

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS



Dissertação

**EFEITO DE *Komagataella phaffii* SOBRE OS NÍVEIS DE ANTICORPOS EM
CAMUNDONGOS IMUNOSSUPRIMIDOS COM CICLOFOSFAMIDA E
VACINADOS COM ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE
Clostridium botulinum E *Clostridium perfringens***

Ellen Luíse Vagheti Hoerlle

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

H693e Hoerlle, Ellen Luíse Vaghetti

Efeito de komagataella phaffii sobre os níveis de anticorpos em camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida e vacinados com antígenos recombinantes de clostridium botulinum e clostridium perfringens / Ellen Luíse Vaghetti Hoerlle ; Angela Nunes Moreira, orientadora ; Fabrício Rochedo Conceição, coorientador. – Pelotas, 2023.

89 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Probiótico. 2. Pichia pastoris. 3. Resposta imune. 4. Imunomodulação. 5. Elisa indireto. I. Moreira, Angela Nunes, orient. II. Conceição, Fabrício Rochedo, coorient. III. Título.

CDD : 641.1

ELLEN LUÍSE VAGHETTI HOERLLE

**EFEITO DE *Komagataella phaffii* SOBRE OS NÍVEIS DE ANTICORPOS EM
CAMUNDONGOS IMUNOSSUPRIMIDOS COM CICLOFOSFAMIDA E
VACINADOS COM ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE
Clostridium botulinum E *Clostridium perfringens***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Ângela Nunes Moreira

Co-orientador: Fabrício Rochedo Conceição

Pelotas, 2023

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter me proporcionado chegar até aqui.

A minha família, em especial ao meu pai, Renato, e minha mãe, Raquel, por todo amor, dedicação e paciência, pois eles sempre me apoiaram e me ajudaram a chegar até aqui e tornar mais esse sonho em realidade, apesar dos 2.285km de distância.

Agradeço ao Thiago, meu noivo e amor da minha vida, que compartilhou comigo mais este momento, foi paciente, me ajudou a ter forças quando eu não tive forças para mais nada e me apoiou e apoia em todos os meus passos e desenvolvimentos, desde a graduação.

Agradeço a minha professora e orientadora Ângela pelos ensinamentos passados. E aos colegas e amigos Taiciane e Rafael, por toda paciência e ajuda, por toda a amizade e por todo tempo disposto para me ajudar ao decorrer desse trabalho, me dando o suporte necessário para que ele fosse realizado da melhor forma possível.

Aos colegas do Lab 6, que me acolheram, especialmente ao Cleiderson, Pedro e Welington, companheiros de finais de semanas, feriados e férias no lab, sempre dispostos a parar suas atividades para ajudar e explicar os processos.

Agradeço a todos os meus professores do PPGNA que contribuíram ainda mais nessa caminhada em busca do conhecimento.

Agradeço também as minhas amigas Lilia, Kamila e Natálie, por sempre estarem comigo e pelo apoio mútuo que nos damos em todas as etapas e ciclos das nossas vidas. E aos meus amigos que sempre torceram por mim e me apoiaram no decorrer deste período.

Muito obrigada!

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.” Cora Coralina

Resumo

HOERLLE, Ellen Luíse Vaghetti. **Efeito de *Komagataella phaffii* sobre os níveis de anticorpos em camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida e vacinados com antígenos recombinantes de *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens***. 2023, 89p. (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS, 2023.

Muitos probióticos potencializam a resposta imune dos seus hospedeiros, efeito benéfico desejável, principalmente para imunossuprimidos. *Komagataella phaffii* vêm demonstrando propriedades probióticas, como melhora da conversão alimentar, aumento do ganho de peso e da soroconversão e efeito antimicrobiano em animais. Além disso, mostrou-se segura para animais imunossuprimidos e os protegeu da leucopenia, neutropenia, peroxidação lipídica e da hepatotoxicidade induzidas pela ciclofosfamida (CF). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação com *Komagataella phaffii* de camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF e vacinados com as proteínas recombinantes rD de *Clostridium botulinum*, e rCPA-C e rCPB de *Clostridium perfringens*, como antígenos vacinais modelos, sobre os níveis de anticorpos, avaliados por ELISA indireto. Para tal fim, 36 camundongos machos *Swiss* com 28 dias de idade (divididos em duas repetições) foram divididos em três grupos: grupo somente vacinado (V), grupo imunossuprimido com CF (250mg. kg⁻¹ em duas doses) e vacinado (CF + V) e grupo suplementado com *Komagataella phaffii*, imunossuprimido com CF e vacinado (CF + K + V). Todos os animais dos três grupos foram imunizados, via subcutânea, com uma única dose de uma vacina polivalente composta de 25 µg de cada uma das três proteínas recombinantes (rCPA-C, rCPB e rD) no dia 19 e animais do grupo CF + K + V receberam suplementação diária, por gavagem, de 10⁸ UFC de *Komagataella phaffii* por animal, durante todo o experimento (47 dias). Animais não suplementados e não imunossuprimidos receberam solução salina pelas mesmas vias e períodos. Os níveis de anticorpos estimulados pelos imunizantes com cada uma das proteínas recombinantes foram avaliadas por ELISA indireto (7, 14, 21 e 28 dias após a vacinação). A suplementação com *Komagataella phaffii* demonstrou aprimorar a resposta imunológica na vacinação com rD dos animais imunossuprimidos, resultando em níveis mais elevados de IgG anti-rD em comparação aos animais

vacinados sem suplementação, além de promover uma resposta imunológica mais rápida. No entanto, não teve efeito na resposta imunológica na vacinação de animais imunossuprimidos com rCPA-C e rCPB. Assim, conclui-se que *Komagataella phaffii* pode potencializar a resposta imune humoral de animais imunossuprimidos vacinados, entretanto a resposta parece ser imunógeno específica. Por fim, *Komagataella phaffii* apresenta-se não apenas como um excelente suplemento imunomodulador imunógeno específico, mas como fonte viável, segura, barata e promissora no setor de alimentos na indústria veterinária e humana, para animais ou pessoas saudáveis ou imunossuprimidos.

Palavras chave: Probiótico, *Pichia pastoris*, resposta imune, imunomodulação ELISA indireto.

ABSTRACT

HOERLLE, Ellen Luíse Vagheti. **Effect of *Komagataella phaffii* on antibody levels in mice immunosuppressed with cyclophosphamide and vaccinated with recombinant *Clostridium botulinum* and *Clostridium perfringens* antigens.** 2023, 89p. (Master in Nutrition and Food) – Postgraduate Program in Nutrition and Food, Faculty of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas – RS, 2023.

Many probiotics potentiate the immune response of their hosts, a desirable beneficial effect, especially for immunosuppressed people. *Komagataella phaffii* have demonstrated probiotic properties, such as improved feed conversion, increased weight gain and seroconversion, and antimicrobial effect in animals. Furthermore, it proved to be safe for immunosuppressed animals and protected them from leukopenia, neutropenia, lipid peroxidation and hepatotoxicity induced by cyclophosphamide (CF). Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of supplementation with *Komagataella phaffii* from Swiss mice immunosuppressed with CF and vaccinated with the recombinant proteins rD from *Clostridium botulinum*, and rCPA-C and rCPB from *Clostridium perfringens*, as model vaccine antigens, on the antibody levels, assessed by indirect ELISA. For this purpose, 36 male Swiss mice aged 28 days (divided into two replicates) were divided into three groups: vaccinated-only group (V), immunosuppressed group with CF (250mg. kg⁻¹ in two doses) and vaccinated (CF + V) and group supplemented with *Komagataella phaffii*, immunosuppressed with CF and vaccinated (CF + K + V). All animals in the three groups were immunized, subcutaneously, with a single dose of a polyvalent vaccine composed of 25 µg of each of the three recombinant proteins (rCPA-C, rCPB and rD) on day 19 and animals in the CF + K group + V received daily supplementation, by gavage, of 10⁸ CFU of *Komagataella phaffii* per animal, throughout the experiment (47 days). Non-supplemented and non-immunosuppressed animals received saline solution by the same routes and periods. The levels of antibodies stimulated by the vaccines with each of the recombinant proteins were evaluated by indirect ELISA (7, 14, 21 and 28 days after vaccination). Supplementation with *Komagataella phaffii* has been shown to improve the immune response in immunosuppressed animals in rD vaccination, resulting in higher levels of anti-rD IgG compared to animals vaccinated without supplementation, in addition to promoting a faster immune response. However, it had no effect on the immune response to vaccination of immunosuppressed

animals with rCPA-C and rCPB. Finally, *Komagataella phaffii* presents itself not only as an excellent specific immunomodulatory supplement, but as a viable, safe, cheap and promising source in the food sector in the veterinary and human industry, for healthy or immunosuppressed animals or people.

Keywords: Probiotic, *Pichia pastoris*, immune response, immunomodulation indirect ELISA.

Lista de Figuras

Figura 1: SDS-PAGE e *Western blot* de rCPA-C, rCPB-C, rCPB e rD. (M) - Marcador; (1) - extrato celular total após expressão em *E. coli* BL21 (DE3); (2) extrato celular total após expressão em *E. coli* BL21 (DE3); (3) sobrenadante de lise (proteína solúvel); (4) - Corpo de inclusão (proteínas insolúveis).....28

Figura 2: Efeito da suplementação com o probiótico *Komagataella phaffi* sobre os níveis de anticorpos IgG anti-rD, avaliados por ELISA indireto, em camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF e vacinados com a proteína recombinante Bont-D de *Clostridium botulinum.V*: grupo somente vacinado; CF + V: grupo imunossuprimido com CF e vacinado e CF + K + V: grupo suplementado com *Komagataella phaffi*, imunossuprimido com CF e vacinado. A. Primeira repetição; *: grupo CF + K + V versus grupo V no dia 14 após a vacinação ($p=0,0022$); **: grupo CF + V versus grupo V no dia 14 após a vacinação ($p=0,0176$); α : Grupo CF + K + V, coletas dos dias 14 e 21 versus coleta do dia 0 ($p=0,0037$ e $p=0,0052$, respectivamente); β : Grupo CF + V, coleta do dia 14 versus coleta do dia 7 ($p=0,014$); μ : Grupo V, coleta do dia 28 versus coletas dos dias 14 ($p=0,091$) 7 ($p=0,0119$) e 0 ($p=0,0084$); B. Segunda repetição. ξ : grupo CF + K + V versus grupo V no dia 21 após a vacinação ($p=0,0329$); ζ : grupo CF + K + V versus grupo CF + V no dia 21 após a vacinação ($p=0,0086$); η : grupo CF + K + V versus grupo CF + V no dia 28 após a vacinação ($p=0,0062$); θ : grupo V versus grupo CF + V no dia 28 após a vacinação ($p<0,0001$); ι : Grupo CF + K + V, coletas do dia 21 versus coletas dos dias 7 e 0 ($p=0,0438$ e $p=0,0002$, respectivamente), e coleta do dia 28 versus coleta do dia 0 ($p=0,0103$); κ : Grupo V, coleta do dia 28 versus coletas dos dias 21 ($p=0,0067$), 14 ($p<0,0001$) 7 ($p<0,0001$) e 0 ($p<0,0001$), e coleta do dia 21 versus coleta do dia 7 ($p=0,0238$) e 0 ($p=0,02$).30

Figura 3: Efeito da suplementação com o probiótico *Komagataella phaffi* sobre os níveis de anticorpos IgG anti-rCPA, avaliados por ELISA indireto, em camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF e vacinados com a proteína recombinante CPA-C de *Clostridium perfringens*. V: grupo somente vacinado; CF + V: grupo imunossuprimido com CF e vacinado e CF + K + V: grupo suplementado com *Komagataella phaffi*, imunossuprimido com CF e vacinado. A. Primeira repetição; α : Grupo CF + K + V, coleta do dia 28 versus coleta do dia 7 ($p=0,0366$); β : Grupo

CF + V, coletas dos dias 28 e 21 versus coletas dos dias 7 ($p=0,0002$ e $p=0,0103$, respectivamente) e 0 ($p=0,0004$ e $p=0,0158$, respectivamente); μ : Grupo V, coleta do dia 28 versus coletas dos dias 7 ($p= 0,0413$) e 0 ($p=0,0142$); B. Segunda repetição. \square : Grupo CF + V, coleta do dia 28 versus coletas dos dias 7 e 0 ($p=0,0112$ e $p= 0,003$, respectivamente); \square : Grupo V, coleta do dia 21 versus coletas dos dias 14 ($p=0,003$), 7 ($p=0,0017$) e 0 ($p=0,0213$).....33

Figura 4: . Efeito da suplementação com o probiótico *Komagataella phaffi* sobre os níveis de anticorpos IgG anti-rCPB, avaliados por ELISA indireto, em camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF e vacinados com a proteína recombinante rCPB de *Clostridium perfringens*. V: grupo somente vacinado; CF + V: grupo imunossuprimido com CF e vacinado e CF + K + V: grupo suplementado com *Komagataella phaffi*, imunossuprimido com CF e vacinado. A. Primeira repetição β : Grupo CF + V, coleta do dia 28 versus coletas dos dias 7 ($p=0,004$) e 0 ($p=0,007$), e coleta do dia 21 versus coletas dos dias 7 ($p=0,0178$) e 0 ($p=0,0316$); μ : Grupo V, coleta do dia 28 versus coletas dos dias 14 ($p=0,0448$), 7 ($p=0,035$) e 0 ($p=0,0223$); B. Segunda repetição. ∞ : grupo CF + V versus grupo V no dia 28 após a vacinação ($p=0,0034$); χ : Grupo CF + V, coleta do dia 28 versus coletas dos dias 7 ($p=0,0048$) e 0 ($p=0,0089$).35

Lista de Abreviaturas e Siglas

CF	Ciclofosfamida
<i>C.botulinum</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>C.perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
CDTec	Centro de Desenvolvimento Tecnológico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAO	Food and agriculture organization
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
INCA	Instituto Nacional do Câncer
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
Pbs-t	Tampão salino tamponado com fosfato
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGI	Trato Gastro-Intestinal
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas
YM	Yest Malt Broth

Sumário

1. Introdução	15
2. Revisão da Literatura e Referencial Teórico	19
3. Objetivos	25
3.1. <i>Objetivo geral</i>	25
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	25
Projeto de Dissertação	26
Avaliação de <i>Pichia pastoris</i> como probiótico recombinante e sua capacidade de liberar proteínas via mucosa no tratamento da Diabetes Mellitus tipo 2 em camundongos com diabetes induzida com estreptozotocina e dieta rica em gordura e açúcar	26
Resumo.....	28
Sumário	30
1 Introdução	31
2 Hipóteses.....	35
3 Revisão de literatura.....	36
4 Resultados e Impactos esperados.....	37
5 Objetivos	38
5.1 Objetivo geral	38
5.2 Objetivos específicos.....	38
6 Materiais e métodos.....	39
6.1 Probióticos e condições de cultivo.....	39
6.2 Obtenção de <i>P. pastoris</i> recombinante transformada com plasmídeo codificando a sequência 10laGLP-1 (<i>P. pastoris</i> / plasmídeo-10laGLP-1) com um promotor induzível.....	39
6.3 Animais e delineamenxto do estudo.....	40
6.4 Teste de tolerância a glicose oral e intraperitoneal.....	42
6.5 Variação de peso corporal, consumo alimentar e de água e conversão alimentar dos animais	42
6.6 Análises bioquímicas	42
6.7 Atividade antioxidante	43
6.8 Análise histopatológica do pâncreas.....	43

	14
7 Aspectos Éticos.....	44
8 Cronograma do estudo.....	45
9 Orçamento do projeto.....	23
Referências bibliográfica.....	24
Relatório do Trabalho de Campo.....	2
Artigo.....	4
Resumo.....	5
Abstract.....	7
1. Introdução.....	8
2. Materiais e Métodos.....	10
2.1. Probiótico e condições de cultivo.....	10
2.2. Suplementação dos animais com o probiótico <i>Komagataella phaffi</i>	11
2.3. Imunossupressão induzida por CF.....	11
2.4. Antígenos Vacinais.....	11
2.5. Vacinação.....	13
2.6. Animais e delineamento do estudo.....	13
2.7. Avaliação da resposta imune humoral por ELISA indireto.....	14
2.8. Análises estatísticas.....	15
3. Resultados.....	16
3.2.1. Avaliação da resposta imune humoral induzida por rD por ELISA indireto.....	17
3.2.2. Avaliação da resposta imune humoral induzida por rCPA-C por ELISA indireto.....	19
3.2.3. Avaliação da resposta imune humoral induzida por rCPB por ELISA indireto.....	21
4. Discussão.....	23
Referências Bibliográficas.....	27

1. Introdução

As doenças imunossupressoras são condições em que o sistema imunológico é comprometido, resultando em uma capacidade reduzida de combater infecções e doenças. Diversas patologias podem levar a imunossupressão, incluindo o HIV/AIDS, doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide, câncer, tratamentos com imunossupressores, como quimioterapia e transplantes de órgãos. Pacientes imunossuprimidos estão mais suscetíveis a infecções oportunistas e recorrência de infecções antigas, aumentando o risco de complicações graves. A identificação precoce e o manejo adequado dessas condições são cruciais para prevenir complicações e melhorar a qualidade de vida desses pacientes (Fauci et al., 2018; Jamenson et al., 2017).

A quimioterapia utiliza medicamentos antineoplásicos para combater as células tumorais através de sua toxicidade, o que possibilita o tratamento precoce de metástases não detectáveis e, em alguns casos, leva à cura de certos tipos de tumores (ONCOGUIA, 2021; INCA, 2022). No entanto, é importante mencionar que os agentes quimioterápicos podem causar diversos efeitos colaterais devido ao fato de afetarem não apenas as células tumorais, mas também as células normais com alta capacidade de replicação (ONCOGUIA, 2021; Silveira et al., 2021).

A ciclofosfamida (CF) é um agente antineoplásico amplamente utilizado no tratamento do câncer. Classificada como um alquilante, é considerada a terapia imunossupressora de maior potência, inibindo a divisão celular e a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) (UPTODATE, 2017; Teles et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Apesar da sua efetividade, o uso da ciclofosfamida é limitado, tanto a curto quanto a longo prazo, devido ao seu alto potencial tóxico (McCune et al., 2017).

Alimentos funcionais tem sido cada vez mais recomendados por profissionais da área da saúde para proporcionar uma melhor qualidade de vida aos pacientes imunossuprimidos (FAO, 2006), devido à efeitos benéficos como o reforço dos mecanismos de defesa imunológicos, melhora das condições físicas e mentais, prevenção ou tratamento de alguma doença e para melhora do estado geral de saúde (Boer, 2021).

Sabe-se que os seres humanos vivem em coexistência com uma variedade de microrganismos, tanto no ambiente externo quanto no interior do organismo, especialmente na microbiota intestinal (Davenport et al., 2017). Os probióticos são

organismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, podem proporcionar benefícios à saúde dos indivíduos (FAO, 2006). É conhecido que os probióticos desempenham um papel importante no sistema imunológico e digestivo, e podem ser utilizados para auxiliar no tratamento de certas patologias através da modulação do sistema imunológico (Splichal et al., 2019; FAO, 2006). Além disso, estudos relatados por Saad et al. (2006) demonstraram que esses probióticos também podem exercer funções benéficas em animais, inclusive em indivíduos imunocomprometidos devido ao uso da ciclofosfamida (Salva et al., 2014).

A influência positiva de probióticos sobre a modulação do sistema imune de camundongos *Swiss* imunocomprometidos pela aplicação de CF foi observada por Salva et al. (2014), onde os valores de leucócitos e neutrófilos apresentavam-se maiores nos grupos tratados com *Lactobacillus*, dados que confirmam os resultados de Wei et al. (2007), ao observarem que os camundongos imunocomprometidos por CF, após receberem suplementação de *Lactobacillus rhamnusus* ZY114 e colostro bovino, melhoraram as funções do sistema imunológico. Tem sido mostrado que *Lactobacillus casei* pode aumentar a proporção de Th1 para Treg e induzir a mudança de classe de anticorpo em células B ativadas na resposta imune, assim expressando e produzindo IgG, IgA ou IgE para exercer efeitos imunomoduladores (Wang et al., 2013; Fu et al., 2020). Entretanto, no estudo realizado por Bujalance et al. (2007), em camundongos BALB/c, constatou-se que o *Lactobacillus plantarum* não promoveu efeito na modulação da imunossupressão induzida pelo mesmo fármaco, sendo necessários mais estudos sobre o tema.

As clostridioses são infecções causadas por diferentes espécies de *Clostridium spp.* que afetam tanto humanos quanto animais, resultando em uma variedade de sintomatologias. Algumas das espécies de *Clostridium* mais comumente associadas a essas infecções incluem o *Clostridium botulinum*, responsável pela intoxicação alimentar conhecida como botulismo; o *Clostridium difficile*, que causa diarreia associada a antibióticos e colite pseudomembranosa; o *Clostridium tetani*, causador do tétano; e o *Clostridium perfringens*, associado a infecções de tecidos moles, gangrena gasosa e gastroenterite. É importante ressaltar que pacientes imunossuprimidos estão particularmente suscetíveis a desenvolver complicações graves em decorrência das clostridioses (Mandell et al., 2020; Sartelli et al., 2014; WHO, 2018).

