoma à doença (GWAS, do inglês *Disease Genome-wide Association Studies*). Foram identificados 71 loci que conferem risco à CD e 47 loci na UC, destes, 28 loci estão relacionados com a predisposição genética do indivíduo em ambas as doenças (ANDERSON et al., 2011; FRANKE et al., 2010). A identificação e análise dos genes envolvidos nestas doenças ajuda no esclarecimento de seus mecanismos intracelulares, tal como, das vias envolvidas na homeostase intestinal (KHOR; GARDET; XAVIER, 2011).

Dentro do genoma, o locus que contém o gene que codifica a proteína NOD2 (do inglês, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain Containing 2*) foi considerada a primeira região de susceptibilidade às IBDs, sendo primeiramente associada à doença de Crohn (SHAW et al., 2011).

A NOD2 é uma proteína intracelular relacionada à resposta imune inata contra diversos patógenos. Para atuar de forma efetiva nesta resposta imune, a NOD2 deve reconhecer o patógeno ou bactéria, este é dado pela resposta aos fragmentos da parede celular bacteriana (CHEN et al., 2008). A NOD2 foi originalmente descrita como um sensor de reconhecimento ao muramilo dipeptídeo (MDP) (SHAW et al., 2011). O MDP é um padrão molecular associado a patógeno (PAMP) encontrado no peptidoglicano (PGN) de todas as bactérias, sejam elas gram positiva ou gram negativa (MCDONALD; INOHARA; NUÑEZ, 2005). Quando em contato com o MDP, a NOD2 recruta a serina-treonina quinase (RIPK2) que por sua vez, atua ativando o fator nuclear

kappa B (NF- κ B, do inglês, Nuclear Factor Kappa B). Nas células dendríticas, este mecanismo induz a autofagia, que será responsável por controlar mecanismos de replicação bacteriana e apresentação de antígenos (COONEY et al., 2010).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que células mamárias expressando NOD2, quando tratadas com MDP, tiveram uma resposta imunológica ativada pelas vias da NF- κ B e MAPK. O estudo *in vitro* demonstrou, através de ensaios bioquímicos e moleculares, que a ligação entre a NOD2 e o MDP se dá pelo contato direto entre eles. Também notaram que baixas concentrações de MDP não eram suficientes para ativar a resposta imune por NF- κ B, contudo, altas concentrações de MDP, derivadas de baixos níveis de NOD2, eram sim capazes de ativar esta resposta. O estudo *in vivo* demonstrou que esta interação é dependente de pH, onde o pH entre 5.0 e 6.5 apresenta força de ligação máxima (GRIMES et al., 2012).

As variantes do gene NOD2 encontrados em pacientes com CD possuem mutações no domínio de reconhecimento ao ligante, devido a isto, não são capazes de induzir o processo autofágico em resposta ao MDP (HOMER et al., 2010). Como resultado destas alterações, a bactéria não é destruída e permanece atuando nas células da mucosa, posteriormente, será desencadeada uma resposta imunológica local (KENNEDY et al., 2018).

Dentre as mutações no gene NOD2, três são amplamente discutidas na literatura, pois, estão relacionadas com a CD de maneira específica. As duas primeiras consistem em polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que alteram a estrutura do domínio LRR (do inglês, *Leucine-rich Repeat*) (HUGOT et al., 2001). A terceira é uma mutação, causada por uma inserção ou deleção, que altera o frame de leitura da sequência de DNA (OGURA et al., 2001).

Estudos em pacientes com CD, demonstraram a inserção de uma citosina na posição 3.020 do éxon 11 no gene NOD2. Esta mutação deu origem a um códon de parada que impediu a formação completa da proteína, resultando em uma NOD2 truncada (NETEA et al., 2005). Como resultado destas alterações, a bactéria não é destruída e permanece atuando nas células da mucosa, posteriormente, será desencadeada uma resposta imunológica local (KENNEDY et al., 2018).

Alguns outros genes de susceptibilidade às IBDs são: IL23R, IL12B, JAK2, STAT3, CARD9, IL1R2, REL, SMAD3 e PRDM1. Um estudo de associação do genoma à doença (GWAS) encontrou que o gene IL23R possui uma alta associação à CD (DUERR et al., 2006).

Apesar dos avanços na descoberta de novos genes envolvidos nas IBDs, é preciso lembrar que a doença é multifatorial, e individualmente, os estudos genéticos não são suficientes para desvendar sua patogênese. Futuros estudos são necessários para analisar as interações genéticas e ambientais nas IBDs. É importante também que seja estudada a atuação sinérgica entre as diferentes vias intracelulares que participam da patogênese da doença, possibilitando assim, elucidar sua etiologia (ZHANG; LI, 2014).

2.4 Fatores Ambientais das IBDs

O ambiente também aparece como um importante fator na patogênese e no agravamento dos sintomas em pacientes com IBD. Alguns fatores considerados de risco para estas doenças são a dieta, localização geográfica, tabagismo, uso de antibióticos e contraceptivos orais, estresse, assim como alguns elementos psicológicos (LOFTUS, 2004). Dentre estes, o tabagismo é o fator ambiental mais amplamente estudado. Sua ação é antagônica, pois apresenta efeitos protetores quanto ao desenvolvimento da colite ulcerativa, ao modo que aumenta o risco da Doença de Crohn (COSNES, 2008; BIRRENBACH; BÖCKER, 2005).

Evidências recentes sugerem que a poluição do ar também atua como um fator de risco importante para ambas UC e CD. Estes dados complementam os dados que demonstram uma maior incidência destas doenças em países industrializados. A presença de material particulado no ar induz uma resposta inflamatória sistêmica com um aumento plasmático de citocinas pró-inflamatórias, entre elas a IL-1 β e IL-6 (EEDEN et al., 2001).

A vitamina D é conhecida por seus efeitos no metabolismo dos ossos e cálcio no organismo. Contudo, estudos recentes vêm demonstrando sua função na modulação do sistema imune, inibindo a proliferação de células pró-inflamatórias e regulando a produção de citocinas pró-inflamatórias por estas células (YIN; AGRAWAL, 2014). A deficiência deste composto é comum em pacientes com IBDs (LESLIE et al., 2008), e verificou-se que em modelo murino, a deficiência desta molécula aumentou a susceptibilidade dos animais à indução da colite por sulfato de sódio dextrano (DSS) (KONG et al., 2007). A suplementação com a forma ativa da vitamina D, conhecida por calcitriol ou 1,25-dihidroxicolecalciferol, diminuiu a gravidade das inflamações intestinais (CANTORNA et al., 2000).

Por último, temos que o estresse também pode atuar no desenvolvimento das IBDs, este processo se dá a partir de quadros de ansiedade e depressão. Logo, indivíduos com baixos níveis de estresse possuem menores chances de desenvolver estas doenças (MAUNDER, 2005). O uso de antidepressivos está relacionado a uma redução no número de relapsos dos sintomas das IBDs em pacientes que eram acometidos por também por distúrbios psicológicos (GOODHAND et al., 2012).

2.5 Modelos Animais Experimentais

O advento de modelos animais para o estudo da inflamação intestinal permitiu um maior entendimento dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na homeostase da mucosa, assim como daqueles envolvidos na patogênese das IBDs. Os modelos animais dão origem a princípios e mecanismos fisiopatológicos relevantes às IBDs em humanos (BOUMA; STROBER, 2003). São também ferramentas importantes que permitem desenvolver, testar e avaliar novas terapias, em sua maiorias drogas anti-inflamatórias, durante ensaios pré-clínicos.

Os modelos podem ser divididos em quatro grupos principais, são eles: (i) colite espontânea resultado de uma anormalidade genética que já ocorre naturalmente; (ii) colite espontânea resultado de mutações genéticas ou pela introdução de um transgene; (iii) colite induzida por agentes exógenos; (iv) colite induzida devido à deficiência de células regulatórias (BLUMBERG; SAUBERMANN; STROBER, 2000).

Dentre os modelos murinos já descritos para inflamação intestinal, destacam-se os modelos de indução química. Eles são os mais comumente utilizados no estudo das IBDs, e apesar de serem relativamente simples, têm uma ação imediata no processo de inflamação (WIRTZ et al., 2007).

Modelos animais utilizados para simular a patogênese da Doença de Crohn, permitem um estudo de aspectos morfofisiológicos, moleculares e genéticos, além do desenvolvimento de novas terapias para esta patologia. Os modelos mais avançados permitem que os pesquisadores manipulem fatores genéticos de modo a determinar suas funções. Contudo, até os modelos mais simples são importantes ferramentas no estudo desta patologia (ANTONIOU et al., 2016).

Uma das maneiras de induzir a CD em modelo murino é pela instilação retal do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em linhagens de camundongos susceptíveis. O modelo murino de colite induzido por ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) foi desenvolvido por Morris et al. em 1989 (MORRIS et al., 1989). Este ácido induz uma resposta Th1 com liberação de IL-12 e este mecanismo é capaz de induzir um quadro de colite transmural no animal (NEURATH et al., 1995). Este seria equivalente a CD humana tanto por seus aspectos histológicos quanto imunológicos. Além disso, o modelo de indução com TNBS apresenta alta reprodutibilidade e é um dos modelos mais amplamente utilizados no estudo da patogênese das IBDs (OH et al., 2014).

Este modelo faz uso de uma solução de TNBS em etanol 50%. Nesta solução o etanol é utilizado como um meio de romper efetivamente a barreira intestinal, ajudando na penetração do TNBS e permitindo a interação deste com as proteínas do tecido do cólon (ANTONIOU et al., 2016). Já o TNBS atua como um hapteno, ou seja, uma pequena molécula que não é capaz de induzir uma resposta imune quando administrada sozinha, mas que pode induzir tais respostas quando estão acopladas à moléculas carreadoras com mais alto peso molecular. Um hapteno na sua forma solúvel livre, não pode estimular as células B e, por tal motivo, não é considerada imunogênica. Contudo, quando acoplada à uma proteína carreadora, este complexo hapteno-carreador ativa não apenas as células B, como também as células T auxiliares, e estimula a via de produção de anticorpos (ELSON et al., 1995). Neste caso, o TNBS ao se ligar às proteínas teciduais pode desencadear uma resposta imunológica (GONÇALVES et al., 2008).

2.6 Resposta Imune nas IBDs

As IBDs resultam da inflamação crônica intestinal e da degradação tecidual causada pela elevada expressão de moléculas pro-inflamatórias envolvidas na imunidade inata e adaptativa (PARK et al., 2017).

As citocinas são pequenas proteínas que atuam nos processos de interação e comunicação entre as células. São encontrados dois grupos principais de citocinas que participam nos processos inflamatórios, são elas as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (ZHANG; AN, 2007).

As citocinas desempenham um papel crucial na patogênese das IBDs, tanto por sua participação nas respostas inflamatórias quanto no desenvolvimento dos sintomas. O desbalanço nos níveis de citocinas pró-inflamatórias impedem que o mecanismo inflamatório cesse. Neste quadro, as pró-inflamatórias estão em níveis e proporções elevados, enquanto as anti-inflamatórias estão diminuídas (NEURATH, 2014). Padrões alterados na produção de citocinas em pacientes com IBDs foram inicialmente descritos no final da década de 1980 e início da década seguinte (EBERT et al., 1984).

A modulação dos níveis de citocinas em estudos *in vivo* comprova a utilização destas moléculas como uma terapia efetiva contra as IBDs. Além disso, houve um maior destaque às citocinas anti-inflamatórias, por sua atuação em processos de prevenção e combate ao processo inflamatório intestinal. Este grupo de citocinas passam a ser os novos alvos terapêuticos destas doenças (POWRIE et al., 1994).

Logo após a descoberta das citocinas como possível terapia para as IBDs, iniciaram-se os testes de diferentes compostos anti-inflamatórios e anticorpos recombinantes. Todavia, os tratamentos realizados com IFN- β , IL-10 e IL-11 não obtiveram resultados satisfatórios. Por outro lado, o tratamento com um anticorpo específico, com função de neutralizar e bloquear, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), mostrou ótimos resultados e se tornou a terapia mais comumente utilizada na clínica atualmente (NEURATH, 2014).

Foi encontrado nas IBDs um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas IL-1, IL-6, IL-18, interferons (IFN) α , β e γ , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e membros da família da IL-12 (IL-22, IL-23, IL-27 e IL-35). Estas moléculas foram produzidas principalmente pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), células dendríticas (CD) e macrófagos. O estímulo para produção destas vêm da via de sinalização dos receptores toll-like (TLR) quando estes são estimulados pela microbiota intestinal (C et al., 2011).

A resposta imunológica das IBDs tem início com as células apresentadoras de antígenos (APCs). As APCs, quando em resposta aos antígenos encontrados na barreira da mucosa, induzem a diferenciação dos linfócitos T CD4+ em linfócitos T auxiliar 1 (*T helper 1*, Th1) e T auxiliar 2 (*T helper 2*, Th2). Os linfócitos Th1 secretam citocinas pró-inflamatórias, como interferon gama

(IFN- γ), interleucina 2 (IL-2), IL-12 e IL-18, enquanto as células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. O IFN- γ proveniente da resposta Th1 estimula a produção inflamatória de TNF- α por macrófagos e monócitos (NEURATH; FINOTTO; GLIMCHER, 2002).

