

“O REPERTÓRIO DE REATIVIDADES DE  
IMUNOGLOBULINAS CONTRA ANTÍGENOS DA  
MICROBIOTA INTESTINAL E ANTÍGENOS PRÓPRIOS DO  
HOSPEDEIRO”



**Monografia apresentada ao Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes, da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
como pré-requisito para a obtenção do grau  
de Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
MARÇO / 2021**

Trabalho realizado no Departamento de Imunobiologia, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ e no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob orientação de André Macedo Vale e co-orientação de Leandro Araújo Lobo.

## FICHA CATALOGRÁFICA

## CIP - Catalogação na Publicação

MP436r Meira Chaves de Assis Pereira, Gustavo  
O REPERTÓRIO DE REATIVIDADES DE IMUNOGLOBULINAS  
CONTRA ANTÍGENOS DA MICROBIOTA INTESTINAL E  
ANTÍGENOS PRÓPRIOS DO HOSPEDEIRO / Gustavo Meira  
Chaves de Assis Pereira. -- Rio de Janeiro, 2021.  
80 f.

Orientador: André Macedo Vale.

Coorientador: Leandro Araújo Lobo.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2021.

1. Linfócitos B. 2. Microbiota Intestinal. 3.  
Autoimunidade. 4. Mimetismo molecular. 5.  
Anticorpos Naturais. I. Macedo Vale, André, orient.  
II. Araújo Lobo, Leandro, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ  
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO  
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E  
IMUNOLOGIA**

**ALUNO: Gustavo Meira Chaves de Assis Pereira**

DRE: 117037645

**BANCA EXAMINADORA:** Profa. Alessandra D'Almeida Filardy (Presidente)  
Profa. Dirlei Nico  
Profa. Juliana Echevarria Lima  
Prof. Fabianno Ferreira Dutra (Suplente)

**Título da Monografia: “O repertório de reatividades de imunoglobulinas  
contra antígenos da microbiota intestinal e antígenos próprios do  
hospedeiro”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/evu-ruyh-sdv>

Data e hora de início: **01 de março de 2021 às 15:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota **10** neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

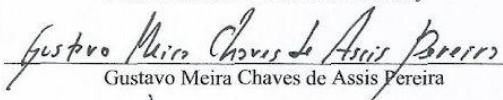
Rio de Janeiro, 1 de Março de 2021.

NOTA	Banca Examinadora:
10	Profa. Alessandra D'Almeida Filardy
10	Profa. Dirlei Nico
10	Profa. Juliana Echevarria Lima
	Prof. Fabianno Ferreira Dutra

Presidente da banca

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Alessandra D'Almeida Filardy


Aluno:

  
\_\_\_\_\_  
Gustavo Meira Chaves de Assis Pereira

Orientador:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. André Macedo Vale / Coorientador: Prof. Leandro Araújo Lobo

Coordenador  
de TCC

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus amigos, familiares e professores por todo o apoio durante essa trajetória e às agências de fomento (CNPq, FAPERJ, PIBIC e CAPES) por tornar o trabalho possível.

## RESUMO

GUSTAVO MEIRA CHAVES DE ASSIS PEREIRA

### O REPERTÓRIO DE REATIVIDADES DE IMUNOGLOBULINAS CONTRA ANTÍGENOS DA MICROBIOTA INTESTINAL E ANTÍGENOS PRÓPRIOS DO HOSPEDEIRO

**Orientador:** André Macedo Vale

**Resumo da monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Goés da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Os linfócitos B são os tipos celulares responsáveis pela porção humoral da imunidade adaptativa dos vertebrados mandibulados. Isso ocorre pela produção e secreção de anticorpos, proteínas que interagem fortemente com outras moléculas e que são formadas a partir de eventos de rearranjo de segmentos gênicos variáveis. Esses eventos de rearranjo ocorrem de maneira supostamente estocástica durante a diferenciação e desenvolvimento dos linfócitos B. Assim, cada linfócito B maduro gerado terá provavelmente passado por um rearranjo único desses segmentos. À esse conjunto de rearranjos únicos se dá o nome de repertório de reconhecimento antigênico. Apesar da interação dos anticorpos com as moléculas que reconhecem ser caracterizada por uma alta especificidade conformacional e química, um mesmo tipo de anticorpo pode reconhecer mais de um tipo de molécula, fenômeno este chamado de imunoreatividade cruzada. Existem imunoreatividades cruzadas implicadas tanto em processos fisiológicos quanto patológicos. Em especial, estima-se que processos de autoimunidade pouco compreendidos possam estar ligados à amplificação de uma resposta autóloga por intermédio de imunoreatividade cruzada em relação a moléculas exógenas. Considerando que o trato intestinal é uma imensa fonte de contato com moléculas exógenas, não só pela alimentação, mas também pela presença de microrganismos comensais e eventuais patógenos, pode-se perceber a importância do estudo desse sítio para a identificação de imunoreatividade cruzadas e as implicações fisiológicas e patológicas destas. Na presente monografia, será discutida: a formação do repertório de reconhecimento antigênico dos linfócitos B; a influência do contato com a microbiota intestinal na constituição deste repertório; a plasticidade do repertório ao longo do desenvolvimento do hospedeiro; e a implicação de imunoreatividades cruzadas identificadas neste repertório em processos fisiológicos e patológicos. Será proposta uma abordagem experimental para a identificação simultânea de múltiplas imunoreatividades cruzadas, comparando com métodos tradicionais, apontando questões pendentes que poderão ser solucionadas, envolvendo análises quantitativas e qualitativas dessas imunoreatividades ao longo do desenvolvimento do indivíduo.

**Palavras-chave:** Linfócitos B; Microbiota Intestinal; Autoimunidade; Mimetismo Molecular; Anticorpos Naturais; Imunoreatividade cruzada.

**ABSTRACT****GUSTAVO MEIRA CHAVES DE ASSIS PEREIRA****THE IMMUNOGLOBULIN REPERTOIRE OF REACTIVITIES AGAINST GUT  
MICROBIOTA ANTIGENS AND HOST SELF-ANTIGENS****Orientador: André Macedo Vale**

**Abstract da monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Goés da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

B lymphocytes are the cell types responsible for the humoral portion of the jawed vertebrates' adaptive immunity. This occurs through the production and secretion of antibodies, proteins that interact strongly with other molecules and that are formed by the rearrangement of variable gene segments. These rearrangement events occur in a supposedly stochastic manner during the differentiation and development of B lymphocytes. Thus, each mature B lymphocyte generated will likely have undergone a unique rearrangement of these segments. The set of unique rearrangements is called the antigenic recognition repertoire. Despite the fact that the interaction of antibodies with the molecules they recognize is characterized by high conformational and chemical specificity, the same type of antibody can recognize more than one type of molecule (a phenomenon often called cross-reactivity). Cross-reactivity may be involved both in physiological and pathological processes. In particular, it is estimated that poorly understood autoimmunity processes may be linked to the amplification of an autologous response through cross-reactivity to exogenous molecules. Considering that the intestinal tract is an immense source of contact with exogenous molecules, not only due to food intake, but also due to the presence of commensal microorganisms and possible eventual pathogens, one can perceive the importance of studying this site for the identification of crossed immunoreactivities, as well as the physiological and pathological implications of these. The present monograph discusses: the formation of the antigen recognition repertoire of B lymphocytes; the influence of contact with the intestinal microbiome in the constitution of this repertoire; the plasticity of the repertoire throughout the development of the host; and the implication of crossed-reactivities identified in this repertoire in physiological and pathological processes; An experimental approach will be proposed for the simultaneous identification of multiple crossed immunoreactivities, being compared to traditional methods. Additionally, pending questions that can be solved, involving quantitative and qualitative analyzes of these immunoreactivities throughout the individual's development, will be discussed.

**Key-words:** B lymphocytes; Intestinal Microbiome; Autoimmunity; Molecular Mimicry; Natural Antibodies; Cross-immunoreactivity.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

AID: Deaminase de citidina Induzida por Ativação

AP-1: Proteína Ativadora 1

APRIL: Ligante A Indutor de Proliferação (*A proliferation-inducing ligand*)

BCIP: 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolilfosfato

BCR: Receptor de Células B (*B Cell Receptor*)

CD: Grupamento de Diferenciação (*Cluster of Differentiation*)

CDR: Região Determinante de Complementariedade

CLP: Progenitor linfóide comum (*common lymphoid progenitor*)

CSR: Recombinação de Troca de Classes (*Class Switch Recombination*)

DAMP: Padrão Molecular Associado a Dano

DNA: Ácido desoxiribonucleico

EBF1: Fator precoce 1 de células B (*Early B cell Factor 1*)

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Fab: Fragmento de ligação ao antígeno (*Antigen Binding Fragment*)

Fc: Fragmento constante (*Constant Fragment*)

FO: Folicular

GALT: Tecidos Linfóides Associados ao Intestino (*Gut Associated Lymphoid Tissues*)

HMGB: *High Mobility Group Box*, proteína constitutiva da cromatina

Ig: Imunoglobulina

IFN: Interferon

IL: Interleucina

IRF3: Fator de Regulação de Interferon-3

ITAMs: motivos de ativação de imunoreceptores a base de tirosina

LCMV: Vírus da Coriomeningite Linfocítica

LDA: Ensaio de Diluição Limitante (*Limiting Dilution Assay*)

LP: Lâmina Própria intestinal, tecido conjuntivo das membranas mucosas no intestino

LPS: Lipopolissacarídeo

MHC: Complexo Maior de Histocompatibilidade



MLN: Linfonodos mesentéricos (*Mesenteric Lymph Nodes*)

Myd88: Gene de Resposta Primária de Diferenciação Mielóide 88

MZ: Zona Marginal do baço (*Marginal Zone*)

NK: *Natural Killer* (células citotóxicas da imunidade inata)

NZW: Camundongo New Zeland White

PAMP: Padrão Molecular Associado a Patógenos

RAG: Gene de Ativação da Recombinação (ou a proteína codificada por esse gene)

RNA: Ácido Ribonucleico

RSS: Sequência sinal de recombinação (*Recombination Signal Sequence*)

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase

PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

SARM: Proteína Contendo Motivos de Alfa-Estéril e Tatu (*Armadillo*)

Sca-1: Antígeno 1 Associado a Células Tronco

SCF: Fator de Células Tronco (*Stem Cell Factor*)

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de Sódio

SIgA: Imunoglobulina A secretória

TCR: Receptor de Células T (*T Cell Receptor*)

TIR: Receptor Toll/Interleucina-1

TRIF: Domínio de TIR Contendo o Adaptador Indutor de Interferon- $\beta$

TLR: Receptor do tipo Toll (*Toll-like Receptors*)

ZPS: Polissacarídeo Zwitteriônico

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do receptor antigênico de células B (BCR) .....	6
Figura 2: Desenvolvimento das subpopulações de células B a partir do modelo das linhagens ..	11
Figura 3: Modelo esquemático da diferenciação das células B .....	20
Figura 4: Ontogenia e desenvolvimento do repertório de células B .....	27
Figura 5: Resumo esquemático da adaptação do método descrito por Nobrega <i>et al.</i> , 1993 e Haury <i>et al.</i> , 1994. ....	49
Figura 6: Ensaio de imunoblot a partir dos sobrenadantes das culturas de subpopulações de células B contra extrato de cérebro murino e <i>Escherichia coli</i> .....	51
Figura 7: Ensaio de imunoblot a partir dos sobrenadantes das culturas de subpopulações de células B (do animal com 3 dias de vida) contra extratos de cérebro murino, <i>Escherichia coli</i> , músculo estriado murino e <i>Bacteroides fragilis</i> .....	51

## SUMÁRIO:

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
viii	
LISTA DE FIGURAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. DESENVOLVIMENTO	
Capítulo 1: Linfócitos B	
1.1 Estrutura e diversidade dos receptores antigênicos de Células B	4
1.2 Ontogenia dos Linfócitos B	10
1.3 Ativação dos Linfócitos B	21
Capítulo 2: Microbiota intestinal	
2.1 A Microbiota e a Homeostase na Mucosa Intestinal	30
2.2 <i>Escherichia coli</i>	37
2.3 <i>Bacteroides fragilis</i>	38
2.4 <i>Enterococcus gallinarum</i>	40
2.5 <i>Proteus mirabilis</i>	42
2.6 Consórcio bacteriano Oligo-MM <sup>12</sup>	43
Capítulo 3: Imunoreatividades de células B contra antígenos da microbiota e do hospedeiro	
3.1 Autoimunidade, mimetismo molecular e fisiologia	45
3.2 Modelos experimentais para avaliação do repertório	48
3.3 Padrão de imunoreatividades ao longo do desenvolvimento	50
4. CONCLUSÕES	53
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

## 1. INTRODUÇÃO

A interação entre organismos multicelulares e unicelulares é ubíqua na natureza e, nos vertebrados mandibulados, os linfócitos B constituem um dos tipos celulares mais importantes na manutenção do equilíbrio necessário para que esta ocorra de forma mutuamente benéfica (Cooper, 2006). Isto se dá pela capacidade destas células de secretar imunoglobulinas, glicoproteínas da superfamília das globulinas, dotadas de alta afinidade e especificidade em relação ao potencial de interação com outras moléculas (antígenos) (Cooper, 2006). A afinidade e a especificidade dessas interações estão majoritariamente associadas às características das regiões variáveis, como estrutura tridimensional, carga e hidrofobicidade dos resíduos de aminoácidos que nelas se encadeiam (Simon e Rajewsky, 1990). Os segmentos gênicos que codificam as regiões variáveis das imunoglobulinas passam por um processo aparentemente estocástico de recombinação, permitindo que cada linfócito expresse receptores antigênicos únicos (Tonegawa, 1983; Alt e Baltimore, 1982). Apesar da suposta natureza aleatória deste processo, observa-se diferenças consistentes nos repertórios de subpopulações distintas de linfócitos B (Tornberg e Holmberg, 1995).

Essas subpopulações são caracterizadas pela expressão de certas moléculas de superfície e fatores transcricionais, podendo ter origem de diferentes progenitores (Hardy e Hayakawa, 2001). Notavelmente, linfócitos B-1a, majoritariamente de origem fetal/neonatal e predominantes nas cavidades peritoneal e pleural do adulto, caracterizados pela alta expressão de IgM e CD19, baixa expressão de IgD e B220, com ausência da expressão de CD23 e presença de CD5 e CD43, possuem um repertório de imunoglobulinas mais associado à linhagem germinativa, isto é, composto pela simples recombinação dos segmentos gênicos V, D e J, sendo também este repertório mais potencialmente auto-reativo (Tornberg e Holmberg, 1995). Já linfócitos B-2, caracterizados pela ausência da expressão de CD5 e CD43, apresentando baixos níveis de IgM e altos de IgD, com expressão de CD19, B220 e CD23, sendo provenientes de precursores na medula óssea ao longo de toda a vida do animal e residentes nos órgãos linfóides secundários e na zona marginal do baço, possuem um repertório com maior diversidade juncional, isto é, adição aleatória de nucleotídeos (N) não codificados na linhagem germinativa (Tornberg e Holmberg, 1995).