Dentro dos parâmetros de vacinação contra *Clostridium*, grupos de pesquisas têm demonstrado que antígenos recombinantes contra espécies patogênicas do gênero geram níveis elevados de anticorpos, apresentando grande potencial como imunizantes (Ferreira et al., 2019; Moreira et al., 2020; Rodrigues et al., 2021). Ferreira et al. (2019) mostraram que 200 mg da toxina α recombinante de *Clostridium perfringens* (rCPA) foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos contra a toxina α nativa em coelhos e ovinos. Estudos recentes demonstram que o domínio C-terminal de CPB (rCPB-C) apresenta maior atividade imunogênica em comparação a rCPB e CPB nativa (vacina comercial) (Rodrigues et al., 2021). Da mesma forma, vacinas recombinantes contendo 200 mg de proteína épsilon de *C.perfringens* (rETX) e da neurotoxina botulíca D de *Clostridium botulinum* (rBONT-D) foram eficientemente avaliadas por Moreira et al. (2016) e Moreira et al. (2019), respectivamente, atingindo altos níveis de anticorpos nas espécies alvo avaliadas (coelhos, ovinos e bovinos). Por essa razão, diante dos imunizantes efetivos já avaliados, as vacinas empregadas neste estudo foram compostas por versões antigênicas recombinantes das toxinas rCPA e rCPB de *C.perfringens* e rD de *C.botulinum*.

Conhecida por ser uma levedura metilotrófica da família Saccharomycetaceae, a *Komagataella phaffi*, conhecida anteriormente como *Pichia pastoris*, a qual foi recentemente reclassificada no novo gênero Komagataella, têm sido utilizada como um sistema de grande sucesso para a produção de proteínas recombinantes em larga escala para o desenvolvimento de vacinas (Nizoli et al., 2009; Dummer et al., 2009 A; Dummer et al., 2009 B; Siedler et al., 2017). Também se distingue pela sua capacidade de crescimento a partir de resíduos de baixo custo e meios de cultura relativamente simples, possibilitando sua produção em larga escala industrial (Gil de los Santos, 2018; Gil de los Santos, 2012). Ou seja, tem as vantagens de apresentar altos rendimentos de produção, ser geneticamente estável, secretar proteínas recombinantes para o meio e apresentar condições de cultura pouco dispendiosas (Hou et al., 2007). Estudos prévios, realizados na Universidade Federal de Pelotas (UFPel), têm demonstrado que ela pode ser caracterizada como probiótico, pois é segura, capaz de resistir à passagem pelo TGI *in vitro* e *in vivo* (França et al., 2015) e apresenta efeitos benéficos ao hospedeiro, como melhora da conversão alimentar e aumento significativo do ganho de peso e da soroconversão contra *C.perfringens* em frangos de corte (Gil de Los Santos et al., 2012), além de efeito antimicrobiano contra *Salmonella Typhimurium* em camundongos Balb/c (França et al., 2015).

Cunha (2016) e Massaut (2018) realizaram estudos para investigar os potenciais efeitos probióticos da *Komagataella phaffii* em camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF, avaliando a segurança da utilização desta levedura em imunossuprimidos, a variação de peso, as contagens de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos e a peroxidação lipídica. *Komagataella phaffii* mostrou-se segura para animais imunossuprimidos e os protegeu dos danos induzidos pela CF, reduzindo a leucopenia e neutropenia, a hepatotoxicidade, as lesões renais e a peroxidação lipídica nos rins e encéfalo dos animais tratados com CF, além de ter melhorado a conversão alimentar e o ganho de peso dos animais dos grupos que receberam o fármaco. E nos animais saudáveis, a *Komagataella phaffii* demonstrou aumentar os parâmetros do hemograma, incluindo concentrações plasmáticas de hemácias e hemoglobina. Além disso, foi observada uma redução na peroxidação lipídica e uma melhora na eficiência alimentar.

Embora amplamente estudada, efeitos da imunidade mediada por *Komagataella phaffii* sob a resposta de anticorpos gerada por antígenos vacinais em animais imunossuprimidos não foram avaliados. Desta forma, o presente estudo tem por objetivo dar continuidade aos estudos de Cunha (2016) e Massaut (2018), avaliando o efeito da suplementação com o probiótico *Komagataella phaffii* sobre os níveis de anticorpos, avaliados por ELISA indireto, em camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF e vacinados, utilizando como imunógenos modelos a neurotoxina D de *Clostridium botulinum* (Bont-D) recombinante (rD), p domínio C-terminal da toxina alfa (rCPA-C) e a proteína beta integral (rCPB) de *Clostridium perfringens*.

2. Revisão da Literatura e Referencial Teórico

A imunossupressão é caracterizada pela redução da atividade do sistema imunológico, podendo ser resultado de doenças específicas ou do uso de medicamentos farmacológicos no tratamento de determinadas condições. Essa condição compromete a capacidade de defesa do organismo contra agentes infecciosos e pode aumentar o risco de desenvolvimento de infecções oportunistas e doenças associadas à imunidade comprometida (Ministério da Saúde, 2021). Além das doenças autoimunes, mencionadas anteriormente, a imunossupressão pode ser observada em pacientes submetidos a transplantes de órgãos, terapia imunossupressora para prevenir a rejeição do enxerto, tratamentos de câncer, como a quimioterapia, e em casos de doenças inflamatórias crônicas (Sacco et al., 2021). O uso de medicamentos imunossupressores, como corticoides, agentes biológicos e imunossupressores tradicionais, visa controlar a resposta imunológica excessiva ou inadequada, mas também pode resultar na diminuição da imunidade do indivíduo. O manejo adequado da imunossupressão é essencial para equilibrar o tratamento da doença de base e minimizar os riscos associados à redução da resposta imune (Ma et al., 2019; Andersen et al., 2022)

O câncer é uma patologia, onde a principal característica é a capacidade de multiplicação e infiltração de células malignas, seu tratamento pode ser realizado de forma isolada ou em combinação. A quimioterapia é o tratamento mais indicado, mas, frequentemente é administrada junto com cirurgia, radioterapia ou com ambas. Também pode ser administrada com outros medicamentos, como imunoterapia, hormonioterapia ou terapia-alvo (INCA, 2022; ONCOGUIA, 2021).

A medicação antineoplásica se mostrou eficaz, pois viabiliza o combate ao câncer através da destruição, inibição ou controle das células cancerígenas em pacientes, sendo possível a cura de alguns tumores e permitindo o tratamento precoce de metástases não detectáveis (INCA, 2022; ONCOGUIA, 2021). Presumivelmente, o tratamento antineoplásico mata todas as células que se dividem rápido e, como os tumores podem se dividir rapidamente, os quimioterápicos acabam matando as células tumorais. Todavia, outras células se dividem rapidamente, como cabelo, unhas, células de defesa do organismo e mucosas, por esse motivo os quimioterápicos são tóxicos para essas células (ONCOGUIA, 2021; Calixto-Lima et al., 2012).

Geralmente, os efeitos colaterais estão associados a todas as classes de agentes antineoplásicos, como alquil sulfonados, nitrozuréias, mostardas

nitrogenadas e triazenos, entretanto os agentes alquilantes são os mais frequentemente utilizados, pois são considerados ciclo-celular não específicos, ou melhor, possuem capacidade de erradicar as células tumorais a despeito de estarem no ciclo celular ou em repouso (Ferdinandi & Ferreira, 2009).

A CF é um pró-fármaco, metabolizado no fígado e excretado pelos rins, pode ser administrado tanto por via oral quanto por intravenosa (Mccune et al., 2017). Pró-fármaco é considerado um fármaco ativo, quimicamente transformado em um derivado inativo, onde é convertido por um ataque químico ou enzimático ou de ambos. A metabolização da CF no fígado, forma os compostos fosfaramida e acroleína, sendo autor pelo maior efeito citotóxico desta (Emadi et al., 2009).

Os agentes quimioterápicos possuem capacidade de afetar a produção de células sanguíneas na medula óssea, por meio do seu potencial de toxicidade, indicando um efeito colateral do tratamento (Silveira et al., 2016). Contudo, a CF, como um agente alquilante, é capaz de desencadear mielossupressão, dos quais as alterações hematológicas geralmente observadas são trombocitopenia, anemia e leucopenia, entretanto, os danos à medula óssea podem ocorrer independentemente do fármaco, dose e do tempo utilizado (Ferdinandi e Ferreira, 2009; Silveira et al., 2013). Além disto, o uso de CF acarreta outros efeitos colaterais, tais como náuseas, vômitos, diarreia, alopecia, dermatite, amenorréia, esterilidade, pneumonite, cistite hemorrágica e cardiotoxicidade (Mccune et al., 2017; UPTODATE, 2017).

Foi observado, em estudos realizados por Faber et al. (2011), com camundongos C3H/HeN, uma redução no número de células brancas totais e linfócitos após aplicação de CF, tal efeito também foi constatado por Zuluaga et al. (2006), no qual foi testado se uma dose reduzida de CF seria capaz de gerar neutropenia em um modelo de imunossupressão experimental simplificado. Os resultados atingidos foram satisfatórios, onde a neutropenia severa foi alcançada ainda no 4º dia, quando foi administrada a segunda dose de CF e a leucopenia foi alcançada 16 horas após a segunda dose do fármaco.

A relação entre microbiota intestinal e saúde vem fomentando um interesse crescente, que deseja identificar novas formas de prevenção e tratamento de inúmeras doenças. Em vista da presença de microrganismos resistentes e da falta de opções de tratamento dependentes de antibióticos, torna-se necessária a criação de métodos diferentes para combater esses microrganismos patógenos,

pois estão frequentemente associados a doenças com elevadas taxas de morbidade e/ou mortalidade (Chua et al., 2017).

Sabe-se que os seres humanos vivem em coexistência com diversos microrganismos no exterior e interior de seu organismo, especialmente na microbiota intestinal (Davenport et al., 2017). Esta é definida como a totalidade de microrganismos presentes na superfície epitelial do TGI (Larsen et al., 2010; Wang et al., 2017a). Logo, a manutenção da microbiota através do uso de probióticos tem causado um interesse crescente (Capurso et al., 2016).

Probióticos são organismos vivos, que quando ingeridos em quantidades adequadas, causam benefícios para a saúde dos indivíduos (FAO, 2002), como promoção da resistência gastrointestinal à colonização de patógenos de origem alimentar, prevenção e/ou tratamento de distúrbios metabólicos referentes ao estresse oxidativo, atuação como antioxidante e auxílio na digestão, protege contra infecções por microrganismos altamente virulentos e estimula o sistema imunológico (Splichal et al., 2019; Gancarčíková et al., 2019; Potočnjak et al., 2017).

Os probióticos possuem três mecanismos de ação: o primeiro é a redução da quantidade de células patogênicas viáveis através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, da competição por nutrientes e da competição por sítios de adesão. O segundo, seria alteração do metabolismo microbiano, por meio do aumento ou diminuição da atividade enzimática. E o terceiro, pelo estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e/ou da atividade dos macrófagos (Saad et al., 2006). Conseqüentemente, ocorre não somente a regulação da microbiota, como também a modulação do sistema imune do hospedeiro, agindo de forma direta na regulação e desenvolvimento da imunidade local e sistêmica (Generoso et al., 2010; Castelli, 2011; Carreiro, 2013; Salva et al., 2014).

Estudos referentes a probióticos demonstram diversos dados positivos sobre os benefícios de sua utilização, já que podem desempenhar um papel significativo no sistema imunológico e reduzir a quantidade e duração de doenças no TGI (Jankovic et al., 2010; Cuppari, 2002). Pode ser utilizado para evitar certas enfermidades, modulando o sistema imune (FAO, 2006), como foi observado em estudo de Saad et al. (2006), com animais imunocomprometidos pelo uso de CF.

O sistema imune é um conjunto de células, tecidos e órgãos que atuam na defesa do organismo contra agentes tóxicos ou infecciosos (Delves, 2021), 70% do sistema linfóide encontra-se no intestino, sendo eles os linfócitos T, B e

fagócitos, desta forma, 20% das células intestinais seriam linfócitos e não enterócitos (Carreiro, 2013).

O sistema imune inato é constituído pelo conjunto de defesas que nosso organismo dispõe desde o nascimento, conta com as informações e anticorpos fornecidos pela mãe. O sistema imune adaptativo, permanece em constante evolução durante a nossa vida, ocorre principalmente por meio da exposição de agentes infecciosos, possibilitando que as células de defesa aprendam a melhor maneira para combater esses agentes patogênicos (Delves, 2021). A imunidade inata e a adaptativa agem em conjunto para agir de forma rápida à agressão, independente de um estímulo prévio, sendo a primeira linha de defesa do organismo. Entretanto, a utilização de quimioterápicos, como a CF, pode causar efeitos danosos neste sistema de defesa (Cruvinel et al., 2010). Segundo Zuluaga et al. (2006), a administração de CF em camundongos albinos *Swiss*, em um regime simplificado de 250mg/ kg, é capaz de reduzir as células do sistema imune, acarretando em uma neutropenia severa, assim como uma redução de 92 e 96% de linfócitos e monócitos, respectivamente.

Os inúmeros benefícios relacionados aos probióticos, pode-se destacar o estímulo à imunidade, ação carcinogênica, prevenção e tratamento de diversas patologias, além da produção intestinal de citocinas anti-inflamatórias e redução das pró-inflamatórias (Saad et al., 2006; Salva et al., 2014; Carreiro, 2013). O estudo realizado por Salva et al.(2014), analisou o efeito de probióticos sobre a modulação dos sistema imune de camundongos *Swiss* sob imunossupressão pela aplicação de CF, constatou-se maiores valores de neutrófilos e leucócitos nos grupos que foram tratados com *Lactobacillus*, dados que confirmam os resultados de Wei et al. (2007), ao observar que os camundongos imunocomprometidos por CF, após receberem suplementação de *Lactobacillus rhamnusus* ZY114 e colostro bovino, melhoraram as funções do sistema imunológico. Entretanto, o estudo de Bajulance et al. (2007), com camundongos balb/c, constatou que o probiótico *Lactobacillus plantarum* não causou efeito na modulação da imunossupressão induzida pela CF.

Probióticos estão sendo cada vez mais utilizados como veículos para a expressão e entrega direcionada de moléculas nativas ou recombinantes nas superfícies mucosas, com aplicações na nutrição e saúde (Icy D'Silva, 2011). A localização da proteína expressa por um probiótico tem impacto na resposta imune, uma vez que sua localização intracelular pode oferecer proteção contra condições adversas no trato gastrointestinal. A liberação mucosa de proteínas por meio de

probióticos tem potenciais aplicações no manejo de doenças imunomoduladoras e na entrega de antígenos vacinais (Michon et al., 2016; Floch, 2014). A transferência de genes de interesse entre organismos utilizando plasmídeos abriu caminho para avanços no desenvolvimento e expressão de proteínas heterólogas de interesse, como antígenos vacinais, proteínas terapêuticas e anticorpos, bem como para o desenvolvimento de probióticos recombinantes seguros (Michon et al., 2016; Icy D'Silva, 2011).

Conhecida por ser uma levedura metilotrófica da família Saccharomycetaceae, a *Komagataella phaffi*, recentemente reclassificada no novo gênero *Komagataella*, tem sido utilizada como sistema de grande sucesso para a produção de proteínas recombinantes (Nizoli et al., 2009; Dummer et al., 2009 A; Dummer et al., 2009 B; Siedler et al., 2017). Pode ser caracterizada como probiótico, pois é inofensiva e capaz de resistir à passagem pelo TGI *in vitro* e *in vivo*, e também apresenta atividade antimicrobiana contra *Salmonella Typhimurium* em camundongos (França et al., 2015). Cunha (2016) realizou estudos para investigar os potenciais efeitos probióticos de *Komagataella phaffi* em camundongos Swiss imunossuprimidos com CF, foram avaliadas a variação de peso, contagem de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos e a segurança da utilização desta levedura em imunossuprimidos. A *Komagataella phaffi* se mostrou segura para animais imunossuprimidos e possui efeito protetor à hepatotoxicidade da ciclofosfamida, aumentou o peso dos animais e os protegeu da leucopenia e neutropenia.

Em um estudo realizado por Gil de Los Santos et al. (2012), foi testado as propriedades probióticas da *Komagataella phaffi* e da *Komagataella phaffi* recombinante contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium perfringens* (*C.perfringens*) sobre a estimulação do sistema imune e eficácia em frangos de corte contra a α toxina de *C.perfringens*, obteve-se resultados positivos em relação ao ganho de peso dos animais que receberam a levedura, nas duas formas, além de apresentarem melhora na soroconversão e não exibirem alterações histopatológicas significativas.

Cunha (2016), no intuito de confirmar a segurança da utilização de *Komagataella phaffi* em camundongos Swiss machos imunossuprimidos com CF, avaliou o estresse oxidativo através da determinação de níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), variação de peso e leucograma, concluindo que a levedura não agiu como um microrganismo oportunista e tampouco causou óbitos nos animais suplementados. Constatou-se um efeito

protetor à toxicidade causada pela aplicação do fármaco nos rins e fígado através da redução de lesões histopatológicas, um estímulo positivo no ganho de peso, proteção significativa contra leucopenia e neutropenia decorrentes da administração do quimioterápico, já que este foi capaz de aumentar consideravelmente o número de células do sistema imune dos animais submetidos ao tratamento medicamentoso, redução dos níveis de TBARS no rim e cérebro dos animais tratados com CF e no fígado e cérebro de animais saudáveis (Cunha, 2016).

Todavia, apesar dos estudos realizados com *Komagataella phaffi* validar efeitos benéficos e potencial probiótico, esta ainda é uma levedura pouco estudada, principalmente em modelos experimentais de imunossupressão induzido por quimioterapia com CF, o que justifica um estudo adicional a fim de avaliar o comportamento sobre outros parâmetros bioquímicos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação com o probiótico *Komagataella phaffi* sobre a resposta imune humoral à vacinas em camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF, utilizando como antígenos vacinais modelos as proteínas recombinantes rD de *Clostridium botulinum*, e rCPA-C e rCPB de *Clostridium perfringens*.

3.2. Objetivos específicos

Expressar as proteínas recombinantes rD, rCPA-C e rCPB para serem utilizadas como imunógenos modelos para a avaliação do efeito da suplementação com o probiótico *Komagataella phaffi* sobre os níveis de anticorpos em camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF;

Padronizar o ELISA direto para avaliação do efeito da suplementação com o probiótico *Komagataella phaffi* sobre os níveis de anticorpos em camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF;

Avaliar o efeito da suplementação com o probiótico *Komagataella phaffi* sobre os níveis de anticorpos, avaliados por ELISA indireto, em camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF e vacinados, utilizando como imunógenos modelos as proteínas recombinantes rD de *Clostridium botulinum*, erCPA-C e rCPB de *Clostridium perfringens*.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS



Projeto de Dissertação

Avaliação de *Pichia pastoris* como probiótico recombinante e sua capacidade de liberar proteínas via mucosa no tratamento da Diabetes Mellitus tipo 2 em camundongos com diabetes induzida com estreptozotocina e dieta rica em gordura e açúcar

Ellen Luíse Vaghetti Hoerlle

Pelotas, 2021

Ellen Luíse Vaghetti Hoerlle

Avaliação de *Pichia pastoris* como probiótico recombinante e sua capacidade de liberar proteínas via mucosa no tratamento da Diabetes Mellitus tipo 2 em camundongos com diabetes induzida com estreptozotocina e dieta rica em gordura e açúcar

Projeto de qualificação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ângela Nunes Moreira

Co-orientador: Fabricio Rochedo Conceição

Pelotas, 2021

HOERLLE, Ellen Luíse Vagheti. **Avaliação de *Pichia pastoris* como probiótico recombinante e sua capacidade de liberar proteínas via mucosa no tratamento da Diabetes Mellitus tipo 2 em camundongos com diabetes induzida com estreptozotocina e dieta rica em gordura e açúcar.** 2021. Projeto de Qualificação (Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos), Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2021.

Resumo

Estudos indicam que probióticos podem desempenhar efeitos antidiabéticos através da modulação da microbiota intestinal, da melhora a tolerância à glicose, entre outros. E probióticos recombinantes liberando alvos via mucosa, entre eles, alvos com efeitos terapêuticos para o diabetes, como o GLP-1, podem auxiliar ainda mais na prevenção e/ou tratamento de diabetes tipo 2 (DM2). *Pichia pastoris*, reclassificada como *Komagataella phaffii*, tem sido utilizada como sistema de grande sucesso para a produção de proteínas recombinantes e tem apresentado propriedades probióticas. Assim, o presente estudo propõe-se a avaliar *P. pastoris* como probiótico recombinante, avaliando sua capacidade de liberar proteínas via mucosa, usando como proteína modelo o GLP-1 de longa ação (10laGLP-1), análogo do GLP-1, para o tratamento de DM2 em camundongos *Swiss* com diabetes induzida por estreptozotocina e dieta rica em gordura e açúcar. A sequência de 10laGLP-1 será desenhada, sintetizada por uma empresa especializada e clonada em um vetor de expressão induzível, para a expressão de 10laGLP-1. Camundongos *Swiss* serão divididos em sete grupos e tratados por 8 semanas como segue: controle, *P. pastoris*/ plasmídeo, *P. pastoris* recombinante, estreptozotocina, metformina, estreptozotocina + *P. pastoris*/ plasmídeo e estreptozotocina + *P. pastoris* recombinante. Os grupos *P. pastoris*/ plasmídeo e estreptozotocina + *P. pastoris*/ plasmídeo receberão formulação contendo 10^9 CFU.g⁻¹ de *P. pastoris* contendo o plasmídeo sozinho e os grupos *P. pastoris* recombinante e estreptozotocina + *P. pastoris* recombinante, receberão 10^9 CFU.g⁻¹ de *P. pastoris*/ plasmídeo-10laGLP-1, ambos por gavagem. Após quatro semanas, os grupos estreptozotocina, estreptozotocina + *P. pastoris*/ plasmídeo, estreptozotocina + *P. pastoris* recombinante e metformina (receberão 300 mg de metformina por quilo de peso corporal) serão injetados com uma dose de

estreptozotocina (100 mg.kg^{-1} de peso) diluída em solução salina a 0,9%, via intraperitoneal (i.p), após jejum de 12 horas, por três dias consecutivos e serão alimentados com uma dieta rica em gordura e em sacarose. Os animais que não forem induzidos com estreptozotocina e os que não receberem a formulação contendo *P. pastoris* receberão solução salina 0,9% em substituição e, os últimos, serão alimentados com uma dieta padrão para roedores. Camundongos tratados com estreptozotocina com glicemia de jejum $> 11,1 \text{ mmol / L}$ serão considerados como com DM2. Serão avaliados o consumo de alimentos e água, a variação de peso corporal e a conversão alimentar dos animais no período. E serão realizados os testes de tolerância a glicose oral e intraperitoneal. Após, será procedida a eutanásia por exsanguinação por punção cardíaca após anestesia com isoflurano. O plasma será empregado na realização das dosagens bioquímicas da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), uréia, creatinina, triglicérides, colesterol total e frações e glicemia de jejum utilizando Kits comerciais. O fígado, os rins e o encéfalo dos animais serão rapidamente removidos, homogeneizados em Tris/HCl 50 mM, pH 7,4 (1:10, m/v) e centrifugados a 4000 g a 4°C por 10 minutos, e o sobrenadante será utilizado para os ensaios de peroxidação lipídica (TBARS), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Por fim, será realizada análise histopatológica do pâncreas dos animais.