O aumento tanto da resposta Th1 quanto Th2 são responsáveis pelo dano tecidual na mucosa intestinal. O início do processo inflamatório nas IBDs é caracterizado pelo perfil Th1, com secreção de IFN- γ e TNF- α . Enquanto que a inflamação crônica é mantida pelo perfil Th2, com a IL-5 e IL-13 como principais moléculas (HANAUER, 2005).

O padrão de expressão das citocinas na UC retrata uma resposta imune Th2 e uma diminuição da resposta Th1. Em pacientes com UC, os níveis de IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-8, IL-12, IFN- γ , e TNF α estão significativamente aumentados. Este dado sugere que ambas, imunidade inata e humoral, participam da patogênese desta doença (SANDS; KAPLAN, 2007).

A CD é caracterizada por uma resposta imune Th1 dominante, desencadeada pelo aumento dos níveis de IFN- γ e IL-12 (MURPHY et al., 2003). Existe também uma resposta Th17 ativada pelas citocinas IL-6, IL-23 e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (MCGEACHY; CUA, 2008). Ocorre ainda, mecanismos de inibição, diferenciação anormal e diminuição no número de células T regulatórias (Treg) em pacientes com CD (YAMADA et al., 2016; KHALILI et al., 2018). O desequilíbrio das respostas imune inata e adaptativa culmina num processo inflamatório exacerbado, com a perda da tolerância da microbiota própria do organismo (SHEN et al., 2017).

A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória que induz a produção de TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-12. Ela pode ser encontrada em dois tipos: IL-1 α e IL-1 β e estes são produzidos em resposta às infecções bacterianas, virais, parasitárias, injúrias e alguns fatores não infecciosos, como o próprio TNF- α (DINARELLO, 1998; DINARELLO, 2011).

Nas IBDs, ocorrem desbalanços dos níveis de IL-1 e do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA) na mucosa intestinal de pacientes com CD e UC. A proporção IL-1/IL-1RA está relacionada a gravidade da doença e se apresenta diminuída nestas doenças, sugerindo que há uma ativação das vias pró-inflamatórias que envolvem a IL-1 (V et al., 1995).

A IL-18 é uma citocina pertencente à família da IL-1, sua produção é feita principalmente por macrófagos e células epiteliais na doença de Crohn (KANAI et al., 2001). O uso de anticorpos monoclonais anti-IL-18 foi capaz de neutralizar a IL-18 em modelos murinos de colite aguda e crônica. Este resultado sugere que o bloqueio de membros da família da IL-1 pode constituir um alvo terapêutico para as IBDs (SIEGMUND et al., 2001).

O nível de IL-6 em pacientes com IBDs está elevado devido ao aumento da produção desta citocina pelas células dendríticas e células T CD4+. Foi visto que o aumento de IL-6 induz a produção do TNF- α , IFN- γ e IL-1 β . Estas três moléculas em associação com o receptor de IL-6 (IL-6R) formam um complexo que previne a morte celular programada (apoptose celular) de células T, estas por sua vez, são responsáveis pela produção de outras citocinas que participam

da cascata de inflamação nas IBDs (ATREYA et al., 2000).

O bloqueio da via do IL-6 com o uso de anticorpos monoclonais foi capaz de diminuir a resposta inflamatória em modelos murinos por meio da menor produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ e IL-1 β (YAMAMOTO et al., 2000). Com base na premissa de um novo tratamento para as IBDs, foram iniciados estudos com o tocilizumab, também conhecido como MRA, um anticorpo específico do IL-6R. Este tratamento mostrou resultados positivos em alguns subgrupos de pacientes com a CD, contudo, mais estudos são necessários para confirmar seu potencial terapêutico nas IBDs (ITO et al., 2004).

Membros da família da IL-12, como o IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35, são produzidos pelas APCs durante as IBDs. Na doença de Crohn a produção aumentada de IL-12 por células dendríticas e macrófagos sugere uma resposta imunológica do tipo Th1 (C et al., 2011). Um estudo realizado em pacientes com CD e UC teve como objetivo avaliar a expressão e liberação de IL-12 por células mononucleares da lâmina própria (LPMCs). O resultado mostrou um nível de expressão elevado de IL-2 pelas LPMCs na CD. Como também sugere que os níveis de IL-12 sejam capazes de diferenciar a CD e UC (MONTELEONE et al., 1997).

As APCs também produzem grandes quantidades de IL-23 na mucosa de pacientes com a doença de Crohn. Esta citocina atua nos mecanismos de manutenção da resposta imunológica, regulando a função das células T de memória e influenciando na proliferação de células Th17 produtoras de IL-17 (PARK et al., 2005). Ela estimula a diferenciação de células T em células Th17 e também atua suprimindo a atividade das células T regulatórias (Treg). Sugere-se que a resposta Th17 atua juntamente à resposta Th1 na patogênese da CD (Z et al., 2011).

A fim de testar o potencial terapêutico da família da citocina IL-2, foram testados dois anticorpos neutralizantes específicos à subunidade 40 de IL-12 e IL-23 (briakinumab e ustekinumab) em pacientes com CD. O resultado foi satisfatório, com uma diminuição das citocinas inflamatórias envolvidas na resposta Th1 no sítio da doença. A importância deste tipo de tratamento se dá, principalmente, em pacientes com CD de moderada à grave e que são resistentes ao tratamento com antagonistas do TNF- α (MANNON et al., 2004; SANDBORN et al., 2012).

2.6.1 TNF- α

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina responsável por transmitir sinais entre células do sistema imune e as outras células do organismo. Está envolvida em processos de imunorregulação, morte celular (apoptose), inflamação, metabolismo celular, trombose, edema, formação de granulomas, entre outros (DEVENTER, 1997).

Nas IBDs, grandes quantidades de TNF- α são produzidas por diferentes grupos celulares, entre eles: monócitos, macrófagos, células dendríticas, células T, adipócitos e fibroblastos (STROBER; FUSS; BLUMBERG, 2002; KAMADA et al., 2008). É produzido majoritariamente por monócitos, macrófagos e células T, na forma de uma proteína transmembranar, ou seja, ligada

à membrana celular. O TNF- α também pode ser encontrado na sua forma solúvel. Este TNF- α solúvel é formado a partir da clivagem do TNF- α transmembranar pela enzima conversora de TNF- α (TACE), também conhecida por preteína desintegrina e metaloproteínase domínio 17 (ADAM17) (BLACK et al., 1997). O TNF- α ligado à membrana celular tem um papel mais relevante na inflamação intestinal do que o TNF solúvel (PERRIER et al., 2013).

O TNF- α exerce influência principalmente em células endoteliais, macrófagos, células epiteliais intestinais (IECs), miofibroblastos e células T. Dentre as diversas funções do TNF- α no processo inflamatório da mucosa intestinal, destacam-se: angiogênese; hipervascularização; indução do aumento da produção de outras citocinas pró-inflamatórias; indução da morte celular de células epiteliais intestinais (IECs) e células de Paneth; destruição tecidual pelo aumento da produção de metaloproteinases (MMPs); resistência de células T à apoptose e ativação do fator nuclear kappa B (LEPPKES et al., 2014).

O TNF- α atua sob as células endoteliais, interferindo no recrutamento de neutrófilos para o sítio de inflamação. Este processo se dá por três mecanismos principais: (i) promovendo um aumento da expressão de selectina, essencial para fase de rolamento; (ii) induzindo uma maior produção de IL-8, que é uma substância quimiotáxica e também atua na fase de migração do neutrófilo; e (iii) aumentando a expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) (SMART; CASALE, 1994; PALEOLOG et al., 1994).

O TNF- α tem um papel central na formação de granulomas. Foi visto um aumento dos níveis de TNF- α em diversos modelos de inflamação granulomatosa. Quanto ao seu papel na formação de granulomas, o TNF- α atua no recrutamento de monócitos mediado pela produção da proteína de quimioatração de monócitos 1 (MCP-1/CCL2) (FLORY et al., 1995). Esta proteína é uma quimiocina responsável pela quimiotaxia e recrutamento de monócitos no sítio de inflamação (PALOMINO; MARTI, 2015).

O TNF- α pode agravar a resposta inflamatória em pacientes com IBDs pela ativação intracelular do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B). Esta ativação se dá pela ligação do TNF- α aos seus receptores do fator de necrose tumoral 1 (TNF-R1) e TNF-R2. O NF- κ B atua regulando a expressão de citocinas pró-inflamatórias, enzimas, moléculas de adesão e genes relacionados à ativação das células B (LAWRENCE, 2010).

Quando ativado, o receptor TNF-R2 presente em células T, provoca um agravamento no quadro da colite em um modelo experimental em camundongos (HOLTMANN et al., 2003). Além disso, a expressão deste receptor está aumentada em pacientes com CD. Ele é ativado apenas pelo TNF membranar, e não pelo TNF solúvel, confirmando a influência e importância do TNF ligado à membrana celular nas IBDs (NEURATH, 2014).

Por ser considerada uma das citocinas pró-inflamatórias mais importantes nas IBDs, diversas estratégias terapêuticas foram desenvolvidas de modo a atuar diretamente no TNF- α (PEYRIN-BIROULET, 2010). O tratamento clínico mais utilizado para as IBDs é com feito a

partir do uso de anticorpos monoclonais que neutralizam e bloqueiam tanto o TNF solúvel quanto o membranar, como o infliximabe ou que bloqueiam apenas o TNF solúvel, como o etanercepte (SANDBORN; HANAUER, 1999a). Na comparação entre o tratamento com infliximabe e etanercepte, ambos anticorpos monoclonais foram capazes de neutralizar o TNF solúvel, mas apenas o infliximabe foi capaz de se ligar e induzir a apoptose de células T. Com base nestas informações, o foco agora está no desenvolvimento de novas estratégias e alvos terapêuticos que atuem especificamente no TNF membranar, de modo a impedir sua interação com o receptor TNF-R2 (BRANDE et al., 2003).

A terapia com anti-TNF- α atua na melhora de aspectos micro e macroscópicos do tecido intestinal inflamado tanto na doença de Crohn quanto na colite ulcerativa. A terapia pode ser feita com anticorpos quiméricos, humanizados ou completamente humanos, entre eles temos o infliximab, adalimumab, certolizumab pegol e golimumab (COHEN; SACHAR, 2017).

2.7 Tratamentos das IBDs

Por se tratar de uma doença multifatorial, e que ainda não possui uma patogênese bem esclarecida, os principais tratamentos para as IBDs visam controlar os sintomas e evitar a remissão da doença (ABRAHAM; CHO, 2009). São utilizados medicamentos que interrompem a cascata inflamatória, reduzindo assim a resposta imunológica exacerbada. Alguns compostos utilizados nos tratamentos tradicionais são os aminossalicilatos, antibióticos, corticoesteróides, metotrexatos e agentes anti-TNF- α (PITHADIA; JAIN, 2011).

Em casos mais severos da doença ou quando os tratamentos disponíveis não mostram resultados no controle dos sintomas, indica-se a intervenção cirúrgica. Estima-se que entre 70-90% dos pacientes com a doença de Crohn precisarão passar pela cirurgia em algum momento durante sua vida. Para colite ulcerativa, estima-se que 20-35% dos pacientes precisarão passar por tal intervenção cirúrgica (HWANG; VARMA, 2008).

O tratamento das IBDs deve ser analisado levando em consideração a resposta de cada paciente à terapia utilizada. Ele não deve gerar efeitos colaterais secundários, e idealmente, controlaria os sintomas e prolongaria os períodos de remissão da doença. A escolha do tratamento deve ser feita pelo médico baseado na frequência dos relapsos, extensão e gravidade da doença, e presença de manifestações extra-intestinais, que significam maiores complicações no quadro de IBD do paciente (SALES-CAMPOS et al., 2014).

Por se tratarem de duas doenças distintas, com aspectos clínicos, imunológicos, genéticos e patofisiológicos singulares, o tratamento da CD e UC serão diferentes. Além disso, para se obter os melhores resultados, deve-se considerar o quadro clínico do paciente, a sua resposta aos tratamentos anteriores e seu diagnóstico (SALES-CAMPOS et al., 2014).

Um dos medicamentos imunossupressores utilizados é o infliximabe. Ele é um anticorpo monoclonal quimérico humano-murino (25% murino e 75% humano) da imunoglobulina G da

subclasse 1 (IgG1) que possui alta afinidade ao TNF- α . Quando ligado a este TNF- α , seja na forma solúvel ou transmembranar, forma um complexo estável e impede a ação do mesmo. Desse modo, atua como um bloqueador do TNF- α para que o processo inflamatório seja reduzido (SCALLON et al., 1995; SANDBORN; HANAUER, 1999b).

Um estudo teve como objetivo avaliar a eficácia e tolerância de um tratamento contínuo com este anticorpo. O tratamento durou quase um ano e nele, 147 pacientes com a doença de Crohn ativa receberam um total de 567 infusões (420 re-infusões) de infliximabe administrados pela via intravenosa. Os resultados mostraram que, após o tratamento, quase 80% dos pacientes retiraram ou diminuíram o uso de esteroides e mais de 88% tiveram bons resultados com o tratamento (WITTHÖFT; LUDWIG, 2005).