Ainda que os mecanismos não estejam esclarecidos, a seleção dos repertórios dessas subpopulações parece estar ligada ao contato tanto com microrganismos quanto com

auto-antígenos (Chen *et al.*, 2018). Na presença dos sinais moleculares adequados, o linfócito B ativado pelo reconhecimento do antígeno sofrerá expansão clonal e cópias dessas imunoglobulinas serão secretadas como anticorpos (Burnet, 1957; Tonegawa, 1983). Apesar de possuírem alta afinidade e especificidade por um determinado antígeno, é possível que anticorpos reconheçam outras moléculas em um processo conhecido como reatividade cruzada. Em indivíduos dotados de determinadas predisposições genéticas, esse processo pode ser amplificado e resultar em afecções autoimunes (Pascual *et al.*, 2010). Sabe-se que anticorpos que reconhecem certas moléculas bacterianas podem reconhecer também estruturas do hospedeiro (Jongh-Leuvenink *et al.* 1986; Wedemeyer *et al.*, 1997), mas ainda faltam estudos em larga escala para a identificação desse tipo de reatividade. Sabe-se também que patobiontes podem levar a manifestações de autoimunidade em camundongos e em humanos (Manfredo Vieira *et al.*, 2018), mas não foi estudado se esse processo está relacionado à imunoreatividade cruzada.

Unindo esses dados à tendência tardia da maior parte das manifestações autoimunes, fazem-se necessários estudos para acompanhar o padrão de reatividade do repertório de imunoglobulinas em diferentes estágios da vida, observando se há uma subpopulação de linfócitos B mais participativa neste processo, se há uma contribuição da colonização microbiana para a amplificação patogênica de uma resposta autóloga e se há um período específico do desenvolvimento em que a autoimunidade passa a ser potencializada.

Dessa forma, serão discutidas a seguir características da geração de diversidade dos receptores antigênicos, do desenvolvimento das células B e da plasticidade do repertório de reconhecimento antigênico destes ao longo da idade do indivíduo, bem como dos estímulos microbianos com os quais entrarão em contato e que poderão moldar padrões de reatividade tanto para a manutenção da homeostase quanto para o desequilíbrio imunopatológico.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho consiste em dissertar sobre os perfis de imunoreatividade de células B em relação a antígenos autólogos ou provenientes da microbiota intestinal, levando em consideração diferentes estágios de desenvolvimento do hospedeiro, a fim de avaliar se há correlação com um maior potencial de auto-reatividade fisiológica ou imunopatológica. Para isto, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

(i) Apresentar e discutir os principais dados da literatura sobre ontogenia e ativação das diferentes subpopulações de linfócitos B;

(ii) Apresentar e discutir os principais dados da literatura sobre a interação entre linfócitos B e microrganismos da microbiota intestinal, ressaltando a relevância de certos antígenos de interesse para investigações futuras sobre o papel de imunoreatividades cruzadas na quebra da homeostase;

(iii) Discutir a plasticidade do repertório de reconhecimento antigênico de células B ao longo do desenvolvimento do indivíduo, buscando correlações com as informações anteriores que possam justificar a maior tendência tardia ao desenvolvimento de afecções autoimunes; e

(iv) Fomentar a discussão com dados experimentais preliminares próprios e propor uma estratégia experimental para tentar responder as questões pendentes.

### 3. DESENVOLVIMENTO

#### CAPÍTULO 1: LINFÓCITOS B

##### 1.1 ESTRUTURA E DIVERSIDADE DOS RECEPTORES ANTIGÊNICOS DE CÉLULAS B

Mesmo os organismos multicelulares mais simples, como os poríferos, possuem elementos usados pelos vertebrados para o reconhecimento imunológico (Cooper, 2006). Essas estratégias constituem a imunidade inata, cujos mecanismos de funcionamento estão associados ao reconhecimento de padrões moleculares amplamente conservados na natureza ou no próprio organismo, como os chamados padrões moleculares associados a patógenos e os padrões moleculares associados a dano celular e tecidual (Janeway, 1989; Matzinger, 1994; Hoffmann *et al.*, 1999; Beutler, 2004; Medzhitov, 2007).

Contudo, conforme a complexidade dos organismos multicelulares aumenta, os mecanismos baseados em padrões moleculares conservados muitas vezes são insuficientes para impedir um desequilíbrio homeostático ao contato com a vasta biodiversidade do planeta (Cooper, 2006). Afinal, o hospedeiro também é um ambiente e, como tal, exerce pressão seletiva, podendo favorecer a emergência, nos microrganismos com os quais tem contato, de mecanismos de evasão da imunovigilância. Por outro lado, pode-se considerar que relações tão dinâmicas de co-evolução requeiram constantes adaptações de sinalização e comunicação, levando ao hospedeiro a necessidade de mecanismos igualmente dinâmicos para compensar seu maior tempo geracional.

De acordo com o dogma central da biologia molecular não seria possível, a partir do contato com uma molécula exógena desconhecida, gerar uma espécie de molde que levasse à produção de um gene que codificaria uma proteína capaz de interagir com alta afinidade com tal molécula. O mais próximo disso que se observa é o sistema CRISPR-Cas, adotado por algumas bactérias, no qual um material genético viral invasor é clivado e inserido entre protoespaçadores em um *locus* do genoma bacteriano, de forma que possa ser produzido RNA com capacidade de reconhecimento do material genético exógeno, atuando como guia, isto é, orientando uma enzima de atividade nuclease (da família Cas) que irá promover a clivagem e consequente eliminação do material genético invasor (Ishino, 1987; Jinek *et al.*, 2012). Esse sistema é extremamente útil

para procariotos, dada sua unicelularidade, mas em organismos multicelulares de alta complexidade não é suficiente um mecanismo intracelular, é necessário um mecanismo que, além de altamente adaptável, possa atingir diferentes tecidos e interfaces.

Em organismos multicelulares, em termos evolutivos, é possível observar de forma mais ancestral o surgimento de receptores que permitem o reconhecimento de estruturas autólogas, como os que permitem a auto-agregação das esponjas ou os receptores para padrões moleculares associados a dano tecidual, observável a partir dos celomados (Cooper, 2006). O reconhecimento de moléculas exógenas desencadeando respostas direcionadas surge com receptores que reconhecem padrões moleculares muito conservados na natureza, como os receptores Toll, caracterizados em *Drosophila* (Cooper, 2006). A capacidade adaptativa de reconhecimento passa a ser melhor observável a partir dos vertebrados, já sendo possível observar receptores variáveis nos agnatos (não-mandibulados). A partir dos gnatostomados (vertebrados mandibulados) os receptores antigênicos variáveis passam a ser produzidos por linfócitos T e linfócitos B, com diferentes especializações (Cooper, 2006). Experimentos de imunização revelam que nestes seres é possível observar a produção de todo um repertório de moléculas capazes de reconhecer não só estruturas exógenas como também endógenas e, ainda, estruturas artificiais como proteínas compostas por aminoácidos sintéticos cuja ocorrência natural não foi descrita (Rüde, 1970). Este fenômeno, inicialmente visto como algo enigmático, foi explicado pelo modelo da recombinação somática e seleção clonal, no qual cada célula da chamada imunidade adaptativa produziria receptores antigênicos de especificidade singular e distinta, ocorrendo posteriormente processos seletivos para a constituição de um repertório de reconhecimento imunitário e subsequente reprodução de tipos celulares com certa especificidade frente a estímulos moleculares associados a sinais secundários que induzem uma resposta efetora (Burnet, 1957; Tonegawa, 1983). Ou seja, de acordo com esses modelos, nos vertebrados mandibulados, a habilidade do sistema imunitário de responder a um grande número de antígenos é possibilitada por receptores de características únicas, expressos nas superfícies de cada uma das células B e T que se formam.

Os genes que codificam esses receptores são divididos em segmentos, de forma que as características únicas de cada receptor se devem a um processo de recombinação somática que ocorre nos órgãos linfóides primários, com a posterior proliferação das células específicas dotadas dos rearranjos necessários em certa resposta (Burnet, 1957; Tonegawa, 1983). Esse evento de recombinação determina as sequências de resíduos de aminoácidos que irão compor a



região variável das imunoglobulinas. Os receptores antigênicos das células B (BCR) são compostos por 4 cadeias polipeptídicas: 2 cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L). Cada cadeia leve e pesada possui uma região constante e uma região variável, sendo o sítio de ligação ao antígeno formado pelas regiões variáveis das cadeias leve e pesada (Lewis, 1994; He *et al.*, 2018) (Figura 1). A região variável da cadeia pesada é codificada por três segmentos gênicos, um do tipo V (de variabilidade), um do tipo D (de diversidade) e um do tipo J (de junção), ao passo que a da cadeia leve é codificada apenas por segmentos dos tipos V e J (Lewis, 1994).

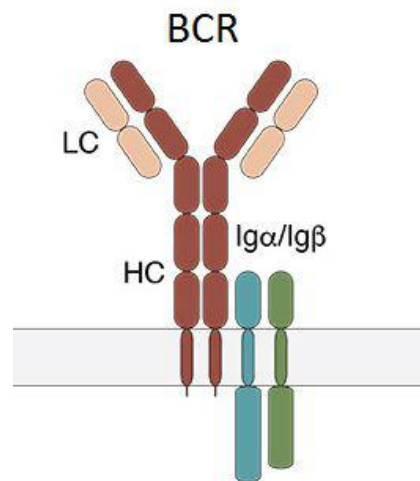


Figura 1 (adaptada de He *et al.*, 2018): estrutura do receptor antigênico de células B (BCR). Em vermelho claro, as cadeias leves (LC) e em vermelho escuro as cadeias pesadas (HC). O receptor está acoplado com as proteínas transmembrana Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ , as quais possuem motivos de ativação de imunoreceptores a base de tirosina (ITAMs), permitindo a transdução intracitoplasmática da sinalização mediante reconhecimento antigênico pelas regiões variáveis do BCR.

Após a recombinação somática, um segmento gênico de cada tipo (VH, DH e JH para a cadeia pesada e VL e JL para a cadeia leve) será utilizado, podendo ou não ocorrer modificações adicionais como a adição de nucleotídeos (Tonegawa, 1983; Alt e Baltimore, 1982). Tanto em humanos quanto em camundongos existem 5 classes principais de cadeias pesadas ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) e dois tipos de cadeia leve ( $\kappa$  e  $\lambda$ ). Os loci C $\gamma$ , C $\alpha$ , C $\mu$ , C $\delta$  e C $\epsilon$  dão origem, respectivamente, às classes de imunoglobulinas IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Existem ainda subtipos nas classes, que variam de acordo com o organismo estudado (Dekkers, 2017). Camundongos BALB/c apresentam 4 subclasses de IgG: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, formadas a partir dos loci C $\gamma$ 1,

C $\gamma$ 2a, C $\gamma$ 2b e C $\gamma$ 3 (Dekkers, 2017). Camundongos C57Bl/6, por sua vez, apresentam IgG2c em vez de IgG2a (Dekkers, 2017). Em humanos, existem 4 subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e 2 subclasses de IgA (IgA1 e IgA2) (Vidarsson, 2014; Dekkers, 2017).

São consistentemente observadas características particulares nas diferentes classes de imunoglobulinas, com IgG sendo mais comumente associada a processos de opsonização, mas sendo importante também em outros processos, como neutralização de microrganismos e ativação do Sistema Complemento. IgA é comumente associada à neutralização de microrganismos e IgE a respostas contra helmintos e sensibilização de mastócitos, basófilos e eosinófilos em processos alérgicos. No desenvolvimento dos linfócitos B, os isotipos IgM e IgD são os primeiros a ser expressos, sendo as outras classes formadas apenas após a ativação da célula B e de um processo conhecido como Recombinação de Troca de Classes (CSR), usualmente dependente de interações entre linfócitos B e T. IgM e IgD contribuem não só para ativação da célula B, mas para respostas primárias a estímulos antigênicos, sendo IgM secretada na forma pentamérica e favorecendo a deposição de proteínas do Sistema Complemento nas superfícies que reconhece, podendo promover a lise de patógenos que reconhece, além de se associar a receptores nas mucosas. Por ser secretada antes da CSR, a classe IgM é comumente utilizada na medicina diagnóstica como marcador de infecção recente, sendo o idiotipo testado (anticorpo da classe IgM com determinada especificidade) progressivamente substituído por outras classes, como IgG, no decorrer da infecção. Contudo, como será discutido posteriormente, existem células de memória secretoras de IgM, muitas vezes de maneira independente de processo infeccioso, contribuindo para funções fisiológicas e para a primeira linha de defesa contra patógenos (Bernasconi *et al.*, 2002; Bernasconi *et al.*, 2003; Klein *et al.*, 1998).

Cada região variável das cadeias leves e pesadas é composta por três porções hipervariáveis denominadas regiões determinantes de complementariedade (CDR), totalizando seis regiões determinantes de complementariedade: CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 na cadeia leve; e CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 na cadeia pesada. Essas regiões são separadas por intervalos de sequências conservadas que se dobram, aproximando os seis CDRs para a formação do sítio de ligação ao antígeno (Schroeder *et al.*, 2006). A análise das regiões determinantes de complementariedade pode ser muito importante no estudo das imunoreatividades, em especial no que diz respeito à região CDR-H3, uma vez que se encontra no centro do sítio de ligação ao antígeno. Muitas vezes a sequência de aminoácidos que constitui a região CDR-H3 é usada como

parâmetro de identificação de clones (isto é, linfócitos que passaram pelo processo de expansão clonal, gerados por mitose a partir da ativação de uma única célula B ativada) com imunoreatividade particular (Schroeder *et al.*, 2006).

Os rearranjos dos segmentos gênicos de imunoglobulina das células B se iniciam com os segmentos associados à cadeia pesada, de DH para JH, seguido pela união dos segmentos VH e DJH da cadeia  $\mu$  (Karasuyama *et al.*, 1990). Em humanos, existem aproximadamente 51 segmentos funcionais V (variáveis) conhecidos, 27 segmentos funcionais D (diversidade) conhecidos e 6 segmentos J (união) funcionais conhecidos disponíveis por *locus* para montagem da cadeia pesada. O *locus* da cadeia pesada em humanos está localizado próximo ao telômero de braço longo do cromossomo 14 e se estende para dentro em direção ao centrômero com os segmentos V na extremidade 5', seguidos pelos segmentos D e, em seguida, pelos segmentos J (Volpe *et al.*, 2008). Já em camundongos BALB/c o *locus* da cadeia pesada encontra-se no cromossomo 12, com cerca de 100 segmentos do tipo V, 13 do tipo D e 4 do tipo J (Feeney, 1993). Apesar de possuírem dois alelos para cadeia pesada, a maior parte das células B expressa apenas a cadeia pesada proveniente de um deles em sua superfície por conta de um processo conhecido como exclusão alélica (Rajewsky 1996).

Em relação às cadeias leves, o *locus*  $\kappa$  humano está localizado no cromossomo 2 e inclui cerca de 40 segmentos gênicos na região  $V\kappa$  agrupados em até sete famílias e cinco segmentos gênicos funcionais na região  $J\kappa$  e um segmento gênico na região  $C\kappa$ , ao passo que o *locus*  $\lambda$  está localizado no cromossomo 22, com aproximadamente 30 segmentos  $V\lambda$  agrupados em 10 famílias. Existem sete genes  $C\lambda$  humanos, quatro dos quais são comprovadamente funcionais e três dos quais parecem ser pseudogenes, sendo cada gene  $C\lambda$  localizado a 3' de um segmento gênico  $J\lambda$ . Já em camundongos BALB/c o *locus*  $V\kappa$  está localizado no cromossomo 6 e contém até 93 segmentos gênicos agrupados em 18 famílias, ao passo que o *locus*  $J\kappa$  contém cinco membros, sendo quatro deles funcionais (Lefranc, 2003).