Palavras chaves: *Komagataella Paffii*, GLP-1, glicemia, controle glicêmico, marcadores bioquímicos, estresse oxidativo

Sumário

1 Introdução	28
2 Hipóteses	32
3 Revisão de literatura	33
4 Resultados e Impactos esperados	34
5 Objetivos	35
5.1 Objetivo geral	35
5.2 Objetivos específicos	35
6 Materiais e métodos	37
6.1 Probióticos e condições de cultivo	37
6.2 Obtenção de <i>P. pastoris</i> recombinante transformada com plasmídeo codificando a sequência 10laGLP-1 (<i>P. pastoris</i> / plasmídeo-10laGLP-1) com um promotor induzível	37
6.3 Animais e delineamento do estudo	38
6.4 Teste de tolerância a glicose oral e intraperitoneal	40
6.5 Variação de peso corporal, consumo alimentar e de água e conversão alimentar dos animais	40
6.6 Análises bioquímicas	40
6.7 Atividade antioxidante	41
6.8 Análise histopatológica do pâncreas	41
7 Aspectos Éticos	43
8 Cronograma do estudo	44
9 Orçamento do projeto	45
Referências bibliográfica	46

1 Introdução

A relação entre microbiota intestinal e saúde vem fomentando um interesse crescente que deseja identificar novas formas de prevenção e tratamento de inúmeras doenças. Em vista da presença de microrganismos resistentes e da falta de opções de tratamento dependentes de antibióticos, torna-se necessária a criação de métodos diferentes para combater esses microrganismos patógenos, pois estão frequentemente associados a doenças com elevadas taxas de morbidade e/ou mortalidade (Chua et al., 2017).

Sabe-se que os seres humanos vivem em coexistência com diversos microrganismos no exterior e interior de seu organismo, especialmente na microbiota intestinal (Davenport et al., 2017). Esta é definida como a totalidade de microrganismos presentes na superfície epitelial do Trato Gastrointestinal (TGI) (Larsen et al., 2010; Wang et al., 2017a). Logo, a manutenção da microbiota através do uso de probióticos tem causado um interesse crescente (Capurso et al. 2016).

Probióticos são organismos vivos, que quando ingeridos em quantidades adequadas, causam benefícios para a saúde dos indivíduos (FAO/WHO, 2002), como promoção da resistência gastrointestinal à colonização de patógenos de origem alimentar, prevenção e/ou tratamento de distúrbios metabólicos referentes ao estresse oxidativo, como diabetes, atuação como antioxidante e auxílio na digestão (Splichal et al., 2019; Gancarčíková et al., 2019; Potočnjak et al., 2017).

A tecnologia recombinante, definida como a transferência do gene de interesse de um organismo para outro organismo utilizando plasmídeos, abriu caminho para avanços no desenvolvimento e expressão de proteínas heterólogas de interesse, como antígenos vacinais, proteínas terapêuticas e anticorpos, e no desenvolvimento de probióticos recombinantes seguros (Michon et al., 2016; Icy D'Silva, 2011). Por essa tecnologia, probióticos podem expressar proteínas recombinantes que podem ser produzidas no citoplasma, sendo secretadas ou ficando na membrana celular ou ancoradas na superfície do probiótico. Probióticos recombinantes estão cada vez mais sendo usados como veículos para a expressão e entrega direcionada de moléculas nativas ou

recombinantes às superfícies mucosas em nutrição e saúde (Icy D'Silva, 2011). A localização da proteína expressa por um probiótico recombinante afeta a resposta imune, pois sua localização intracelular pode proteger a proteína das condições adversas no TGI. O manejo de doenças autoimunes e a liberação de antígenos vacinais estão inclusos nas aplicações potenciais da liberação mucosa de proteínas por probióticos recombinantes (Michon et al., 2016; Floch, 2014).

O diabetes mellitus (DM) é definido como uma síndrome metabólica de origem múltipla, caracterizada por hiperglicemia consequente à deficiência à insulina (WHO, 2019), decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina exercer adequadamente seus efeitos (Ministério da Saúde, 2009), e por distúrbios do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas (WHO, 2019). Pacientes que são diagnosticados com essa patologia devem ter cuidados diários com o seu estilo de vida, para controlar os níveis de glicose no sangue e evitar complicações (Ahola et al., 2017). Existem três tipos de DM: tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e gestacional (DMG) (WHO, 2016).

O DM2, que será o observado no estudo, é uma desordem metabólica onde o organismo produz insulina, mas ela não exerce a função adequada. Isso pode acontecer por duas razões: as células beta (β) do pâncreas produzem insulina, mas não em quantidades adequadas para a diminuição da glicemia e para produzir a energia que o corpo necessita, ou as células do organismo não funcionam corretamente, apresentando uma resistência à insulina, por isso elas não conseguem captar a insulina e manter a glicose controlada (Poretsky, 2010; Asemi et al., 2013; WHO, 2019).

Diversos estudos fazem uso de Estreptozotocina para a indução experimental de DM. A Estreptozotocina é um antibiótico produzido pelo *Streptomyces achromogenes*, que, para as células β pancreáticas, se torna tóxico. A sua ação em camundongos se iguala com a fisiopatologia da DM em humanos (Silva, et al., 2010; Kavalali et al., 2002; Baydas, 2003).

O aumento na prevalência de DM2 em todo o mundo é relacionada a rápidas mudanças ambientais que impactam negativamente sobre fatores de risco do diabetes, como hábitos dietéticos e sedentarismo (IDF, 2017; WHO, 2016). Estudos apontam que a microbiota intestinal é afetada por fatores genéticos e ambientais, além de ser importante para o entendimento dos

mecanismos compreendidos na patologia da DM2 (Caniet al., 2007; Wu et al., 2011).

Estudos indicam que probióticos podem desempenhar efeitos antidiabéticos através da modulação da microbiota intestinal e/ou da resposta imune, da melhora a tolerância à glicose, entre outros (Simon et al., 2015; Akbari et al., 2016; Gomes et al., 2014; Singh et al., 2017). Desta forma, probióticos podem auxiliar na prevenção e/ou tratamento de DM2 (Zeng et al., 2016), bem como os probióticos recombinantes, liberando alvos via mucosa, entre eles, alvos com efeitos terapêuticos para o DM, os quais podem intensificar tais efeitos.

Um alvo terapêutico para o tratamento do DM, utilizando probióticos recombinantes, é o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1, do inglês *Glucagon-like peptide-1*) e seus análogos. O GLP-1 é um hormônio com importante ação hipoglicemiante produzido pelas células L do íleo distal e cólon em resposta a ingestão de nutrientes. Ele se liga a receptores de proteína G com alta afinidade (GPCRs) localizados nas células beta pancreáticas e exerce função de biossíntese e secreção de insulina dependente de glicose e inibe a secreção de glucagon. Também é responsável pela redução da velocidade do esvaziamento gástrico e do apetite, prolonga o período de saciedade pós-prandial, diminuindo a necessidade de ingestão de alimentos e o peso corporal de pacientes obesos diabéticos e melhora a sensibilidade à insulina, sem causar hipoglicemia (Sun et al., 2019; Gao Z. et al, 2009; Holz et al., 2003; Knop et al., 2003; Nauck et al., 1996; Willms et al., 1996). Contudo o GLP-1 natural tem uma meia vida biológica extremamente curta, por ser inativado rapidamente pela enzima dipeptidil-peptidase IV (DPP IV), limitando sua aplicação como agente terapêutico. Desta forma, foram elaborados análogos do GLP-1 que apresentam os mesmos efeitos benéficos que GLP-1, porém com uma meia vida mais longa, como a sequência codificando dez repetições em *tandem* de GLP-1 de longa ação (10laGLP-1) recombinante, expressa por *Saccharomyces cerevisiae* resistente à DPP-IV (Jiang et al., 2019).

Conhecida por ser uma levedura metilotrófica da família Saccharomycetaceae, a *Pichia pastoris*, reclassificada no novo gênero Komagataella como *Komagataellaphaffii*, tem sido utilizada como um sistema de grande sucesso para a produção de proteínas recombinantes

(Nizoliet al., 2009; Dummer et al., 2009 A; Dummer et al., 2009 B; Siedler et al., 2017). Pode ser caracterizada como probiótico, pois é inofensiva e capaz de resistir à passagem pelo TGI *in vitro* e *in vivo*, e também apresenta atividade antimicrobiana contra *SalmonellaTyphimurium* em camundongos (França et al., 2015). Cunha (2016) realizou estudos para investigar os potenciais efeitos probióticos de *P. pastoris* em camundongos *Swiss* imunossuprimidos (com ciclofosfamida). Foram avaliadas a variação de peso, contagem de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos e a segurança da utilização desta levedura em imunossuprimidos. *P. pastoris* se mostrou segura para animais imunossuprimidos e possuiu efeito protetor à hepatotoxicidade da ciclofosfamida, aumentou o peso dos animais e os protegeu da leucopenia e neutropenia.

P. pastoris tem sido usada para expressão de análogos de GLP-1 (Hou et al., 2007; Chen et al., 2007; Gao et al., 2009; Zhou et al., 2008; Zhou et al., 2009; Prabha et al., 2009; Huang et al., 2008; Qian, 2015; Dou et al., 2008), mas somente como sistema de expressão heteróloga. Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar *P. pastoris* como probiótico recombinante, avaliando sua capacidade de liberar proteínas via mucosa, usando como proteína modelo o GLP-1 de longa ação (10laGLP-1), análogo do GLP-1 com atividade biológica mais duradoura, para o tratamento da diabetes tipo 2, em camundongos *Swiss* com diabetes induzida por estreptozotocina e dieta rica em gordura e açúcar.

2 Hipóteses

Há benefícios na utilização de formulação contendo *P. pastoris* como probiótico recombinante e sua capacidade de liberar proteínas via mucosa, e na prevenção e/ou tratamento do DM2, tanto nos níveis de glicemia em jejum, como nos testes de tolerância a glicose oral e intraperitoneal. Também nos parâmetros bioquímicos e estresse oxidativo em camundongos Swiss com DM induzida por estreptozotocina.

3 Revisão de literatura

Foi realizada busca de artigos nas seguintes bases de dados: Pubmed, Medline, Periódicos Capes, Scielo, Google Acadêmico, entre outros. Foram pesquisados artigos publicados nos últimos 12 anos, e não houve outros limites nas buscas. A busca de artigos também foi feita através de checagem de referências dos artigos consultados. Foram utilizadas combinações dos seguintes descritores: Recombinant Probiotic and Diabetes, *Pichia pastoris* and Probiotic, GLP-1 and diabetes and treatment, *Komagataellaphaffii*, *Komagataella phaffii* and Probiotic, *Komagataellaphaffii* and diabetes.

4 Resultados e Impactos esperados

Espera-se que os camundongos com DM induzida por estreptozotocina e dieta rica em gordura e em açúcar, suplementados com a formulação contendo o probiótico recombinante *P. pastoris* liberando GLP-1 de longa ação (10laGLP-1) apresentem melhora na hiperglicemia, nos testes de tolerância a glicose oral e intraperitoneal e nos parâmetros de estresse oxidativo e em outros parâmetros bioquímicos.

Acredita-se que os resultados desse trabalho terão impacto positivo no tratamento e no manejo das complicações do DM, o que futuramente poderá impactar diretamente na saúde do paciente diabético, melhorando assim seu prognóstico e qualidade de vida.

5 Objetivos

5.1 Objetivo geral

O objetivo do presente projeto é avaliar *P. pastoris* como probiótico recombinante, avaliando sua capacidade de liberar proteínas via mucosa, usando como proteína modelo o GLP-1 de longa ação (10laGLP-1), análogo do GLP-1 com atividade biológica mais duradoura, para o tratamento da diabetes tipo 2, em camundongos *Swiss* com diabetes induzida por estreptozotocina e dieta rica em gordura e açúcar.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar *P. pastoris* como probiótico recombinante para liberação mucosa de proteínas terapêuticas ou antígenos vacinais, usando um plasmídeo de expressão induzível para a secreção de proteínas alvo, como alternativa viável à síntese química e à administração injetável de proteínas;
- Avaliar, em camundongos *Swiss* com diabetes induzida por estreptozotocina e dieta rica em gordura e açúcar, o efeito de uma formulação contendo *P. pastoris* como probiótico recombinante para liberação mucosa do GLP-1 de longa ação (10laGLP-1), sobre:
 - Os níveis de glicemia de jejum;
 - O teste de tolerância a glicose oral e intraperitoneal;
 - Outros parâmetros bioquímicos como aspartato aminotransferases (AST), alanina aminotransferases (ALT), triglicerídeos, colesterol total e frações, creatinina e uréia, avaliando-se, assim, a atividade benéfica deste probiótico recombinante sobre esses parâmetros;
 - O consumo de alimentos e água, a variação de peso corporal e a conversão alimentar dos animais no período;
 - O estresse oxidativo, através da avaliação da peroxidação lipídica (determinação dos níveis de TBARS) e da avaliação da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) no fígado, encéfalo e rins, avaliando-se, assim, a atividade antioxidante deste probiótico recombinante;
 - A análise histopatológica do pâncreas.

6 Materiais e métodos

6.1 Probióticos e condições de cultivo

O microrganismo *P. pastoris* que será utilizado nesse trabalho será proveniente do banco de microrganismos do Núcleo de Biotecnologia (CDTec-UFPEl).

Pichia pastoris liofilizado será ressuspenso em solução salina, semeado em placas contendo Ágar Levedura, Peptona e Dextrose (YPD) e as placas incubadas por 42 horas à 28°C. A seguir, 50 µL de uma suspensão contendo 3 a 5 colônias da levedura serão adicionados a 70 mL de caldo YPD e os cultivos serão incubados em agitador orbital a 200 rpm, a 28°C, por aproximadamente 24 h. Após, 70 mL dos inóculos serão adicionados a 700 mL de caldo YPD e os cultivos serão incubados a 28°C sob agitação de 200 rpm durante 24h. As concentrações de *P. pastoris* serão determinadas através de diluição decimal em solução salina (NaCl 0,9%) estéril e contagem em placas contendo Agar YPD (em UFC. mL⁻¹).

6.2 Obtenção de *P. pastoris* recombinante transformada com plasmídeo codificando a sequência 10laGLP-1 (*P. pastoris*/ plasmídeo-10laGLP-1) com um promotor induzível

A sequência de 10laGLP-1 (Jiang et al., 2019) será desenhada no software Vector NTI 11 (Invitrogen), sintetizada por uma empresa especializada e clonada em vetor de expressão induzível segundo Green e Sambrook (2012). Os plasmídeos com 10laGLP-1 e sozinhos (controle) serão avaliados em eletroforese em gel de agarose e submetidos à análise de restrição e sequenciamento, e serão transformados em células de *P. pastoris* competente por eletroporação. Para avaliar a expressão de 10laGLP-1, os transformantes de *P. pastoris* recombinante contendo plasmídeo/10laGLP-1 e somente o plasmídeo (controle) serão cultivados em 10 mL de caldo YPD contendo antibiótico para seleção (pré-inóculo). No dia seguinte, 9 mL de caldo YPD com a mesma concentração de antibiótico serão inoculados com 1 mL (10% do volume final de cultivo) do pré-inóculo.

6.3 Animais e delineamento do estudo

Os ensaios biológicos do experimento com diabetes serão desenvolvidos no Biotério da Faculdade de Nutrição da UFPel. Camundongos *Swiss* machos com três semanas de idade, procedentes do Biotério da Faculdade de Nutrição da UFPel, serão mantidos em gaiolas em um ambiente controlado (temperatura, umidade e luminosidade).

Após, os camundongos *Swiss* serão divididos em sete grupos, e tratados por oito semanas como segue: 1) grupo controle, o qual não sofrerá indução da DM e não será suplementado com a formulação contendo *P. pastoris*; 2) grupo *P.pastoris*, que não sofrerá indução da DM e será suplementado diariamente com a formulação contendo 10^9 UFC. mL⁻¹ de *P. pastoris*/plasmídeo por gavagem; 3) grupo *P.pastoris* recombinante, não sofrerá indução da diabetes e será suplementado diariamente com a formulação contendo 10^9 UFC. mL⁻¹ de *P. pastoris* recombinante transformada com plasmídeo codificando a sequência 10laGLP-1 (*P.pastoris*/plasmídeo-10laGLP-1) por gavagem; 4) grupo estreptozotocina, sofrerá indução da DM por estreptozotocina e dieta rica em gordura e em açúcar e não será suplementado com *P.pastoris*; 5) grupo estreptozotocina + *P. pastoris*, sofrerá indução de diabetes e será suplementado diariamente com a formulação contendo 10^9 UFC. mL⁻¹ de *P. pastoris*/plasmídeo por gavagem; e 6) grupo estreptozotocina + *P. pastoris* recombinante, sofrerá indução de diabetes e será suplementado diariamente com a formulação contendo 10^9 UFC. mL⁻¹ de *P. pastoris* recombinante (*P. pastoris*/ plasmídeo-10laGLP-1) por gavagem; 7) Grupo tratado com metformina (sofrerão indução de diabetes e receberão 300 mg. kg⁻¹ de peso corporal). Os animais que não forem induzidos com estreptozotocina serão injetados com solução salina 0,9% e os que não receberem a formulação contendo *P. pastoris* receberão solução salina 0,9% por gavagem.

Os camundongos dos grupos com diabetes induzida (grupos com 14 animais cada) serão alimentados com uma dieta rica em gordura e rica em sacarose (composição alimentar: 18% de banha, 20% de sacarose, 3% de leite em pó integral, 4% de gema de ovo e 55% de ração básica) durante todo o experimento. E os animais dos outros grupos serão alimentados com uma dieta padrão para roedores. Após quatro semanas, camundongos dos grupos com

DM induzida serão injetados com estreptozotocina (100 mg. kg^{-1} de peso, Sigma) diluída em solução salina a 0,9%, via intraperitoneal (i.p), após jejum de 12 horas, por três dias consecutivos. Os camundongos tratados com estreptozotocina receberão solução de glicose a 5% diluída em água durante 24h após a indução da diabetes, a fim de prevenir a morte por choque hiperglicêmico. Três dias após o último dia de indução do diabetes, amostras de sangue dos animais serão coletadas a partir da veia da cauda, para verificar a glicemia após 4 horas de jejum, através do sangue da veia da cauda usando um glicosímetro digital Accu-Check Nano Performa (Roche, Brasil), a fim de confirmar a indução da diabetes. Camundongos tratados com estreptozotocina com glicemia de jejum $> 11,1 \text{ mmol/ L}$ serão considerados como com DM2 (Jiang et al., 2019) e animais com glicemia de jejum menor que $11,1 \text{ mmol/ L}$ receberão injeção bifásica de estreptozotocina (50 mg. kg^{-1} de peso). A glicemia de jejum será medida novamente três dias após a segunda injeção. Os animais que não receberem a formulação contendo *P. pastoris* e os que não forem induzidos com estreptozotocina receberão solução salina 0,9% em substituição.

A aparência clínica geral e a mortalidade de todos os grupos serão observadas diariamente. O consumo de alimentos e água e o peso corporal de todos os grupos também serão examinados durante o tratamento. Os níveis de glicemia de jejum serão medidos diariamente através do sangue da veia da cauda usando o glicosímetro digital.

Após oito semanas de tratamento (após jejum de 12 horas), amostras de sangue dos animais serão coletadas a partir da veia da cauda, para verificar a glicemia após 12 horas de jejum. Os camundongos receberão a última gavagem dos probióticos e serão submetidos a um teste de tolerância a glicose oral e intraperitoneal. Amostras de sangue serão coletadas da veia da cauda em diferentes momentos após a administração de glicose, e os níveis de glicose sanguínea serão medidos. E por fim, será procedida a eutanásia através da exsanguinação por punção cardíaca após anestesia com isoflurano. Os animais serão colocados em caixas fechadas e expostos a algodão embebido em isoflurano. Após constatada a ausência de reflexos, será realizada a punção intracardíaca para exsanguinação e a coleta de sangue em tubos contendo heparina sódica. Se necessário, será realizado o deslocamento

cervical para constatação da morte do animal. Todos os esforços serão realizados para diminuir o sofrimento dos animais. O procedimento será feito em sala específica e isolada.