Outros anticorpos monoclonais capazes de se ligar ao TNF- α são adalimumab, certolizumab, e golimumab. O primeiro atua se ligando ao TNF- α e bloqueando a sua interação com os receptores de superfície celular p55 e p75. O segundo neutraliza seletivamente o TNF- α mas não o fator de necrose tumoral beta (TNF- β), que também é conhecido como linfotoxina-A. E o último possui o mesmo mecanismo do infliximabe, em que se liga e inibe ambas formas, solúvel e transmembranar do TNF- α (SINGH et al., 2017).

Os anticorpos monoclonais (mAbs) são anticorpos de uma mesma especificidade produzidos por células híbridas imortalizadas em animais imunizados. O método baseia-se na fusão de células de mieloma com linfócitos B produtores de anticorpos obtidos do baço de animais imunizados. A célula de mieloma confere imortalidade ao linfócito B produtor de anticorpos e permite o seu crescimento em cultura de células. O linfócito B, por outro lado, determina a especificidade ao antígeno do anticorpo que será produzido. A linhagem de células híbridas resultantes desta fusão podem crescer continuamente em cultura ou serem congeladas para uso posterior. Esta técnica permite a produção de grandes quantidades do mesmo anticorpo, e podem ser desenvolvidos geneticamente anticorpos para os mais diversos alvos, como enzimas, hormônios, vírus e bactérias (COLE, 1987).

Atualmente, a produção dos anticorpos é feita em escala comercial com o uso de grandes biorreatores. Nestes, encontram uma cultura de células de mamíferos produtora de anticorpos. A purificação do anticorpo é realizada a partir do sobrenadante ou meio da cultura, pois o mAb será liberado neste meio ao ser produzido pelas células. Depois de retirado, o meio passa por uma série de cromatografias e membranas de filtração, com objetivo de retirar as impurezas e proteínas que não são do seu interesse. As etapas de purificação se procedem até que o produto final chegue a um alto nível de pureza. Este ainda é um processo complexo e caro, principalmente devido às etapas de purificação (SHUKLA; THÖMMES, 2010).

A produção dos mAbs recombinantes em bactérias e fungos ainda não é tão amplamente explorada quanto a produção em células animais. O uso destes micro-organismos pode significar uma diminuição no custo de produção, além de oferecer a possibilidade de serem utilizados pela via oral (SPADIUT et al., 2013). A tecnologia do DNA recombinante é um dos

métodos mais importantes para produção de anticorpos monoclonais recombinantes, tornando-os menos imunogênicos. Ela permite tanto a introdução de genes que codificam um anticorpo monoclonal de interesse quanto a modificação de um anticorpo monoclonal, a fim de alterar sua estrutura, função ou formar moléculas com propriedades específicas (KUNERT; REINHART, 2016).

A aplicação do anticorpo deve ser feita sempre em ambiente hospitalar, por meio da via intravenosa, para que ele seja capaz de chegar à região de interesse. É feita uma infusão lenta, de modo a diminuir os efeitos colaterais do tratamento. Contudo, outras vias de administração para estas moléculas são estudadas, como, por exemplo, a via oral (REILLY; DOMINGO; SANDHU, 1997). Um estudo com o anticorpo monoclonal anti-CD3 demonstrou que, quando administrado pela via oral em humanos, apresentou-se biologicamente ativo e consiste em um método seguro. Este estudo comprova a eficiência desta via na entrega dos anticorpos, que serão absorvidos principalmente pela mucosa intestinal (ILAN et al., 2010).

Com o avanço no estudo das IBDs, aumentou também o número de potenciais alvos moleculares que podem ser utilizados pela terapia com anticorpos monoclonais. Alguns destes são as citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão envolvidas no processo inflamatório das IBDs (SHAH; MAYER, 2010).

As mais recentes abordagens terapêuticas para CD e UC atuam diretamente nas citocinas, uma vez que estas possuem um papel crucial tanto na indução da inflamação intestinal quanto em diversos sintomas e complicações. Existem quatro maneiras de reduzir os efeitos de uma citocina no organismo, são elas (i) o bloqueio da sua produção; (ii) inibição do processo celular que produz a proteína ativa; (iii) neutralização da citocina na circulação e (iv) bloqueio do seu receptor (BIONDO-SIMÕES et al., 2003).

Com base nesse conceito, os diferentes tratamentos visam atuar em uma ou mais vias, para inibir ou bloquear as citocinas pró-inflamatórias envolvidas na patogênese da doença (NEURATH, 2017). Uma das maneiras de melhorar a eficiência dos tratamentos já conhecidos é utilizando bactérias geneticamente modificadas como vetores para a entrega dos fármacos e agentes terapêuticos em humanos. O uso destas permite também a entrega do fármaco diretamente aos sítios de inflamação na mucosa intestinal (WEGMANN et al., 2017).

Atualmente, dentro do grupo de bactérias que são utilizadas como vetores, as bactérias lácticas modificadas geneticamente vêm sendo aplicadas na entrega de proteínas funcionais em mucosas como forma de tratamento de inúmeras patologias, incluindo as IBDs (CANO-GARRIDO; SERAS-FRANZOSO; GARCIA-FRUITÓS, 2015).

2.8 Bactérias Lácticas

As bactérias lácticas (BAL) são um grupo heterogêneo e ubíquo de microrganismos capazes de obter energia pela conversão de hexoses em ácido láctico. São gram-positivas,

mesófilas, anaeróbias facultativas, imóveis, não produtoras de esporos e não produtoras de catalase. Dentre tais características, a sua capacidade de produzir o ácido láctico é a responsável por nomear o grupo (MAKAROVA; KOONIN, 2007; CARVALHO et al., 2017).

Espécies deste grupo podem ser encontradas em diferentes ambientes, desde frutas e vegetais em decomposição, até o trato gastrointestinal, oral e urogenital de mamíferos e outros animais (H et al., 2005). Os mais importantes gêneros de LABs são *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* (KLEIN et al., 1998).

A maior parte das BALs possuem o status GRAS (do inglês, *Generally Regarded as Safe*) pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture*, USDA), indicando que tais bactérias não apresentam efeitos patogênicos e podem ser utilizados de forma segura (DANIEL et al., 2011).

São um dos grupos de bactérias mais importantes no âmbito industrial. Sua utilização é feita desde a antiguidade, podendo ser empregada na produção e conservação de alimentos fermentados, como queijos, iogurtes, pães, vinhos, carnes e embutidos (WELLS; MERCENIER, 2008). Além disso, pode ser utilizada na produção de ácido láctico (MARTINEZ et al., 2013), bacteriocinas (VUYST; LEROY, 2007) e exopolissacarídeos (WELMAN; MADDOX, 2003).

Outro uso comum das BALs é como probiótico, com a função de impedir e diminuir a colonização intestinal por uma microbiota patogênica, evitando assim, respostas inflamatórias decorrentes deste desequilíbrio. Entre as espécies com efeitos probióticos, destacam-se as *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. e *Lactococcus* spp. (SANDERS, 2003).

Além do seu uso tradicional, novas aplicações estão surgindo para as BALs, entre elas está o uso como vacinas orais (STEIDLER et al., 2000) e a produção de proteínas heterólogas. As bactérias lácticas atuam como “usinas celulares” ou biofábricas produzindo citocinas, enzimas, antígenos, anticorpos, entre outras moléculas de interesse biotecnológico (NOUAILLE et al., 2003a). Além destas aplicações, por serem pouco imunogênicas, as BALs podem ser utilizadas também nos programas de imunização, atuando como veículo para entrega destas proteínas e antígenos diretamente à mucosa do hospedeiro (MERCENIER; MÜLLER-ALOUF; GRANGETTE, 2000).

2.8.1 *Lactococcus lactis*

Dentre as BALs, a *Lactococcus lactis* é a espécie mais bem caracterizada do grupo. É considerada organismo modelo no estudo do metabolismo, fisiologia e genética das BALs. É de fácil manipulação em laboratório, possui status GRAS, é heterofermentativa facultativa e mesófila. Foi a primeira das BALs a ter seu genoma completamente sequenciado, e por esse motivo, um grande número de ferramentas genéticas já estão documentadas para este grupo, como protocolos de transformação, vetores de clonagem e vetores de seleção (MILLS et al., 2006).

Existem duas subespécies de *L.lactis*, elas foram inicialmente designadas como *Streptococcus lactis* e *Streptococcus cremoris* antes de serem reclassificadas como *L.lactis* ssp. *lactis* e *L.lactis* ssp. *cremoris*, respectivamente (K.H.SCHLEIFER et al., 1985). Estas subespécies são amplamente utilizadas devido seu interesse industrial, além disso, se tornaram ótimos modelos para estudos de biologia molecular, genética, metabolismo e fisiologia das BALs (BOLOTIN et al., 2001).

O avanço no estudo destas bactérias, principalmente no campo da genética, permitiu o surgimento de novas aplicações para elas, como a entrega de proteínas heterólogas, genes e vacinas nos sítios de mucosas do hospedeiro (BAHEY-EL-DIN; GAHAN; GRIFFIN, 2010).

Tradicionalmente, os sistemas de expressão de alta eficiência em procariontos, ou seja, sistemas que produzem grandes quantidades de proteínas heterólogas, são utilizados em *Escherichia coli* (CHEN, 2012). Alguns problemas estão relacionados ao uso de *E.coli* na produção de proteínas heterólogas. Uma delas é a presença de LPS, que é naturalmente imunogênica e deve ser retirada antes do uso em humanos. Outro problema está no fato de que a proteína produzida, na maioria dos sistemas de expressão, fica acumulada no interior da célula. Para que estas sejam retiradas, são necessárias várias etapas de purificação, além de ser um processo difícil, estas etapas podem deixar o processo mais caro (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

A *L.lactis* aparece como um micro-organismo alternativo viável para produção destas proteínas em relação a outros modelos, como *E.coli* e *Pichia pastoris*. Inúmeras proteínas de origem eucariótica, bacteriana e viral já foram produzidas utilizando *L.lactis*, entre elas temos enzimas, bacteriocinas, fatores de virulência, alérgenos e interleucinas (NOUAILLE et al., 2003b; LOIR et al., 2005). Dentre os sistemas de expressão mais utilizados em *L.lactis*, se destacam o sistema NICE (Nisin Controlled Expression System) (MIERAU; KLEEREBEZEM, 2005) e o sistema XIES (Xylose-Inducible Expression System) (MIYOSHI et al., 2004).

A maior dificuldade no uso de *L.lactis* para produção de proteínas heterólogas está na expressão de alguns genes eucarióticos. O problema surge pela falta de mecanismos intracelulares de processamento pós-traducional, como glicosilação e formação de pontes dissulfeto nestas bactérias. Estas modificações são importantes para gerar a forma ativa da proteína. Quando esse processamento não acontece corretamente, a proteína de interesse será produzida em pequenas quantidades ou não chegará a sua forma ativa (PONTES et al., 2011).

Para contornar este problema as BALs podem ser utilizadas como veículo para entrega dos plasmídeos de DNA. Estes plasmídeos levam consigo os genes eucarióticos de interesse que necessitam de modificações pós-traducionais. Ao serem entregues às células eucarióticas do hospedeiro, os plasmídeos serão expressos e a proteína será produzida corretamente, utilizando a maquinaria celular destas células (BERMÚDEZ-HUMARÁN et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2009a).

Algumas características as fazem bons organismos para desempenhar esta função de

carreadora. Entre elas estão a capacidade de resistir ao ambiente ácido do estômago, permitindo assim que elas cheguem viáveis à mucosa intestinal; não possuem lipopolissacarídeos (LPS) na sua parede celular e não são imunogênicas. Diante disto, podem ser utilizadas tanto nos processos de imunização quanto como vetores (MERCENIER; MÜLLER-ALOUF; GRANGETTE, 2000).

De modo a melhorar o processo de entrega deste DNA, foi construído um plasmídeo com nome de pValac (Figura 1) Ele foi construído a partir da fusão de: (i) um promotor de citomegalovírus (pCMV), que permite a expressão da proteína em células eucarióticas; (ii) duas origens de replicação, uma proveniente de *L.lactis* (Rep A) e outra de *E. coli* (Rep C), permitindo a replicação deste plasmídeo nestas duas linhagens bacterianas; (iii) gene de resistência ao cloranfenicol, um antibiótico de amplo espectro, a presença deste gene é importante para o processo de seleção das linhagens recombinantes; (iv) um sítio de clonagem múltipla (MCS) (v) sequência sinal de poliadenilação do Hormônio Bovino de Crescimento (BHG-poliA), que vai ajudar na estabilização do transcrito de RNA . Além destas características, este plasmídeo possui dois sítios de restrição, *ClaI* e *BgIII*, para atuar também na ligação das regiões eucarióticas e procarióticas no plasmídeo (GUIMARÃES et al., 2009b).

Figura 1 – Estrutura do plasmídeo pValac



A: Plasmídeo pValac. B: Sítio de clonagem múltipla (MCS) com regiões de ligação para diferentes enzimas de restrição, destacando ao sítio de ligação a RNA polimerase T7 e sítio de reconhecimento a cauda poli-A. Fonte: Guimarães et al, 2009.