A atuação do maquinário enzimático de recombinação nos referidos segmentos gênicos é possibilitada pela presença de sinais conservados de recombinação que flanqueiam cada segmento gênico e determinam o sítio de recombinação recíproca. Cada sinal é formado por uma sequência altamente conservada de 7 pares de bases (um heptâmero, normalmente formado pela sequência CACTGTG ou pela sequência CACAGTG) e uma sequência moderadamente conservada de 9 pares de bases rica em adenina e timina (um nonâmero, normalmente formado

pela sequência GGTTTTTGT ou ACAAAAAACC), separadas por espaçadores de 12 ou 23 pares de bases com sequência não conservada (Tonegawa 1983; Ramsden *et al.*, 1994). Esse espaço de 12 ou 23 pares de bases é correspondente respectivamente a uma ou duas voltas na estrutura helicoidal do DNA e, durante o processo de recombinação somática, são favorecidos rearranjos de segmentos gênicos flanqueados com espaçadores de tamanhos diferentes, isto é, rearranjos de segmentos gênicos flanqueados por espaçadores de 12 pares de bases com segmentos gênicos flanqueados por espaçadores de 23 pares de bases. Isso garante que não ocorram rearranjos de segmentos gênicos do mesmo tipo (como o rearranjo de dois segmentos V em vez de um rearranjo com segmentos V e J na cadeia leve), visto que em todos os *loci* o tamanho dos espaçadores é igual entre segmentos do mesmo tipo e difere entre os segmentos que fazem fronteira. O processo de recombinação de V (D) J é mediado pelo complexo recombinase VDJ, uma conjunto diversificado de enzimas. As principais enzimas envolvidas são as proteínas codificadas pelos genes ativadores da recombinação 1 e 2 (RAG1 e RAG2), a enzima desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) e a nuclease Artemis, que atua na via não-homóloga de reparo de DNA. O processo se inicia quando o complexo recombinase V(D)J, principalmente pela atividade da enzima RAG1, mas também com atuação de RAG2 e auxílio das proteínas HMGB (*High Mobility Group Box*) do tipo 1 ou 2, se liga a uma sequência sinal de recombinação (RSS), que flanqueia um segmento gênico recombinante, clivando então uma única fita de DNA entre a primeira base da RSS e o segmento codificante (Dai *et al.*, 2004). Com isso, forma-se um grupo hidroxil livre na extremidade 3' e um grupo fosfato livre na extremidade 5' da fita de DNA clivada, de maneira que o complexo recombinase posiciona o grupo hidroxil reativo para o ataque nucleofílico da ligação fosfodiéster da fita oposta, resultando na formação de dois terminais de DNA assimétricos: um deles, dotado do segmento codificante, com uma estrutura em grampo (*hairpin*); e o outro, dotado dos sinais de recombinação, com terminal abrupto (Dai *et al.*, 2004).

As extremidades dos terminais abruptos são ligadas formando um pedaço circular de DNA contendo todas as sequências intermediárias entre os segmentos de codificação (isto é, os sinais de recombinação). Já os terminais codificantes são processados em uma segunda etapa mediada por um grupo de fatores reparadores de DNA, incluindo Ku70, Ku80, DNAPKcs e XRCC4, sendo ainda postulado que as enzimas RAG1 e RAG2 também atuem nessa fase (Lewis e Gellert, 1989; Lieber, 1991; Dai *et al.*, 2004). Desta forma, a recombinação V(D)J resulta na

formação de duas junções de DNA: uma junção codificante, formada pela fusão dos segmentos gênicos codificantes, e uma junção dos sinais, formada pela fusão dos heptâmeros dos sinais de recombinação. Essa junção dos sinais é tipicamente precisa, sem perdas ou adições de nucleotídeos, ao passo que a junção codificante é com alguma frequência imprecisa, com perda ou adição de nucleotídeos, o que aumenta a variabilidade dos receptores antigênicos das células B, contribuindo para a maior diversidade do repertório de reconhecimento de epítopos (Lewis, 1994a). A adição de nucleotídeos pode ocorrer de forma palindrômica (P), na qual é catalisada pelas enzimas de reparo uma repetição invertida de um ou mais nucleotídeos por complementaridade da outra fita simples de DNA se a clivagem pela nuclease Artemis ocorrer em um ponto diferente do inicialmente clivado por RAG1/2; ou de forma N (de *non-template*, isto é, não relacionada à fita molde), quando a adição de nucleotídeos é realizada de forma estocástica pela enzima transferase deoxinucleotidil terminal (TdT) (Roychoudhury *et al.*, 1976; Alt e Baltimore, 1982). A expressão das enzimas RAG-1, RAG-2 e TdT ocorre pontualmente apenas durante os processos de recombinação, sendo a atividade de TdT iniciada e encerrada antes da expressão das recombinases, de forma que adições de nucleotídeos N à junção dos segmentos gênicos é menos comum nas cadeias leves que nas pesadas (Bentolila *et al.*, 1999).

Esses mecanismos garantem a geração da diversidade dos receptores das células B, contudo o equilíbrio do sistema dependerá da funcionalidade dessas imunoglobulinas, sendo necessárias etapas de seleção que ocorrerão durante o desenvolvimento da linhagem celular.

## 1.2 ONTOGENIA DOS LINFÓCITOS B

Nos vertebrados mandibulados, as células do sistema imunitário derivam de células tronco hematopoiéticas que se diferenciam em precursores mielóides e linfóides, sendo os últimos associados à formação tanto de linfócitos B quanto de linfócitos T (componentes da imunidade adaptativa) e ainda de células NK (componentes citotóxicos da imunidade inata) e da subpopulação de células dendríticas CD8 $\alpha$ +. A diferenciação das células tronco hematopoiéticas em linfócitos B parece estar intimamente associada a fatores microambientais pouco elucidados que promovem a expressão dos fatores de transcrição E2A e EBF (Sigvardsson *et al.*, 2002). Em indivíduos adultos, esse processo hematopoiético ocorre na medula óssea, com o desenvolvimento de linfócitos B nesse sítio sendo iniciado nos estágios adjacentes ao nascimento e diminuindo ao longo da vida. Contudo, durante os estágios iniciais do desenvolvimento

embrionário a medula óssea ainda não está formada. Assim, em humanos e camundongos a geração de células B no estágio embrionário e neonatal ocorre nos tecidos para-aórticos, fígado e baço (Melchers, 1991; Montecino-Rodriguez, 2012). Um resumo esquemático do desenvolvimento das subpopulações de células B de acordo com o modelo das linhagens pode ser observado na Figura 2:

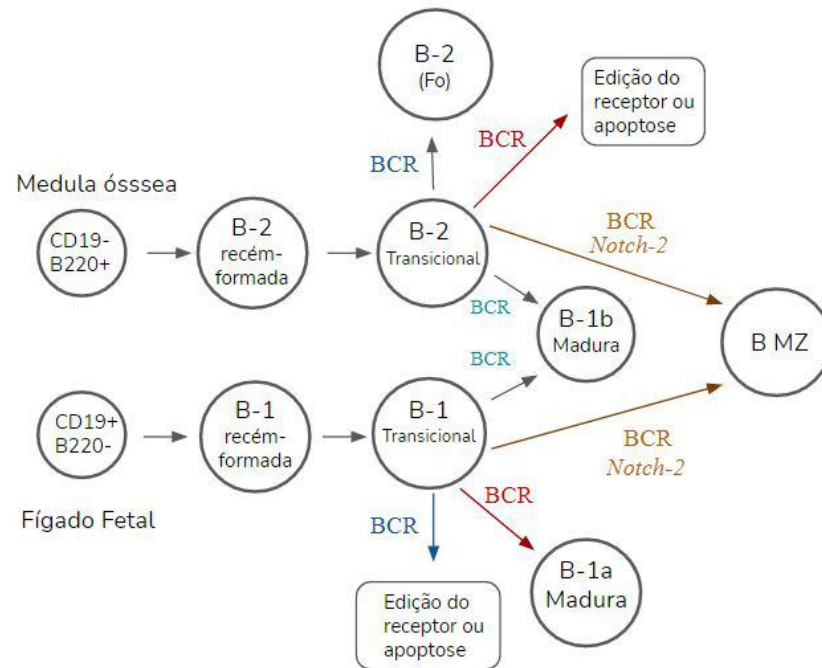


Figura 2 (adaptada de Hardy, 2006): Desenvolvimento das subpopulações de células B a partir do modelo das linhagens. Sinalização do BCR: em vermelho, reconhecimento forte; em azul, reconhecimento fraco; em verde, reconhecimento intermediário; em marrom, reconhecimento intermediário com ativação da via de Notch-2, cujos ligantes não estão completamente elucidados. Células B-1b (CD5-) podem ser formadas por precursores com ambos programas transicionais que se refletem na expressão de CD19 e B220, ao passo que células B-1a (CD5+) são majoritariamente formada pelos precursores CD19+, B220-.

O sítio hematopoiético de origem desses precursores parece contribuir para características fenotípicas dos linfócitos B produzidos. Células B-2 migram após a maturação para órgãos linfóides secundários como linfonodos, placas de Peyer e zona marginal do baço, sendo formadas principalmente por precursores provenientes da medula óssea. Já células B-1a são formadas principalmente por precursores provenientes dos sítios hematopoiéticos embrionários,

especialmente o fígado fetal, migrando após a maturação majoritariamente para cavidades serosas, como a cavidade peritoneal e a cavidade pleural, parecendo ser sua reposição na vida adulta do indivíduo puramente associada a mitoses (Hardy e Hayakawa, 2001). Células B-1b, por sua vez, parecem poder ser formadas tanto por precursores do fígado fetal quanto, em menor proporção, por precursores da medula óssea, sendo comumente caracterizadas pela expressão das mesmas moléculas de superfície presentes em células B-1a, com exceção de expressarem níveis baixos ou nulos de CD5, migrando também majoritariamente para sítios serosos (Hardy e Hayakawa, 2001). Células B-1 de ambos os tipos podem ser encontradas em menor proporção no baço, mas estão praticamente ausentes nos linfonodos e placas de Peyer (Hardy e Hayakawa, 2001).

Ainda que o modelo proposto para a geração de diversidade das imunoglobulinas suponha uma aleatoriedade no processo, observa-se diferenças consistentes nos receptores das células B-1 e B-2. As imunoglobulinas produzidas pelas células B-1 frequentemente reagem com auto-antígenos e epítomos polissacarídicos repetitivos de microrganismos, sendo geralmente dotadas de segmentos V relativamente não mutados em sua sequência codificante. Apesar das células B-1 serem minoritárias em camundongos adultos, parecem produzir a maior parte de IgM circulante e uma proporção significativa dos chamados “anticorpos naturais” presentes no soro e nas mucosas (Berland e Wortis, 2002). Define-se anticorpos naturais como os que são produzidos independentemente do contato com macromoléculas exógenas (como, por exemplo, os anticorpos que podem ser encontrados em camundongos *Germ Free* e *Antigen Free*, isto é, camundongos criados sem colonização ou contato com populações microbianas, que recebem dieta de nutrientes particulados, como aminoácidos livres, e cujos linfócitos B ainda assim secretam anticorpos). Acredita-se, portanto, que o estímulo para a secreção desses anticorpos venha do contato com auto-antígenos. O fato de suas regiões determinantes de complementaridade serem usualmente formadas por sequências de aminoácidos codificados pela linhagem germinativa parece refletir a pressão seletiva que resultou na formação da atual composição dos segmentos V(D)J, de maneira a otimizar processos fisiológicos e imunológicos mesmo sem estímulos exteriores. Talvez o exemplo mais claro desse fenômeno seja o dos anticorpos anti-fosforilcolina: gerados de forma independente do contato com antígenos exógenos, esses anticorpos apresentam imunoreatividade cruzada contra a forma oxidada da lipoproteína de baixa densidade, cuja deposição excessiva é associada a processos como o de aterosclerose, e contra o polissacarídeo C

da parede celular de *Streptococcus pneumoniae*, agente etiológico de infecções respiratórias e meningite, cumprindo simultaneamente uma função fisiológica de manutenção da integridade arterial e uma função imunitária no sentido classicamente atribuído à palavra (Schenkein *et al.*, 2001; Vale *et al.*, 2013).

A princípio, poderia-se imaginar que essas diferenças entre o repertório de imunoglobulinas de células B-1 e B-2 decorreriam de fatores de seleção nos ambientes em que são formadas, favorecendo a sobrevivência de linfócitos cujos receptores antigênicos possuísem determinadas características. Estudos recentes nesse sentido, com a construção de um sistema loxp-CRE que permitia substituir o segmento gênico variável correspondente à cadeia pesada (VH) do receptor antigênico de uma célula B-2 por um segmento VH comumente associado ao BCR de células B-1a, demonstram que as células B-2 modificadas para expressar receptor tipicamente associado a células B-1 adquiriram características fenotípicas transcricionais de células B-1a e, em ensaios de transferência adotiva, migraram para sítios tipicamente associados a células B-1a, como as cavidades peritoneal e pleural (Graf *et al.*, 2019). Porém, a baixa expressão de CD5 nessas células as tornaria mais fenotipicamente próximas de células B-1b, as quais podem ser formadas a partir de precursores na medula óssea.

A reconstrução de subpopulações de células B em experimentos de transferência adotiva para animais irradiados ainda é um tema controverso, com alguns autores alegando a possibilidade de reconstituir a população de células B-1a a partir de precursores da medula óssea (Düber *et al.*, 2009; Holodick *et al.*, 2009) e outros alegando que a reconstrução seria lenta e incompleta, sem a formação do repertório de receptores antigênicos tipicamente associados às células B-1a e com diferenças fenotípicas nos linfócitos formados (Barber *et al.*, 2011; Hardy *et al.*, 1987; Lalor *et al.*, 1989a; Lalor *et al.*, 1989b). As diferenças fenotípicas entre os precursores de células B-1 e B-2 no fígado fetal e na medula óssea, por outro lado, são bem estabelecidas. Os precursores de células B-1 são caracterizados dentre células pró-B pela expressão de AA4.1, CD19, CD43, sem a expressão de B220, ao passo que precursores de células B-2 expressam B220 e não expressam CD19 (Montechino-Rodriguez *et al.*, 2006).