6.4 Teste de tolerância a glicose oral e intraperitoneal

O teste de tolerância a glicose oral será realizado conforme descrito por CHEN et al. (2007) e o teste de tolerância a glicose intraperitoneal será realizado conforme descrito por Liu et al. (2016). Camundongos receberão glicose (1,5 mg de glicose/ g peso corporal) administrada por via oral através de um tubo de gavagem e 2g/ kg dissolvida em água intraperitonealmente, respectivamente, após jejum de 12 horas. Glicemia será medida com amostras de sangue da veia caudal em 0, 15, 30, 60, 90, e 120 min pós-administração.

6.5 Variação de peso corporal, consumo alimentar e de água e conversão alimentar dos animais

O consumo de alimentos e água e o peso corporal de todos os grupos também serão examinados durante o tratamento. Para a avaliação da variação de peso, os animais serão pesados todos os dias. A média do consumo alimentar será avaliada através da subtração do peso da ração oferecida inicialmente aos grupos pela quantidade restante final, sendo determinada todos os dias. Para o cálculo do índice de conversão alimentar (ICA) por grupo nos períodos avaliados, será utilizada a equação: $ICA = \text{média de consumo alimentar} / \text{média de ganho de peso no período}$ e, para obter-se o índice de eficiência alimentar (IEA) por grupo nos períodos, será utilizada a equação: $IEA = \text{média de ganho de peso} / \text{média de consumo alimentar no período}$.

6.6 Análises bioquímicas

O plasma será obtido por centrifugação a 2000 g durante 10 min do sangue coletado por punção cardíaca em tubos contendo heparina sódica e utilizado para realizar as dosagens bioquímicas da aspartatoaminotransferase (AST), alaninaaminotransferase (ALT), uréia, creatinina, colesterol total e

frações, triglicerídeos e glicose. A análise bioquímica das amostras de plasma será realizada utilizando kits comerciais (Labtest, Brasil).

6.7 Atividade antioxidante

O fígado, um rim e o encéfalo serão rapidamente removidos em condições assépticas, pesados e homogeneizados em 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 (1/10, w / v). Os tecidos homogeneizados serão centrifugados a 4000 g durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante será utilizado para o TBARS e para a avaliação da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD.

Os níveis de TBARS serão determinados como descrito por Ohkawa (1979) no fígado, rim e encéfalo. Um dos produtos finais da peroxidação lipídica, malondialdeído (MDA), servirá como um índice da intensidade do estresse oxidativo. MDA reage com ácido tiobarbitúrico e gera um produto colorido que pode ser medido espectrofotometricamente a 532 nm. O nível de TBARS será expresso em nmolMDA.g⁻¹ do tecido.

A medida da atividade da enzima CAT envolve o consumo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e será determinada através de um espectrofotômetro a 240 nm, de acordo com Aebi (1984). A atividade da enzima será expressa em unidades de UCAT.g⁻¹ de proteína.

A medida da atividade da enzima SOD baseia-se na inibição da reação do radical superóxido com adrenalina, como descrito por Misra e Fridovich (1972), e será detectada com um espectrofotômetro a 480 nm. A atividade da enzima será expressa em U.g⁻¹ de proteína.

6.8 Análise histopatológica do pâncreas

O pâncreas será rapidamente removido em condições assépticas, fixado com 10% de formalina e embebido em parafina. Seções serão cortadas e coradas com hematoxilina. O grau de insulinite será determinado de acordo com o seguinte critério: sem insulinite (ausência de infiltração celular), peri- insulinite (infiltração somente na periferia das ilhotas), insulinite suave (<50% da área das ilhotas infiltrada) e insulinite severa (≥50% da área das ilhotas infiltrada) (Liu et al., 2016).

7 Aspectos Éticos

O estudo será submetido à Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e ocorrerá de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

8 Cronograma do estudo

As atividades previstas devem ser desenvolvidas ao longo de 5 semestres, sendo desenvolvidas segundo o cronograma abaixo:

Semestres de Estudo	1/2020	2/2020	1/2021	2/2021	1/2022
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X
Qualificação do Projeto				X	
Obtenção de <i>P. pastoris</i> recombinante transformada com plasmídeo codificando a sequência 10laGLP-1					X
Suplementação com a formulação contendo <i>P.pastoris</i>					X
Indução de DM com estreptozotocina nos camundongos correspondentes					X
Avaliação da variação de peso e ingestão alimentar					X
Coleta de amostras de sangue dos animais para verificar a glicemia					X
Realização de eutanásia e coleta de sangue por punção cardíaca					X
Análise Bioquímica das amostras de plasma					X
Avaliação do estresse oxidativo em tecido hepático, cerebral e renal					X
Análise histopatológica do pâncreas					X
Redação da dissertação e do artigo					X
Defesa da Dissertação					X

9 Orçamento do projeto

Alguns materiais a serem utilizados para a execução do projeto serão comprados com recursos do PROAP do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos-PPGNA e o restante será fornecido pelo Laboratório de Imunologia Aplicada (CDTec- UFPel).

Referências bibliográfica

Aebi, H. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 121- 126, 1984.

Ahola, Aila J; Harjutsalo, Valma; Forsblom, Carol; Freese, Riitta; Makimattila, Sari; Groop, Ph. *The Self-reported Use of Probiotics is Associated with Better Glycaemic Control and Lower Odds of Metabolic Syndrome and its Components in Type 1 Diabetes*. *Journal of Probiotics & Health*, [S.L.], v. 05, n. 04, p. 1-8, 2017. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2329-8901.1000188>.

Akbari, V.; Hendijani, F; Feizi, A.; Varshosaz, J.; Fakhari, Z.; Morshedi, S.; Mostafavi, S. A. Efficacy and safety of oral insulin compared to subcutaneous insulin: A systematic review and Meta-analysis. *Journal of Endocrinological Investigation*, v. 39 (2), p. 215–225, 2016.

Amar, Jacques; Chabo, Chantal; Waget, Aurélie; Klopp, Pascale; Vachoux, Christelle; Bermúdez-Humarán, Luis G.; Smirnova, Natalia; Bergé, Mathieu; Sulpice, Thierry; Lahtinen, Sampo. *Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment*. *Embo Molecular Medicine*, [S.L.], v. 3, n. 9, p. 559-572, 3 ago. 2011. EMBO. <http://dx.doi.org/10.1002/emmm.201100159>.

American Diabetes Association (ADA) (2009) Diagnosis and classification of Diabetes mellitus. *Diabetes Care* 32(Suppl 1):62–67. <https://doi.org/10.2337/dc09-S062Applications>. *AdvNutr*, 10, pp. 17-30.

American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2009. *Diabetes Care*. 2009 Jan;32 Suppl 1(Suppl 1):S13-61. doi: 10.2337/dc09-S013. PMID: 19118286; PMCID: PMC2613589.

Asemi Z, Zare Z, Shakeri H, Sabihi S-S, Esmailzadeh A (2013) *Effect of multispecies probiotic supplements on metabolic profiles, hs-CRP, and oxidative stress in patients with type 2 diabetes*. *Ann NutrMetab* 63(1–2):1–9. <https://doi.org/10.1159/000349922>

Bagarolli, Renata A.; Tobar, Natália; Oliveira, Alexandre G.; Arađjo, Tiago G.; Carvalho, Bruno M.; Rocha, Guilherme Z.; Vecina, Juliana F.; Calisto, Kelly; Guadagnini, Dioze; Prada, Patrícia O. *Probiotics modulate gut microbiota and improve insulin sensitivity in DIO mice*. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, [S.L.], v. 50, p. 16-25, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.08.006>.

Balakumar M, Prabhu D, Sathishkumar C, Prabhu P, Rokana N, Kumar R, Raghavan S, Soundarajan A, Grover S, Batish VK, Mohan V, Balasubramanyam M. Improvement in glucose tolerance and insulin sensitivity by probiotic strains of Indian gut origin in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *Eur J Nutr*. 2018 Feb;57(1):279-295. doi: 10.1007/s00394-016-1317-7. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27757592.

- Baydas, G., Reiter, R. J., Yasar, A., Tuzcu, M., Akdemir, I., & Nedzvetskii, V. S. (2003). *Melatonin reduces glial reactivity in the hippocampus, cortex, and cerebellum of streptozotocin-induced diabetic rats*. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(7), 797–804. doi:10.1016/s0891-5849(03)00408-8
- Bertonhi, Laura Gonçalves; Dias, Juliana Chioda Ribeiro. *Diabetes mellitus tipo 2: aspectos clínicos, tratamento e conduta dietoterápica*. *Revista Ciências Nutricionais Online*, Bebedouro, Sp, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2018.
- Billimoria, Z. C., Pandya, S., Bhatt, P., et al. (2016). *Probiotics-To Use, or Not to Use? An Updated Meta-analysis*. *ClinPediatr (Phila)*, 55, pp. 1242-1244.
- Blottiere, H. M., de Vos, W. M., Ehrlich, S. D., et al. (2013). *Human intestinal metagenomics: state of the art and future*. *Curr Opin Microbiol*, 16, pp. 232-9.
- Bouttefeux, O.; Beloqui, A.; Preát, V. Delivery of peptides via the oral route: diabetes treatment by peptide-loaded nanoparticles. *Current Pharmacology Design*, v. 22, p.1161-1176, 2016.
- Brownlee M. *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):813-20. doi: 10.1038/414813a. PMID: 11742414.
- Brubaker PL, Anini Y. *Direct and indirect mechanisms regulating secretion of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2*. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003;81(11):1005-12.
- Butel, M. J. (2014). *Probiotics, gut microbiota and health*. *Med Mal Infect*, 44, pp. 1-8.
- Butler, M. I., Cryan, J. F., Dinan, T. G. (2019). *Man and the Microbiome: A New*
- Calcinaro, F., Dionisi, S., Marinaro, M. et al. *Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse*. *Diabetologia* 48, 1565–1575 (2005). <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1831-2>
- Caniet, P. D.; Amar, J.; Iglesias, M. A.; Poggi, M.; Knauf, C.; Bastelica, D.; Neyrinck, A. M.; Fava, F.; Tuohy, K. M.; Chabo, C. *Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance*. *Diabetes*, [S.L.], v. 56, n. 7, p. 1761- 1772, 24 abr. 2007. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/db06-1491>.
- Capurso, L. (2016). [Probiotics]. *RecentiProgMed*, 107, pp. 267-77.
- Carvalho BM, Guadagnini D, Tsukumo DM, Schenka AA, Latuf-Filho P, Vassallo J, et al. *Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice*. *Diabetologia* 2012;55(10):2823–34.
- Caselli, Michele; Vaira, Dino; Cassol, Francesca; Calò, Girolamo; Vaira, Guiseppina; Papini, Francesco; Holton, John. *Recombinant Probiotics and their Potential in Human Health*. *International Journal of Probiotics & Prebiotics*, [s. l], v. 7, n. 2, p. 53-57, maio 2012.

- Chang, Y. S., Trivedi, M. K., Jha, A., et al. (2016). Symbiotic for Prevention and Chen SW, Zhong J, Huan LD. [Expression of human insulin in lactic acid bacteria and its oral administration in non-obese diabetic mice]. *WeiSheng wu xuebao = Acta Microbiologica Sinica*. 2007 Dec;47(6):987-991.
- Cho, Seungchan; Kim, Dongjun; Lee, Yongjun; Kil, Eui-Joon; Cho, Mun-Ju; Byun, Sung-June; Cho, Won; Lee, Sukchan. Probiotic *Lactobacillus Paracasei* Expressing a Nucleic Acid-Hydrolyzing Minibody (3D8 Scfv) Enhances Probiotic Activities in Mice Intestine as Revealed by Metagenomic Analyses. *Genes*, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 276, 29 de maio 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes9060276>.
- Chua KJ, Kwok WC, Aggarwal N, Sun T, Chang MW. *Designer probiotics for the prevention and treatment of human diseases*. *Curr Opin Chem Biol*. 2017 Oct;40:8-16. doi: 10.1016/j.cbpa.2017.04.011. Epub 2017 May 4. PMID: 28478369.
- Cunha, L. R. *Efeito da levedura Pichia pastoris sobre parâmetros imunológicos e de estresse oxidativo em camundongos Swiss submetidos à quimioterapia com ciclofosfamida*. 2016. 99 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de pós-graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.
- Daliri, E. B.-M. Lee, B. H. (2015). *New perspectives on probiotics in health and disease*. *Food Science and Human Wellness*, 4, pp. 56-65.
- Davenport, E. R., Sanders, J. G., Song, S. J., et al. (2017). *The human microbiome in evolution*. *BMC Biol*, 15, pp. 127.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., ... Tumbaugh, P. J. (2013). *Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome*. *Nature*, 505(7484), 559–563. doi:10.1038/nature12820
- de Almada, C. N., Nunes de Almada, C., Martinez, R. C., et al. (2015). *Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99, pp. 4175-99.
- Deacon CF, Holst JJ, Carr RD. *Glucagon-like peptide-1: a basis for new approaches to the management of diabetes*. *Drugs Today (Barc)*. 1999;35(3):159-70.
- Dou, W.F.; Lei, J.Y.; Zhang, L.F.; Xu, Z.H.; Chen, Y.; Jin, J. Expression, purification, and characterization of recombinant human serum albumin fusion protein with two human glucagon-like peptide-1 mutants in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, v. 61(1), p. 45-49, 2008.
- Dugas LR, Lie L, Plange-Rhule J, Bedu-Addo K, Bovet P, Lambert EV, Forrester TE, Luke A, Gilbert JA, Layden BT (2018) *Gut microbiota, short chain fatty acids, and obesity across the epidemiologic transition: the METS- Microbiome study protocol*. *BMC Public Health*. 18:978. <https://doi.org/10.1186/s12889-018-5879-6>

Dummer, L. A.; Conceição, F. R.; Nizoli, L. Q.; De Moraes, C. M.; Rocha, A. R.; De Souza, L. L.; Ross, T.; Vidor, T.; Leite, F. P. L. *Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast Pichia pastoris*. Journal of Virological Methods, v. 161, n. 1, p.84-90, 2009a.

Dummer, L. A.; Nizoli, L. Q.; Rocha, A. S. R.; De Moraes, C. M.; Conceição, F. R.; Gil-Turnes, C.; Vidor, T.; Leite, F. P. L. *Production and characterization of recombinant bovine herpesvirus type 5 glycoprotein D expressed in Pichia pastoris*. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 128, n. 1-3, p.315- 316, 2009b.

Ehlers MR, Klaff LJ, D'Alessio DA, Brazg R, Kay HD, Harley RE, Mathisen AL, Schneider R. *Recombinant glucagon-like peptide-1 (7-36 amide) lowers fasting serum glucose in a broad spectrum of patients with type 2 diabetes*. HormMetab Res. 2003;35(10):611-6.

Eitahed, H. S., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M., & Mofid, V. (2012). *Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients*. Nutrition, 28(5), 539–543. doi:10.1016/j.nut.2011.08.013

Floch, Martin. *Recommendations for Probiotic Use in Humans—A Update*. Pharmaceuticals, [S.L.], v. 7, n. 10, p. 999-1007, 10 out. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph7100999>.

França, R. C., Conceição, F. R., Mendonça, M., Haubert, L., Sabadin, G., de Oliveira, P. D., ... Moreira, Â. N. (2015). *Pichia pastoris X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against Salmonella Typhimurium*. Applied Microbiology and Biotechnology, 99(19), 7953–7961. doi:10.1007/s00253-015-6696-9

Gadecka, A. Bielak-Zmijewska, A. (2019). *Slowing Down Ageing: The Role of Nutrients and Microbiota in Modulation of the Epigenome*. Nutrients, 11, pp. 1251.

Gancarčíková S, Nemcová R, Popper M, et al. The Influence of Feed- Supplementation with Probiotic Strain Lactobacillus reuteri CCM 8617 and Alginate on Intestinal Microenvironment of SPF Mice Infected with Salmonella Typhimurium CCM 7205. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019;11(2):493–508. doi:10.1007/s12602-018-9413-z

Gao, Z., Bai, G., Chen, J., Zhang, Q., Pan, P., Bai, F., & Geng, P. (2009). *Development, Characterization, and Evaluation of a Fusion Protein of a Novel Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Analog and Human Serum Albumin in Pichia pastoris*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 73(3), 688–694. doi:10.1271/bbb.80742

Gomes, A.C.; Bueno, A.M.; Souza, R.G.M; Mota, J.F. Gut microbiota, probiotics and diabetes. Nutrition Journal, v. 1, p. 13-60, 2014

Gonçalves AM, Pedro AQ, Maia C, Sousa F, Queiroz JA, Passarinha LA. *Pichia Green*, M. e Sambrook, J. (2012) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4ª Edição, Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Holz GG, Chepurny OG. *Glucagon-like peptide-1 synthetic analogs: new therapeutic agents for use in the treatment of diabetes mellitus*. *Curr Med Chem*. 2003;10(22):2471-83.

Hou, J.; Yan, R.; Yang, L.; Wu, Z.; Wang, C.; Ding, D.; Li, N.; Ma, C.; Li, M. High-Level Expression of Fusion Protein Containing 10 Tandem Repeated GLP-1 Analogs in Yeast *Pichia pastoris* and Its Biological Activity in a Diabetic Rat Model. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 71:6, p. 1462-1469, 2007.

Huang, Y.S.; Chen, Z.; Chen, Y.Q.; Ma, G.C.; Shan, J.F.; Liu, W.; Zhou, L.F. Preparation and characterization of a novel exendin-4 human serum albumin fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of peptide science*, v. 14(5), p. 588-595, 2008.

International Diabetes Federation (IDF) (2017) *Diabetes Atlas*. Eighth Edition. <https://diabetesatlas.org>

Jiang, P.; M.A., C.; Hao, J.; Han, H.; Li, M. Construction of a dietary-cure *Saccharomyces cerevisiae* expressing long-acting glucagon-like peptide-1 and investigation of its hypoglycemic activity in type 2 diabetes mellitus mouse model. *Journal of Biosciences*, v. 44:9, 2019.

Karbalaei, Mohsen; Rezaee, Seyed A.; Farsiani, Hadi. *Pichia pastoris: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins*. *Journal of Cellular Physiology*, [S.L.], v. 235, n. 9, p. 5867-5881, 14 fev. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.29583>.

Karlsson, F. H., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C. J., Fagerberg, B., ... Bäckhed, F. (2013). *Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control*. *Nature*, 498(7452), 99–103. doi:10.1038/nature12198

Kavalali, G., Tuncel, H., Göksel, S., & Hatemi, H. H. (2003). *Hypoglycemic activity of Urtica pilulifera in streptozotocin-diabetic rats*. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(2-3), 241–245. doi:10.1016/s0378-8741(02)00315-x

Knop FK, Vilsboll T, Larsen S, Madsbad S, Holst JJ, Krarup T. *No hypoglycemia after subcutaneous administration of glucagon-like peptide-1 in lean type 2 diabetic patients and in patients with diabetes secondary to chronic pancreatitis*. *Diabetes Care*. 2003;26(9):2581-7.

Larsen, N., Vogensen, F. K., van den Berg, F. W. J., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K., ... Jakobsen, M. (2010). *Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults*. *PLoS ONE*, 5(2), e9085. doi: 10.1371/journal.pone.0009085

Liu, K.F.; Liu, Xiao-Rui; Li, G.L.; Lu, S.P.; Jin, L.; Wu, J. Oral administration of *Lactococcus lactis*-expressing heat shockprotein 65 and tandemly repeated IA2P2 prevents type 1 diabetes in NOD mice. *Immunology Letters*, v. 174, p. 28–36, 2016.

Lyssenko V, Jonsson A, Almgren P, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, Berglund G, Altshuler D, Nilsson P, Groop L (2008) *Clinical risk factors, DNA variants, and the development of Type 2 Diabetes*. N Engl J Med 359:2220–2232. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0801869>

Martín, R., Miquel, S., Ulmer, J. et al. *Role of commensal and probiotic bacteria in human health: a focus on inflammatory bowel disease*. Microb Cell Fact 12, 71 (2013). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-71>

Meneilly GS, Greig N, Tildesley H, Habener JF, Egan JM, Elahi D. *Effects of 3 months of continuous subcutaneous administration of glucagon-like peptide 1 in elderly patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care. 2003;26(10):2835-41.

Michon C, Langella P, Eijsink VG, Mathiesen G, Chatel JM. Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: strategies and applications. *Microb Cell Fact*. 2016; 15:70. Published 2016 May 3. doi:10.1186/s12934-016-0468-9

Mika, A., Van Treuren, W., González, A., Herrera, J. J., Knight, R., &Fleshner,

M. (2015). *Exercise Is More Effective at Altering Gut Microbial Composition and Producing Stable Changes in Lean Mass in Juvenile versus Adult Male F344 Rats*. PLOS ONE, 10(5), e0125889. doi:10.1371/journal.pone.0125889

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Diabetes*. Disponível em: <<https://bvsmms.saude.gov.br/diabetes/>>. Acesso: 08 de maio de 2021.

Mishima, E., Fukuda, S., Shima, H., Hirayama, A., Akiyama, Y., Takeuchi, Y., ... Abe, T. (2014). *Alteration of the Intestinal Environment by Lubiprostone Is Associated with Amelioration of Adenine-Induced CKD*. Journal of the American Society of Nephrology, 26(8), 1787–1794. doi:10.1681/asn.2014060530

Misra HP, Fridovich I. O papel do ânion superóxido na autoxidação da epinefrina e um ensaio simples para superóxido dismutase. J Biol Chem. 25 de maio de 1972; 247 (10): 3170-5. PMID: 4623845.