Com o objetivo de estudar o mecanismo de entrega dos plasmídeos pela bactéria, foi construída uma linhagem de *L. lactis* invasiva. Ela foi construída a partir da clonagem do gene de *Staphylococcus aureus* que codifica a Proteína de Ligação à Fibronectina A (FnBPA) (BERMÚDEZ-HUMARÁN et al., 2013). A FnBPA é uma proteína mediadora de adesão da bactéria com a célula do hospedeiro, logo, atua aumentando a entrada da bactéria em células não-fagocíticas. Em um experimento *in vitro*, a produção de FnBPA na superfície da *L. lactis* aumentou a sua capacidade de invasão das células em 100 vezes e também aumentou a sua capacidade de transferência dos plasmídeos em 30 vezes (INNOCENTIN et al., 2009). *In vivo*, a eficiência da linhagem foi dependente da quantidade de fibronectina livre disponível no lúmen (CHATEL et al., 2008).

O uso de uma linhagem de *L. lactis* invasiva (FnBPA+) para entrega de plasmídeos de expressão eucariótica pode ser vista como uma estratégia de aperfeiçoamento do processo de expressão heteróloga. Este uso, se implementado corretamente, é uma opção segura, econômica e eficiente para o tratamento das mais variadas doenças, incluindo a doença de Crohn.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- Analisar as diferenças dos parâmetros de peso e comprimento do cólon entre o protocolo simultâneo de indução da colite por TNBS e o protocolo fracionado de indução da colite por TNBS em animais tratados com *Lactococcus lactis* FnBPA+ (pValac:anti-TNF- α).

3.2 Objetivos Específicos

- Induzir a doença de Crohn com TNBS em camundongos Balb/C de forma fracionada.
- Tratar camundongos Balb/C com a linhagem *Lactococcus lactis* FnBPA+ (pValac:anti-TNF- α).
- Avaliar os efeitos macroscópicos do tratamento com a linhagem *Lactococcus lactis* FnBPA+ (pValac:anti-TNF- α) no protocolo fracionado de indução da colite por TNBS.
- Comparar a média de comprimento do cólon entre os protocolos simultâneo e fracionado de indução de colite por TNBS.
- Comparar a variação de peso entre os protocolos simultâneo e fracionado de indução de colite por TNBS.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Balb/C , fêmeas, de 7 a 8 semanas. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA), onde tiveram livre acesso à água e ração durante todo o experimento. Foi mantido um controle de temperatura (22-24°C) e um ciclo de luz diurno/noturno de 12 horas. Os procedimentos para experimentação animal foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB protocolo 1840030418).

4.2 Linhagem Bacteriana

A bactéria *Lactococcus lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac:*anti-TNF- α*) foi cedida pelos colaboradores da Universidade de Brasília. As culturas foram diluídas em uma solução estéril de glicerol 80% na proporção 1:4 (1 parte de glicerol 80% e 4 partes de cultura bacteriana) e foram mantidas em um ultrafreezer a -80 °C. O cultivo prévio foi feito em meio de cultura ágar M17 (TERZAGHI; SANDINE, 1975) acrescido de 0,5% de glicose, a 30 °C, por 16 horas, sem agitação.

4.3 Preparação das Bactérias

A bactéria utilizada no tratamento foi preparada anteriormente a gavagem. Inicialmente, a bactéria foi alíquotada e centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos a 4 °C, a fim separar a bactéria do meio de cultivo com glicerol. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspenso em um volume de 1.5 mL de salina e depois passou por uma nova centrifugação nos mesmos parâmetros da anterior. Foram feitas outras duas lavagens. Ao final da última centrifugação, o *pellet* foi ressuspenso em 1.5 mL de uma solução de PBS adicionada de 10% de soro fetal bovino (SFB). A bactéria ficou incubada nesta solução por 1 hora a 4 °C. Após essa etapa, foram realizadas três novas lavagens com objetivo de retirar a solução de PBS-SFB 10%. No fim, a bactéria foi ressuspenso no volume de salina proporcional ao número de doses foram administradas naquele dia.

4.4 Grupos Experimentais

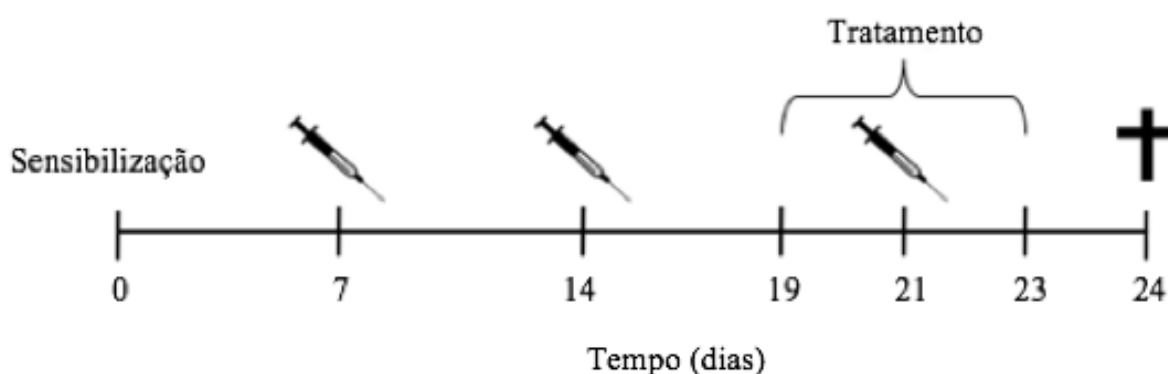
Os animais foram divididos em três grupos nos dois protocolos de indução da doença de Crohn analisados. São eles: (i) Controle: tratamento oral com salina e instilação intra-retal de etanol (n=7); (ii) TNBS: tratamento oral com salina e instilação intra-retal de etanol/TNBS (n=11); (iii) Anti-TNF- α : tratamento oral com *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac:*anti-TNF- α*) e instilação intra-retal de etanol/TNBS (n=6). Todos os animais foram pesados diariamente.

4.5 Indução da colite por TNBS

4.5.1 Protocolo simultâneo de indução da colite por TNBS

O protocolo simultâneo de indução da colite por TNBS, adaptado de Wirtz et al. (2017), foi executado em um período de 25 dias. Este protocolo foi realizado anteriormente por França (2018). A Figura 2 mostra o cronograma de indução da colite por TNBS destacando as principais etapas e os dias que estas foram executadas.

Figura 2 – Cronograma da indução da colite por TNBS e tratamento com bactérias



Dia 0: Sensibilização; Dia 7: Primeira indução da colite; Dia 14: Segunda indução da colite; Dia 19: Primeiro dia do tratamento com a bactéria *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac:anti-TNF- α) via gavagem; Dia 21: Terceira indução da colite; Dia 23: Último dia do tratamento com a bactéria *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac:anti-TNF- α) e Dia 24: Eutanásia. Fonte: Adaptado de Wirtz (2017).

As doses de TNBS foram administradas de forma progressiva a cada 7 dias, com 0.75, 1.0 e 2.5 mg de TNBS, respectivamente. Entre os dias 19 e 23 foi feito o tratamento com a bactéria via gavagem e no dia 24 os animais foram eutanasiados com a retirada imediata do sangue e órgãos (intestino e baço) para análises posteriores.

A sensibilização foi feita sete dias antes da primeira instilação intra-retal de TNBS. Nesta primeira etapa os animais foram anestesiados com isoflurano 2% e foi feita a raspagem dos pelos da região dorsal. Foram aplicados 150 μ l da solução de pré-sensibilização diretamente na pele do animal. Esta solução é composta por uma mistura (acetona e azeite na proporção 4:1, respectivamente) + TNBS 1%.

Em todas as três induções os animais foram inicialmente anestesiados via injeção intraperitoneal de uma mistura de cetamina e xilasina. O volume de anestésico administrado para cada animal foi calculado utilizando cetamina e xilasina (75 mg/kg + 10 mg/kg do animal). Logo após a anestesia, para os animais do grupo TNBS e anti-TNF- α , foram efetuadas as administrações intra-retais de uma solução de TNBS. As doses de TNBS foram administradas de forma progressiva a cada 7 dias, com 0.75, 1.0 e 2.5 mg de TNBS 5%, respectivamente (Figura 1). Estas doses

foram associadas ao etanol 40% chegando a um volume final de 100 μ l por camundongo. Os animais do grupo Controle receberam uma solução sem TNBS, composta por água destilada, salina e etanol 40%. A composição e os volumes utilizados de cada reagente nas três induções estão retratados nas Tabelas 1, 2 e 3. A água destilada é utilizada no lugar do TNBS 5% no grupo Controle.

Tabela 1 – Composição das soluções utilizadas na 1^a indução

Grupos TNBS e anti-TNF-α	Grupo Controle
TNBS 5% = 15 μ l	Água destilada = 15 μ l
Etanol 40% = 40 μ l	Etanol 40% = 40 μ l
Salina = 45 μ l	Salina = 45 μ l
Volume Final = 100 μ l	Volume Final = 100 μ l

Fonte: Autor

Tabela 2 – Composição das soluções utilizadas na 2ª indução

Grupos TNBS e anti-TNF-α	Grupo Controle
TNBS 5% = 30 μ l	Água destilada = 30 μ l
Etanol 40%= 40 μ l	Etanol 40%= 40 μ l
Salina = 30 μ l	Salina = 30 μ l
Volume Final = 100 μ l	Volume Final = 100 μ l

Fonte: Autor

Tabela 3 – Composição das soluções utilizadas na 3ª indução

Grupos TNBS e anti-TNF-α	Grupo Controle
TNBS 5% = 50 μ l	Água destilada = 50 μ l
Etanol 40%= 40 μ l	Etanol 40%= 40 μ l
Salina = 10 μ l	Salina = 10 μ l
Volume Final = 100 μ l	Volume Final = 100 μ l

Fonte: Autor

4.5.2 Protocolo fracionado de indução da colite por TNBS

Devido ao número limitado de animais, o experimento foi fracionado, feito com no máximo dois animais por dia. O protocolo fracionado de indução da colite por TNBS é, então,

uma adaptação do protocolo simultâneo descrito anteriormente. Todos os animais tinham de 7 a 8 semanas e passaram pelos 25 dias de experimento. As Tabelas 4, 5 e 6 mostram o cronograma do modelo fracionado de indução da colite por TNBS nos grupos Controle, TNBS e anti-TNF- α , respectivamente.

Cada grupo foi fracionado, de maneira que apenas dois animais tivessem seu período de indução iniciado por dia. Por exemplo, o grupo Controle (n=7) contou com animais que iniciaram o protocolo de indução (Dia 0) nos dias 20, 22, 24 e 26 de Julho de 2018 (Tabela 4). O grupo TNBS (n=11) incluiu animais que começaram nos dias 21, 23, 25 e 26 de Julho de 2018, como também animais que iniciaram nos dias 11 e 13 de Agosto de 2018 (Tabela 5). O grupo anti-TNF- α (n=6) contou com animais que iniciaram nos dias 10, 12 e 14 de Agosto de 2018 (Tabela 6). Cada dupla de camundongos que tinham o mesmo dia de início também possuíam a mesma data para eutanásia. A eutanásia dos animais que sobreviveram ao protocolo de indução se deu 25 dias após a respectiva data de início.

Tabela 4 – Cronograma do protocolo fracionado de indução da colite por TNBS para o grupo Controle

Grupo	Animais	Data de início do protocolo (Dia 0)	Data de término do protocolo (Dia 24)
Controle	1	20/07/18	13/08/18
	2	20/07/18	13/08/18
	3	22/07/18	15/08/18
	4	22/07/18	15/08/18
	5	24/07/18	17/08/18
	6	24/07/18	17/08/18
	7	26/07/18	19/08/18

Fonte: Autor

Tabela 5 – Cronograma do protocolo fracionado de indução da colite por TNBS para o grupo TNBS

Grupo	Animais	Data de início do protocolo (Dia 0)	Data de término do protocolo (Dia 24)
TNBS	1	21/07/18	13/08/18
	2	21/07/18	13/08/18
	3	23/07/18	15/08/18
	4	23/07/18	15/08/18
	5	25/07/18	17/08/18
	6	25/07/18	17/08/18
	7	26/07/18	19/08/18
	8	11/08/18	04/09/18
	9	11/08/18	04/09/18
	10	13/08/18	06/09/18
	11	13/08/18	06/09/18

Fonte: Autor

Tabela 6 – Cronograma do protocolo fracionado de indução da colite por TNBS para o grupo tratamento anti-TNF- α

Grupo	Animais	Data de início do protocolo (Dia 0)	Data de término do protocolo (Dia 24)
Tratamento TNF-α	1	10/08/18	03/09/18
	2	10/08/18	03/09/18
	3	12/08/18	05/09/18
	4	12/08/18	05/09/18
	5	14/08/18	07/09/18
	6	14/08/18	07/09/18

Fonte: Autor

4.6 Tratamento

Os animais do grupo tratado anti-TNF- α recebeu através de gavagem, 1×10^9 UFC da linhagem *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac:*anti-TNF- α*) ressuspendida num volume de 100 μ L de salina. As inoculações foram feitas por cinco dias consecutivos (dias 19, 20, 21, 22 e 23). Durante o mesmo período, os grupos Controle e TNBS receberam o inóculo de salina estéril, pelo mesmo método de gavagem, para que fossem expostos às mesmas condições de estresse e manipulação ao grupo que recebeu o tratamento com a bactéria.

4.7 Retirada do Cólon

Após a eutanásia dos animais, o cólon foi cuidadosamente retirado, lavado e o comprimento foi mensurado considerando sua extensão desde a junção com o ceco até o reto. A medida foi realizada com o auxílio de uma régua graduada em centímetros.