De fato, existem outros indícios de que há uma mudança desenvolvimental na linfopoiese de células B, visto a expressão dos fatores de transcrição Sox17 e Lin28b em células tronco hematopoiéticas do fígado fetal mas não da medula óssea (Kim *et al.* 2007; Yuan *et al.*, 2012). A proteína Lin28b atua como inibidora pós-transcricional de Let-7, um precursor de microRNA que



age de forma interferente no fator de transcrição Arid3a, o qual modula a sinalização do receptor antigênico das células B. Dessa forma, a expressão de Lin28b nas células tronco hematopoiéticas do fígado fetal modifica toda a cascata de sinalização associada ao receptor antigênico. Todavia, mesmo a expressão ectópica de Lin28b em precursores provenientes da medula óssea é insuficiente para a reconstituição da população de células B-1a com seu repertório canônico de reconhecimento antigênico, mostrando que outros fatores também contribuem para a diferença observada no processo de linfopoiese de acordo com a origem dos precursores (Yuan *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2015). Esses indícios parecem indicar que desde um estágio bastante precoce do desenvolvimento na linhagem hematopoiética esses precursores já estariam comprometidos com processos intracelulares, que poderiam inclusive levar ao favorecimento da construção de certos tipos de receptores antigênicos. Assim, mesmo que a mudança artificial do receptor, como pelo sistema loxp-CRE, pudesse resultar em uma mudança fenotípica observável, talvez as características transcripcionais nos primeiros estágios de desenvolvimento das células B-1 não possibilitassem a formação de outros tipos de receptor, como os observados nos linfócitos B-2, pelas vias naturais.

Esses fatores são importantes pois, assim como outros, demonstram que o repertório imunológico e as formas de resposta diferem de acordo com a idade. Sabe-se, por exemplo, que idosos são mais propensos a infecções e menos responsivos a vacinas (Dorrington e Bowdish, 2013; Lord, 2013), além de terem maior propensão a doenças autoimunes (Vadasz *et al.*, 2013). Em células obtidas de animais mais velhos, observa-se consistentemente a diminuição na expressão dos genes RAG, resultando em menor produção de células B imaturas na medula óssea (Labrie *et al.*, 2005). De forma semelhante, o estudo da região determinante de complementariedade de linfócitos B humanos sugere que com a idade há uma diminuição da diversidade do repertório que parece se correlacionar com a redução da saúde do paciente (Troutaud *et al.*, 1999). Assim, uma possível explicação para a menor responsividade vacinal poderia estar associada tanto a essa menor geração de células B-2 imaturas pela medula óssea quanto ao fato de que células de memória acumuladas ao longo da vida deixariam menos espaço nos folículos dos órgãos linfóides secundários para a entrada de células B recém formadas, que teriam ainda dificuldade na concorrência por sinais de sobrevivência com essas células que já passaram por processos competitivos de maturação de afinidade. Paralelamente, a maior incidência de afecções autoimunes nesses indivíduos poderia estar associada a uma diminuição

da representatividade de células B-2 nos folículos, pela diminuição da produção de células B imaturas na medula óssea, e um aumento da participação das células B-1 no repertório dos nichos periféricos, já que os receptores antigênicos das células B-1 estão mais associados ao reconhecimento autólogo, em especial no que diz respeito às células B-1a (Murakami e Honjo, 1995).

Desta forma, para a compreensão das imunoreatividades e da formação de respostas efetoras, é preciso levar em consideração não só os padrões globais de reconhecimento antigênico, mas também como estes são alterados ao longo do desenvolvimento do organismo e se há relação entre certos tipos de reatividade e subpopulações linfocitárias.

A gestação humana dura em média cerca de 38 semanas, podendo-se encontrar células pré-B a partir da 7ª semana, células B imaturas a partir da 9ª semana, células B expressando IgM e IgD em suas superfícies a partir da 13ª semana e plasmócitos a partir da 16ª semana. Ao fim do segundo trimestre a produção de células B é gradativamente redirecionada para a medula óssea, onde continua a ocorrer pelo resto da vida, ao passo que a produção hepática, em contraposição, cessa. Já a gestação murina dura cerca de 3 semanas, com a hematopoiese sendo iniciada cerca de 7 dias após a fertilização, quando células precursoras no saco vitelino se diferenciam em células eritróides primitivas e nucleadas (em contraposição às hemácias, anucleadas, do indivíduo adulto). Essas células são responsáveis pelo transporte de oxigênio no embrião. A partir do oitavo dia de gestação, quando iniciam-se os batimentos cardíacos, pode-se detectar células tronco hematopoiéticas capazes de gerar todos os tipos celulares das linhagens sanguíneas na região Aorta-Gônada-Mesonefros. No 11º dia de gestação, já são encontradas células tronco hematopoiéticas no saco vitelínico, na placenta e no fígado fetal, que aos poucos passará a dominar o processo hematopoiético nos estágios iniciais de desenvolvimento. Células pré-B podem ser encontradas a partir do 12º dia de gestação e células B expressando IgM na membrana podem ser encontradas a partir do 16º dia. O número de células tronco hematopoiéticas se expande no fígado fetal a partir do 13º dia, atingindo seu pico por volta do 16º dia. A partir desse ponto, a medula óssea em formação passa gradualmente a assumir a produção das células B (Schroeder, 2006).

Cada estágio particular de diferenciação das células B pode ser caracterizado pela expressão de moléculas de superfície (como, por exemplo, antígenos de reconhecimento, moléculas de adesão e receptores de quimiocinas ou citocinas), bem como pelo conjunto de

fatores transcricionais que determinam a expressão gênica em cada etapa e pelo estado de rearranjo dos genes que dão origem às cadeias pesada e leve do receptor antigênico (imunoglobulina) (Figura 2). As células tronco hematopoiéticas são caracterizadas por apresentar o antígeno 1 associado a células tronco (Sca-1) em sua superfície e pela alta expressão de CD117 (uma molécula também conhecida como c-Kit, um receptor tirosina-quinase), essencial para a interação com fator de células tronco (SCF), uma citocina que existe tanto de forma solúvel quanto ancorada a membranas celulares e que direcionará o desenvolvimento da célula para sua forma de progenitora multipotente (Kyle-Cezar *et al.*, 2007). A sinalização pelo fator de células tronco ajuda a manter as células tronco hematopoiéticas e as células progenitoras multipotentes derivadas destas nos nichos apropriados de desenvolvimento. Já a interação entre SCF e c-Kit leva à diferenciação das células progenitoras multipotentes, que perdem a capacidade de proliferação extensiva, mas que ainda podem se diferenciar em diferentes linhagens hematopoiéticas (Bernstein *et al.* 1991).

No período fetal, células tronco hematopoiéticas primitivas, derivadas da região Aorta-Gônada-Mesonefros, recebem sinalização pelo ligante de c-Kit e pela quimiocina CXCL10, sendo atraídas para o fígado fetal, onde completam seu desenvolvimento em contato com os microambientes mesenquimais e epiteliais, ricos em quimiocinas como CXCL10, CXCL12, CCL7, CCL9, e CX3CL1 (Yokomizo *et al.*, 2011; Tsuneto *et al.*, 2013).

Já na medula óssea, os precursores hematopoiéticos expressam também o receptor de quimiocinas CXCR4 que interagirá com a quimiocina CXCL12, derivada de células estromais da medula óssea, e assim se manterão no microambiente adequado para a prossecução do desenvolvimento (Funk *et al.*, 1993).

A partir deste ponto, as principais diferenças na ontogenia da linhagem B no órgão linfóide primário, nos contextos fetal e pós-natal, estão associadas ao fato de que na medula óssea: há geração de células B a partir de precursores hematopoiéticos por todo o restante da vida do indivíduo; há a formação de um repertório mais diverso de imunoglobulinas, possivelmente pelo contato com estímulos moleculares não totalmente elucidados, com maior adição e deleção de nucleotídeos nas regiões juncionais dos segmentos gênicos V(D)J, gerando um maior número de receptores antigênicos com regiões determinantes de complementariedade distintas; há a sustentação de populações periféricas (*pools* periféricos) de células B. De toda forma, com a progressão do desenvolvimento, seguindo um gradiente de sinalizações moleculares, as células

tronco hematopoiéticas, precursores multipotentes, precursores linfóides e linfócitos B em desenvolvimento migram da parte externa da região medular para a mais interna, seja esta região medular do fígado fetal ou da medula óssea do indivíduo formado (Hardy e Hayakawa, 2001).

Conforme se comprometem com a linhagem linfóide, as células precursoras, já apresentando c-Kit e Sca-1 (Figura 3), passam a expressar o receptor flt-3 que interage com seu ligante na membrana das células estromais, desencadeando a sinalização para que a célula precursora inicie a síntese do receptor de interleucina-7 (IL-7R, também conhecido por CD127). A sinalização por interleucina-7 (IL-7) é essencial para o desenvolvimento dos progenitores linfóides comuns (CLP) e das células B, promovendo, pelo acoplamento do receptor IL-7R à via da Janus Quinase e Transdutor de Sinal Ativador de Proteínas de Transcrição (JAK-STAT), o aumento na produção de moléculas anti-apoptóticas, como MCL1, bem como o aumento na expressão de genes de proliferação celular como c-myc e n-myc (Clark *et al.*, 2013). Experimentos em camundongos demonstram que células estromais de medula óssea obtidas de indivíduos em idade avançada produzem menos IL-7 e que linfócitos B obtidos desses mesmos indivíduos respondem menos à sinalização por IL-7 (Labrie *et al.*, 2005), demonstrando o efeito da idade tanto em nível secretório quanto recipiente, o que ressalta a importância do estudo desses processos ao longo do desenvolvimento do animal.

No momento em que passa a expressar o receptor flt-3, a célula precursora perde o potencial eritróide, sendo esta então uma etapa marcante do comprometimento ontogênico, ainda que neste ponto seja possível o engajamento tanto com a linhagem de desenvolvimento mielóide quanto linfóide (Zriwil *et al.*, 2018). Prosseguindo no comprometimento com a linhagem linfóide, há um aumento na expressão de IL-7R e EBF1 e diminuição na expressão de c-Kit e Sca-1, levando à formação de células LMPP: *Lymphoid-primed Multipotent Progenitor*, isto é, células precursoras comprometida com a linhagem linfóide. Inicia-se ainda a expressão dos genes RAG (1 e 2) e a produção da enzima TdT (Figura 3), de forma que o rearranjo dos segmentos gênicos DH e JH é desencadeado ainda nos precursores linfóides comuns (Figura 3), sendo então possível observá-lo também em precursores de células T (Alt *et al.*, 1984). Com este rearranjo e a expressão de B220 e MHC de classe II, formam-se as chamadas células pró-B precoces (*Early pro-B cells*).

Em seguida, com a junção de um segmento VH ao rearranjo D-JH, formam-se as células pró-B tardias. As células pró-B tardias tornam-se células pré-B precoces ao expressar a cadeia  $\mu$

citoplasmática com cadeias leves provisórias, configurando o receptor das células pré-B. As caudas citoplasmáticas da cadeia pesada dos receptores de células B são muito curtas para entrar no citoplasma e transmitir um sinal de ligação ao antígeno, sendo então a transdução do sinal de ligação do antígeno ao BCR possibilitada pela associação com as proteínas transmembrana  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$ , as quais possuem motivos de ativação de imunoreceptores a base de tirosina (ITAMs) que se fosforilam em resposta à ligação do antígeno ao BCR, iniciando uma cascata de sinalização citoplasmática. Após a expressão da cadeia  $\mu$ , ocorre a suspensão temporária da expressão e dos genes RAG 1 e RAG 2 e as células pré-B que tiveram sucesso em parear a cadeia pesada rearranjada com a cadeia leve provisória sofrem sucessivas mitoses dependentes da integração do sinal gerado através da associação do pré-BCR com  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$  com a do sinal gerado pelos receptores de interleucina 7 (Rolink *et al.*, 2000). É possível que ligantes desconhecidos também desempenhem papel importante nesse estágio. Em animais adultos, parecem ser favorecidas células cujo rearranjo da cadeia pesada utilizou segmentos VH mais distantes dos segmentos D-JH no processo proliferativo (Boekel *et al.*, 1997). Como as células em divisão são maiores que as células em repouso, as células pré-B precoces também são chamadas de células pré-B grandes.

Após a proliferação, o rearranjo dos segmentos gênicos que darão origem à cadeia leve é iniciado. As células pré-B tardias, também chamadas de células pré-B pequenas, resultantes das sucessivas mitoses anteriores, realizam o rearranjo  $V\kappa-J\kappa$  nos segmentos gênicos da cadeia leve e, caso este não seja produtivo, é realizado o rearranjo  $V\lambda-J\lambda$  (Gorman e Alt, 1998). Este processo se inicia pela união de uma região V a uma região J, de forma que o complexo VJ permanece separado da região C da cadeia leve por um íntron, até o momento da transcrição em que o *splicing* leva à remoção do íntron e resulta na formação de um transcrito V-J-C maduro. O sucesso na formação da cadeia leve rearranjada com a cadeia pesada anteriormente produzida leva à expressão de IgM de superfície, caracterizando o estágio de célula B imatura. Essas células expressam baixos níveis das moléculas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xl, além de expressarem na membrana altos níveis de Fas, uma molécula capaz de transmitir sinalização de morte celular quando entra em contato com seu ligante. Nesse momento, pode ocorrer a seleção negativa, em que a interação de alta afinidade do receptor antigênico com um ligante pode resultar na edição do receptor por rearranjo no outro alelo da cadeia leve se ainda disponível (Tiegs *et al.*, 1993), na substituição do segmento gênico VH (Zhang *et al.*, 2004), em anergia ou em morte celular, podendo estes processos estar associados à modelagem de um repertório de reatividade

relativamente conservado (Schelonka *et al.*, 2007). Essa hipótese é fortalecida quando leva-se em conta que a ausência de sinalização pelo BCR também pode resultar em morte celular, demonstrando que podem ser necessários de sinais de sobrevivência associados ao BCR e interações com ligantes desconhecidos (Lam *et al.*, 1997; Freitas e Rocha, 2000). As células B-2 imaturas são comumente classificadas em estágios transicionais, sendo as células T1 caracterizadas pela expressão de IgM de membrana, CD24 e CD93, sendo negativas para CD21 e CD23. Nessas células, já se inicia o *splicing* alternativo no *locus* C $\mu$ -C $\delta$  IgD, levando à co-expressão de IgM e IgD na membrana citoplasmática, porém ainda com baixas taxas de IgD. As células B imaturas no estágio transicional T1 deixam o órgão linfóide primário pela corrente sanguínea, através dos capilares sinusóides, e adentram o baço pela arteríola central. Nas bainhas linfóides periarteriolares, ocorre a mencionada seleção negativa. As células que passam por esse processo adentram os folículos e prosseguem com o desenvolvimento, diminuindo a expressão de CD24 e CD93 e aumentando a expressão do Receptor do Fator de Ativação de Linfócitos B (BAFF-R) e de IgD de membrana, caracterizando o estágio transicional T2. O Fator de Ativação de Linfócitos B (BAFF) é produzido por células da linhagem mielóide e é essencial para a sobrevivência das células B-2 nesse estágio de transição. Assim, a expressão de BAFF-R pelas células B-2 no estágio T2 é de suma importância e este parece ser também um mecanismo de seleção, agora positiva, visto que a expressão de BAFF-R é dependente da sinalização pelo BCR (Schweighoffer *et al.*, 2013). Evidências da seleção positiva incluem experimentos que examinaram a maturação de células B no baço de camundongos com BCRs transgênicos, sugerindo que a seleção positiva mediada por ligantes seria necessária para entrada da célula B madura no pool periférico (Cyster *et al.*, 1996) e comparações de repertórios de imunoglobulinas de células B virgens imaturas e maduras, revelando diferenças consistentes no uso dos segmentos gênicos V, incluindo expansão de clones selecionados, o que implicaria que muitas células B pré-imunes convencionais seriam selecionadas por ligantes (Gu *et al.*, 1991; Levine *et al.* 2000). Nesse sentido, são observadas ainda diferenças no repertório de camundongos *germ free*, isto é, criados em condições que impedem contato com qualquer microrganismo, e de camundongos controle (colonizados), mostrando que ligantes de origem microbiana contribuem para a seleção do repertório (Chen *et al.*, 2018). Quando cessa a expressão de CD24 e CD93 e a expressão de IgD na membrana chega a seu pico, as células B-2 se tornam maduras e migram para os folículos linfóides dos órgão linfóides secundários (Engel, 1995; Kövesdi, 2010). As células B-1

transicionais, por sua vez, não dependem da interação com BAFF e as interações fortes de antígenos com o BCR parecem promover seleção positiva em vez de negativa (Miller *et al.*, 1992). Outra subpopulação de células B, as células B da zona marginal do baço (MZ), também passam por estágios de transição diferenciados: apesar de requererem sinalização por BAFF, como as células B-2, o desenvolvimento do fenótipo MZ está associado à sinalização pela via do receptor Notch 2 (Saito *et al.*, 2003). O resumo esquemático do desenvolvimento das células B pode ser observado na Figura 3:

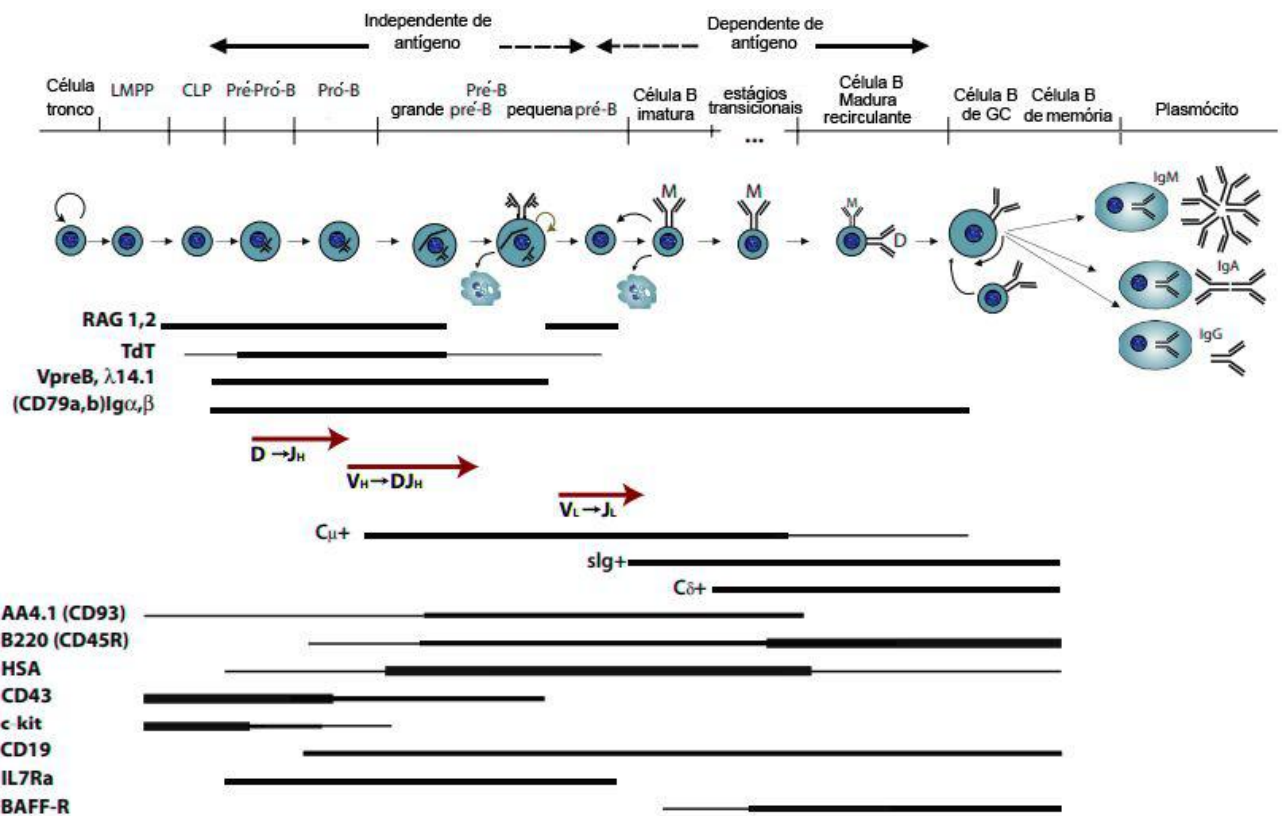


Figura 3 (adaptada de Vale *et al.*, 2015): Modelo esquemático da diferenciação das células B. É mostrada a expressão de genes e moléculas (tracejados pretos) ao longo dos diferentes estágios de maturação.

Ao fim do programa de maturação, as células B-2 migram principalmente para os folículos linfóides, direcionadas pela interação da quimiocina CXCL13, secretada por células dendríticas foliculares, com o receptor CXCR5 expresso na membrana linfocitária, mas não permanecem estáticas nesses sítios: recirculam através do sangue e da linfa retornando aos folículos em ciclos sucessivos. Já as células B-1 migram principalmente para as cavidades serosas seguindo um gradiente da quimiocina CXCL13, secretada por macrófagos peritoneais e

células do omento (Ansel *et al.*, 2002). O fato da mesma quimiocina guiar essas diferentes subpopulações para diferentes sítios anatômicos parece indicar tanto a presença de outros estímulos moleculares nesse processo, incluindo fatores ligados ao estágio de desenvolvimento do indivíduo, considerando a origem majoritariamente fetal/neonatal das células B-1 e majoritariamente pós-natal das células B-2.

Desta forma, a compartimentalização das células B é bem característica: no baço, encontram-se, além das células B transitórias, as células B-2 foliculares, as células B de zona marginal e, em menor proporção, células B-1a e B-1b; os linfonodos periféricos, por sua vez, abrigam principalmente células B-2 recirculantes, frequentemente associadas à memória imunológica; por fim, nas cavidades serosas, como peritoneal e pleural, encontram-se principalmente linfócitos B-1a e B-1b, mas também uma pequena população de linfócitos B-2 (Lortan *et al.*, 1987).

Os processos de geração de diversidade das imunoglobulinas levam à formação do repertório emergente e as imunoglobulinas presentes nas células B dos órgãos linfóides secundários constituem o chamado *repertório disponível* de reconhecimento antigênico. Mas há ainda o *repertório atual*, composto pelas imunoglobulinas presentes em plasmócitos e secretadas, circulantes nos fluidos corporais. A formação do repertório atual depende de um processo adicional, de ativação das células B em contato com um estímulo antigênico e sinais secundários ou co-estimulatórios.

### 1.3 ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS B

Para que a homeostase seja mantida, a secreção de imunoglobulinas, que levará à formação do chamado repertório atual, é um processo regulado, dependente de uma combinação de fatores que levarão à ativação dos linfócitos B. Ainda que sinais secundários sejam essenciais para a ativação, servindo como forma de controle, o sinal primário essencial é o reconhecimento de um antígeno pelo receptor antigênico da célula B (BCR). O contato do BCR pode se dar tanto com antígenos solúveis, os quais podem ser filtrados do sangue pelo baço ou atingir os linfonodos pela circulação linfática, quanto com antígenos apresentados por outras células ou ainda na superfície de microrganismos. A ativação dos linfócitos B *in vivo* é comumente definida pela associação entre antígenos e receptores antigênicos de forma a aproximá-los das jangadas lipídicas associadas a moléculas como Lyn, com atividade tirosina quinase, levando a uma



transdução de sinal intracelular, sendo este processo amplificável por interações com moléculas secretadas ou de superfície expressas por células T ou células da imunidade inata. Para isso, as células B precisam migrar para sítios apropriados nos órgãos linfóides secundários e se associar corretamente, por adesão de superfície, com outras células, de forma que a célula B que receba os sinais corretos no local correto sofrerá expansão clonal, produzindo células secretoras de anticorpos ou células de memória com alta afinidade (Rajewsky, 1996).

A ligação dos antígenos à IgMs de superfície leva a alterações conformacionais nos BCRs, aproximando-os das jangadas lipídicas, de forma que as tirosinas quinases Lyn possam fosforilar os componentes de sinalização Ig- $\alpha$  (CD79A) e Ig- $\beta$  (CD79B), que possuem caudas intracitoplasmáticas com Motivos de Ativação de Imunoreceptores a base de Tirosina (ITAMs), expondo sítios para recrutamento e ativação de proteínas de três famílias de tirosinas quinases: Syk, Src e Tec (Reth, 1989; Yamanashi *et al.*, 1991; Stepanek *et al.*, 2013). Essas proteínas quinases fosforilam suas respectivas proteínas adaptadoras, definidas como moléculas com um grande número de sítios de ligação para outras proteínas, facilitando a formação de grandes complexos de sinalização que interagirão com enzimas produtoras de mensageiros secundários (Takata *et al.*, 1994; Cox *et al.*, 1996; Law *et al.*, 1996; Fu *et al.*, 1998; Okada *et al.*, 2000).

A ativação de Syk leva à fosforilação e ativação de proteínas como BLNK, Btk e PLC $\gamma$ 2 (Niiro e Clark, 2002). A atividade tirosina quinase de Syk promove por ao menos duas vias a localização de membrana da proteína fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) através de interações com sua subunidade p85: tanto pela fosforilação de CD19, que permite o recrutamento e ativação de p85, quanto pela fosforilação de Cbl, uma ubiquitina ligase, que permite sua interação com p85 e ativação de PI3K (Otero *et al.*, 2001; Yokozeki *et al.*, 2003). A atividade conjunta de Syk e Btk leva à fosforilação de BCAP, uma proteína adaptadora de PI3K, a qual direciona p85 para microdomínios ricos em glicolípídeos após o contato do BCR com o antígeno (Okada *et al.*, 2000). Desta forma, PI3K catalisa a conversão de fosfatidilinositol 4,5-trifosfato em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), o qual é essencial para a translocação de Akt, uma proteína de atividade serina/treonina quinase. Uma vez corretamente posicionada na membrana através da ligação com PIP3, Akt pode ser fosforilada por suas quinases ativadoras, como a Quinase 1 Dependente de Fosfoinosítídeo (PDPK1, na treonina 308) e o Alvo em Mamíferos para o Complexo 2 da Rapamicina (mTORC2, na serina 473). A fosforilação por mTORC2 estimula a subsequente fosforilação de Akt pela Proteína Quinase 1 Dependente de

Fosfoinosítídeo (PDPK1), levando à ativação de Akt (Jacinto *et al.*, 2006; Sarbassov *et al.*, 2005). Uma vez ativada, Akt pode ativar ou desativar seus substratos (por exemplo, mTOR1) por meio de sua atividade quinase. A fosforilação de Akt e estimulação do BCR levam ainda à inibição da proteína pró-apoptótica Bad e ativação das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-XL (Datta *et al.*, 1997). Nesse momento, Akt também fosforila o fator de transcrição FOXO, induzindo sua saída do núcleo e promovendo assim programas transcricionais de proliferação celular (Yamagata *et al.*, 2008). Uma das consequências mais expressivas dessa cascata de sinalização é a ativação, por Akt, das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da quinase I $\kappa$ B, levando à ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, que controla uma série de genes associados ao processo inflamatório (Bai *et al.*, 2009). Adicionalmente, a fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$  leva à sua degradação pela via proteassomal, expondo a subunidade RelA de NF- $\kappa$ B, o que leva à translocação da mesma e ao aumento na expressão de proteínas associadas à proliferação e sobrevivência celular, como c-Myc e proteínas da família Bcl-2 (Grumont *et al.*, 2002). Lyn, Syk e Blk podem também fosforilar e exacerbar a ativação de PLC $\gamma$ 2, que hidrolisa fosfatidilinositol 4,5-bifosfato em inositol 3,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), levando à mobilização de cálcio e estimulando a atividade da proteína quinase C (PKC). PLC $\gamma$ 2 fosforilada também leva à ativação da via das MAP quinases, o que também contribui para a translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo celular (Ishiai *et al.*, 1999).

Para que a ativação realmente ocorra, no entanto, são necessários sinais secundários, como sinais co-estimulatórios providos por outras células ou como o reconhecimento de ligantes de receptores do tipo Toll (TLR). Os TLRs constituem uma família ancestral de receptores, com características conservadas por milhões de anos de evolução, sendo encontrados tanto em vertebrados quanto em invertebrados, e desempenhando um importante papel no reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs, que na verdade podem ser encontrados também em microrganismos não patogênicos), os quais são extremamente conservados. Um exemplo é o Lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa de bactérias Gram Negativas, o qual é reconhecido por TLR-4. Existem características comuns aos TLRs, como regiões ricas em repetições de resíduos de leucina na porção extracelular, um domínio transmembrana e um domínio Receptor Toll/Interleucina-1 (TIR) na região citosólica (Bernasconi *et al.*, 2003).

O reconhecimento de ligantes de Toll pelos TLRs inicia uma cascata de sinalização mediada pela interação do domínio TIR com diferentes proteínas adaptadoras, como a proteína do Gene de Resposta Primária de Diferenciação Mielóide 88 (Myd88), o Domínio de TIR Contendo o Adaptador Indutor de Interferon- $\beta$  (TRIF), a proteína do Domínio do Receptor Toll/Interleucina-1 Contendo Proteína Adaptadora (TIRAP), a Molécula Adaptadora Associada a TRIF (TRAM) e a Proteína Contendo Motivo de Alfa-Estéril e Tatu (SARM) (Barton e Medzhitov, 2003). Myd88 é a proteína adaptadora mais comum, mediando sinalização de todos os TLRs, com exceção do TLR3, cuja sinalização ocorre por intermédio de TRIF. A interação de um ligante com TLR4 inicia tanto as vias de Myd88 quanto de TRIF. Já TIRAP, TRAM e SARM estão associadas a papéis regulatórios e auxiliares nas vias de Myd88 e TRIF (Kawasaki e Kawai, 2014). O resultado da sinalização pelos TLRs é a ativação da expressão de genes com atividade pró-inflamatória e antimicrobiana pela ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B, como o Fator Regulatório de Interferon-3 (IRF3) e como a Proteína Ativadora 1 (AP-1) (Kawasaki e Kawai, 2014). Vale ressaltar que a estimulação com ligantes de receptores do tipo Toll em grandes quantidades pode levar à ativação policlonal dos linfócitos B, os quais, nesse contexto, secretam imunoglobulinas de forma independente da sinalização por BCR (Sverinsson, Andersson e Möller, 1972; Sverinsson e Larsson, 1986; Browne, 2012). Esse artifício é utilizado em culturas de células B recuperadas de órgãos linfóides para que se obtenha um sobrenadante rico em imunoglobulinas que possa ser utilizado em ensaios experimentais (Sverinsson, Andersson e Möller, 1972; Sverinsson e Larsson, 1986; Nobrega *et al.*, 1993). Outro resultado da sinalização pelos TLRs é o aumento da expressão de MHC e da apresentação antigênica, bem como o aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias como CD80 e CD86, que auxiliam nas interações com células T (Kawasaki e Kawai, 2014).