Muñoz-Garach, Araceli; Diaz-Perdigones, Cristina; Tinahones, Francisco J. *Microbiota y diabetes mellitus tipo 2*. Endocrinología y Nutrición, [S.L.], v. 63, n. 10, p. 560-568, dez. 2016. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.endonu.2016.07.008>.

Nauck, M.A.; Wollschlager, D.; Werner, J.; Holst, J.J.; Orskov, C.; Creutzfeldt, W. Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 in patients with NIDDM. Diabetologia, v.39, p. 1546-1553,1996.

Nizoliet, L. Q.; Conceição, F. R.; Silva, S. S.; Dummer, L. A.; Santos Júnior, A. G.; Leite, F. P. L. *Immunogenicity and antigenicity of the recombinant EMA-1 protein of Theileriaequi expressed in the yeast Pichia pastoris*. Revista Brasileira de Parasitologia

Veterinária, [S.L.], v. 18, n. 02, p. 1-4, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01802001>.

Nogueira, Janaína Cândida Rodrigues. *Probióticos - Revisão da Literatura*. Revista Brasileira de Ciências da Saúde, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 487-492, 1 out. 2011. Portal de Periodicos UFPB. <http://dx.doi.org/10.4034/rbcs.2011.15.04.16>.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979 Jun;95(2):351-8. doi: 10.1016/0003-2697(79)90738-3. PMID: 36810.

Poretzky, Leonid. *Principles of Diabetes Mellitus*. 2. ed. New York - Ny: Springer Science+Business Media, 2010. 869 p.

Potočnjak M, Pušić P, Frece J, Abram M, Janković T, Gobin I. Three New *Lactobacillus plantarum* Strains in the Probiotic Toolbox against Gut Pathogen *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. *Food Technol Biotechnol*. 2017;55(1):48–54. doi:10.17113/ftb.55.01.17.4693

Prabha, L.; Govindappa, N.; Adhikary, L.; Melarkode, R.; Sastry, K. Identification of the dipeptidyl aminopeptidase responsible for N-terminal clipping of recombinant Exendin-4 precursor expressed in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, v. 64(2), p.155-61, 2009.

Qian, K.; Li, C.; Gong, X.; Ndawula, C. Jr.; Qian, J.; Chen, Y.; Li, H.; Jin, J. Expression of a glucagon-like peptide-1 analogue, as a therapeutic agent for type II diabetes, with enhanced bioactivity and increased N-terminal homogeneity in *Pichia pastoris*. *Biotechnology letters*, v. 37(11), p. 2229-2235, 2015.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., ... Levenez, F. (2010). *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. *Nature*, 464(7285), 59–65. doi:10.1038/nature08821

Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., ... Shen, D. (2012). *A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes*. *Nature*, 490(7418), 55–60. doi:10.1038/nature11450

Rashid, S. K., Khodja, N. I., Auger, C., Alhosin, M., Boehm, N., Oswald- Mammosser, M., & Schini-Kerth, V. B. (2014). *Probiotics (VSL#3) Prevent Endothelial Dysfunction in Rats with Portal Hypertension: Role of the Angiotensin System*. *PLoS ONE*, 9(5), e97458. doi:10.1371/journal.pone.0097458

Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Duncan, A. E., Kau, A. L., ... Gordon, J. I. (2013). *Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice*. *Science*, 341(6150), 1241214–1241214. doi:10.1126/science.1241214

Salgaço MK, Oliveira LGS, Costa GN, Bianchi F, Sivieri K. *Relationship between gut microbiota, probiotics, and type 2 diabetes mellitus*. *ApplMicrobiolBiotechnol*. 2019

Dec;103(23-24):9229-9238. doi: 10.1007/s00253-019-10156-y. Epub 2019 Oct 29. PMID: 31664483.

Santos, João Rodrigo Gil De Los; storch, Otávio Brod; fernandes, Cristina Gevehr; Gil-Turnes, Carlos. *Evaluation in broilers of the probiotic properties of Pichia pastoris and a recombinant P. pastoris containing the Clostridium perfringens alpha toxin gene*. Veterinary Microbiology, [S.L.], v. 156, n. 3-4, p. 448-451, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic>

Shaw, J. E., Sicree, R. A., & Zimmet, P. Z. (2010). *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. Diabetes Research and Clinical Practice, 87(1), 4–14. doi: 10.1016/j.diabres.2009.10.007

Siedler, B. S.; Roloff, B. C.; De Sá, G. L.; Neis, A.; Conceição, F. R.; Hartwig, D. D.; Borsuk, S.; Dellagostin, O. A.; Campos, F. S.; Roehe, P. M.; Hartleben, C. P.; McBride, A. J. A. Secretory expression of bovine herpesvirus type 1/5 glycoprotein E in *Pichia pastoris* for the differential diagnosis of vaccinated or infected cattle. Protein Expression and Purification, v.130, p.21-27, 2017

Sigurðardóttir, Á. K. (2005). *Self-care in diabetes: model of factors affecting self-care*. Journal of Clinical Nursing, 14(3), 301–314. doi:10.1111/j.1365- 2702.2004.01043.x

Silva, Icy D'. *Recombinant Technology and Probiotics*. International Journal of Engineering and Technology, Ontario, Canadá, v. 3, n. 4, p. 288-293, 2011.

Silva, Maísa; Lima, Wanderson Geraldo de; Silva, Marcelo Eustáquio; Pedrosa, Maria Lucia. *Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters*. ArqBrasEndocrinolMetab, Ouro Preto, Mg, v. 1, n. 55, p. 46-53, dez. 2010.

Simon, M.C.; Strassburger, K.; Nowotny, B.; Kolb, H.T.; Nowotny, P.; Burkart, V.; Zivehe, F.; Hwang, J.H.; Stehle, P.; Pacini, G. Intake of *Lactobacillus reuteri* improves incretin and insulin secretion in glucose-tolerant humans: A proof of concept. Diabetes Care, v. 38 (10), p. 1827–1834, 2015.

Singh, Birbal; mal, Gorakh; Marotta, Francesco. *Designer Probiotics: paving the way to living therapeutics*. Trends in Biotechnology, [S.L.], v. 35, n. 8, p. 679- 682, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.04.001>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. *Diagnóstico e tratamento*. Disponível em: <<https://diabetes.org.br/diagnostico-e-tratamento/>>. Acesso: 08 de maio de 2021.

Splichal I, Donovan SM, Splichalova Z, et al. Colonization of Germ-Free Piglets with Commensal *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus mucosae*, and Probiotic *E. coli* Nissle 1917 and Their Interference with *Salmonella* Typhimurium. *Microorganisms*. 2019;7(8):273. Published 2019 Aug 20. doi:10.3390/microorganisms7080273.

Sun, Zhongke; Sun, Xuejiao; Li, Juan; Li, Zhaoyang; Hu, Qingwei; Li, Lili; Hao, Xinqi; Song, Maoping; Li, Chengwei. *Using probiotics for type 2 diabetes mellitus intervention: advances, questions, and potential*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, [S.L.], v. 60, n. 4, p. 670-683, 11 jan. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2018.1547268>.

Tang, W. H., Wang, Z., & Levison, B. S. (2013). *Intestinal Microbial Metabolism of Phosphatidylcholine and Cardiovascular Risk*. *Journal of Vascular Surgery*, 58(2), 549. doi:10.1016/j.jvs.2013.06.007

Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., ... Gordon, J. I. (2008). *A core gut microbiome in obese and lean twins*. *Nature*, 457(7228), 480–484. doi:10.1038/nature07540

Vandenplas, Yvan; Huys, Geert; Daube, Georges. *Probiotics: an update*. *Jornal de Pediatria*, [S.L.], v. 91, n. 1, p. 6-21, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2014.08.005>.

Vasquez, E. C., Pereira, T. M. C., Peotta, V. A., Baldo, M. P., & Campos-Toimil, M. (2019). *Probiotics as Beneficial Dietary Supplements to Prevent and Treat Cardiovascular Diseases: Uncovering Their Impact on Oxidative Stress*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–11. doi:10.1155/2019/3086270

Wang, F., Zhang, P., Jiang, H., & Cheng, S. (2012). *Gut Bacterial Translocation Contributes to Microinflammation in Experimental Uremia*. *Digestive Diseases and Sciences*, 57(11), 2856–2862. doi:10.1007/s10620-012-2242-0

Wang, Yang; Wu, Yanping; Wang, Yuanyuan; Xu, Han; Mei, Xiaoqiang; Yu, Dongyou; Wang, Yibing; Li, Weifen. *Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria*. *Nutrients*, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 521, 19 maio 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu9050521>.

Wang, Yulan; Wang, Baohong; Wu, Junfang; Jiang, Xiangyang; Tang, Huiru; Nielsen, Ole H.. *Modulation of Gut Microbiota in Pathological States*. *Engineering*, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 83-89, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eng.2017.01.013>.

Wang, Z., Roberts, A. B., Buffa, J. A., Levison, B. S., Zhu, W., Org, E., ... Hazen, S. L. (2015). *Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis*. *Cell*, 163(7), 1585–1595. doi:10.1016/j.cell.2015.11.055

Wen, Y., Skidmore, J. C., Porter-Turner, M. M., Rea, C. A., Khokher, M. A., & Singh, B. M. (2002). *Relationship of glycation, antioxidant status and oxidativestress to vascular endothelial damage in diabetes*. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 4(5), 305–308. doi:10.1046/j.1463-1326.2002.00212.

WHO, 2002. FAO/WHO Expert Consultation. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London: Ontario (Canada); 2002

Willms, B.; Werner, J.; Holst, J.J.; Orskov, C.; Creutzfeldt, W.; Nauck, M.A. Gastric emptying, glucose responses and insulin secretion after a liquid test meal: Effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabology*, v. 81, p. 327-332, 1996.

World Health Organization (2016) *Global Reports on Diabetes*. World Health Organization. WHO Press, Geneva

World Health Organization (2019) *Classification of diabetes mellitus*. Geneva..Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Relatório do Trabalho de Campo

Devido à pandemia de COVID-19 e às restrições de acesso ao laboratório, tornou-se inviável a execução do projeto original de dissertação, que envolvia a construção e avaliação de um probiótico recombinante, impossibilitando sua apresentação para a banca de qualificação. Em razão disso, foi proposto um novo projeto envolvendo o mesmo probiótico, porém sem a etapa de recombinação, com foco na investigação do efeito do probiótico em animais com diabetes. Infelizmente, o experimento teve início em 2022, mas não foi concluído a tempo de utilizar seus resultados na realização deste trabalho. Diante dessa situação, decidiu-se adotar um projeto que havia sido iniciado pela aluna Khadija Massaut, mas não foi concluído e incluído em sua dissertação. Esse projeto tinha como objetivo avaliar o efeito do mesmo probiótico sobre a resposta imune de animais imunossuprimidos, utilizando a técnica de ELISA indireto.

O período de aproximadamente um ano no laboratório de Imunologia Aplicada representou uma experiência extremamente enriquecedora para mim, uma vez que, ao longo da minha trajetória acadêmica, nunca havia tido a oportunidade de trabalhar em um laboratório. Durante esse tempo, pude adquirir um amplo conjunto de habilidades e conhecimentos, incluindo a realização de extração de DNA, cultivo de probióticos, expressão, quantificação e purificação de proteínas, SDS-PAGE, ELISA, *Western-blot*, atividades microbiológicas, experimentação animal, entre muitas outras atividades. Essa vivência prática me proporcionou um aprendizado significativo e uma compreensão mais aprofundada das técnicas e metodologias utilizadas na área de imunologia aplicada.

Durante a minha experiência na experimentação animal, adquiri habilidades práticas relevantes no manejo de camundongos, incluindo técnicas como gavagem, coleta de sangue, aplicação de injeção intraperitoneal e realização de eutanásia. Essas competências foram fundamentais para a condução dos estudos e permitiram-me obter amostras e realizar procedimentos necessários para a análise dos dados. Além disso, adquirir esse conhecimento sobre técnicas de manipulação e procedimentos éticos em experimentação

animal foi essencial para garantir o bem-estar dos animais envolvidos nos estudos.

Artigo

Efeito de *Komagataella phaffi* sobre os níveis de anticorpos em camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida e vacinados com antígenos recombinantes de *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens*.

Resumo

Probióticos podem potencializar a resposta imune dos seus hospedeiros, efeito benéfico desejável, principalmente para imunossuprimidos. *Komagataella phaffii* vêm demonstrando propriedades probióticas, inclusive para animais imunossuprimidos, onde os protegeu da leucopenia, neutropenia, peroxidação lipídica e da hepatotoxicidade induzidas pela ciclofosfamida (CF). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação com *Komagataella phaffii* sobre os níveis de anticorpos, avaliados por ELISA indireto, de camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF e vacinados, utilizando como imunógenos modelos as proteínas recombinantes rD de *Clostridium botulinum*, e rCPA-C e rCPB de *Clostridium perfringens*. Para isso, 36 camundongos machos *Swiss* com 28 dias de idade (divididos em duas repetições) foram divididos em três grupos: grupo somente vacinado (V), grupo imunossuprimido com CF (250mg.kg⁻¹ em duas doses) e vacinado (CF + V) e grupo suplementado com *Komagataella phaffii*, imunossuprimido com CF e vacinado (CF + K + V). Todos os animais dos três grupos foram imunizados, via subcutânea, com uma única dose de uma vacina polivalente composta de 25 µg de cada uma das três proteínas recombinantes (rCPA-C, rCPB e rD), no dia 19, e animais do grupo CF + K + V receberam suplementação diária, por gavagem, de 10⁸ UFC de *Komagataella phaffii* durante todo o experimento (47 dias). Animais não suplementados e não imunossuprimidos receberam solução salina pelas mesmas vias e períodos. Os níveis de anticorpos estimulados pelos imunizantes com cada uma das proteínas recombinantes foram avaliadas por ELISA indireto (7, 14, 21 e 28 dias após a vacinação). A suplementação com *Komagataella phaffii* potencializou a resposta imune dos animais imunossuprimidos vacinados com rD, visto que esses animais apresentaram níveis de IgG anti-rD superiores aos de animais vacinados não suplementados, e gerou uma resposta imune mais precoce. Entretanto, não influenciou na resposta imune de animais imunossuprimidos vacinados com rCPA-C e rCPB. Assim, concluiu-se que *Komagataella phaffii* pode potencializar a resposta imune humoral de animais imunossuprimidos vacinados, entretanto a resposta parece ser imunógeno específica.

Palavras chaves: Probióticos, *Pichia pastoris*, imunomodulação, resposta imune, ELISA indireto.

Abstract

Probiotics can enhance the immune response of their hosts, a desirable beneficial effect, especially for immunosuppressed people. *Komagataella phaffii* have demonstrated probiotic properties, including for immunosuppressed animals, where it protected them from leukopenia, neutropenia, lipid peroxidation and hepatotoxicity induced by cyclophosphamide (CF). Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of supplementation with *Komagataella phaffii* on the levels of antibodies, evaluated by indirect ELISA, of Swiss mice immunosuppressed with CF and vaccinated, using as model immunogens the recombinant proteins rD of *Clostridium botulinum*, and rCPA -C and rCPB from *Clostridium perfringens*. For this, 36 male Swiss mice aged 28 days (divided into two replicates) were divided into three groups: vaccinated-only group (V), immunosuppressed group with CF (250mg.kg⁻¹ in two doses) and vaccinated (CF + V). and group supplemented with *Komagataella phaffii*, immunosuppressed with CF and vaccinated (CF + K + V). All animals in the three groups were immunized, subcutaneously, with a single dose of a polyvalent vaccine composed of 25 µg of each of the three recombinant proteins (rCPA-C, rCPB and rD), on day 19, and animals in the CF group + K + V received daily supplementation, by gavage, of 10⁸ CFU of *Komagataella phaffii* throughout the experiment (47 days). Non-supplemented and non-immunosuppressed animals received saline solution by the same routes and periods. The levels of antibodies stimulated by the vaccines with each of the recombinant proteins were evaluated by indirect ELISA (7, 14, 21 and 28 days after vaccination). Supplementation with *Komagataella phaffii* potentiated the immune response of immunosuppressed animals vaccinated with rD, as these animals had higher levels of anti-rD IgG than vaccinated animals not supplemented, and generated an earlier immune response. However, it did not influence the immune response of immunosuppressed animals vaccinated with rCPA-C and rCPB. Thus, it was concluded that *Komagataella phaffii* can potentiate the humoral immune response of vaccinated immunosuppressed animals, however the response seems to be specific immunogen.

Keywords: Probiotic, *Pichia pastoris*, immune response, indirect ELISA immunomodulation.

1. Introdução

A ciclofosfamida (CF) é um medicamento antineoplásico com propriedades tóxicas que pode matar células tumorais, permitindo o tratamento de leucemias agudas e crônicas (ONCOGUIA, 2021; INCA, 2022), mieloma múltipla (Byrne et al., 2013), linfoma (Dörffel et al., 2013), doenças autoimunes (DeZern et al., 2013; Aoki et al., 2013) e preparo do paciente para transplante de medula óssea (Luznik & Fuchs, 2010; Brodsky, 2010). No entanto, a CF, um agente antineoplásico do tipo alquilante de alta potência em terapias imunossupressoras, inibe a divisão celular e a síntese do DNA (UPTODATE, 2017; Teles et al., 2016; Ministério da Saúde, 2014). Além disso, apresenta um alto potencial tóxico (McCune et al., 2017) e é imunossupressora.

Os alimentos funcionais, como os probióticos, oferecem uma opção para melhorar a qualidade de vida dos pacientes imunossuprimidos. Eles têm efeitos benéficos, como fortalecer os mecanismos de defesa imunológica, melhorar as condições físicas e mentais, prevenir ou tratar doenças e promover uma melhoria geral da saúde (FAO, 2006; Boer, 2021).

Estudos têm demonstrado que os probióticos, organismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, trazem benefícios para a saúde, como melhoria do sistema imunológico e digestivo (FAO, 2006; Splichal et al., 2019). Esses benefícios também são observados em animais imunocomprometidos pelo uso de ciclofosfamida (CF) (Salva et al., 2014). Salva et al. (2014) observaram uma influência positiva dos probióticos na modulação do sistema imunológico de camundongos Swiss imunocomprometidos pela CF, onde os grupos tratados com *Lactobacillus* apresentaram valores mais elevados de leucócitos e neutrófilos. Wei et al. (2007) também constataram que a suplementação de *Lactobacillus rhamnosus* ZY114 e colostro bovino melhorou as funções do sistema imunológico em camundongos imunocomprometidos pela CF. Além disso, estudos mostraram que *Lactobacillus casei* pode modular a resposta imunológica, aumentando a proporção de Th1 para Treg e induzindo a mudança de classe de anticorpos em células B ativadas, o que resulta na produção de IgG, IgA ou IgE (Wang et al., 2013; Fu et al., 2020). No entanto, Bujalance et al. (2007) não encontraram efeito de modulação da

imunossupressão induzida pela CF com o uso de *Lactobacillus plantarum* em camundongos BALB/c, indicando a necessidade de mais estudos sobre o tema.

As clostridioses são infecções causadas por diferentes espécies de *Clostridium spp.*, afetando humanos e animais e resultando em uma variedade de sintomas. Algumas espécies comumente associadas incluem *Clostridium botulinum* (causador do botulismo), *Clostridium difficile* (causa diarreia associada a antibióticos e colite pseudomembranosa), *Clostridium tetani* (causa tétano) e *Clostridium perfringens* (associado a infecções de tecidos moles, gangrena gasosa e gastroenterite). Pacientes imunossuprimidos estão particularmente propensos a complicações graves de clostridioses (Mandell et al., 2020; Sartelli et al., 2014; WHO, 2018).

Antígenos recombinantes de espécies patogênicas do gênero *Clostridium* geram altos níveis de anticorpos, mostrando potencial como imunizantes (Ferreira et al., 2019; Moreira et al., 2020; Rodrigues et al., 2021). Estudos demonstraram que toxina α recombinante de *Clostridium perfringens* (rCPA) induziu altos títulos de anticorpos em coelhos e ovinos (Ferreira et al., 2019), e a neurotoxina botulínica D de *Clostridium botulinum* (rBONT-D) também gerou altos níveis de anticorpos em coelhos, ovinos e bovinos (Moreira et al., 2019). Por isso, esses imunizantes foram utilizados neste estudo.

A *Komagataella phaffi*, anteriormente conhecida como *Pichia pastoris*, é uma levedura metilotrófica utilizada com sucesso na produção de proteínas recombinantes para vacinas em larga escala (Nizoliet al., 2009; Dummer et al., 2009 A; Dummer et al., 2009 B; Siedler et al., 2017). Ela se destaca por seu crescimento a partir de resíduos de baixo custo e meios de cultura simples, permitindo sua produção industrial em larga escala (Gil de los Santos, 2012; Gil de los Santos, 2018). Além disso, estudos demonstraram que a *Komagataella phaffi* possui características probióticas, sendo segura, capaz de resistir ao trato gastrointestinal e apresentando efeitos benéficos, como melhora da conversão alimentar e aumento do ganho de peso em frangos de corte (Gil de Los Santos et al., 2012). Também mostrou efeito antimicrobiano contra *Salmonella Typhimurium* em camundongos (França et al., 2015). Estudos adicionais investigaram os efeitos probióticos da *Komagataella phaffi* em animais imunossuprimidos com CF, mostrando sua segurança e capacidade de proteção

contra danos induzidos pelo medicamento, melhorando parâmetros como conversão alimentar e ganho de peso (Cunha, 2016; Massaut, 2018).