4.8 Análises Estatísticas

As médias de comprimento do cólon e variação do peso foram analisadas pelo teste paramétrico *One-way* e *Two-way* ANOVA seguido pelo Teste de Tukey e Teste de Bonferroni, respectivamente. As comparações foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, California, U.S.A.). Os valores com intervalos de confiança menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados significativos.

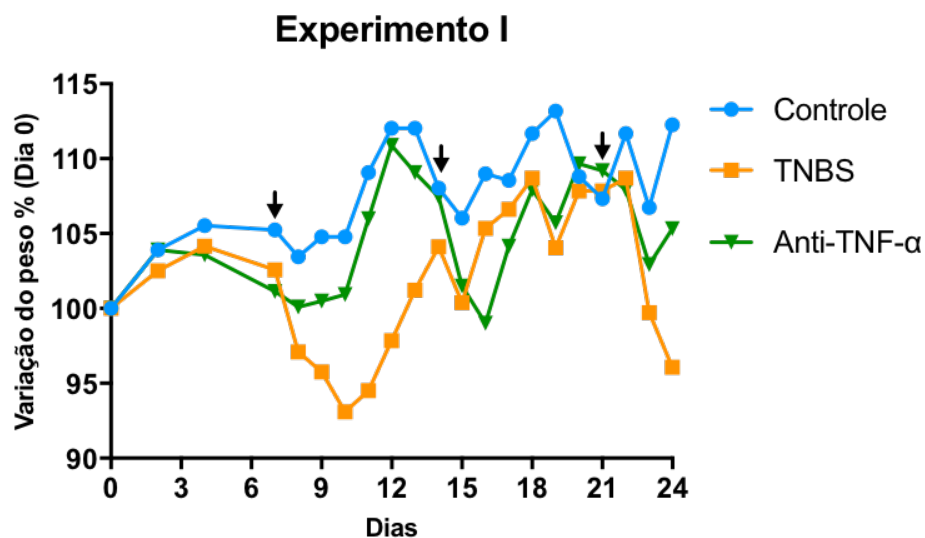
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Peso dos animais

O cálculo, em porcentagem, da variação de peso dos animais foi feito com o objetivo de avaliar de forma sistêmica, a gravidade das lesões causadas pela injeção intra-retal de TNBS. Ele foi feito, inicialmente, considerando 100% de peso no dia 0 do experimento (Figuras 3 e 4).

Durante o Experimento I (protocolo simultâneo de indução da colite por TNBS) o grupo Controle apresentou ganho de peso corporal, como também manteve um valor sempre maior que o seu peso inicial. Por outro lado, os grupos que foram induzidos à colite, apresentaram uma variação de peso considerável durante o experimento, onde as maiores variações foram dadas nos dias seguintes às administrações de TNBS, que se deram nos dias 7, 14 e 21 (Figura 3).

Figura 3 – Variação do peso dos animais no protocolo simultâneo de indução de colite por TNBS



A variação do peso dos animais do modelo simultâneo de indução de colite por TNBS está expressa pela porcentagem em relação ao peso no dia 0. Número de animais por grupo: Controle (n=4), TNBS (n=6) e TNF- α (n=6). As setas indicam as três induções com TNBS, nos dias 7, 14 e 21. Análise realizada utilizando o teste Two-way ANOVA e o pós-teste de Bonferroni, sendo $p < 0,05$. Fonte: Adaptado de França (2018).

Este modelo deve ser acompanhado por uma perda de peso progressiva quando em comparação aos animais que foram administrados com apenas etanol. Além disso, a taxa de mortalidade se eleva com o aumento da perda de peso do animal (NEURATH et al., 1995). A inflamação causada por TNBS é caracterizada pela formação de úlceras focais e granulomas, distorção de criptas e espessamento do cólon (FOLIGNÉ et al., 2006a).

O TNF- α têm efeitos significantes no metabolismo energético e apetite, estando envolvido na perda de peso em diversas doenças, como obesidade (M.BULLÓ-BONET et al., 1999) e a doença pulmonar obstrutiva crônica (FRANCIA et al., 1994). Ele atua como inibidor da diferenciação de adipócitos, por meio da supressão de marcadores metabólicos responsáveis

por este processo, como a lipoproteína lipase (LPL) , glicerol-3-fosfato desidrogenase e o transportador de glicose tipo 4 (GLUT4). Além disso, o TNF- α também promove a lipólise de adipócitos maduros e interfere a cascata de sinalização da insulina, impedindo absorção de glicose pelo mecanismo de transporte dependente de insulina (HUBE; HAUNER, 2000). Outra molécula importante em quadros de obesidade, é a leptina, esta também pode ter sua expressão e secreção aumentada quando estimulada pelo aumento de TNF- α no organismo (KIRCHGESSNER et al., 1998).

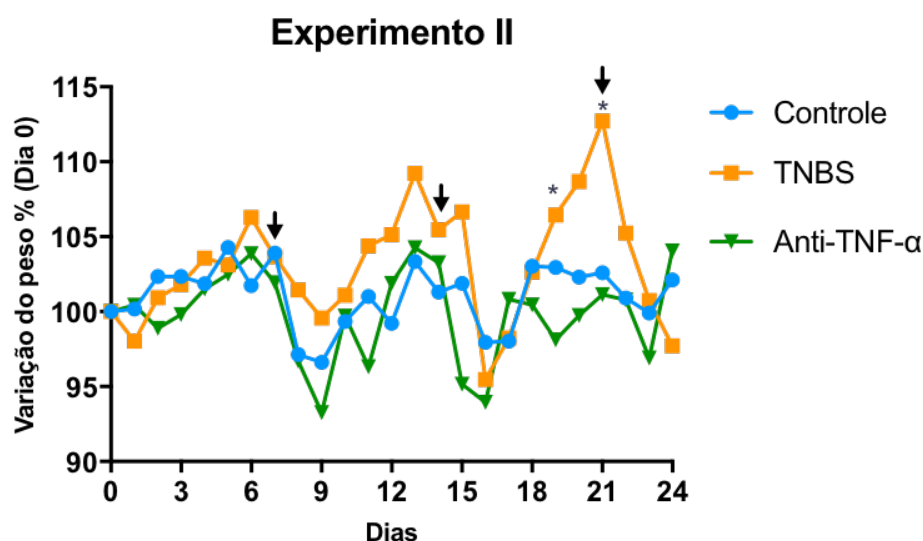
Os animais do grupo TNBS e anti-TNF- α apresentaram uma perda de peso por 2-3 dias seguidos após a injeção de TNBS, assim como os estudos realizados por Ávila-Román et al. (2016) e Mariman et al. (2011). Os camundongos tratados com anti-TNF- α apresentaram uma perda de peso menor que o grupo TNBS entre a primeira e segunda instilação (Dias 7 a 14), e depois da segunda indução este valor de perda de peso se manteve equivalente à variação do grupo TNBS. No dia da eutanásia (Dia 24), os grupos Controle e anti-TNF- α apresentaram uma porcentagem de peso maior que seus respectivos pesos iniciais, enquanto que o grupo TNBS mostrou a menor porcentagem de peso corporal.

Foi observada uma diferença estatística entre os grupos Controle e TNBS, mas não houve diferença entre os grupos TNBS e anti-TNF- α . A comparação entre os grupos Controle e anti-TNF- α também mostrou não ser estatisticamente significativa. Estes dados sugerem que o tratamento com o anti-TNF- α foi capaz de diminuir ou prevenir o dano tecidual causado pela indução com TNBS, resultados similares foram encontrados por Li et al. (2017).

Durante o Experimento II (protocolo fracionado de indução da colite por TNBS), representado na Figura 4, o grupo Controle apresentou ganho de peso corporal, mas diferentemente do observado no Experimento I, não manteve um valor sempre maior que o seu peso inicial. Tanto o grupo Controle, quanto os grupos que foram induzidos à colite, apresentaram uma variação de peso considerável durante o experimento. De maneira similar à Figura 3, as maiores variações ocorreram nos dias seguintes às administrações de TNBS, que se deram nos dias 7, 14 e 21(Figura 4).

Os camundongos tratados com anti-TNF- α apresentaram uma perda de peso similar ao grupo TNBS e Controle durante toda indução até chegar no período de tratamento, entre os dias 19 e 23. Dentro deste período foram encontrados dois dias (Dias 19 e 21) em que houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos TNBS e anti-TNF- α , estes estão representados no gráfico por um (*). No dia da eutanásia (Dia 24), de forma parecida à Figura 3, os grupos Controle e anti-TNF- α apresentaram uma porcentagem de peso maior que seus respectivos pesos iniciais, enquanto que o grupo TNBS mostrou a menor porcentagem de peso corporal.

Figura 4 – Variação do peso dos animais no protocolo fracionado de indução de colite por TNBS

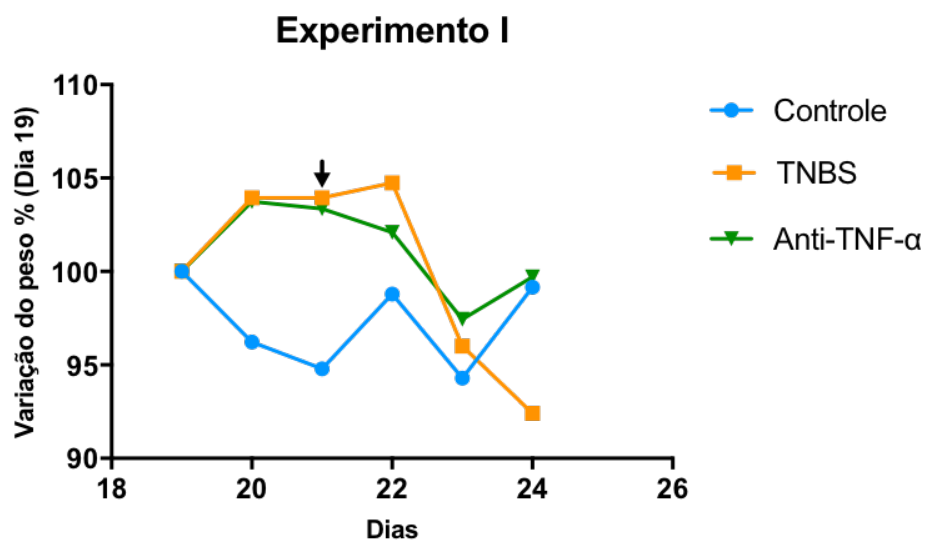


A variação do peso dos animais do modelo fracionado de indução de colite por TNBS está expressa pela porcentagem em relação ao peso no dia 0. Número de animais por grupo: Controle (n=6), TNBS (n=6) e TNF- α (n=6). As setas indicam as três induções com TNBS, nos dias 7, 14 e 21. Análise realizada utilizando o teste Two-way ANOVA e o pós-teste de Bonferroni, sendo $p < 0,05$. (*) equivale a diferença estatisticamente significativa entre os grupos TNBS e anti-TNF- α . Fonte: Autor.

As Figuras 5 e 6 mostram a variação do peso em relação ao peso do animal no primeiro dia de tratamento (Dia 19) nos protocolos simultâneo e fracionado, respectivamente. Dentro deste período está a última indução com TNBS, que ocorre no dia 21. Após cada administração de TNBS, o animal apresenta uma perda de peso. Um dos mecanismos pelo qual esta alteração acontece no protocolo murino de indução de colite por TNBS foi descrito por Gurung et al. (2018) e envolve a via de sinalização intracelular atrelada ao receptor de fator de necrose tumoral 1 (TNF-R1). Esta via está diretamente relacionada à ativação do NF- κ B, esta ativação foi causada pelo aumento de TNF- α , em que esta via atua como um dos mecanismos principais na fisiopatologia da colite crônica, aumentando a expressão de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias.

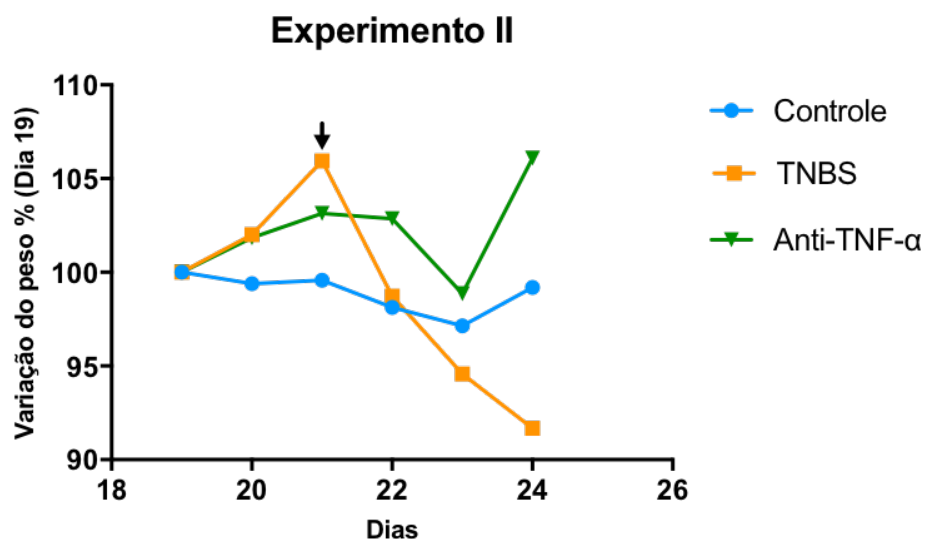
Contudo, não houve diferença significativa entre as médias dos grupos Controle, TNBS e anti-TNF- α no protocolo simultâneo durante o período de tratamento, entre os dias 19 e 23 (Figura 5). O mesmo resultado foi observado no protocolo fracionado de indução da colite por TNBS (Figura 6). Apesar de não apresentar uma diferença estatisticamente significativa, o gráfico apresenta uma tendência ao resultado pretendido. Estes resultados, para serem validados, necessitariam de um maior número de animais por grupo. Em sua maioria, as pesquisas que envolvem o método de indução por TNBS utilizam um número de animais por grupo maior que 10. Alguns destes estudos, como os realizados por Jeong et al. (2013) e Mariman et al. (2011), utilizam entre 10 e 12 animais em cada grupo analisado que passa pelo método de indução por TNBS.