Essa interação com células T é importante para a troca de classe de imunoglobulinas, sendo as respostas resultantes dos processos de ativação classificadas como T- dependentes, nas quais há interação com células T CD4<sup>+</sup>; e T-independentes (Noelle e Snow, 1990). As células T, também constituintes da imunidade adaptativa, apresentam receptores antigênicos gerados por processo de recombinação, mas com a particularidade de que há uma restrição em relação ao reconhecimento antigênico: reconhecem apenas peptídeos na fenda do complexo maior de histocompatibilidade (MHC). Todas as células nucleadas de mamíferos expressam MHC de classe I (MHC-I) e antígenos gerados endogenamente nessas células são ligados a moléculas de

MHC-I e apresentados na superfície celular. Esta via de apresentação antigênica permite a detecção de células transformadas ou infectadas que exibam peptídeos de proteínas mutadas ou exógenas. Tal detecção é realizada pelas células T CD8+, que possuem atividade citotóxica. Já antígenos do espaço extracelular e, por vezes, também endógenos, são processados em vesículas endocíticas e apresentados na superfície celular por MHC-II, que pode ser reconhecido pelas células T CD4+, também chamadas de células T auxiliares, as quais secretam citocinas e sinais moleculares para coordenar e direcionar as respostas imunitárias inata e adaptativa (Noelle e Snow, 1990).

Nas respostas humorais T-dependentes, as células B ativadas pelo contato com o antígeno e sinais secundários, como ligantes de Toll, se aglomeram na fronteira dos folículos com as zonas de células T, tentando se engajar nas chamadas interações cognatas, que ocorrem entre células B e T que reconhecem um mesmo antígeno (mas não necessariamente o mesmo epítipo) (Garside *et al.*, 1998; Okada *et al.*, 2005). É comum, neste contexto, que o contato inicial com o antígeno se dê por intermédio de células dendríticas foliculares. Antígenos circulantes podem entrar em contato com componentes do Sistema Complemento, um grupo de proteínas sintetizadas pelo fígado e que circulam pelo sangue de forma inativa até o contato com padrões moleculares levar à deposição sequencial desses componentes. As células dendríticas foliculares possuem receptor para a proteína C3 do Sistema Complemento, bem como para a porção Fc de anticorpos circulantes. Desta forma, as células dendríticas foliculares podem levar antígenos íntegros em sua superfície para linfócitos B. No reconhecimento antigênico pelo BCR, a célula B inicia o processo de endocitose mediada por receptor, através de vesículas recobertas por clatrina, sendo então o ligante degradado pelos conteúdos lisossomais e iniciando-se o processo de apresentação de peptídeos por MHC de classe II. As células T CD4+ previamente ativadas podem então reconhecer peptídeos na fenda do MHC-II. Nestas células T CD4+ foliculares há uma elevada expressão de moléculas de superfície importantes nas interações cognatas, como a molécula CD40L que interage com CD40 da célula B, podendo levar à proliferação da célula B, maturação de afinidade e recombinação troca de classe (CSR) de imunoglobulina (Figura 4). A interação entre CD40L e CD40 é tão importante para a CSR que deficiências nessas moléculas levam à rara síndrome de hiper-IgM, caracterizada pela baixa ou ausente produção de outras classes de imunoglobulinas, com impacto negativo na formação de memória imunitária humoral e levando o indivíduo ao comprometimento da homeostase imunológica (Notarangelo *et al.*, 2006).

O reconhecimento do antígeno pelo BCR consiste no primeiro sinal de ativação, sendo a intensidade desse sinal potencialmente amplificada pelo complexo CD19, composto pelas moléculas CD21, CD19, CD81 e CD225, permitindo o reconhecimento da proteína C3 do Sistema Complemento por CD21 e a subsequente transdução do sinal pelo restante do complexo (Carter e Fearon, 1992). Mas, como mencionado, os sinais secundários serão essenciais para a conclusão da ativação e formação da resposta. Na interação com as células T, sinais co-estimulatórios ocorrem também entre as moléculas ICOSL, CD80 (B7.1)/CD86(B7.2) e PDL-1 da superfície da célula B com os receptores ICOS, CTLA-4 e PD-1, respectivamente, na superfície da célula T. Assim como a interação entre CD40L e CD40, a interação entre PD-1 e PDL-1 parece ser importante para respostas com formação de centros germinativos e geração de anticorpos de alta afinidade (Good-Jacobson *et al.*, 2010). A molécula CD28, constitutivamente expressa na superfície de linfócitos T, também pode promover proliferação e CSR em células B se interagir com a molécula CD86 das mesmas, mas inibir estes processos caso interaja com a molécula CD80. A co-estimulação por CD28 pode ainda ser contrabalanceada no contexto de alta expressão de CTLA-4 na célula T, uma vez que CTLA-4 pode se ligar com maior afinidade a CD80 e CD86, bloqueando a interação com CD28 (Walker e Samson, 2011).

Todas essas interações dependem ainda de moléculas de adesão celular, como integrinas, em um primeiro momento, sendo a sinapse imunológica subsequentemente mantida por interações homotípicas entre moléculas SLAM e SAP presentes na superfície de ambas as células (Sayos *et al.*, 1998). Adicionalmente, há a liberação de citocinas, o que talvez seja um dos pontos mais importantes na interação cognata. Durante a interação, a célula B libera interleucina-6 (IL-6), essencial para a manutenção das células T foliculares (sendo esta interleucina também liberada por células dendríticas foliculares) (Nurieva *et al.*, 2010). Ao receber IL-6, a célula T secreta interleucina-21 (IL-21), promovendo a proliferação da célula B, bem como a diferenciação em plasmablasto, secreção de imunoglobulinas e CSR.

De fato, a troca de classe de imunoglobulinas é extremamente dependente dos sinais moleculares solúveis recebidos pela célula B, sendo observada em camundongos a troca de classes para IgG1 e IgE na presença de IL-4 (Snapper *et al.*, 1988), IgA e IgG2b na presença de TGF- $\beta$  (Garcia *et al.*, 1996), IgA na presença de IL-5 e ácido retinóico (Nikawa *et al.*, 2001), bem como de IgG2a e IgG3 na presença de IFN- $\gamma$  (Bossie e Viteta, 1991; Snapper *et al.*, 1992); ao passo que em humanos foram observadas trocas para IgG1 e IgG3 na presença de IL-10

(Brière *et al.*, 1994), IgG1 e IgE na presença de IL-4 (Claassen *et al.*, 1990), IgG4 e IgE na presença de IL-4 e IL-13 (Punnonen *et al.* 1993), bem como para IgA na presença de TGF- $\beta$  (Nilsson *et al.*, 1991), não sendo tão claro o direcionamento para uma classe específica na presença de IFN- $\gamma$ . De forma geral, os mecanismos do direcionamento da troca de classes ainda estão em processo de elucidação. Ainda que se saiba que a estimulação por IL-4, por exemplo, leva à expressão do fator transcricional STAT6 e que os promotores para as sequências de região constante C $\gamma$ 1 (associada à classe IgG1) e C $\epsilon$  (associada à classe IgE) possuem sítios de ligação para STAT6 (Hebenstreit *et al.*, 2006), não está claro o que exatamente determinará que a célula em contato com IL-4 passe a produzir IgG1 ou IgE após a CSR. Um resumo esquemático dos eventos da ontogenia pode ser visto na Figura 4.

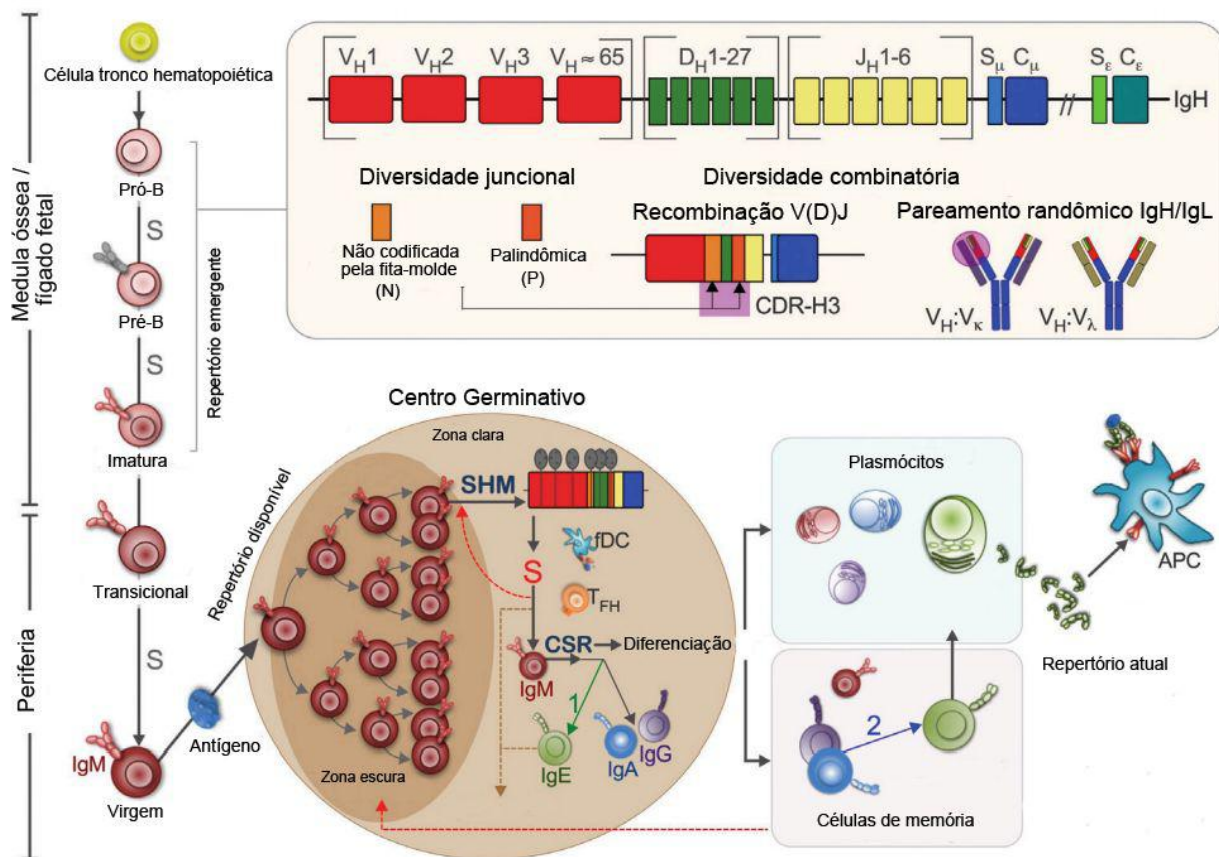


Figura 4 (adaptada de Gould e Wu, 2018): Ontogenia e desenvolvimento do repertório de células B. A partir do canto superior esquerdo: o repertório emergente de células B nos órgãos linfóides primários (medula óssea ou fígado fetal, a depender do estágio de desenvolvimento do indivíduo) adquire diversidade combinatória e juncional (mostrada na caixa) por meio de recombinação de segmentos

gênicos dos tipos V (D) J (apenas a cadeia pesada está ilustrada); de pareamento aleatório da cadeia pesada com a cadeia leve ( $\lambda$  ou  $\kappa$ ); e edição de nucleotídeos N / P nas junções CDR-H3 (retângulo roxo). Após a maturação, os linfócitos migram para as periferias e as imunoglobulinas presentes em suas membranas constituem o chamado repertório disponível. Mediante ativação por contato com antígeno na periferia, as células B migram para os centros germinativos (GC) dos órgãos linfóides secundários, onde sofrem expansão clonal na zona escura e subsequente hipermutação somática (SHM), que leva a modificações no BCR. Na zona clara dos GC, na presença de células T foliculares (TFH) e Células Dendríticas foliculares (fDC), as células B que sofreram SHM competem pelo antígeno e por sinais de sobrevivência (podendo realizar um ciclo, pontilhado em vermelho), o que leva à seleção das que acumularam mutações que favorecem o reconhecimento do antígeno em questão, processo esse conhecido como maturação de afinidade. As células B podem sofrer recombinação de troca de classes e se diferenciar em células B de memória ou plasmócitos secretores de anticorpos (que constituem o repertório atual).

Por conta da restrição de reconhecimento dos receptores antigênicos das células T por peptídeos na fenda do MHC, é comum que se diga que as respostas T-dependentes se dão contra antígenos proteicos. Mas esse nem sempre é o caso: a vacina conjugada para *Haemophilus influenzae* tipo B, por exemplo, é composta pela conjugação da fração capsular polissacarídica do microrganismo conjugada ao toxóide tetânico, de natureza proteica. Dessa forma, o receptor antigênico da célula B pode reconhecer a porção sacarídica, internalizar e processar a molécula e apresentar para a célula T CD4<sup>+</sup> um peptídeo do toxóide tetânico conjugado. Assim, a interação entre CD40L da célula T CD4<sup>+</sup> e CD40 da célula B pode promover a troca de classe de imunoglobulina, de maneira que a célula B poderá, por exemplo, produzir anticorpos da classe IgG contra o antígeno capsular de natureza polissacarídica (Cochi *et al.*, 1985; Kelly *et al.*, 2004). Da mesma forma, o reconhecimento de um antígeno proteico pela célula B e pela célula T cognata não precisa se dar pelo mesmo epítipo, de maneira que a região determinante de complementariedade das IgG produzidas não terá restrição de reconhecimento por peptídeos que encaixem na fenda do MHC.

A célula B ativada no contexto de interação com uma célula T cognata pode, por mecanismos ainda não totalmente elucidados, mas possivelmente relacionados à intensidade de reconhecimento do antígeno e à qualidade dos sinais co-estimulatórios (Benson *et al.*, 2007), se mover para áreas extrafoliculares, proliferando e se diferenciando em plasmócitos de vida curta

secretores de anticorpos; ou adentrar os folículos de células B, formando Centros Germinativos (GC), passando pelo processo de maturação de afinidade, no qual a região variável do BCR passa por uma série de modificações resultantes da ação da enzima Deaminase de Citidina Induzida por Ativação (AID), em um processo reconhecido como Hipermutação Somática (SHM) (Figura 4), sendo as células com BCR modificado submetidas a um processo de competição por fatores de sobrevivência no qual supostamente sobrevivem apenas as que reconhecem o antígeno com maior afinidade (Berek *et al.*, 1991). Discute-se, porém, a possibilidade dos GCs contribuírem não só para a formação de células com maior afinidade para certo antígeno, mas também para a manutenção da diversidade, evitando a oligoclonalidade, existindo estimativas que apontam para a existência de 5 a 10 vezes mais tipos clonais do que previsto pelos modelos tradicionais (Faro e Or-Guil, 2013).

Com a progressão da resposta imunitária, os focos extrafoliculares de plasmócitos diminuem e observa-se a emergência de plasmócitos de vida longa e de células B de memória (Blink *et al.*, 2005). Os plasmócitos de vida longa são encontrados principalmente na medula óssea e, na maioria dos casos, os genes das regiões variáveis das imunoglobulinas exibem um grande número de mutações somáticas, sugerindo que essas células passaram pelo processo de maturação de afinidade nos GCs.