Entretanto, efeitos da *Komagataella phaffii* sob a resposta de anticorpos gerada por antígenos vacinais em animais imunossuprimidos não foram avaliados. Desta forma, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito da suplementação com o probiótico *Komagataella phaffii* sobre os níveis de anticorpos, avaliados por ELISA indireto, em camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF e vacinados, utilizando como imunógenos modelos a neurotoxina D de *Clostridium botulinum* (Bont-D) recombinante (rD), o domínio C-terminal da toxina alfa (rCPA-C) e a proteína beta integral (rCPB) de *Clostridium perfringens*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Probiótico e condições de cultivo

A levedura *Komagataella phaffii* utilizada neste estudo foi proveniente do banco de microrganismos do Núcleo de Biotecnologia (CDTec-UFPel). A levedura congelada, suspensa em glicerol à 80%, foi semeada em duplicata em recipiente erlenmeyer contendo 10ml de meio de cultura Yest Malt Broth (YM), e incubada por 24h à 28°C. Em seguida, esse cultivo foi homogeneizado em outro recipiente contendo 90mL de meio YM (etapa realizada em duplicata) e incubado novamente nas mesmas condições. O cultivo foi centrifugado inicialmente a 700rpm sob refrigeração de 4°C por 10 minutos para separar o *pellet* do meio e, após, o *pellet* foi lavado duas vezes com 300mL de solução salina (NaCl 0,9%) por meio da centrifugação nas mesmas condições. A concentração de *Komagataella phaffii* foi determinada através da diluição em série decimal do cultivo em solução salina estéril e da contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFCs.mL⁻¹) em placas contendo meio YM, após a incubação das mesmas à 37°C por 24h.

2.2. Suplementação dos animais com o probiótico *Komagataella phaffi*

Os animais dos grupos suplementados com *Komagataella phaffi* receberam uma dose diária de 10^8 UFC da levedura diluída em 100 μ L de solução salina por gavagem por 47 dias, do dia 1 ao dia 47, ou seja, durante todo o período do experimento. Os animais do grupo somente vacinado (V) e do grupo imunossuprimido com CF e vacinado (CF + V), ou seja, que não foram suplementados com *Komagataella phaffi*, receberam o mesmo volume de solução salina pela mesma via e período, no intuito de simular os mesmos níveis de estresse.

2.3. Imunossupressão induzida por CF

A imunossupressão induzida por CF foi realizada de acordo com o modelo descrito por Zuluaga et al. (2006). A infusão de CF foi realizada via intraperitoneal e o tratamento foi realizado em dois momentos. A primeira dose de CF ocorreu no dia 15 do estudo, quando foi aplicada em cada animal dos grupos imunossuprimidos com CF uma injeção de 150mg.kg⁻¹ de peso de CF diluída em solução salina. No dia 18 do estudo, ou seja, três dias depois da 1ª dose, a segunda dose foi aplicada com 100mg.kg⁻¹ de peso, totalizando uma dosagem de 250mg.kg⁻¹ de CF por animal. Os animais do grupo somente vacinado (V), ou seja, que não foram imunossuprimidos por CF, receberam o mesmo volume de solução salina pela mesma via e nos mesmos dias, no intuito de simular os mesmos níveis de estresse.

2.4. Antígenos Vacinais

Foram utilizados como modelos de antígenos vacinais as proteínas recombinantes domínio C-terminal da toxina alfa (rCPA-C) e proteína beta integral (rCPB) de *Clostridium perfringens* e a neurotoxina botulínica do sorotipo D (rD) de *Clostridium botulinum*. As mesmas proteínas foram utilizadas para sensibilizar as placas no ELISA indireto, para a avaliação da resposta imune humoral.

Para a expressão das proteínas heterólogas foram utilizadas células previamente preparadas de *E. coli* BL21 (DE3) Star™ (Invitrogen),

transformadas por choque térmico com os vetores pET28a/D, pET28a/cpa-c e pAE/cpb (Milach et al., 2012; Salvarani et al., 2013; Moreira et al., 2016; Moreira et al., 2020). Após a transformação, as bactérias foram cultivadas em um pré-inóculo com 10mL de caldo LB (10g triptona, 5g de extrato de levedura, 10g NaCl: volume final 1L, pH 7,0) contendo 100µg/mL de canamicina e ampicilina, mantidos em agitador orbital (37°C, 180rpm) *overnight*. No dia seguinte, 50mL de caldo LB com a mesma concentração de canamicina e ampicilina foram inoculados com 5mL (10% do volume final do cultivo) de pré-inóculo. No terço final da fase logarítmica de crescimento (DO_{600} 0,6 a 0,8), a expressão das proteínas heterólogas ocorreu pela adição de 0,5mM de isopropil β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) por 3h.

Para a avaliação da expressão, uma alíquota de 1mL de cada cultivo após a indução por 3h com IPTG foi coletada, centrifugada (13.000rpm, 1min) e preparada para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). Para o preparo das amostras, os *pellets* foram suspensos em 80µL de água milliQ e 20µL de tampão de amostra 5x (250mM Tris pH 6,8; 1% (w/v) SDS; 50% (v/v) glicerol; 5% (v/v) β -mercaptoetanol; 0,15g azul de bromofenol) e as amostras aquecidas a 100°C por 10 minutos. As amostras foram aplicadas cada uma em dois geis de poliacrilamida 12% e após a eletroforese, um gel com cada proteína foi corado com *Coomassie blue* e o outro submetido à *Western blot* usando como anticorpo secundário anticorpo anti-histidina conjugado com peroxidase.

Após a confirmação da expressão por SDS-PAGE, o restante dos cultivos foram centrifugados (10.000 rpm, por 10min à 4°C), os *pellets* celulares foram suspensos em tampão Akta Wash (200mM NaH₂PO₄, 0,5M NaCl e 5mM imidazole, pH 8,0) acrescido de lisozima (100µg/mL), as suspensões foram incubados por 1h a 37°C, sonicadas (6 ciclos de 30 segundos a 60Hz) e centrifugadas novamente (10.000rpm, por 15min à 4°C). Os sobrenadantes, contendo a fração solúvel das proteínas, foram armazenados a -20°C. Os *pellets* dos lisados celulares foram lavados com PBS acrescido de 0,05% de Triton x100 por três vezes e, por fim, suspensos em tampão Akta Wash com 8M de uréia e mantido sob agitação por 16h à 4°C. Após foi realizado uma nova corrida em gel

de poliacrilamida 12% a partir das proteínas contidas nos sobrenadantes e as suspendidas em uréia para avaliação da solubilidade.

A purificação das proteínas foi realizada por cromatografia de afinidade. Após, foi realizado diálise para remoção da uréia contida nas proteínas na forma de corpo de inclusão e as proteínas foram quantificadas por ensaio de BCA (THERMO FISCHER SCIENTIFIC, 2023) e submetidas a à *Western blot* usando como anticorpo secundário anticorpo anti-histidina conjugado com peroxidase.

2.5. Vacinação

Todos os animais dos três grupos foram imunizados, via subcutânea com uma única dose de 200µl de uma vacina polivalente composta de 25µg de cada uma das três proteínas recombinantes (rCPA-C, rCPB e rD) diluídas em solução salina estéril 0,9% acrescidas de 15% adjuvante hidróxido de alumínio, no dia 19 (19 dias após o início da suplementação diária dos animais com 10^8 UFC.mL⁻¹ do probiótico *Komagataella phaffi* e um dia após a 2ª dose de imunossupressão com CF).

2.6. Animais e delineamento do estudo

Foram utilizados 36 camundongos *Swiss* (n=36) machos com 28 dias de idade, divididos em duas repetições (contendo n=12 na primeira n=24 na segunda), todos provenientes do Biotério Central da UFPel. Todos os animais receberam dieta padrão para roedores e água esterilizada *ad libitum*. Os animais foram mantidos em gabinetes 27x19x20cm, comedouro tipo túnel e bebedouro de polipropileno com capacidade para 500mL contendo um máximo de cinco camundongos por gabinete com temperatura de 22-24°C, umidade relativa de 65-75% e ciclos de luz e escuridão de 12h. Os ensaios biológicos foram desenvolvidos no Biotério Central da UFPel.

Em cada repetição, os animais foram randomizados e divididos em três grupos: grupo somente vacinado (V), grupo imunossuprimido com CF e vacinado (CF + V) e grupo suplementado com *Komagataella phaffi*, imunossuprimido com CF e vacinado (CF + K + V).

A suplementação diária de 10^8 UFC.mL⁻¹ do probiótico por gavagem dos animais dos grupos iniciou 15 dias antes da primeira injeção de CF e continuou até o final do experimento (dia 47).

No 15º e 18º dia foram realizadas as imunossupressões induzidas por CF nos grupos CF + V e CF + K + V, onde os animais receberam duas injeções de CF (dose total de 250mg/kg⁻¹). Foram coletadas amostras de sangue de todos os animais antes da vacinação e 7, 14 21 e 28 dias após a vacinação, através da veia facial, conforme os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo COBEA.

E no dia 45, todos animais foram submetidos à eutanásia após jejum de 6 horas e anestesia com isoflurano. A eutanásia foi realizada pelo procedimento de exsanguinação por punção cardíaca, bem como os demais procedimentos com animais seguiram os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (DOU, 2016). O projeto foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPel sob o número de parecer 6974.

2.7. Avaliação da resposta imune humoral por ELISA indireto

Os níveis de anticorpos estimulados pelos imunizantes, antes da vacinação e 7, 14 21 e 28 dias após a vacinação com cada uma das proteínas recombinantes foram avaliados por ELISA indireto. Inicialmente, foi realizada uma padronização de ELISA indireto, avaliando-se diferentes concentrações dos antígenos e diluições dos soros e conjugados. Após a determinação das melhores condições, microplacas (Nunc-Immuno Micro Well MaxiSorp) foram sensibilizadas com 200, 400 e 800ng/poços dos antígenos recombinantes rCPA-C, rCPB e rD, respectivamente, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 (100µL/poço) e incubadas por 18h, à 4°C. Posteriormente, as placas foram incubadas (por 1h à 37°C) com 100µL/poço de solução de bloqueio (PBS-T + 5% w/v de leite em pó desnatado). Após a lavagem com PBS-T, as placas foram incubadas (100µL/poço) com soros dos animais diluídos em PBS-T (1:200; 1:400; e 1:800, respectivamente), à 37°C por 1h. Por fim, 100µL/poço de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich) nas diluições 1:4000, 1:8000 e 1:4000, respectivamente, foram adicionados e as placas incubadas por 1h à 37°C. A cada etapa as placas foram

lavadas 3 vezes com PBS-T. Finalmente, uma solução de revelação contendo tampão citrato fosfato (0,1M, pH 4,0), o-fenilenodiamina (0,4mg/mL) e 0,1% (v/v) de H₂O₂, foi adicionada e as placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 minutos no escuro antes da adição da solução STOP de ácido sulfúrico 2N (50µL/poço). A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Biochrom EZ Read 400) calibrado com absorvância de 492nm. Foram utilizados como controles positivo e negativo a proteína rETX, uma proteína épsilon recombinante de *C.perfringens*, com os soros dos animais que foram vacinados com a rETX e dos animais não vacinados, respectivamente.

2.8. Análises estatísticas

Os dados obtidos através da pesquisa foram digitados no Microsoft Office Excel® e após foi utilizado o programa Graphpad Prism 7.0®, para análises estatísticas, através dos testes: Two-way Anova e Tukey para correlação de variância entre os grupos. Os dados foram apresentados como razão, médias e desvio-padrão.

3. Resultados

3.1. Expressão dos Antígenos Vacinais

Foram obtidas 596µg/mL, 447µg/mL e 432µg/mL das proteínas recombinantes rCPA-C, rCPB-C e rD, respectivamente, após a expressão em *E. coli* BL21 (DE3) Star, purificação por cromatografia de afinidade, diálise para remoção da uréia contida nas proteínas na forma de corpo de inclusão e quantificação (Figura 1).

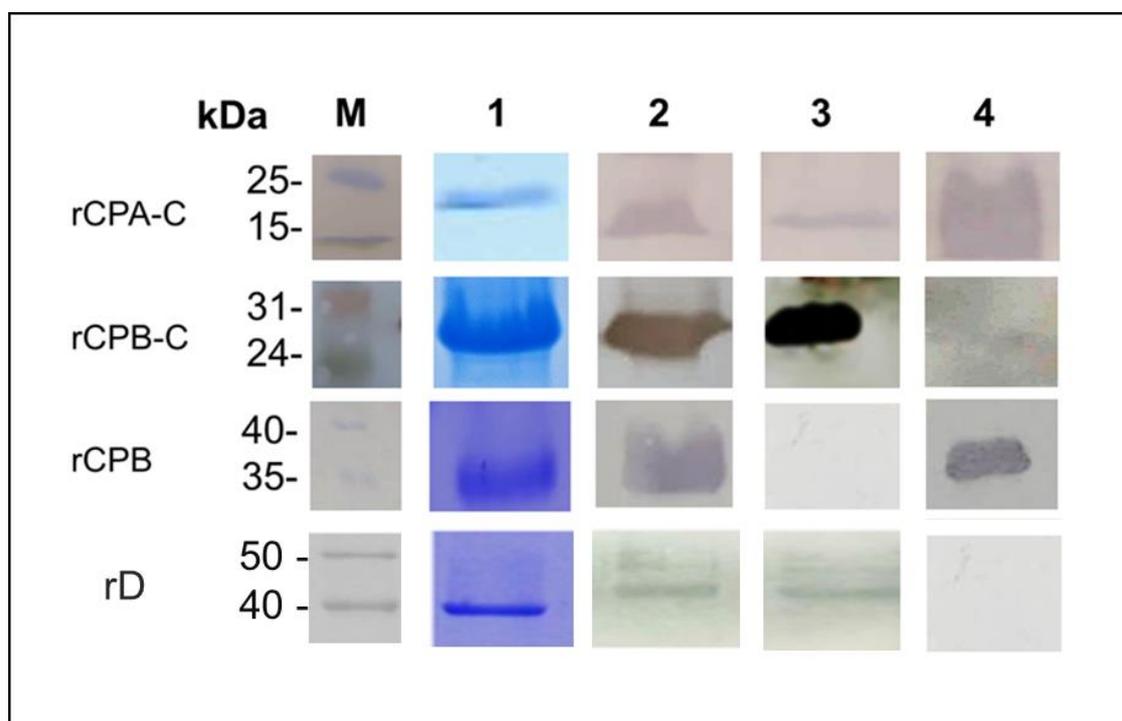


Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio (SDS-PAGE). e *Western blot* de rCPA-C, rCPB-C, rCPB e rD usando como anticorpo secundário anticorpo anti-histidina conjugado com peroxidase. (M) – Marcador Thermo Scientific Pré-corado; (1) SDS-PAGE do extrato celular total após expressão em *E. coli* BL21 (DE3); (2) *Western blot* do extrato celular total após expressão em *E. coli* BL21 (DE3); (3) *Western blot* do sobrenadante de lise (proteína solúvel); (4) *Western blot* dos corpos de inclusão (proteínas insolúveis).

3.2. Avaliação da resposta imune humoral por ELISA indireto

As melhores condições para a avaliação da resposta imune humoral dos animais por ELISA indireto, ou seja, para a avaliação dos níveis de anticorpos

estimulados pelos antígenos recombinantes rCPA-C, rCPB e rD, estabelecidas na padronização de ELISA foram: sensibilização das microplacas com 200, 400 e 800ng/poços dos antígenos recombinantes rCPA-C, rCPB e rD, respectivamente, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6; soros dos animais diluídos 1:200; 1:400; e 1:800, respectivamente, em PBS-T; e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:4000, 1:8000 e 1:4000, respectivamente, em PBS-T.

3.2.1. Avaliação da resposta imune humoral induzida por rD por ELISA indireto

A suplementação com *Komagataella phaffi* potencializou a resposta imune de anticorpos IgG anti-rD de animais imunossuprimidos vacinados, pois gerou níveis de anticorpos significativamente maiores no dia 14 após a vacinação em comparação com os níveis dos animais somente vacinados, na primeira repetição (Figura 2A), e nos dias 21 e 28 após a vacinação em comparação com os níveis dos animais imunossuprimidos vacinados, na segunda repetição, sendo que no dia 21, os níveis de anticorpos também foram significativamente maiores do que os dos animais somente vacinados (Figura 2B).

Além disso, na primeira repetição, o aumento significativo dos níveis de anticorpos gerado pela suplementação com *Komagataella phaffi* dos animais imunossuprimidos foi mais precoce, nos dias 14 e 21, em comparação com antes da vacinação, enquanto que nos animais somente vacinados, ocorreu no dia 28, em comparação com antes da vacinação e com os dias 7 e 14. Já animais imunossuprimidos vacinados apresentaram aumento significativo somente no dia 14, em comparação com o dia 7 (Figura 2A). E na segunda repetição, animais do grupo suplementado com *Komagataella phaffi*, imunossuprimido com CF e vacinado apresentaram aumento significativo dos níveis de anticorpos IgG anti-rD no dia 21, em comparação com antes da vacinação e com o dia 7; e no dia 28, em comparação com antes da vacinação. Já os animais somente vacinados apresentaram aumento significativo dos níveis de anticorpos no dia 21, em comparação com antes da vacinação e com o dia 7; e no dia 28, em comparação

com antes da vacinação e com todos os dias avaliados (dias 7, 14 e 21) (Figura 2B).

Foram observados também, no dia 14 após a vacinação na primeira repetição, níveis de anticorpos significativamente maiores nos animais imunossuprimidos vacinados em comparação com os animais somente vacinados (Figura 2A). Já na segunda repetição, foram observados, no dia 28 após a vacinação, níveis de anticorpos significativamente maiores nos animais do grupo somente vacinado em comparação com os animais do grupo imunossuprimido vacinado (Figura 2B).

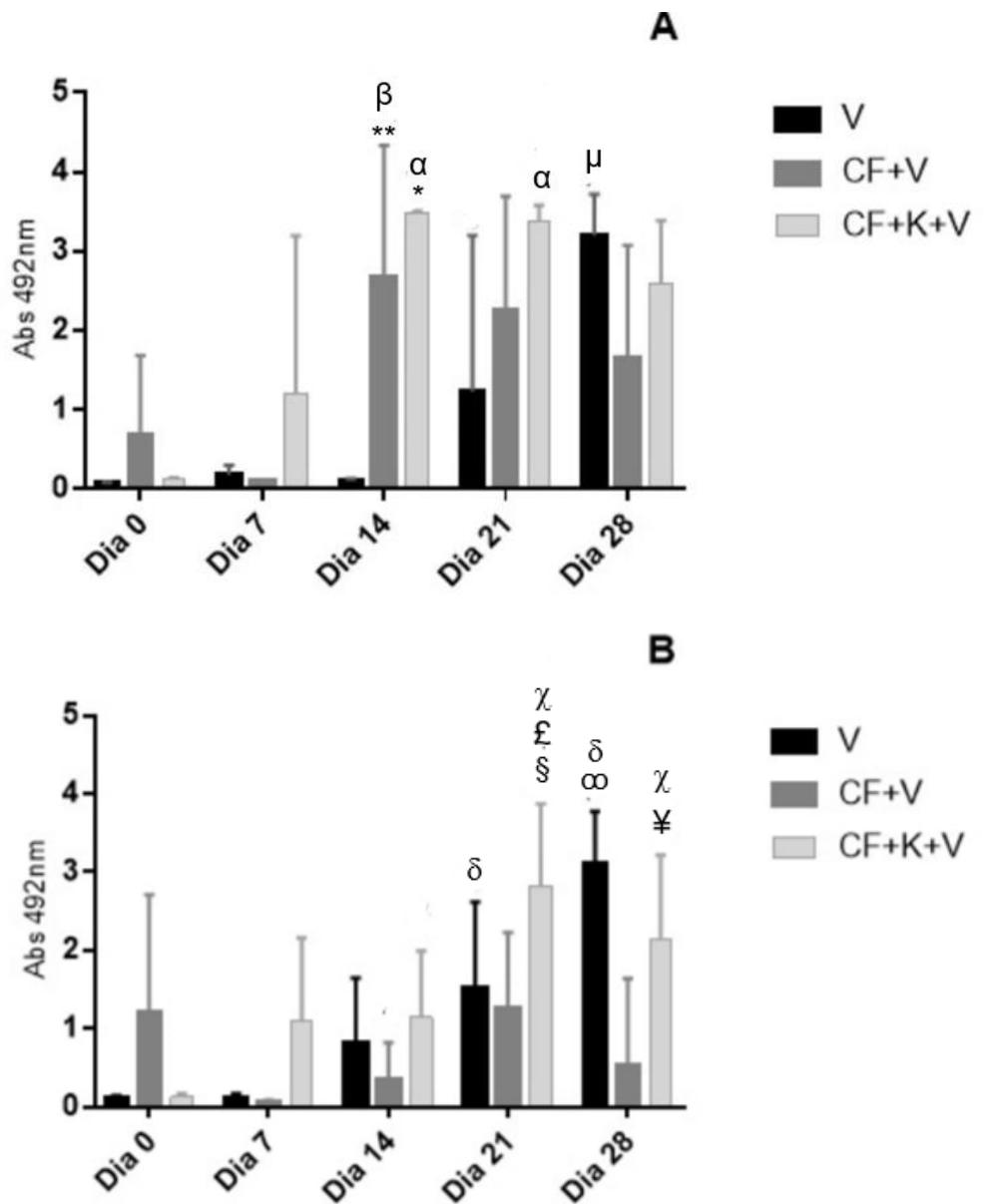


Figura 2. Efeito da suplementação com o probiótico *Komagataella phaffii* sobre os níveis de anticorpos anti-rD, avaliados por ELISA indireto, em camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF e vacinados com a proteína

recombinante rD de *Clostridium botulinum*. V: grupo somente vacinado; CF + V: grupo imunossuprimido com CF e vacinado e CF + K + V: grupo suplementado com *Komagataella phaffi*, imunossuprimido com CF e vacinado. A. Primeira repetição; *: grupo CF + K + V versus grupo V no dia 14 após a vacinação ($p=0,0022$); **: grupo CF + V versus grupo V no dia 14 após a vacinação ($p=0,0176$); α : Grupo CF + K + V, coletas dos dias 14 e 21 versus coleta do dia 0 ($p=0,0037$ e $p=0,0052$, respectivamente); β : Grupo CF + V, coleta do dia 14 versus coleta do dia 7 ($p=0,014$); μ : Grupo V, coleta do dia 28 versus coletas dos dias 14 ($p=0,091$) 7 ($p=0,0119$) e 0 ($p=0,0084$); B. Segunda repetição. \S : grupo CF + K + V versus grupo V no dia 21 após a vacinação ($p=0,0329$); \pounds grupo CF + K + V versus grupo CF + V no dia 21 após a vacinação ($p=0,0086$); \yen : grupo CF + K + V versus grupo CF + V no dia 28 após a vacinação ($p=0,0062$); ∞ : grupo V versus grupo CF + V no dia 28 após a vacinação ($p<0,0001$); χ : Grupo CF + K + V, coletas do dia 21 versus coletas dos dias 7 e 0 ($p=0,0438$ e $p=0,0002$, respectivamente), e coleta do dia 28 versus coleta do dia 0 ($p=0,0103$); δ : Grupo V, coleta do dia 28 versus coletas dos dias 21 ($p=0,0067$), 14 ($p<0,0001$) 7 ($p<0,0001$) e 0 ($p<0,0001$), e coleta do dia 21 versus coleta do dia 7 ($p=0,0238$) e 0 ($p=0,02$).