Figura 5 – Variação do peso dos animais entre os dias 19 e 24 no protocolo simultâneo de indução de colite por TNBS



A variação do peso dos animais do modelo simultâneo de indução de colite por TNBS está expressa pela porcentagem em relação ao peso no início do tratamento (Dia 19) com a *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac:anti-TNF- α). Número de animais por grupo: Controle (n=4), TNBS (n=6) e TNF- α (n=6). Percentual de variação do peso em relação ao início do tratamento (Dia 19) com a *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac:anti-TNF- α). Análise realizada utilizando o teste Two-way ANOVA e o pós-teste de Bonferroni, sendo $p < 0,05$. Fonte: Autor.

Figura 6 – Variação do peso dos animais entre os dias 19 e 24 no protocolo fracionado de indução da colite por TNBS



A variação do peso dos animais do modelo fracionado de indução de colite por TNBS está expressa pela porcentagem em relação ao peso no início do tratamento (Dia 19) com a *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac:anti-TNF- α). Número de animais por grupo: Controle (n=6), TNBS (n=6) e TNF- α (n=6). Percentual de variação do peso em relação ao início do tratamento (Dia 19) com a *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac:anti-TNF- α). Análise realizada utilizando o teste Two-way ANOVA e o pós-teste de Bonferroni, sendo $p < 0,05$. Fonte: Autor.

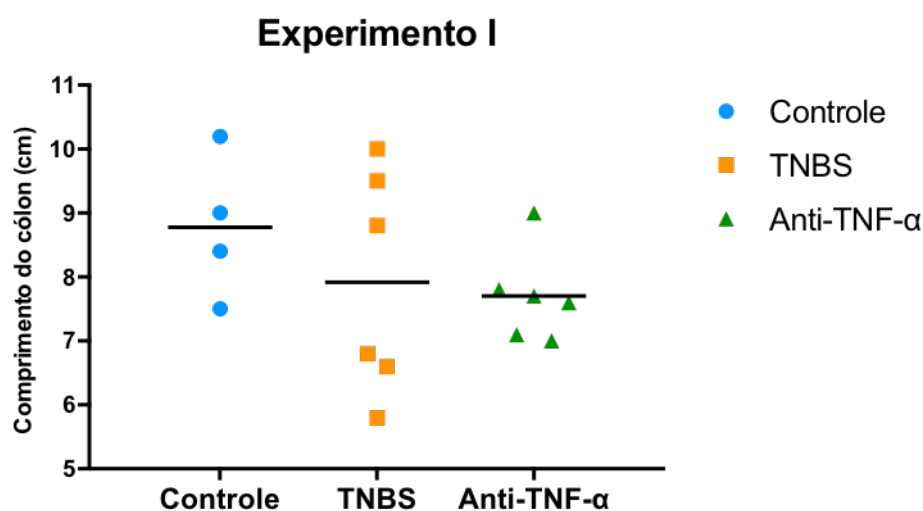
5.2 Comprimento do cólon

Em relação à análise do comprimento do cólon no protocolo simultâneo de indução de colite por TNBS (Figura 7), a média de comprimento do cólon do grupo Controle foi de 8.775 cm, apresentando uma variação entre 7.5 e 10.2 cm. Para o grupo TNBS, a média foi de 7.916 cm, com uma variação entre 5.8 e 10 cm. E para o grupo anti-TNF- α , a média foi de 7.7 cm, com valores variando entre 7 e 9 cm. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a média dos três grupos. Este dado sugere que o tratamento com anti-TNF- α não promoveu uma melhora significativa quanto ao encurtamento do cólon encontrado no grupo TNBS.

O protocolo de colite induzida por TNBS utilizada neste trabalho demonstrou semelhanças quanto aos sinais clínicos observados na doença de Crohn em humanos, como perda de peso, diarreia, sangramento retal e prolapso retal (JONES-HALL; GRISHAM, 2014).

Outros estudos mostram que durante a progressão da doença de Crohn, ocorre um espessamento da parede intestinal com presença de fibrose, levando a uma tração da camada muscular e resultando num encurtamento do cólon (FOLIGNÉ et al., 2006b). Além disso, o desenvolvimento da colite crônica pelo protocolo de indução por TNBS, deve apresentar, em comparação ao grupo Controle, uma diminuição no comprimento do cólon dos animais induzidos por TNBS. Esta alteração pode ser vista em estudos realizados por Oh et al. (2014) e Jeong et al. (2013).

Figura 7 – Comprimento do cólon no protocolo simultâneo de indução de colite por TNBS



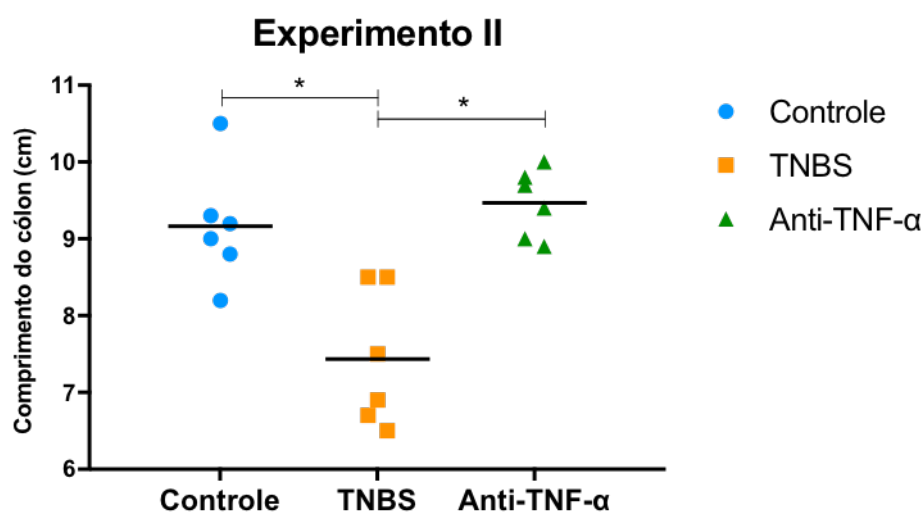
Número de animais por grupo: Controle (n=4), TNBS (n=6) e TNF- α (n=6). Análise comparativa entre os grupos foi realizada pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey, sendo $p < 0,05$. Fonte: Autor

Quanto ao protocolo fracionado de indução da colite por TNBS (Figura 8), o comprimento do cólon dos animais do grupo Controle variou entre 8.2 e 10.5 cm, com uma média de 9.166 cm. Para o grupo TNBS o comprimento variou entre 6.5 e 8.5 cm, com uma média de 7.433 cm. E o grupo anti-TNF- α obteve uma média de 9.466 cm, com uma variação entre 8.9 e 10 cm. Neste

gráfico é importante destacar que houve uma diferença significativa entre a média dos grupos Controle e TNBS, e dos grupos anti-TNF- α e TNBS. Mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e anti-TNF- α .

A diminuição do comprimento do cólon encontrada nos animais do grupo TNBS condiz com o que era esperado para este protocolo, como também demonstra a semelhança deste aos sinais clínicos da doença de Crohn. Este mesmo resultado pode ser encontrado em outros estudos que utilizaram o protocolo de indução com TNBS para avaliação da eficácia ou efeito protetor de uma molécula de interesse. O resultado apresentado na Figura 8 é compatível aos resultados obtidos nos estudos do farrerol (RAN et al., 2018), extrato de antocianinas do mirtilo (WU et al., 2011) e óleo de cominho preto (ISIK et al., 2010). Em todos três experimentos citados houve uma diminuição dos níveis de anti-TNF- α , seja por meio do bloqueio pelo anticorpo monoclonal quanto pela ação intracelular dos respectivos compostos. Houve também um aumento no comprimento do cólon do grupo tratado quando em comparação ao grupo TNBS. Estes dados comprovam a ação benéfica dos respectivos tratamentos na resposta inflamatória contra a indução da colite por TNBS e o efeito protetor destas moléculas, incluindo o anticorpo anti-TNF- α (SHEN et al., 2007).

Figura 8 – Comprimento do cólon no protocolo fracionado de indução da colite por TNBS



Número de animais por grupo: Controle (n=6), TNBS (n=6) e TNF- α (n=6). Análise comparativa entre os grupos foi realizada pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey, sendo $p < 0,05$. Fonte: Autor.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em concordância à hipótese levantada neste estudo, a alteração do protocolo não influenciou de forma significativa os resultados observados quanto à variação de peso e comprimento do cólon dos animais.

Quanto à variação do peso dos animais, não houve uma diferença significativa entre os dois protocolos de indução da colite por TNBS (simultâneo e fracionado). E em relação ao comprimento do cólon dos animais, o protocolo fracionado de indução da colite por TNBS apresentou um resultado satisfatório e mais aproximado ao que se encontra em outros trabalhos.

Embora a indução seja feita de forma fracionada, deve-se manter da melhor forma possível o controle de todas as variáveis. Estudos futuros, com um maior número de animais e avaliação de outros parâmetros, são necessários para obter uma melhor compreensão destes dois modelos de indução da colite por TNBS.

Referências

- ABRAHAM, C.; CHO, J. H. Inflammatory bowel disease. **The New England journal of medicine**, v. 361, p. 2066 – 78, 11 2009.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 12, p. 205 – 17, 3 2015.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. et al. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 15, p. 39 – 49, 10 2017.
- ANDERSON, C. A. et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. **Nature genetics**, v. 43, p. 246 – 52, 2 2011.
- ANDOH, A. et al. Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Gastroenterology April 2011, Volume 46, Issue 4, pp 479–486**, v. 46, n. 4, p. 479 – 486, Abril 2011.
- ANTONIOU, E. et al. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. **Annals of medicine and surgery (2012)**, v. 11, p. 9 – 15, 9 2016.
- ATREYA, R. et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. **Nature medicine**, v. 6, p. 583 – 8, 5 2000.
- ÁVILA-ROMÁN, 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**, Cambridge University Press, v. 116, n. 12, p. 2044 – 2052, 2016. ISSN 0007-1145.
- BÄCKHED, F. et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science (New York, N.Y.)**, v. 307, p. 1915 – 20, 3 2005.
- BAHEY-EL-DIN, M.; GAHAN, C. G. M.; GRIFFIN, B. T. Lactococcus lactis as a cell factory for delivery of therapeutic proteins. **Current gene therapy**, v. 10, p. 34 – 45, 2 2010.
- BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Crohn's disease. **Lancet (London, England)**, v. 380, p. 1590 – 605, 8 2012.
- BÄUMLER, A. J.; SPERANDIO, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**, v. 535, p. 85 – 93, 7 2016.
- BENGMARK, S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. **Gut**, v. 42, p. 2 – 7, 3 1998.
- BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G. et al. Engineering lactococci and lactobacilli for human health. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 278 – 283, Junho 2013.
- BESTEN, G. den et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of lipid research**, v. 54, p. 2325 – 40, 7 2013.
- BIONDO-SIMÕES, M. D. L. P. et al. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. **Rev bras Coloproct**, v. 23, n. 3, p. 172 – 182, 2003.

- BIRRENBACH, T.; BÖCKER, U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. **Inflammatory bowel diseases**, v. 10, p. 848 – 59, 1 2005.
- BLACK, R. A. et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. **Nature**, v. 385, p. 729 – 33, 2 1997.
- BLUMBERG, R. S.; SAUBERMANN, L. J.; STROBER, W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. **Current opinion in immunology**, v. 11, p. 648 – 56, 1 2000.
- BOLOTIN, A. et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. **Genome research**, v. 11, p. 731 – 53, 5 2001.
- BONEN, D. K.; CHO, J. H. The genetics of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 124, p. 521 – 36, 1 2003.
- BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, p. 521 – 33, 7 2003.
- BRANDE, J. M. H. V. den et al. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 124, p. 1774 – 85, 6 2003.
- C, N. S. et al. Relationship between human intestinal dendritic cells, gut microbiota, and disease activity in Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 17, n. 10, p. 2027 – 2037, Outubro 2011.
- CANO-GARRIDO, O.; SERAS-FRANZOSO, J.; GARCIA-FRUITÓS, E. Lactic acid bacteria: reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes. **Microbial Cell Factories**, BioMed Central, v. 14, p. 137 –, 2015. ISSN 1475-2859. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4573465/>>.
- CANTORNA, M. T. et al. 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. **The Journal of nutrition**, v. 130, p. 2648 – 52, 10 2000.
- CARVALHO, R. D. D. O. et al. Use of Wild Type or Recombinant Lactic Acid Bacteria as an Alternative Treatment for Gastrointestinal Inflammatory Diseases: A Focus on Inflammatory Bowel Diseases and Mucositis. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 800 –, 5 2017.
- CHANG, C.; LIN, H. Dysbiosis in gastrointestinal disorders. **Best practice & research. Clinical gastroenterology**, v. 30, p. 3 – 15, 4 2016.
- CHATEL, J. et al. In vivo transfer of plasmid from food-grade transiting lactococci to murine epithelial cells. **Gene therapy**, v. 15, p. 1184 – 90, 4 2008.
- CHEN, G. et al. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. **Annual review of pathology**, v. 4, p. 365 – 98, 10 2008.
- CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1102 – 1107, 2012. ISSN 0734-9750.