Já nas respostas T-independentes, a ativação da célula B pode se dar por duas vias: nas respostas T-independentes do tipo 1 (TI-1) pelo contato do BCR com antígenos que também se ligam a receptores para padrões moleculares conservados, como os TLRs e os Receptores Ricos em Repetições de Leucina Ligantes de Nucleotídeos (NLRs); e nas respostas T-independentes do tipo 2 (TI-2) pelo reconhecimento de epítomos repetitivos (Mond *et al.*, 1995). As respostas T-independentes mais bem caracterizadas ocorrem na Zona Marginal do baço (MZ) e em tecidos linfóides associados a mucosas. O processo CSR é raro em respostas T-independentes, mas pode ocorrer, sendo mais comumente observada a formação de IgA. Estímulos que contribuem para isso são a secreção de BAFF e do Ligante Indutor de Proliferação APRIL por células dendríticas, células epiteliais e estromais nos tecidos linfóides associados ao intestino (GALT) e na Lâmina Própria (LP) intestinal (Bergvist *et al.*, 2010). A secreção de APRIL pelas células epiteliais intestinais está intimamente associada à detecção de ligantes de TLRs, sendo essa detecção desencadeadora da liberação de outras moléculas, como as linfopoiéticas estromais tímicas, que estimulam células dendríticas a também secretar APRIL. Em humanos, esse tipo de troca de



classes T-independente pode favorecer a formação de IgA2, que é mais resistente a certas proteases bacterianas que IgA1 (Kett *et al.*, 1995; Plaut *et al.*, 1974).

Considerando essa dependência da disponibilidade de antígenos, da interação com outras células do sistema imunitário e de estímulos moleculares específicos para a ativação das células B, pode-se perceber que o intestino é o sítio anatômico com um dos maiores potenciais para ser o ponto de partida dessas relações dinâmicas, sendo a principal porta de entrada para uma quantidade enorme de moléculas exógenas, mas também intimamente associado a estruturas do sistema imunitário.

## CAPÍTULO 2: MICROBIOTA INTESTINAL

### 2.1 A MICROBIOTA E A HOMEOSTASE NA MUCOSA INTESTINAL

A mucosa intestinal dos gnátostomados é a maior interface desses hospedeiros com microrganismos. Estima-se que na microbiota intestinal humana existam cerca de  $10^{12}$  a  $10^{14}$  células bacterianas, distribuídas por cerca de 500 a 1000 diferentes espécies, com múltiplas cepas, e as estimativas para camundongos são semelhantes (Sender *et al.*, 2016; Chung *et al.*, 2020). Essa relação comensal ou até mutualista se estende também a arqueas, vírus e ainda a fungos e outros microrganismos eucarióticos, como amebas (Hoffmann *et al.*, 2013). Além do contato constante com microrganismos, a mucosa intestinal recebe uma vasta quantidade de antígenos exógenos provenientes da alimentação ou deglutição (Faria *et al.*, 2013).

Para que seja possível lidar com toda essa diversidade, os tecidos linfóides associados ao intestino (GALT) são compostos por estruturas altamente organizadas, como os linfonodos mesentéricos (MLN) e as placas de Peyer (PP), contando ainda com o auxílio de linfócitos difusos ou em conjuntos espaçados na lâmina própria (LP) e epitélio intestinal. Mas essa complexidade é moldada ao longo do desenvolvimento. No período perinatal, o sistema imunitário das mucosas é menos responsivo, contando bastante com a proteção de fatores imunes transmitidos pelo aleitamento materno, porém, se desafiado, é capaz de rápida resposta (Mellander *et al.* 1984; Takemura *et al.*, 1985). Existem ainda evidências de que o sistema imunitário nas mucosas pode ser estimulado de forma intra-uterina, potencialmente no contato com auto-antígenos e em respostas anti-idiotípicas contra IgG materno que transpassa a barreira placentária, sendo possível detectar a respostas imunitárias em humanos recém-nascidos de até 28 semanas expostos a agentes infecciosos durante a gestação (Gleeson e Cripps, 2004). No 100º

dia de gestação podem ser encontradas células que expressam IgM, IgD e CD5 em suas superfícies, com a detecção de IgA sendo possível por volta do 120º dia e a observação de folículos primários de células B e zonas de células T com vênulas endoteliais altas possível por volta do 135º dia (Spencer *et al.*, 1986; Gleeson e Cripps, 2004). É possível observar, já no nascimento, células B ativas nos folículos linfóides associados ao intestino. A partir das 12 semanas de idade, a maturação de células B atinge seu pico, os centros germinativos surgem nas mucosas intestinais e, nesse contexto, predominam as células secretoras de IgM. Ao fim do primeiro mês de vida, o número de células secretoras de IgA passa a crescer expressivamente até que estas predominem nas mucosas intestinais (Perkkiö e Savilahti, 1980; Knox, 1986).

O parto natural leva à exposição do indivíduo à microbiota vaginal materna e, frequentemente, também à fecal (Wang *et al.* 2019). Nos momentos subsequentes, há contato com microrganismos da pele de outros indivíduos, microrganismos presentes em gotículas salivares e também microrganismos do ambiente. Antígenos e microrganismos presentes em alimentos, como no leite materno, contribuem fortemente para a formação da interface entre sistema imunitário e microbiota na mucosa intestinal, tanto em termos de estímulo da secreção de imunoglobulinas quanto de colonização. Há evidências da colonização intestinal do indivíduo neonato por bactérias presentes no leite materno, as quais são em grande parte compostas por membros dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Acinetobacter* e *Enterobacter*, sendo provenientes principalmente da pele areolar materna. Há ainda descrições da presença de microrganismos associados à microbiota intestinal da mãe no leite que esta produz, sendo também descrita a correlação entre amamentação e colonização do neonato por esses microrganismos (Jost *et al.*, 2014; Kordy *et al.*, 2020).

Ainda que fatores genéticos possam contribuir para a colonização por determinados microrganismos (Goodrich *et al.*, 2014), visto que polimorfismos, por exemplo, podem levar à formação de estruturas moleculares que facilitam ou dificultam a adesão microbiana ao epitélio intestinal, a composição da microbiota intestinal é altamente influenciada pela dieta e certas alterações nas comunidades microbianas do intestino parecem resultar em processos inflamatórios não só locais, mas também distais ou mesmo sistêmicos (Littman e Pamer, 2011). Isso pode se dar tanto pela ausência de microrganismos considerados benéficos quanto pela presença de microrganismos patogênicos, que encontram menos competição para a colonização sem uma comunidade microbiana comensal bem estabelecida.

Dentre os potenciais benefícios que bactérias intestinais podem trazer ao hospedeiro estão melhor descritos a produção de vitaminas e de ácidos graxos de cadeia curta, bem como a competição com microrganismos patogênicos ou oportunistas e a estimulação dos sistemas imunitário e endócrino (Morowitz *et al.*, 2012).

Desta forma, o estudo da microbiota foi considerado de bastante relevância desde os primórdios da microbiologia. Contudo, os métodos dependentes de cultivo não são capazes de revelar sua real complexidade. Até recentemente, estimava-se como consenso que menos de 1% das bactérias encontradas no intestino humano seriam cultiváveis pelos métodos conhecidos (Quin *et al.*, 2010; Sender *et al.*, 2016). Este dado, porém, tem sido contestado, com alguns grupos alegando sucesso no cultivo de maiores proporções da composição bacteriana intestinal (Browne *et al.*, 2016). Mesmo assim, por depender de análises paralelas metagenômicas e filogenéticas, o cultivo e a identificação de uma maior proporção de bactérias que habitam o intestino, bem como a melhor compreensão deste ecossistema microbiano, tem sido possível apenas com os recentes avanços em técnicas moleculares.

Ainda que, pelos fatores anteriormente descritos, a microbiota intestinal humana possa ser altamente heterogênea, certas características parecem ser bastante preservadas nas mais diferentes populações, como o fato dos Filos mais prevalentes serem, em ordem de abundância média, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia, sendo 90% das bactérias do intestino pertencentes aos Filos Firmicutes e Bacteroidetes. O filo Firmicutes é composto por mais de 200 gêneros, como *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* e *Ruminococcus*. Já o Filo Bacteroidetes apresenta dois gêneros predominantes, *Bacteroides* e *Prevotella*. O filo Actinobacteria é proporcionalmente menos abundante e representado principalmente pelo gênero *Bifidobacterium* (Arumugam *et al.*, 2013).

Bactérias anaeróbias presentes nos Filos Firmicutes e Bacteroidetes codificam um vasto repertório enzimático que permite a hidrólise de carboidratos complexos não digeríveis por humanos, existindo ainda gêneros como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* especializados na fermentação de oligossacarídeos, frutooligosacarídeos e do polissacarídeo inulina. A fermentação desses carboidratos incorre na produção de metabólitos, como os ácidos graxos de cadeia curta acetato, propionato e butirato, os quais podem ser absorvidos pelo hospedeiro através de receptores nas células epiteliais intestinais, em adipócitos e até mesmo em células do

sistema imunitário, acreditando-se que tais moléculas teriam efeitos endócrinos e imunomodulatórios (Sims *et al.*, 2014; Andoh *et al.*, 2016; Ohira *et al.*, 2016).

Adicionalmente, a microbiota intestinal pode prover ao hospedeiro vitaminas do complexo B, como biotina, cobalamina, folato, ácido nicotínico, ácido pantotênico, piridoxina, riboflavina e tiamina, sendo também descrita a produção de vitamina K (Rowland *et al.*, 2018).

Como mencionado, a composição saudável da microbiota intestinal, ainda que permaneça em carência de uma definição mais objetiva, justamente pela dificuldade de cultivo e caracterização de todos os microrganismos e nichos envolvidos, tem também caráter protetor contra patógenos oportunistas. Talvez o exemplo mais claro desse fenômeno seja o das infecções por *Clostridioides difficile* (anteriormente referido como *Clostridium difficile*, mas reclassificado com base na composição do RNA ribossomal 16S). Indivíduos submetidos a antibioticoterapia prolongada podem sofrer depleção de parte considerável da microbiota, tornando-se passíveis da infecção oportunista por *C. difficile*. Esta infecção pode ser de difícil tratamento, mas o advento do transplante fecal tem trazido bons resultados, eliminando o quadro infeccioso com a reposição de uma microbiota balanceada (Rohlke e Stollman, 2012). O fato do transplante fecal apresentar bons resultados, mas o mesmo não ser igualmente reproduzido com alternativas probióticas ou simbióticas, parece fortalecer a hipótese de que a maior parte dos componentes da microbiota intestinal humana ainda é de fato incultivável ou desconhecida.

Existem, inclusive, microrganismos que nunca foram cultivados *in vitro* de interesse na pesquisa imunológica. As chamadas “Bactérias Segmentadas Filamentosas” fazem parte da composição da microbiota intestinal de roedores, peixes e aves, sendo potentes indutoras de inflamação em camundongos. Acredita-se que essas bactérias formem uma linhagem distinta na Família Clostridiaceae, sendo o nome provisório *Candidatus Savagella* proposto para o gênero. Contudo, não se sabe se as “Bactérias Segmentadas Filamentosas” constituem de fato um grupo homogêneo, podendo na verdade ser composto por múltiplos gêneros e espécies. A colonização de camundongos com Bactérias Filamentosas Segmentadas induz drástica produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-17 (IL-17), e expressivo aumento na secreção de IgA (Klaasen *et al.*, 1993). Em concordância com esses resultados, em camundongos deficientes na enzima AID, cujos linfócitos não realizam Hipermutação Somática, não passando portanto pelo processo de maturação de afinidade e apresentando comprometimento na CSR, o que leva a uma

resposta deficiente de IgA, pode-se observar uma rápida expansão de Bactérias Filamentosas Segmentadas (Suzuki *et al.*, 2004).

A presença de IgA secretória (SIgA) nas mucosas é de grande importância para a manutenção da homeostase. Através de um processo denominado exclusão imune, por exemplo, SIgA pode promover a neutralização de potenciais patógenos, se ligando a estes e impedindo sua adesão a receptores, de forma que sejam subsequentemente eliminados com o muco que reveste o epitélio, sendo tal eliminação, no caso do intestino, associada ao peristaltismo. Esse bloqueio também pode ocorrer com antígenos alimentares. Mas o real escopo das atividades de SIgA parece ser muito mais abrangente. A incidência de certos idiotipos de SIgA nas mucosas intestinais pode favorecer a colonização pelos microrganismos reconhecidos (Bollinger *et al.*, 2003; Gutzeit *et al.*, 2014). Além disso, foi observada a participação de SIgA no retro-transporte de antígenos pelo epitélio intestinal, de forma a favorecer o processamento dos mesmos por células dendríticas nos GALT (Weltzin *et al.*, 1989).

SIgA é composta de duas moléculas de IgA, uma proteína juncional J e um componente secretório. O complexo dimérico IgA-J é produzido por linfócitos B nos tecidos associados às mucosas e o componente secretório é produzido por células do epitélio intestinal. Este componente secretório atua como receptor para IgA dimérica e, com a interação dessas moléculas, forma-se o complexo SIgA que é endocitado e transportado para a face apical da célula epitelial intestinal, sendo subsequentemente liberado no lúmen. O componente secretório está associado à proteção de SIgA da degradação por proteases microbianas (Stadtmueller *et al.*, 2016).

Essa produção de IgA é dependente de estímulos antigênicos, os quais são em boa parte providos aos linfócitos B por outras células do sistema imunitário. Nas placas de Peyer, ocorre uma constante amostragem de antígenos do lúmen intestinal por células M, enterócitos de características peculiares que capturam antígenos luminiais e promovem sua transcitose, liberando-os na região da cúpula subendotelial. Esses antígenos podem então ser processados por células dendríticas que podem apresentá-los a células T, as quais podem interagir com linfócitos B nos GALT, MLN e na Lâmina Própria, sendo possível assim que ocorra a recombinação de troca de classes de imunoglobulinas. Também pode ocorrer a interação direta entre células dendríticas e linfócitos B, em respostas T-independentes, e a indução da resposta imunitária pode ocorrer também em folículos linfóides isolados do intestino delgado (Brandtzaeg, 2010).

Muitas citocinas, incluindo interleucina-4, TGF- $\beta$ , interleucina-5, interleucina-6 e interleucina-10 (IL-10) podem contribuir como estímulos moleculares para a produção de SIgA, sendo TGF- $\beta$  e IL-10 requeridas ainda para a manutenção do ambiente tolerogênico nas mucosas, o que fortalece as conexões entre produção de SIgA e homeostase. A liberação dessas citocinas está em boa parte associada ao reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos por receptores de células da imunidade inata como TLRs, NLRs e receptores indutíveis por ácido retinóico (Lavelle *et al.*, 2010).

As células dendríticas são particularmente importantes nesse processo. Além de receberem os antígenos capturados pelas células M, células dendríticas CX3CR1+ são capazes de emitir projeções de dendritos que penetram a monocamada de células epiteliais intestinais, possibilitando a captura de antígenos e microrganismos e sendo importantes para a indução da resposta de células T CD4+ dos fenótipos Th1 e Th17, responsáveis por respostas efetoras na barreira das mucosa intestinal (Rescigno *et al.*, 2001). Acredita-se que esse processo de emissão de dendritos esteja relacionado à sinalização por Myd88 via TLRs e conte também com a participação do receptor de quimiocinas CX3CR1 (Chieppa *et al.*, 2006; Niess *et al.*, 2005). Contudo, camundongos deficientes de CX3CR1, apesar de apresentarem menos projeções de dendritos no lúmen intestinal, ainda as apresentam nas regiões proximais do intestino delgado (Chieppa *et al.*, 2006).