3.2.2. Avaliação da resposta imune humoral induzida por rCPA-C por ELISA indireto

Na primeira repetição, os níveis de anticorpos dos animais do grupo suplementado com *Komagataella phaffi*, imunossuprimido com CF e vacinado apresentaram aumento significativo dos níveis de anticorpos IgG anti-rCPA no dia 28, em comparação com antes da vacinação e com o dia 7. Entretanto, a suplementação com *Komagataella phaffi* não influenciou na resposta imune dos níveis de anticorpos IgG anti-rCPA de animais imunossuprimidos vacinados, pois o mesmo aumento ocorreu com os animais dos grupos somente vacinados e imunossuprimidos vacinados, sendo que no grupo dos animais imunossuprimidos vacinados, esse aumento significativo da resposta imune já ocorreu também no dia 21, e não houve diferença significativa nos níveis de anticorpos entre os grupos em nenhum dos dias avaliados após a vacinação, em ambas as repetições (Figura 3A). E na segunda repetição, apenas os animais do grupo somente vacinado apresentaram aumento significativo dos níveis de anticorpos no dia 21 (mas somente neste dia), em comparação com antes da vacinação e com os dias 7 e 14 e os animais do grupo imunossuprimido vacinado apresentaram aumento significativo da resposta imune somente no dia 28, em comparação com antes da vacinação e com o dia 7 (Figura 3B).

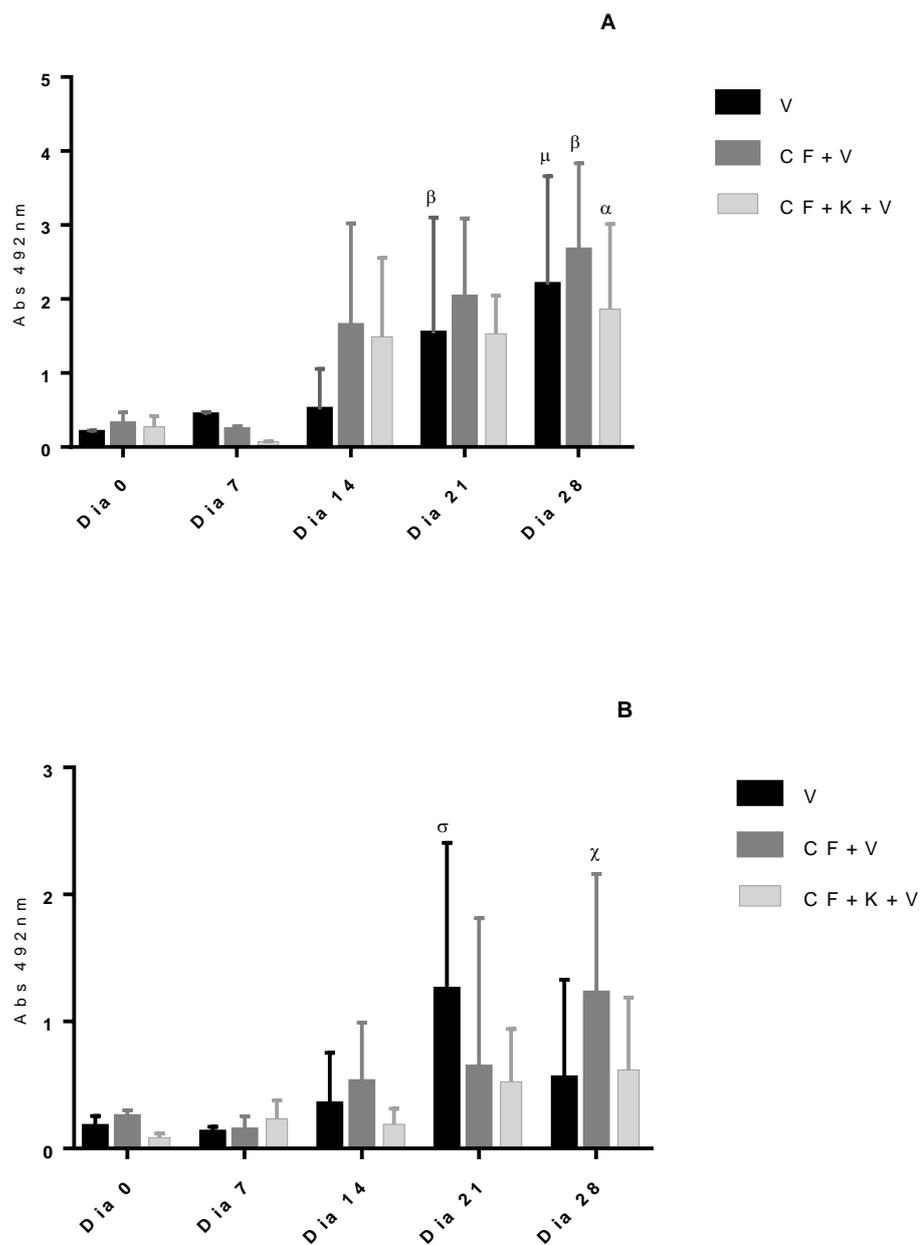


Figura 3. Efeito da suplementação com o probiótico *Komagataella phaffi* sobre os níveis de anticorpos anti-CPA-C, avaliados por ELISA indireto, em camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF e vacinados com a proteína recombinante rCPA-C de *Clostridium perfringens*. V: grupo somente vacinado; CF + V: grupo imunossuprimido com CF e vacinado e CF + K + V: grupo suplementado com *Komagataella phaffi*, imunossuprimido com CF e vacinado. A. Primeira repetição; α : Grupo CF + K + V, coleta do dia28 versus coleta do dia7 ($p=0,0366$); β : Grupo CF + V, coletas dos dias 28 e 21 versus coletas dos dias 7 ($p=0,0002$ e $p=0,0103$, respectivamente) e 0 ($p=0,0004$ e $p=0,0158$, respectivamente); μ : Grupo V, coleta do dia 28 versus coletas dos dias 7 ($p=0,0413$) e 0 ($p=0,0142$); B. Segunda repetição. χ : Grupo CF + V, coleta do dia 28 versus coletas dos dias 7 e 0 ($p=0,0112$ e $p=0,003$, respectivamente); δ : Grupo V, coleta do dia 21 versus coletas dos dias 14 ($p=0,003$), 7 ($p=0,0017$) e 0 ($p=0,0213$).

3.2.3. Avaliação da resposta imune humoral induzida por rCPB por ELISA indireto

A suplementação com *Komagataella phaffi* não influenciou na resposta imune de anticorpos IgG anti-rCPB de animais imunossuprimidos vacinados, pois na primeira repetição, não houve diferença significativa nos níveis de anticorpos entre os grupos em nenhum dos dias avaliados após a vacinação (Figura 4A), e na 2ª repetição, a vacinação dos animais gerou, no dia 28 após a vacinação, níveis de anticorpos IgG anti-rCPB significativamente maiores somente nos animais imunossuprimidos vacinados, em comparação com os animais somente vacinados (Figura 4B).

Além disso, a suplementação com *Komagataella phaffi* não aumentou os níveis de anticorpos IgG anti-rCPB gerados de animais imunossuprimidos vacinados no decorrer das coletas, em ambas as repetições, pois não foram observadas diferenças significativas nos níveis de anticorpos dos animais do grupo suplementado com *Komagataella phaffi*, imunossuprimido com CF e vacinado em nenhum dos dias avaliados após a vacinação, assim como do grupo somente vacinado na segunda repetição. Entretanto, animais imunossuprimidos vacinados apresentaram aumentos significativos dos níveis de anticorpos no dia 28, em comparação com antes da vacinação e com o dia 7, em ambas as repetições, e também no dia 21, na segunda repetição (Figura 4A e B). E animais vacinados apresentaram aumento significativo da resposta imune somente no dia 28, em comparação com antes da vacinação e com os dias 7 e 14, na primeira repetição (Figura 4A).

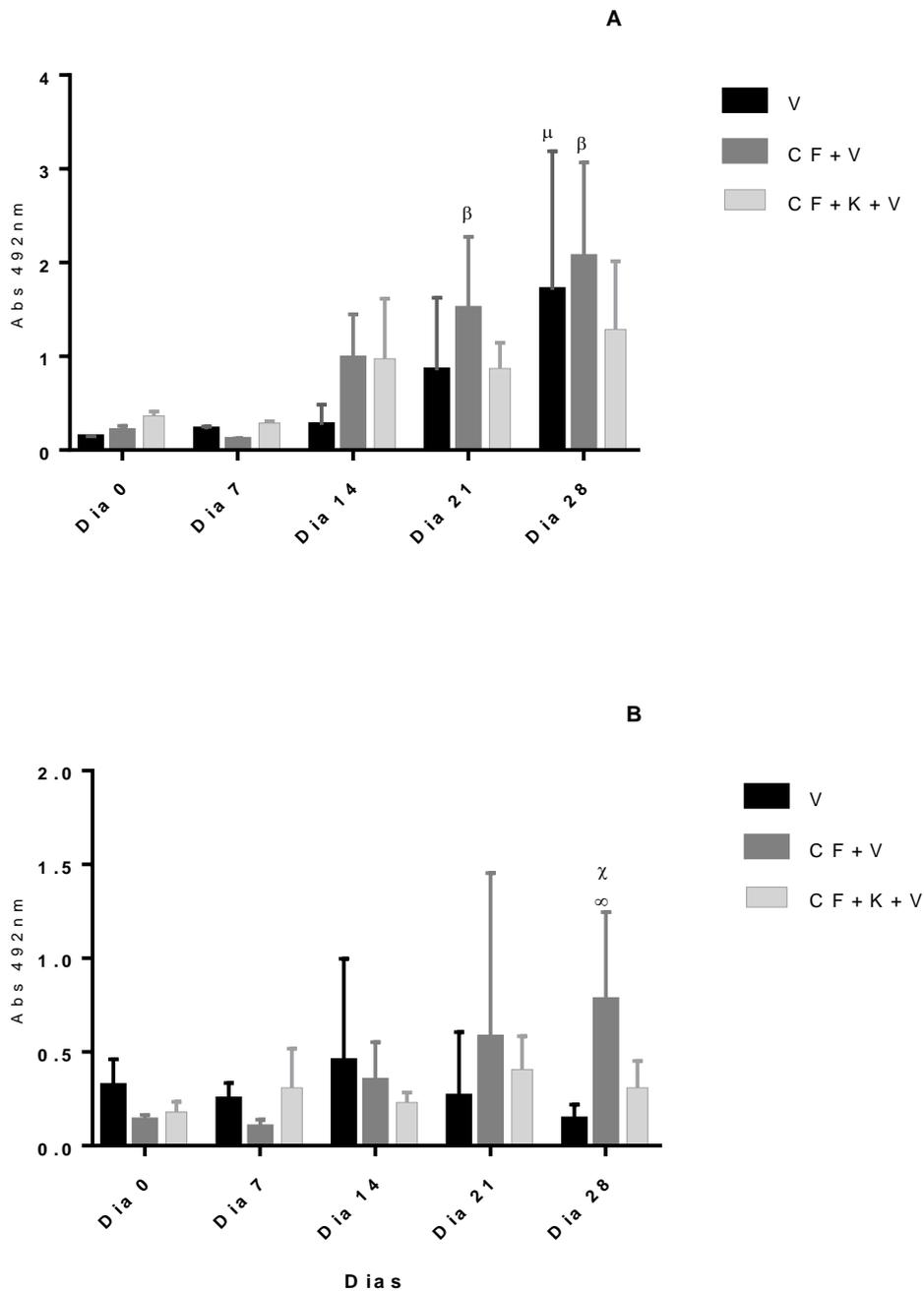


Figura 4. Efeito da suplementação com o probiótico *Komagataella phaffi* sobre os níveis de anticorpos anti-rCPB, avaliados por ELISA indireto, em camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF e vacinados com a proteína recombinante rCPB de *Clostridium perfringens*. V: grupo somente vacinado; CF + V: grupo imunossuprimido com CF e vacinado e CF + K + V: grupo suplementado com *Komagataella phaffi*, imunossuprimido com CF e vacinado. A. Primeira repetição β : Grupo CF + V, coleta do dia 28 versus coletas dos dias 7 ($p=0,004$) e 0 ($p=0,007$), e coleta do dia 21 versus coletas dos dias 7 ($p=0,0178$) e 0 ($p=0,0316$); μ : Grupo V, coleta do dia 28 versus coletas dos dias 14 ($p=0,0448$), 7 ($p=0,035$) e 0 ($p=0,0223$); B. Segunda repetição. ∞ : grupo CF + V versus grupo V no dia 28 após a vacinação ($p=0,0034$); χ : Grupo CF + V, coleta do dia 28 versus coletas dos dias 7 ($p=0,0048$) e 0 ($p=0,0089$).

4. Discussão

Os resultados indicam que a administração contínua de *Komagataella phaffii* pode modular a resposta imune em animais imunossuprimidos. Embora o mecanismo específico de ação da *Komagataella phaffii* não tenha sido elucidado, estudos sugerem que certos probióticos podem exercer efeito imunomodulador no primeiro contato com o antígeno da vacina, estimulando células de memória que respondem de forma mais eficiente a encontros posteriores com o antígeno (Ross et al., 2012). Neste estudo, avaliamos o efeito do probiótico em apenas uma dose vacinal, indicando que *Komagataella phaffii* pode atuar de forma eficaz na resposta imune, mesmo sem o estímulo de células de memória de múltiplas doses vacinais. Com base em nossos resultados, a suplementação com *Komagataella phaffii* no momento da primeira dose da vacina é importante tanto para modular a resposta imune contra o antígeno em animais saudáveis quanto em animais com imunossupressão induzida por CF.

Constantemente, são desenvolvidos antígenos vacinais visando melhorar a efetividade da resposta imune nas espécies-alvo. No entanto, além da atividade vacinal em si, o uso de dietas nutritivas e compostos bioativos desempenha um papel crucial, fornecendo maior fonte energética, proteínas e atividade imunomoduladora, que contribuem para o bem-estar e proteção contra diversas infecções (Bujalance et al., 2007; Gil de los Santos, 2012; OPAS, 2021).

Os resultados deste estudo confirmam evidências na literatura de que certos probióticos podem aumentar ou modular a resposta imune (Gil de los Santos e Gil-Turnes, 2005; Bujalance et al., 2007). Estudos mostraram que a suplementação da dieta com probióticos, mesmo em diferentes espécies, pode aumentar as respostas imunes contra vários antígenos. *Komagataella phaffii*, embora pouco explorada, pode ser uma fonte alternativa promissora de probióticos com efeitos imunomoduladores (Cunha, 2016). Gil de los Santos et al. (2012) demonstraram que *Komagataella phaffii* KM71H aumentou a soroconversão de anticorpos contra a toxina CPA de *C.perfringens* em animais suplementados. Gaboardi et al. (2019) observaram um aumento de até 76% na resposta antigênica em soros de aves imunizadas e suplementadas com *Komagataella phaffii* em comparação com o controle, enquanto Kasmani et al.

(2012) relataram um aumento de até 82% no título de anticorpos quando *Brevibacillus laterosporus* foi incluído na dieta de codornas. No entanto, o potencial imunomodulador de *Komagataella phaffii* em animais imunossuprimidos ainda não havia sido avaliado.

Os resultados obtidos neste estudo complementam as descobertas de Cunha (2016) e Massaut (2018), que demonstraram a segurança da utilização de *Komagataella phaffii* em animais imunossuprimidos, bem como sua influência positiva nas contagens de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos, além da redução da peroxidação lipídica. Em geral, *Komagataella phaffii* demonstrou efeitos protetores contra a hepatotoxicidade da CF, promovendo aumento de peso dos animais e melhorando a eficiência alimentar. Além disso, a levedura proporcionou proteção contra a leucopenia, neutropenia e redução da peroxidação lipídica nos rins e cérebro dos animais, bem como preveniu lesões renais (Cunha, 2016; Massaut, 2018).

Já foram observadas divergências quanto à influência dos probióticos na modulação da resposta imune em camundongos imunocomprometidos pela aplicação de CF. Enquanto Bujalance et al. (2007) relataram que *Lactobacillus plantarum* não teve efeito na modulação da imunossupressão induzida pela CF, evidenciando a necessidade de investigações adicionais sobre o assunto, Salva et al. (2014) demonstraram que os grupos tratados com *Lactobacillus rhamnosus* ZDY114 apresentaram valores mais elevados de leucócitos e neutrófilos, destacando os benefícios desse probiótico na resposta celular.

O emprego de probióticos na suplementação de animais não parece apresentar influência sob a resposta imune gerada por todo produto antigênico e alguns autores mostraram que probióticos podem ter efeitos imunomoduladores dependendo das propriedades do imunógeno e do adjuvante empregado.

No presente estudo, a suplementação da levedura *Komagataella phaffii* não demonstrou atividade imunomoduladora em animais imunossuprimidos e vacinados com rCPA-C, o principal fator relacionado a doenças entéricas em aves (Dahiya et al., 2006; Thompson et al., 2006). Embora os níveis de anticorpos tenham aumentado significativamente no grupo suplementado no dia

28, em comparação com antes da vacinação e com o dia 7, a suplementação não influenciou na resposta imune dos animais imunossuprimidos imunizados. Além disso, não houve diferença significativa nos níveis de anticorpos entre os grupos em nenhum dos dias avaliados após a vacinação, contrariando os resultados de Gil de los Santos et al. (2012), onde a suplementação com *Komagataella phaffii* resultou em maiores soroconversões.

A suplementação com *Komagataella phaffii* também não influenciou na resposta imune de animais imunossuprimidos vacinados com rCPB. O aumento dos níveis de anticorpos IgG totais não foi observado para rCPB em camundongos imunossuprimidos, imunizados com rCPB e suplementados com *Komagataella phaffii* no presente estudo, como ocorreu nos animais dos grupos apenas vacinados e imunossuprimidos vacinados, e em estudos anteriores (Salvarani et al., 2013; Moreira et al., 2016). Entretanto, rCPB pode não ser o melhor antígeno vacinal para geração de uma resposta imune robusta e de fácil detecção *in vitro*. Estudos recentes demonstram que o domínio C-terminal de rCPB (rCPB-C) apresenta maior atividade imunogênica em comparação a rCPB e CPB nativa (vacina comercial) (Rodrigues et al., 2021). Além disso, devido a dificuldades de expressão e purificação do antígeno rCPB, o ensaio de ELISA empregado para detecção de anticorpos anti-rCPB foi realizado com rCPB-C. Por sua vez, é possível que alguns epítomos que são encontrados em rCPB (região N-terminal) poderiam não estar presentes em rCPB-C. Contudo, essa hipótese pode ser pouco significativa quando considerado que rCPB-C se apresenta mais imunogênica *in vivo* (Rodrigues et al., 2021).

Apesar dos resultados negativos com rCPA-C e com rCPB, relatos já demonstraram que o tratamento de animais com *Komagataella phaffii* pode estimular minimamente a produção de anticorpos específicos, com aumento de apenas 35% em comparação ao grupo controle (Gaboardi et al., 2019), bem como pode levar a títulos não significativos de anticorpos nos grupos tratados com probióticos em comparação aos demais grupos (Khan et al., 2014; Alizadeh et al., 2016).