COHEN, B. L.; SACHAR, D. B. Update on anti-tumor necrosis factor agents and other new drugs for inflammatory bowel disease. **BMJ**, BMJ Publishing Group Ltd, v. 357, 2017. ISSN 0959-8138. Disponível em: <<https://www.bmj.com/content/357/bmj.j2505>>.

COLE, S. P. Monoclonal antibodies. **Canadian family physician Medecin de famille canadien**, v. 33, p. 369 – 72, Fevereiro 1987.

COONEY, R. et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. **Nature medicine**, v. 16, p. 90 – 7, 12 2010.

COSNES, J. What is the link between the use of tobacco and IBD? **Inflammatory bowel diseases**, v. 14 Suppl 2, p. S14 – 5, 9 2008.

COSNES, J. et al. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 140, p. 1785 – 94, 5 2011.

DANESE, S.; FIOCCHI, C. Ulcerative colitis. **The New England journal of medicine**, v. 365, p. 1713 – 25, 11 2011.

DANIEL, C. et al. Recombinant lactic acid bacteria as mucosal biotherapeutic agents. **Trends in biotechnology**, v. 29, p. 499 – 508, 6 2011.

DEVENTER, S. J. V. Tumour necrosis factor and Crohn's disease. **Gut**, v. 40, p. 443 – 8, 4 1997.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 8, p. 253 – 65, 6 1998.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, p. 3720 – 32, 2 2011.

DUERR, R. H. et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. **Science (New York, N.Y.)**, v. 314, p. 1461 – 3, 10 2006.

EBERT, E. C. et al. T-cell abnormalities in inflammatory bowel disease are mediated by interleukin 2. **Clinical immunology and immunopathology**, v. 33, p. 232 – 44, 11 1984.

ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, p. 1635 – 8, 4 2005.

EEDEN, S. F. van et al. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 164, p. 826 – 30, 9 2001.

ELSON, C. O. et al. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 109, p. 1344 – 67, 10 1995.

FLORY, C. M. et al. Regulatory roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in monocyte chemoattractant protein-1-mediated pulmonary granuloma formation in the rat. **The American journal of pathology**, v. 146, p. 450 – 62, 2 1995.

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, p. 390 – 400, 3 2006.

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, p. 390 – 400, 3 2006.

FRANÇA, A. D. **Análise dos parâmetros macroscópicos e histológicos em modelo murino de doença de Crohn induzida por TNBS tratado com Lactococcus lactis carreadores de plasmídeos para a entrega de gene de fragmento de anti-TNF-alfa na mucosa intestinal**. 2018. 50 p. Monografia (Biotecnologia) — Universidade Federal da Paraíba.

FRANCIA, M. D. et al. Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 150, p. 1453 – 5, 11 1994.

FRANKE, A. et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. **Nature genetics**, v. 42, p. 1118 – 25, 11 2010.

GENSOLLEN, T. et al. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. **Science (New York, N.Y.)**, v. 352, p. 539 – 44, 4 2016.

GILL, S. R. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 312, p. 1355 – 9, 6 2006.

GONÇALVES, C. C. M. et al. Alternativas terapêuticas em modelos experimentais de doença inflamatória intestinal. **Ciência Cuidado e Saúde**, v. 7, n. 1, p. 107 – 111, 2008.

GOODHAND, J. R. et al. Do antidepressants influence the disease course in inflammatory bowel disease? A retrospective case-matched observational study. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 18, n. 7, p. 1232 – 1239, Julho 2012.

GRIMES, C. L. et al. The innate immune protein Nod2 binds directly to MDP, a bacterial cell wall fragment. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 13535 – 7, 8 2012.

GUIMARÃES, V. et al. A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. **Genetic vaccines and therapy**, v. 7, p. 4 –, 2 2009.

GUIMARÃES, V. et al. A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. **Genetic vaccines and therapy**, v. 7, p. 4 –, 2 2009.

GURUNG, P. et al. Ameliorating effect of TI-1-162, a hydroxyindenone derivative, against TNBS-induced rat colitis is mediated through suppression of RIP/ASK-1/MAPK signaling. **European journal of pharmacology**, v. 827, p. 94 – 102, 3 2018.

H, H. et al. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 1093 – 1101, Novembro 2005.

HA, F.; KHALIL, H. Crohn's disease: a clinical update. **Therapeutic advances in gastroenterology**, SAGE Publications Ltd STM, v. 8, n. 6, p. 352 – 9, 11 2015. ISSN 1756-2848.

HA, F.; KHALIL, H. Crohn's disease: a clinical update. **Therapeutic advances in gastroenterology**, v. 8, p. 352 – 9, 11 2015.

- HANAUER, S. B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflammatory bowel diseases**, v. 12 Suppl 1, p. S3 – 9, 12 2005.
- HAYASHI, H.; SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. **Microbiology and immunology**, v. 46, p. 535 – 48, 10 2002.
- HOLTMANN, M. H. et al. Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo. **European journal of immunology**, v. 32, p. 3142 – 51, 1 2003.
- HOMER, C. R. et al. ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 139, n. 5, p. 1630 – 1641, Novembro 2010.
- HOUGHTLING, P. D.; WALKER, W. A. Why is initial bacterial colonization of the intestine important to infants' and children's health? **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 60, p. 294 – 307, 10 2014.
- HUBE, F.; HAUNER, H. The role of TNF-alpha in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance? **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme**, v. 31, p. 626 – 31, 2 2000.
- HUGOT, J. P. et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v. 411, p. 599 – 603, 6 2001.
- HWANG, J. M.; VARMA, M. G. Surgery for inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 17, p. 2678 – 2690, Maio 2008.
- ILAN, Y. et al. Oral administration of OKT3 monoclonal antibody to human subjects induces a dose-dependent immunologic effect in T cells and dendritic cells. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 1, p. 167 – 177, 1 2010.
- INNOCENTIN, S. et al. Lactococcus lactis expressing either Staphylococcus aureus fibronectin-binding protein A or Listeria monocytogenes internalin A can efficiently internalize and deliver DNA in human epithelial cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 14, p. 4870 – 4878, Julho 2009.
- ISIK, F. et al. Protective effects of black cumin (Nigella sativa) oil on TNBS-induced experimental colitis in rats. **Digestive diseases and sciences**, v. 56, p. 721 – 30, 7 2010.
- ITO, H. et al. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 126, n. 4, p. 989 – 996, Abril 2004.
- JEONG, J. et al. Kalopanaxsaponin B Ameliorates TNBS-Induced Colitis in Mice. **Biomolecules & therapeutics**, v. 20, p. 457 – 62, 9 2013.
- JONES-HALL, Y. L.; GRISHAM, M. B. Immunopathological characterization of selected mouse models of inflammatory bowel disease: Comparison to human disease. **Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology**, v. 21, p. 267 – 88, 6 2014.
- JOOSSENS, M. et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. **Gut**, v. 60, p. 631 – 7, 1 2011.

- KAMADA, N. et al. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, p. 2269 – 80, 5 2008.
- KANAI, T. et al. Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 121, p. 875 – 88, 10 2001.
- KENNEDY, N. A. et al. The Impact of NOD2 Variants on Fecal Microbiota in Crohn's Disease and Controls Without Gastrointestinal Disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 24, n. 3, p. 583 – 592, Feb 2018. ISSN 1078-0998.
- KHALILI, A. et al. CD4+CD25+CD127low FoxP3+ regulatory T cells in Crohn's disease. **Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne**, 2 2018.
- KHOR, B.; GARDET, A.; XAVIER, R. J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, p. 307 – 17, 6 2011.
- K.H.SCHLEIFER et al. Transfer of Streptococcus lactis and Related Streptococci to the Genus Lactococcus gen. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 183 – 195, Setembro 1985.
- KIRCHGESSNER, T. G. et al. Tumor necrosis factor-alpha contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. **The Journal of clinical investigation**, v. 100, p. 2777 – 82, 2 1998.
- KLEIN, G. et al. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 41, p. 103 – 25, 8 1998.
- KONG, J. et al. Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 294, p. G208 – 16, 10 2007.
- KUNERT, R.; REINHART, D. Advances in recombinant antibody manufacturing. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, p. 3451 – 61, 3 2016.
- LANGE, K. M. de; BARRETT, J. C. Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics. **Journal of autoimmunity**, v. 64, p. 91 – 100, 8 2015.
- LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, p. a001651 –, 5 2010.
- LEPPKES, M. et al. Pleiotropic functions of TNF- α in the regulation of the intestinal epithelial response to inflammation. **International immunology**, v. 26, p. 509 – 15, 5 2014.
- LESLIE, W. D. et al. Vitamin D status and bone density in recently diagnosed inflammatory bowel disease: the Manitoba IBD Cohort Study. **The American journal of gastroenterology**, v. 103, p. 1451 – 9, 4 2008.
- LI, Z. et al. Effectiveness of C5a aptamers in a TNBS-induced colitis mouse model. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 14, p. 6119 – 6124, 12 2017.
- LOFTUS, E. V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v. 126, p. 1504 – 17, 5 2004.

- LOIR, Y. L. et al. Protein secretion in *Lactococcus lactis* : an efficient way to increase the overall heterologous protein production. **Microbial cell factories**, v. 4, p. 2 –, 1 2005.
- MÄHLER, M.; LEITER, E. H. Genetic and environmental context determines the course of colitis developing in IL-10-deficient mice. **Inflammatory bowel diseases**, v. 8, p. 347 – 55, 12 2002.
- MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. **Journal of bacteriology**, v. 189, p. 1199 – 208, 11 2007.
- MANNON, P. J. et al. Anti-Interleukin-12 Antibody for Active Crohn's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 20, p. 2069 – 2079, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1056/NEJMoa033402>>.
- MARIMAN, R. et al. Gene expression profiling identifies mechanisms of protection to recurrent trinitrobenzene sulfonic acid colitis mediated by probiotics. **Inflammatory bowel diseases**, v. 18, p. 1424 – 33, 12 2011.
- MARTINEZ, F. A. C. et al. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, n. 1, p. 70 – 83, Março 2013.
- MARTINEZ-MEDINA, M. et al. Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. **Inflammatory bowel diseases**, v. 12, p. 1136 – 45, 11 2006.
- MAUNDER, R. G. Evidence that stress contributes to inflammatory bowel disease: evaluation, synthesis, and future directions. **Inflammatory bowel diseases**, v. 11, p. 600 – 8, 5 2005.
- M.BULLÓ-BONET et al. Tumour necrosis factor, a key role in obesity? **FEBS Letters**, v. 451, n. 3, p. 215 – 219, 1999. ISSN 0014-5793.
- MCDONALD, C.; INOHARA, N.; NUÑEZ, G. Peptidoglycan signaling in innate immunity and inflammatory disease. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, p. 20177 – 80, 4 2005.
- MCGEACHY, M. J.; CUA, D. J. The link between IL-23 and Th17 cell-mediated immune pathologies. **Seminars in immunology**, v. 19, p. 372 – 6, 3 2008.
- MECONI, S. et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro. **Cellular microbiology**, v. 9, p. 1252 – 61, 1 2007.
- MERCENIER, A.; MÜLLER-ALOUF, H.; GRANGETTE, C. Lactic acid bacteria as live vaccines. **Current issues in molecular biology**, v. 2, n. 1, p. 17 – 25, 7 2000.
- MIERAU, I.; KLEEREBEZEM, M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 68, p. 705 – 17, 8 2005.
- MILLS, S. et al. Plasmids of lactococci - genetic accessories or genetic necessities? **FEMS microbiology reviews**, v. 30, p. 243 – 73, 2 2006.
- MIYOSHI, A. et al. A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. **FEMS microbiology letters**, v. 239, p. 205 – 12, 10 2004.
- MONTELEONE, G. et al. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. **Gastroenterology**, v. 112, p. 1169 – 78, 4 1997.