É sugestível que diferenças nas soroconversões induzidas entre microrganismos se devem-se à intensificação inespecífica da resposta imune já verificada com alguns probióticos (Gil de los Santos e Gil-Turnes, 2005; Gil-

Turnes et al., 2007; Bujalance et al., 2007), e não pela estimulação específica produzida pelo antígeno recombinante empregado (Gil de los Santos et al., 2012). Por sua vez, neste estudo três antígenos foram utilizados para compor a formulação vacinal, o que sugere que o efeito de *Komagataella phaffii*, quanto à imunomodulação, pode estar também associado a uma resposta imunógeno-específica.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que *Komagataella phaffii* desempenha efeito benéfico sob a imunidade humoral desencadeada por animais imunizados imunossuprimidos, embora a resposta de animais imunossuprimidos à suplementação com *Komagataella phaffii* pareça ser imunógeno específica. Como mostrado, efeitos positivos de imunidade mediada por anticorpos foram observados em animais imunossuprimidos suplementados com *Komagataella phaffii* e imunizados com um antígeno recombinante contra *C.botulinium*, porém níveis superiores de anticorpos não foram constatados para antígenos contra *C.perfringens*. No entanto, propriedades imunológicas celulares ainda necessitam de investigações, uma vez que a imunomodulação de um probiótico pode estar associada a efeitos diversos de imunidade, incluindo funções imunomoduladoras na atividade celular (estímulo de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias) ou a outros anticorpos específicos (IgA, IgM e diferentes subclasses de IgG). Por fim, *Komagataella phaffii* apresenta-se não apenas como um excelente suplemento imunomodulador imunógeno específico, mas como fonte viável, segura, barata e promissora no setor de alimentos na indústria veterinária e humana, para animais ou pessoas saudáveis ou imunossuprimidos.

Referências Bibliográficas

ABRAHAM, P.; RABI, S. Protective effect of aminoguanidine against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. *Redox report*, v. 16, n. 1, p. 8-14, 2011.

ALVES, A. A.; SILVEIRA, A. L. S.; NASCIMENTO, K. B. R.; RESENDE, A. B.; SANTOS, T. M. P. Alterações hematológicas em pacientes oncológicos internados em um hospital público de Sergipe. 2º Congresso Internacional de Atividade Física, Nutrição e Saúde – CIAFIS. Universidade Tiradentes. 2016.

AMARETTI, A.; DI NUNZIO, M.; POMPEI, A.; RAIMONDI, S.; ROSSI, M.; BORDONI, A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Applied microbiology Biotechnology*, v. 97, p. 809–817, 2013.

ANDERSEN, Kathleen M; A BATES, Benjamin; RASHIDI, Emaan s; OLEX, Amy L; MANNON, Roslyn B; PATEL, Rena C; SINGH, Jasvinder; SUN, Jing; AUWAERTER, Paul G; NG, Derek K. Long-term use of immunosuppressive medicines and in-hospital COVID-19 outcomes: a retrospective cohort study using data from the national covid cohort collaborative. *The Lancet Rheumatology*, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 33-41, jan. 2022. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2665-9913\(21\)00325-8](http://dx.doi.org/10.1016/s2665-9913(21)00325-8).

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. 2002.

AOKI, Kazunari; TAKAHASHI, Takayuki; TABATA, Sumie; KURATA, Masayuki; MATSUSHITA, Akiko; NAGAI, Kenichi; ISHIKAWA, Takayuki. Efficacy and tolerability of reduced-dose 21-day cycle rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone therapy for elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, [S.L.], v. 54, n. 11, p. 2441-2447, 17 abr. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/10428194.2013.780654>.

BENNETT, John; DOLIN, Raphael; BLASER, Martin J.. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 9. ed. United State Of America: Elsevier, 2019.

BOER, Alie de. Fifteen Years of Regulating Nutrition and Health Claims in Europe: the past, the present and the future. *Nutrients*, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 1725, 19 maio 2021. MDPI AG. <http://doi.org/10.3390/nu13051725>.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Extraordinária de Enfrentamento à COVID-19. Nota Técnica Nº 27/2021-SECOVID/GAB/SECOVID/MS. Administração de dose de reforço de vacinas contra a Covid-19. Brasília-DF. (Acesso em 16 de abril de 2023), 2021:7p. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/vacinas/NTDoseReforo.pdf>

BRODSKY, Robert A.. High-dose cyclophosphamide for autoimmunity and alloimmunity. *Immunologic Research*, [S.L.], v. 47, n. 1-3, p. 179-184, 20 jan. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-009-8149-y>.

BUJALANCE, C.; MORENO, E.; JIMENEZ- VALERA, M.; RUIZ-BRAVO, A. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. *International journal of food microbiology*, v. 113, p. 28–34, 2007.

BYRNE, M.; WINGARD, J.R.; MOREB, J.s.. Continuous Infusion Cyclophosphamide and Low-Dose Total Body Irradiation Is a Safe and Effective Conditioning Regimen for Autologous Transplant in Multiple Myeloma. *Transplantation Proceedings*, [S.L.], v. 45, n. 9, p. 3361-3365, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.03.054>.

CALIXTO-LIMA, L. et al. Dietetic management in gastrointestinal complications from antineoplastic chemotherapy. *Nutr. Hosp.*, v. 27, n. 1, p. 65-75, 2012.

CARREIRO, D. M. Glúten, toxicidade, reações e sintomas. 1. ed. São Paulo: Vida e consciência Ltda. 2013. 224 p.

CASTELLI, Regina Maria. Sinergismo dos probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *Toyo* sobre a imunomodulação em camundongos. 2011. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, 2011.

CHEN, C. Y.; CHEN, S. W.; WANG, H. T. Effect of supplementation of yeast with bacteriocin and *Lactobacillus* culture on growth performance, cecal fermentation, microbiota composition, and blood characteristics in broiler chickens. *J Anim Sci* Vol. 30, No. 2:211-220 February 2017

CHEN, L.; LIU, W.; LI, Y.; LUO, S.; LIU, Q.; ZHONG, Y.; JIAN, Z.; BAO, M. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 attenuates the atherosclerotic progression through modulation of oxidative stress and inflammatory process. *International Immunopharmacology*, v.17, p. 108-115, 2013.

COP – Centro de Oncologia do Paraná –. Efeitos colaterais da quimioterapia. <http://centrodeoncologia.com/noticias/informacoes-parapacientes/tratamentos/efeitos-colaterais-da-quimioterapia/> 15/07/18

Dezern AE, Styler MJ, Drachman DB, Hummers LK, Jones RJ, Brodsky RA. Repeated treatment with high dose cyclophosphamide for severe autoimmune diseases. *Am J Blood Res*. 2013;3(1):84-90. Epub 2013 Jan 17. PMID: 23358715; PMCID: PMC3555191.

DÖRFFEL, Wolfgang; RÜHL, Ursula; LÜDERS, Heike; CLAVIEZ, Alexander; ALBRECHT, Marion; BÖKKERINK, Jos; HOLTE, Harald; KARLEN, Jonas; MANN, Georg; MARCINIAK, Heinz. Treatment of Children and Adolescents With

Hodgkin Lymphoma Without Radiotherapy for Patients in Complete Remission After Chemotherapy: final results of the multinational trial gpoh-hd95. *Journal Of Clinical Oncology*, [S.L.], v. 31, n. 12, p. 1562-1568, 20 abr. 2013. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2012.45.3266>.

DOU. Diário Oficial da União. Resolução Normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016. "Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Brasil, 2016.

DUMMER, L. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; NIZOLI, L. Q.; DE MORAES, C. M.; ROCHA, A. R.; DE SOUZA, L. L.; ROSS, T.; VIDOR, T.; LEITE, F. P. L. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Virological Methods*, v. 161, n. 1, p.84-90, 2009a.

DUMMER, L. A.; NIZOLI, L. Q.; ROCHA, A. S. R.; DE MORAES, C. M.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL-TURNES, C.; VIDOR, T.; LEITE, F. P. L. Production and characterization of recombinant bovine herpesvirus type 5 glycoprotein D expressed in *Pichia pastoris*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 128, n. 1-3, p.315-316, 2009b

FABER, J.; VAN LIMPT, K.; KEGLER, D.; LUIKING, Y.; GARSSSEN, J.; VAN HELVOORT, A.; VOS, A. P.; KNOLS, J. Bacterial Translocation Is Reduced by a Specific Nutritional Combination in Mice with Chemotherapy-Induced Neutropenia. *Nutrition and Disease*, p. 1292-1298, 2011.

FAO - ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. Probióticos em los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudio FAO Alimentación y Nutrición. Roma, 2006.52p

FAUCI, Anthony S.; FOLKERS, Gregory K.; LANE, H. Clifford. Chapter 202: Human Immunodeficiency Virus Disease: AIDS and Related Disorders. In: LOSCALZO, Joseph; FAUCI, Anthony; KASPER, Dennis; HAUSER, Stephen; LONGO, Dan; JAMESON, J. Larry. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 21. ed. United States Of America: McGraw Hill, 2022. Cap. 202, p. 3095. Disponível em: <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=3095&ionid=265434013>. Acesso em: 16 abr. 2023.

FDA US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for industry andinvestigators: safety reporting requirements for INDs andBA/BE Studies. Silver Spring, MD. 2012:29. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/./Guidances/UCM227351.pdf>. 2018

FERDINANDI, D. M.; FERREIRA, A. A. Agentes alquilantes: reações adversas e complicações hematológicas. *AC & Científica*, v. 1, p. 1-12, 2009

FERREIRA, A. L.; ROCHA, C. P. R.; VIEIRA, L. M.; DUSSE, L. M. S.; JUNQUEIRA, D. R. G.; CARVALHO, M. G. C. Alterações hematológicas induzidas por medicamentos convencionais e alternativos. Rev. Bras. Farm. 94 (2): 94-101, 2013.

FERREIRA, Marcos Roberto A.; MOTTA, Jaqueline F.; AZEVEDO, Morgana L.; SANTOS, Lucas M. dos; MOREIRA JÚNIOR, Clóvis; RODRIGUES, Rafael R.; DONASSOLO, Rafael A.; REIS, Alessandra dos S. Belo; BARBOSA, José D.; SALVARANI, Felipe M.. Inactivated recombinant *Escherichia coli* as a candidate vaccine against *Clostridium perfringens* alpha toxin in sheep. Anaerobe, [S.L.], v. 59, p. 163-166, out. 2019. Elsevier BV. <http://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.07.002>.

FRANÇA, R. C.; CONCEIÇÃO, F. C.; MENDONÇA, M.; HAUBERT, L.; SABADIN, G.; OLIVEIRA, P. D.; AMARAL, M. G.; SILVA, W. P.; MOREIRA, A. N. *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella Typhimurium*. Appl Microbiol Biotechnol, 2015. 99:7953–7961

Gaboardi, G.C., Alves, D., Gil de los Santos, D. et al. Influence of *Pichia pastoris* X-33 produced in industrial residues on productive performance, egg quality, immunity, and intestinal morphometry in quails. Sci Rep 9, 15372 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51908-0>

GIL DE LOS SANTOS, J. R.; STORCH, O. B.; FERNANDES, C. G.; GILTURNES, C. Evaluation in broilers of the probiotic properties of *Pichia pastoris* and a recombinant *P. pastoris* containing the *Clostridium perfringens* alpha toxin gene. Veterinary Microbiology, 2012. 156:448–451

Huang F, Qiao HM, Yin JN, Gao Y, Ju YH, Li YN. Early-Life Exposure to *Clostridium leptum* Causes Pulmonary Immunosuppression. PLoS One. 2015 Nov 13;10(11):e0141717. doi: 10.1371/journal.pone.0141717. PMID: 26565810; PMCID: PMC4643994.

IMLAY, Hannah; KAUL, Daniel; RAO, Krishna. Risk factors for *Clostridium difficile* infection in HIV-infected patients. Sage Open Medicine, [S.L.], v. 4, p. 205031211668429, 1 jan. 2016. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/2050312116684295>.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Manual de boas práticas: exposição ao risco químico na central de quimioterapia: conceitos e deveres / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; Rio de Janeiro, 2015

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Tratamento do câncer. http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento_INCA.

JANKOVIC, I.; SYBESMA, W.; PHOTHIRATH, P.; ANANTA, E.; MERCENIER, A. Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, p. 175–181, 2010

LIU, Fuhong; XUE, Song; ZHANG, Yongping; YANG, Jingxian; HU, Jiajun; LI, Di; MA, Xiaojun; WANG, Jingbo. *Clostridium perfringens* sepsis in three patients with acute leukemia and review of the literature. *International Journal Of Hematology*, [S.L.], v. 113, n. 4, p. 508-517, 2 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12185-020-03060-z>.

LUZNIK, Leo; FUCHS, Ephraim J.. High-dose, post-transplantation cyclophosphamide to promote graft-host tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunologic Research*, [S.L.], v. 47, n. 1-3, p. 65-77, 12 jan. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-009-8139-0>.

Ma W, Li W, Yu S, Bian H, Wang Y, Jin Y, Zhang Z, Ma Q and Huang L Immunomodulatory effects of complex probiotics on the immuno-suppressed mice induced by cyclophosphamide. *Front. Microbiol.* 14:1055197, jan 2023. doi: 10.3389/fmicb.2023.1055197

MASSAUT, Khadija Bezerra. Perfil sanguíneo, estresse oxidativo e desempenho alimentar de camundongos *Swiss* suplementados com *Pichia pastoris* e imunossuprimidos com ciclofosfamida. 2018. 142 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas,RS,2018. Disponível em: http://www.guaiaica.ufpel.edu.br/bitstream/prefix/4881/1/Dissertacao_Khadija_Massaut.pdf. Acesso em: 16 jan. 2023.

MCCUNE, W.J; MACR, M.D; CLOWSE, M. B. General principles of the use of cyclophosphamide in rheumatic diseases. UpToDate. Disponível em: https://www.uptodate.com/contents/general-principles-of-the-use-of-cyclophosphamide-in-rheumatic-diseases?source=search_result&search=ciclofosfamida&selectedTitle=5~150

MOREIRA, Clóvis; CUNHA, Carlos Eduardo Pouey da; MOREIRA, Gustavo Marçal Schmidt Garcia; MENDONÇA, Marcelo; SALVARANI, Felipe Masiero; MOREIRA, Ângela Nunes; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo. Protective potential of recombinant non-purified botulinum neurotoxin serotypes C and D. *Anaerobe*, [S.L.], v. 40, p. 58-62, ago. 2016. Elsevier BV. <http://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.05.012>.

MOREIRA, Clóvis; FERREIRA, Marcos R.A.; FINGER, Paula F.; MAGALHÃES, Carolina G.; CUNHA, Carlos E.P.; RODRIGUES, Rafael R.; OTAKA, Denis Y.; GALVÃO, Cleideanny C.; SALVARANI, Felipe M.; MOREIRA, Ângela N.. Protective efficacy of recombinant bacterin vaccine against botulism in cattle. *Vaccine*, Pelotas, Rs, v. 38, n. 11, p. 2519-2526, mar. 2020. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.01.089>

MOREIRA, Gustavo Marçal Schmidt Garcia; SALVARANI, Felipe Masiero; CUNHA, Carlos Eduardo Pouey da; MENDONÇA, Marcelo; MOREIRA, Ângela Nunes; GONÇALVES, Luciana Aramuni; PIRES, Prhiscylla Sadanã; LOBATO, Francisco Carlos Faria; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo. Immunogenicity of a Trivalent Recombinant Vaccine Against *Clostridium perfringens* Alpha, Beta, and Epsilon Toxins in Farm Ruminants. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-9, 23 mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://doi.org/10.1038/srep22816>.

NIZOLI, L. Q.; CONCEIÇÃO, F. R.; SILVA, S. S.; DUMMER, L. A.; SANTOS JÚNIOR, A. G.; LEITE, F. P. L. Immunogenicity and antigenicity of the recombinant EMA-1 protein of *Theileria equi* expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 2, p.1-4, 2009.

OC – Onco Center. Alteração nas células do sangue durante a quimioterapia. <http://oncocentermedicos.com.br/site/2015/09/08/alteracao-nas-celulas-dosangue-durante-a-quimioterapia/>

OLIVEIRA, Isabella Picolli Avaliação da resposta imune protetora contra *Sporothrix Schenckii* frente à vacinação profilática com células dendríticas isogênicas ativadas, em camundongos imunossuprimidos. Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2021. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/237318>>.

PACHECO, Ágatha Rezende. Respostas imunes induzidas por vacinas de DNA contra Zika e neuroadaptação de um isolado viral em camundongos para futuros testes de vacinas. 2021. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/53289>

RODRIGUES, Rafael Rodrigues; FERREIRA, Marcos Roberto Alves; DONASSOLO, Rafael Amaral; ALVES, Mariliana Luiza Ferreira; MOTTA, Jaqueline Freitas; MOREIRA JUNIOR, Clovis; SALVARANI, Felipe Masiero; MOREIRA, Angela Nunes; CONCEICAO, Fabricio Rochedo. Evaluation of the expression and immunogenicity of four versions of recombinant *Clostridium perfringens* beta toxin designed by bioinformatics tools. *Anaerobe*, [S.L.], v. 69, p. 102326, jun. 2021. Elsevier BV. <http://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102326>.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.

SACCO, Roberto; WOOLLEY, Julian; YATES, Julian; CALASANS-MAIA, Monicadiuana; AKINTOLA, Oladapo; PATEL, Vinod. The role of antiresorptive drugs and medication-related osteonecrosis of the jaw in nononcologic immunosuppressed patients: a systematic review. *Journal Of Research In Medical Sciences*, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 23, 2021. Medknow. http://dx.doi.org/10.4103/jrms.jrms_794_20.

SALVA, S.; MARRANZINO, G.; VILENA, J.; AGÜERO, G.; ALVAREZ, S. Probiotic *Lactobacillus* strains protect against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. *International Immunopharmacology*, v. 22, p 209–221, 2014.

SANTOS, E. W.; OLIVEIRA, D. C.; HASTREITER, A.; SILVA, G. B.; BELTRAN, J. S. O.; TSUJITA, M.; CRISMA, A. R.; NEVES, S. M. P.; FOCK, R. A.; BORELLI, P. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, *Swiss Webster* and BALB/c mice. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 53, n. 2, p. 138-145, 2016.

SANTOS, Francisco Denis Souza. Avaliação de *Bacillus toyonensis* como bioadjuvante em vacina recombinante. 2016. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/ppgveterinaria/files/2016/03/Francisco-Denis-Souza-Santos.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2023.

SARTELLI, M., MALANGONI, M.A., MAY, A.K. et al. World Society of Emergency Surgery (WSES) guidelines for management of skin and soft tissue infections. *World J Emerg Surg* 9, 57 (2014). <https://doi.org/10.1186/1749-7922-9-57>

SAYED-AHMED MM. Progression of cyclophosphamide-induced acute renal metabolic damage in carnitine-depleted rat model. *Clin Exp Nephrol* 2010; 14:418–26.

SIEDLER, B. S.; ROLOFF, B. C.; DE SÁ, G. L.; NEIS, A.; CONCEIÇÃO, F. R.; HARTWIG, D. D.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; CAMPOS, F. S.; ROEHE, P. M.; HARTLEBEN, C. P.; MCBRIDE, A. J. A. Secretory expression of bovine herpesvirus type 1/5 glycoprotein E in *Pichia pastoris* for the differential diagnosis of vaccinated or infected cattle. *Protein Expression and Purification*, v.130, p.21-27, 2017.

SILVEIRA, Fernanda Modesto; WYSOCKI, Anneliese Domingues; MENDEZ, Roberto della Rosa; PENA, Silvana Barbosa; SANTOS, Edirlei Machado dos; MALAGUTI-TOFFANO, Silmara; SANTOS, Vinícius Batista dos; SANTOS, Mariana Alvina dos. Impacto do tratamento quimioterápico na qualidade de vida de pacientes oncológicos. *Acta Paulista de Enfermagem*, [S.L.], v. 34, n. 2021, p. 1-9, 2021. *Acta Paulista de Enfermagem*. <http://doi.org/10.37689/acta-ape/2021ao00583>.

STORCH O. B. Avaliação como probióticos para frangos de corte de *Pichia pastoris* e *Pichia pastoris* recombinante contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium perfringens*. Dissertação de mestrado, Pelotas: 2008.

TELES, K. A.; MEDEIROS-SOUZA, P.; LIMA, F. A. C.; ARAÚJO, B. G.; LIMA, R. A. C. Rotina de administração de ciclofosfamida em doenças autoimunes reumáticas: uma revisão. *rev bras reumatol*. 2017; 57(6):596–604.

TELES, Kaian Amorim; MEDEIROS-SOUZA, Patrícia; LIMA, Francisco Aires Correa; ARAÓJO, Bruno Gedeon de; LIMA, Rodrigo Aires Correa. Rotina de administração de ciclofosfamida em doenças autoimunes reumáticas: uma revisão. *Revista Brasileira de Reumatologia*, [S.L.], v. 57, n. 6, p. 596-604, nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://doi.org/10.1016/j.rbr.2016.04.009>.

THERMO FISCHER SCIENTIFIC. BCA Assay and Lowry Assays. Disponível em: <https://shre.ink/Thermofischer>. Acesso em: 15 fev. 2023.

UPTODATE. Cyclophosphamide: Drug information. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/cyclophosphamide-druginformation?source=preview&search=ciclofosfamida&anchor=F13494888#F13494888>

WEI, H.; JIANG L.; XUE Y.; FANG D.; GUO H. Secreted expression of Dengue virus type 2 full-length envelope glycoprotein in *P. pastoris*. *Journal of Virological Methods*. v. 109, p.17-23, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Botulism. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/botulism>. Acesso em: 16 abr. 2023.