- MORRIS, G. P. et al. Hapten-Induced Model of Chronic Inflammation and Ulceration in the Colon. **Gastroenterology**, v. 96, p. 795 – 603, 1989.
- MURPHY, C. A. et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. **The Journal of experimental medicine**, v. 198, p. 1951 – 7, 12 2003.
- NATIVIDAD, J. M. M.; VERDU, E. F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. **Pharmacological research**, v. 69, p. 42 – 51, 10 2012.
- NETEA, M. G. et al. NOD2 3020insC mutation and the pathogenesis of Crohn's disease: impaired IL-1beta production points to a loss-of-function phenotype. **The Netherlands journal of medicine**, v. 63, p. 305 – 8, 9 2005.
- NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, p. 329 – 42, 4 2014.
- NEURATH, M. F. Current and emerging therapeutic targets for IBD. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 14, p. 269 – 278, 2 2017.
- NEURATH, M. F.; FINOTTO, S.; GLIMCHER, L. H. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. **Nature medicine**, v. 8, p. 567 – 73, 6 2002.
- NEURATH, M. F. et al. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, p. 1281 – 90, 11 1995.
- NG, S. C. et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **The Lancet**, v. 390, n. 10114, p. 2769 – 2778, Dezembro 2017.
- NOUAILLE, S. et al. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 2, p. 102 – 11, 8 2003.
- NOUAILLE, S. et al. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 2, p. 102 – 11, 8 2003.
- OGURA, Y. et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v. 411, p. 603 – 6, 6 2001.
- OH, S. Y. et al. Comparison of experimental mouse models of inflammatory bowel disease. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 33, n. 2, p. 333 – 340, 2 2014.
- PALEOLOG, E. M. et al. Functional activities of receptors for tumor necrosis factor-alpha on human vascular endothelial cells. **Blood**, v. 84, p. 2578 – 90, 10 1994.
- PALMELA, C. et al. Adherent-invasive. **Gut**, v. 67, p. 574 – 587, 11 2017.
- PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 13, p. 469 – 73, 10 2015.
- PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature immunology**, v. 6, p. 1133 – 41, 10 2005.

- PARK, J. H. et al. IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules. **Autoimmunity reviews**, v. 16, p. 416 – 426, 2 2017.
- PERRIER, C. et al. Neutralization of membrane TNF, but not soluble TNF, is crucial for the treatment of experimental colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 19, n. 2, p. 246 – 253, Fevereiro 2013.
- PEYRIN-BIROULET, L. Anti-TNF therapy in inflammatory bowel diseases: a huge review. **Minerva gastroenterologica e dietologica**, v. 56, p. 233 – 43, 5 2010.
- PITHADIA, A. B.; JAIN, S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). **Pharmacological reports : PR**, v. 63, p. 629 – 42, 8 2011.
- PODOLSKY, D. K. Inflammatory bowel disease. **The New England journal of medicine**, v. 347, p. 417 – 29, 8 2002.
- POGGIOLI, G. et al. Infliximab in the treatment of Crohn's disease. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 3, p. 301 – 8, 3 2008.
- PONTES, D. et al. Production of Fibronectin Binding Protein A at the Surface of *Lactococcus lactis* Increases Plasmid Transfer In Vitro and In Vivo. **PLOS ONE**, Public Library of Science, v. 7, n. 9, p. e44892 – –, Sep 2012.
- PONTES, D. S. et al. *Lactococcus lactis* as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems. **Protein expression and purification**, v. 79, p. 165 – 75, 6 2011.
- POWRIE, F. et al. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. **Immunity**, v. 1, p. 553 – 62, 10 1994.
- QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, p. 59 – 65, Março 2010.
- 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, p. 6296 – 302, 9 2001.
- RAN, X. et al. Farrerol Ameliorates TNBS-Induced Colonic Inflammation by Inhibiting ERK1/2, JNK1/2, and NF- κ B Signaling Pathway. **International journal of molecular sciences**, v. 19, 7 2018.
- RANDHAWA, P. K. et al. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. **The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology**, v. 18, p. 279 – 88, 9 2014.
- REILLY, R. M.; DOMINGO, R.; SANDHU, J. Oral delivery of antibodies. Future pharmacokinetic trends. **Clinical pharmacokinetics**, v. 32, p. 313 – 23, 4 1997.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 172 –, 5 2014.
- ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, p. 313 – 23, 4 2009.

SALES-CAMPOS, H. et al. Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 48, p. 96 – 107, 12 2014.

SANDBORN, W. J. et al. Ustekinumab Induction and Maintenance Therapy in Refractory Crohn's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 16, p. 1519 – 1528, 2012. PMID: 23075178. Disponível em: <<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203572>>.

SANDBORN, W. J.; HANAUER, S. B. Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agents, pharmacology, clinical results, and safety. **Inflammatory bowel diseases**, v. 5, p. 119 – 33, 5 1999.

SANDBORN, W. J.; HANAUER, S. B. Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agents, pharmacology, clinical results, and safety. **Inflammatory bowel diseases**, v. 5, p. 119 – 33, 5 1999.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition reviews**, v. 61, p. 91 – 9, 5 2003.

SANDS, B. E.; KAPLAN, G. G. The role of TNFalpha in ulcerative colitis. **Journal of clinical pharmacology**, v. 47, p. 930 – 41, 6 2007.

SATSANGI, J. et al. Genetics of inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 35, p. 696 – 700, 5 1994.

SCALLON, B. J. et al. Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions. **Cytokine**, v. 7, p. 251 – 9, 4 1995.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLoS biology**, v. 14, p. e1002533 –, 8 2016.

SHAH, B.; MAYER, L. Current status of monoclonal antibody therapy for the treatment of inflammatory bowel disease. **Expert review of clinical immunology**, v. 6, p. 607 – 20, 7 2010.

SHAW, M. H. et al. The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition, and T cell activation. **Trends in immunology**, v. 32, p. 73 – 9, 1 2011.

SHEN, C. et al. Remission-inducing effect of anti-TNF monoclonal antibody in TNBS colitis: Mechanisms beyond neutralization? **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 13, n. 3, p. 308 – 316, Mar 2007. ISSN 1078-0998.

SHEN, Z. et al. Update on intestinal microbiota in Crohn's disease 2017: Mechanisms, clinical application, adverse reactions, and outlook. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 32, p. 1804 – 1812, 7 2017.

SHUKLA, A. A.; THÖMMES, J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. **Trends in biotechnology**, v. 28, p. 253 – 61, 3 2010.

SIEGMUND, B. et al. Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 281, p. R1264 – 73, 9 2001.

- SILVEIRA, R. C. et al. Doença de Crohn em recém-nascido. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Cidade Editora Científica Ltda, v. 28, n. 3, p. 338 – 341, 09 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-98802008000300012&lng=en&nrm=iso>.
- SINGH, S. et al. Monoclonal Antibodies: A Review. **Current clinical pharmacology**, v. 13, p. 85 – 99, 8 2017.
- SMART, S. J.; CASALE, T. B. TNF-alpha-induced transendothelial neutrophil migration is IL-8 dependent. **The American journal of physiology**, v. 266, p. L238 – 45, 3 1994.
- SPADIUT, O. et al. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. **Trends in biotechnology**, v. 32, p. 54 – 60, 11 2013.
- STEIDLER, L. et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. **Science (New York, N.Y.)**, v. 289, p. 1352 – 5, 8 2000.
- STROBER, W.; FUSS, I.; MANNON, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, p. 514 – 21, 3 2007.
- STROBER, W.; FUSS, I. J.; BLUMBERG, R. S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annual review of immunology**, v. 20, p. 495 – 549, 2 2002.
- TAVARES, L. M. **Análise dos parâmetros macro e microscópicos da Doença de Crohn em modelo animal tratado com *Lactococcus lactis* carreadores de plasmídeos para expressão local de anti-IL-1 β** . 2018. 48 p. Monografia (Biotecnologia) — Universidade Federal da Paraíba.
- TERZAGHI, B. E.; SANDINE, W. E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. **Applied microbiology**, v. 29, p. 807 – 13, 6 1975.
- TONTINI, G. E. et al. Differential diagnosis in inflammatory bowel disease colitis: state of the art and future perspectives. **World journal of gastroenterology**, v. 21, p. 21 – 46, 1 2015.
- V, C. et al. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 5, p. 2434 – 2440, 3 1995.
- VUYST, L. D.; LEROY, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 13, p. 194 – 9, 9 2007.
- WEGMANN, U. et al. Use of genetically modified bacteria for drug delivery in humans: Revisiting the safety aspect. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017. ISSN 2045-2322.
- WELLS, J. M.; MERCENIER, A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. **Nature reviews. Microbiology**, v. 6, p. 349 – 62, 3 2008.
- WELMAN, A. D.; MADDOX, I. S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. **Trends in biotechnology**, v. 21, p. 269 – 74, 6 2003.
- WIJMENGA, C. Expressing the Differences between Crohn Disease and Ulcerative Colitis. **PLOS Medicine**, Public Library of Science, v. 2, n. 8, p. e230 – –, Aug 2005.

WIRTZ, S. et al. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nature protocols**, v. 2, p. 541 – 6, 4 2007.

WIRTZ, S. et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. **Nature protocols**, v. 12, p. 1295 – 1309, 6 2017.

WITTHÖFT, T.; LUDWIG, D. Effectiveness and tolerability of repeated treatment with infliximab in patients with Crohn's disease: a retrospective data analysis in Germany. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 20, n. 1, p. 18 – 23, Janeiro 2005.

WU, L. et al. **Protective Effect of Anthocyanins Extract from Blueberry on TNBS-Induced IBD Model of Mice**. [S.l.: s.n.], 2011. v. 2011. (Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, v. 2011).

YAMADA, A. et al. Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology**, v. 22, p. 2195 – 205, 2 2016.

YAMAMOTO, M. et al. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 164, p. 4878 – 82, 4 2000.

YATSUNENKO, T. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, p. 222 – 227, Junho 2012.

YIN, K.; AGRAWAL, D. K. Vitamin D and inflammatory diseases. **Journal of inflammation research**, v. 7, p. 69 – 87, 6 2014.

Z, L. et al. The increased expression of IL-23 in inflammatory bowel disease promotes intraepithelial and lamina propria lymphocyte inflammatory responses and cytotoxicity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, p. 597 – 606, Abril 2011.

ZHANG, J.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **International anesthesiology clinics**, v. 45, p. 27 – 37, 4 2007.

ZHANG, Y.; LI, Y. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. **World journal of gastroenterology**, v. 20, p. 91 – 9, 1 2014.

GLOSSÁRIO

ÁCIDO LÁTICO: É um ácido monocarboxílico resultado da metabolização do açúcar.

ANTIBACTERIANO: Substância que impede ou inibe o desenvolvimento de bactérias.

ANTICORPO: Proteínas que atuam no sistema imunológico de defesa do organismo.

ANTÍGENO: Toda substância que ao entrar no organismo induz uma resposta imune e produção de anticorpos contra ele.

AUTOFAGIA: Processo celular de degradação e reciclagem de componentes da célula.

BIOFÁBRICA: Organismo vivo utilizado na produção em larga escala de moléculas de alto valor agregado.

BIOFÁRMACO: Medicamento originado a partir de uma fonte ou processo biológico.

CITOCINA: Molécula envolvida na emissão de sinais entre as células do organismo durante uma resposta imune.

COLITE: Reação inflamatória no cólon.

CÓLON: Porção média do intestino grosso que vai do ceco ao reto.

EUCARIONTES: Seres vivos que possuem núcleo celular delimitado por uma membrana nuclear.

EUTANÁSIA: Técnica de causar a morte de uma maneira indolor e com o mínimo de estresse.

FRACIONADO: Algo que se fracionou, foi dividido em frações ou partes menores.

GAVAGEM: Método de introdução de alimentos líquidos no estômago através de um tubo inserido pela boca.

GENES EUCARIÓTICOS: Genes de organismos eucariontes.

HEXOSE: Monossacarídeo formado por uma cadeia de seis átomos de carbono.

HISTOPATOLOGIA: É o estudo de como uma doença afeta um conjunto de células ou a análise microscópica de tecidos que foram removidos de pacientes doentes quando é realizada uma biópsia.

ÍLEO: Porção final do intestino delgado.

INFLAMAÇÃO: É uma reação do organismo a uma infecção ou lesão tecidual.

INFLAMAÇÃO AGUDA: É a inflamação inicial em resposta à uma lesão celular ou tecidual.

INFLAMAÇÃO CRÔNICA: É uma inflamação de duração prolongada e que acontece de semanas a meses.

INJEÇÃO INTRAPERITONEAL: Injeção de uma substância no peritônio.

INOCULAÇÃO: Ato de introduzir, transmitir, injetar, uma vacina, toxina, vírus ou bactéria em um outro organismo, humano ou animal.

INÓCULO: Nome dado a suspensão de um micro-organismo com concentração definida.

INSTILAÇÃO INTRA-RETAL: Introdução de um líquido ou tratamento pelo reto.

MICROBIOTA: Conjunto de micro-organismos que habitam um ecossistema.

MURINO: Adjetivo dado que diz respeito aos ratos.

PATOGÊNESE: É o modo pelo qual os agentes etiológicos agredem o organismo.

PATÓGENOS: Organismos que são capazes de causar doença no hospedeiro, alguns exemplos são os fungos, vírus, protozoários e bactérias.

PLASMÍDEO: Molécula circular de DNA capaz de se reproduzir de forma independente ao DNA genômico.

PROTEÍNA RECOMBINANTE: Proteína que foi codificada a partir de um gene que sofreu recombinação.

QUIMÉRICO: Adjetivo relativo à quimera.

RECIDIVA: Reaparecimento da doença ou sintoma após um período de tempo de médio à longo.

REMITENTE: Doença cujo sintomas diminuem de intensidade por alguns períodos de tempo.

SINÉRGICO: Ação simultânea.

SINTOMATOLOGIA: É o estudo e interpretação dos sintomas observados em uma doença.

SORO FETAL BOVINO: É a fração líquida do sangue coagulado de um feto bovino.

UBÍQUO: Algo que está presente ou existe em toda parte.