Há ainda a atividade de macrófagos CX3CR1+ que parece contribuir para um ambiente tolerogênico, com a produção de interleucina-10 (IL-10) no encontro de antígenos inócuos, não associados a padrões moleculares de dano ou de patógenos, sendo IL-10 indutora da diferenciação e manutenção de células T regulatórias (Treg) (Hadis *et al.*, 2011). Células Treg são caracterizadas pela expressão de CD4 e do programa transcricional FOXP3, sendo associadas à supressão de respostas imunitárias exacerbadas. A manutenção da tolerância por células Treg está associada ao reconhecimento de auto-antígenos e à modulação negativa de respostas imunitárias tanto por contato célula-célula quanto por citocinas solúveis, sendo também estas células indutíveis pela ação de células dendríticas CD103+ (Taams *et al.*, 2005).

Contudo, a ação excessiva de células Treg pode levar à susceptibilidade a infecções (Smigiel *et al.*, 2014; Yordanova *et al.*, 2019). Essa ação é contrabalançada pela subpopulação de células Th17, descritas independentemente por dois grupos (Veldhoen *et al.*, 2006; Bettelli *et al.*, 2006) como células T de perfil altamente pró-inflamatório. Outra população de células T que

pode contrabalançar a ação das células Treg é a população de células  $\gamma\delta$ T. Diferentemente das outras células T, cujo receptor antigênico é formado por cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , as células  $\gamma\delta$ T possuem cadeias  $\gamma$  e  $\delta$  na constituição do TCR. As células T  $\gamma\delta$  são peculiares, pois parecem não requerer processamento de antígenos e apresentação de epítopos peptídicos por MHC, acreditando-se que tenham um papel proeminente no reconhecimento de antígenos lipídicos. Essas células podem ser ativadas pelo contato de moléculas associadas a dano celular, como pela exposição extracelular de proteínas de choque térmico e são importantes produtoras de interleucina-17 (Holtmeier e Kabelitz, 2005).

A diversa população de bactérias comensais no intestino contribui para a diferenciação, expansão e manutenção de tecidos e células do sistema imunitário, incluindo células Treg, Th17 e  $\gamma\delta$ T. Camundongos *Germ Free* exibem microvilosidades intestinais reduzidas, dificultando a absorção de nutrientes, bem como anomalias imunitárias, como placas de Peyer mal formadas redução de células produtoras de IgA, redução da população de células TCD4+ na lâmina própria e perfil de expressão gênica modificado nas células epiteliais intestinais, tornando-os mais suscetíveis a infecções oportunistas (Hooper e Gordon, 2001; Macpherson e Harris, 2004).

O desequilíbrio dessas interações, pode levar à expansão de um tipo celular específico e ao comprometimento da saúde do hospedeiro. A expansão das populações de células Th17 e  $\gamma\delta$  T, por exemplo, bem como a produção excessiva de IL-17, está relacionada à progressão de doenças autoimunes, favorecendo a secreção anticorpos auto-reativos. Essa expansão também pode ocorrer naturalmente com a idade (Chen *et al.*, 2016), bem como a expansão de certas auto-reatividades e de certos componentes da microbiota (Nagpal *et al.*, 2018), levando à hipótese de que esses fenômenos podem estar relacionados.

De fato, o aumento que se observa com o passar da idade nos títulos de algumas imunoglobulinas auto-reativas reflete um aumento quantitativo em determinadas especificidades detectáveis em concentrações mais baixas em camundongos jovens (Nobrega *et al.*, 1996). Adicionalmente, células B-1a, expostas a transformações ambientais relacionadas à idade do indivíduo, podem se tornar potentes ativadoras de células TCD8+, contribuindo para a desregulação da homeostase (Lee-Chang *et al.*, 2016).

Além dessa potencial ativação distinta, a expansão dos compartimentos de células B-1a também ocorre com a idade e é descrita em muitos modelos de autoimunidade, incluindo o modelo de Lúpus Eritematoso Sistêmico com camundongos NZB/W F1 (Hayawaka *et al.*, 1983).

Interessantemente, avanços recentes têm mostrado que a translocação de microrganismos intestinais pode levar à manifestação dessa doença (Manfredo Vieira *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019).

Desta forma, fica evidente a contribuição da composição da microbiota para a regulação de homeostase imunológica. Porém, para a caracterização de imunoreatividades e elucidação de mecanismos são necessárias abordagens mais delimitadas. A seguir, será discutido o interesse em certos microrganismos comuns ao trato intestinal de humanos e camundongos, que podem estar implicados em fenômenos de imunoreatividade cruzada e que servirão como ponto de partida para investigações futuras.

## 2.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* é uma das bactérias mais prevalentes no intestino humano. Trata-se de um bacilo Gram-Negativo, do filo Proteobacteria, família Enterobacteriaceae, ubíquo no intestino de animais endotérmicos, dotado de metabolismo respiratório facultativo, isto é, podendo viver em condições de aerobiose ou anaerobiose. Devido a sua prevalência no trato intestinal de animais endotérmicos, sua presença é utilizada como indício de contaminação fecal em amostras de água (Edberg *et al.*, 2000).

Membros da espécie apresentam uma grande quantidade de fímbrias, adesinas e flagelos. Bioquimicamente, são caracterizados por fatores como a fermentação da lactose (devido a produção de lactase), produção de gás na fermentação da glicose, produção de indol a partir de triptofano, capacidade de descarboxilação de lisina e, na maioria das cepas, de descarboxilação de ornitina (Darland *et al.*, 1974). Também podem ser classificados por sorotipo, de acordo com os antígenos O (presente na camada de lipopolissacarídeo), H (associado à flagelina) e K (o antígeno capsular) (Whitefield e Roberts, 1999).

Dentre os benefícios que cepas comensais de *E. coli* podem trazer ao hospedeiro estão a síntese de vitamina K<sub>2</sub> (Ellis e Glover, 1968; Bryant *et al.*, 1976; Bentley e Meganathan, 1982) e vitamina B<sub>12</sub> (Lawrence e Roth, 1996).

Todavia, a espécie é muito heterogênea, apresentando estirpes patogênicas com variados mecanismos de virulência. Essas estirpes são comumente classificadas pelo quadro clínico que causam, existindo cepas enteropatogênicas (caracterizadas pela produção do fator de adesão a enterócitos), enterotoxigênicas (caracterizadas pela produção das toxinas LT e ST),



enteroinvasivas (com a expressão de adesinas que geram um quadro clínico idêntico à shigelose), entero-hemorrágicas (caracterizadas pela produção de toxinas “Shiga-like”, semelhantes às encontradas em *Shigella sp.*), difusamente aderentes (caracterizadas pelo seu padrão de adesão em co-cultura com células HeLa ou HEp-2), associadas à meningite neonatal (apresentando o antígeno capsular K1, semelhante a glicopeptídeos cerebrais, o que dificulta a ativação de respostas efectoras), enteroagregativas (caracterizadas pelo seu padrão de adesão intermediado por fimbrias agregativas), uropatogênicas (com receptores específicos para moléculas do epitélio renal, sendo também frequentemente produtoras de hemolisinas) e enteropatogênicas septicêmicas (resistentes ao reconhecimento pelo Sistema Complemento) (Clements *et al.*, 2012).

Sua prevalência em isolados clínicos, contudo, está mais associada ao fato de ser um microrganismo de metabolismo respiratório facultativo e não fastidioso, sendo portanto de mais fácil cultivo. Avalia-se que a maioria das estirpes sejam inócuas ou benéficas para o hospedeiro, sendo algumas inclusive utilizadas para fins probióticos (Grozdanov *et al.*, 2004).

Em relação à avaliação de imunoreatividade cruzada, a chaperona DnaK deste microrganismo é uma interessante candidata, dada sua homologia com a proteína de choque térmico HSC70, presente em humanos e camundongos (Baaklini *et al.*, 2020).

### 2.3 *Bacteroides fragilis*

Estima-se que *Bacteroides fragilis* tenha uma relação mais ancestral de co-evolução com hospedeiros. Trata-se de uma bactéria anaeróbia, Gram-Negativa, de formato bacilar, encapsulada e não esporuladora, pertencente ao Filo Bacteroidetes, Família Bacteroidaceae, sendo intrinsicamente resistente à penicilina pela produção de beta-lactamase e outros fatores ainda não caracterizados (Syndman *et al.*, 2010). Devido a sua grande prevalência no trato intestinal humano, bacteriófagos de *B. fragilis* são frequentemente utilizados em análises de contaminação fecal humana em água.

Bioquimicamente, a espécie é caracterizada por fatores como a produção de catalase, crescimento na presença de sais biliares e crescimento apenas no fundo do caldo tioglicolato (como característico de microrganismos estritamente anaeróbios). Como um grande número de cepas é intrinsecamente resistente à canamicina, a resistência a canamicina e bile em testes de disco-difusão é considerada característica de identificação presuntiva de *B. fragilis* em relação a outros bacilos anaeróbios Gram-Negativos (Draper e Barry, 1977).

Ainda que suas interações com o hospedeiro sejam consideradas predominantemente comensais ou mutualistas, isolados clínicos de *B. fragilis* são os mais comuns no gênero *Bacteroides*, sendo considerada esta a espécie mais virulenta. Contudo, processos patogênicos desencadeados por *B. fragilis* são na maioria das vezes associados a traumas como perfuração intestinal, ruptura do epitélio intestinal por tumorações malignas, incisões cirúrgicas e apendicite (Wexler, 2007).

Os polissacarídeos zwitteriônicos (ZPS), como os polissacarídeos capsulares PS-A e PS-B, produzidos por *Bacteroides fragilis*, são capazes de ativar células T regulatórias, mantendo o ambiente tolerogênico na mucosa intestinal. Isso ocorre pois o caráter zwitteriônico desses polissacarídeos permite sua interação com as bordas da fenda do MHC de classe II (a qual normalmente abriga apenas peptídeos) em células apresentadoras de antígenos, permitindo sua apresentação de forma semelhante à que ocorreria com glicopeptídeos conjugados. Normalmente, polissacarídeos não apresentam carga positiva e são considerados ativadores de células B em respostas T-independentes com geração de IgM, mas não de IgG. Contudo, as características peculiares desses polissacarídeos de *Bacteroides fragilis* permitem a geração de células de memória convencionais (Mazmanian *et al.*, 2005).

Dados experimentais adicionais, demonstram que o baço de camundongos *Germ Free* possuem uma menor proporção de células CD4<sup>+</sup> que o baço de animais convencionalmente colonizados e que a colonização por *B. fragilis* corrige essa proporção, mesmo em camundongos monocolonizados, ou seja, mesmo na ausência de outras bactérias da microbiota. Além disso, a colonização com uma cepa mutante de *B. fragilis*, incapaz de produzir PS-A, não foi capaz de corrigir a proporção de células TCD4<sup>+</sup> no baço dos animais, ao passo que a presença de PS-A purificado induz a proliferação de células TCD4<sup>+</sup> *in vitro* (Mazmanian *et al.*, 2005; Mazmanian *et al.*, 2006). Essa estimulação de células TCD4<sup>+</sup> também leva à produção de interleucina-10, com notáveis propriedades anti-inflamatórias. Ademais, tanto ensaios *in vitro* quanto *in vivo* demonstram o potencial estimulatório de PS-A para a produção de interleucina-12, interleucina-2 e IFN- $\gamma$ , evidenciando sua capacidade imunomodulatória (Mazmanian *et al.*, 2005).

Em relação ao estudo das imunoreatividades cruzadas, foi observado que a proteína BfUbb produzida por *B. fragilis* possui mimetismo molecular com a ubiquitina altamente conservada em células eucarióticas, sendo também possível encontrar com maior prevalência anticorpos no soro de pacientes, com condições como Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite

Reumatóide, que reconhecem essa molécula (Stewart *et al.* 2018). Contudo, não foi caracterizada de fato a imunoreatividade cruzada nem os clones secretores destas imunoglobulinas. Faltam também modelos experimentais, como de imunização de animais, para identificar se o contato com BfUbb realmente induz a proliferação de clones auto-reativos.

#### 2.4 *Enterococcus gallinarum*

O gênero *Enterococcus*, pertencente ao Filo dos Firmicutes, compõe uma considerável proporção da microbiota intestinal de animais endotérmicos e insetos, sendo encontrado também no trato urinário e em amostras ambientais como de solo e água (Martin e Mundt, 1972). São bactérias não esporulantes, Gram Positivas e resistentes à bile. Apresentam morfologia de cocos ou diplococos e sobrevivem tanto em condições de aerobiose quanto de anaerobiose. Apresentam atividade das enzimas pirrolidonil arilamidase, sendo capazes de hidrolisar L-pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida. Inicialmente, os microrganismos desse gênero que podiam ser identificados, como *Enterococcus faecalis*, eram classificados como *Streptococcus* do grupo D de Lancefield, sendo hoje diferenciados tanto por testes moleculares como por sua capacidade de crescimento em altas concentrações de NaCl (Manero e Blanch, 1999).

Trata-se de bactérias ácido lácticas, sendo então muitas vezes aplicadas em culturas probióticas e processos fermentativos de alimentos (Foulquié Moreno *et al.*, 2005). Contudo não foi atestada a segurança desse uso e de acordo com a lista de Presunção Qualificada de Segurança da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, as espécies de *Enterococcus* não constam nem na categoria de bactérias atestadamente seguras, nem na de potencialmente perigosas (Ogier e Serror, 2008).

As espécies mais comumente encontradas na microbiota humana são *Enterococcus faecalis*, e *Enterococcus faecium* (Murray, 1990). *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus* são encontradas menos frequentemente, mas o interesse médico nessas espécies tem crescido devido à sua resistência intrínseca à vancomicina (Leclercq *et al.*, 1992; Britt e Potter, 2017) e pela sua maior prevalência na colonização de aves de criação (Xavier *et al.*, 2008), sendo inclusive suposto que alta incidência de *Enterococcus gallinarum* em camundongos de laboratório esteja associada à presença do microrganismo na microbiota ingerida com a ração.

Ainda que as infecções causadas por *Enterococcus sp.* sejam na maior parte dos casos de caráter oportunista, com maior prevalência em indivíduos imunocomprometidos ou submetidos a

antibioticoterapia prolongada, fatores como a resistência intrínseca à vancomicina de *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus*, o aumento em achados de resistência em outras espécies do gênero, a capacidade de troca de genes de resistência com outros microrganismos, como *Staphylococcus aureus* (Rengaraj *et al.*, 2016), e a observação do potencial de resistência a todos os antibióticos utilizados clinicamente (Hollenbeck *et al.*, 2012), têm levado à caracterização de microrganismos do grupo como patógenos emergentes, especialmente em ambiente hospitalar (Braïek e Smaoui, 2019).

*E. gallinarum* e *E. casseliflavus* são 99,9% idênticas em relação à sequência que codifica o RNA ribossomal 16S e podem ser bioquimicamente diferenciadas do restante do gênero pela produção de ácido a partir de metil- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo (Devriese *et al.*, 1996). Apesar da capacidade de fermentar a xilose ser presente em todas as espécies do gênero, *E. gallinarum*, por contar com enzimas pré-formadas, realiza esse processo fermentativo de forma muito mais rápida, podendo a leitura do teste ser efetuada em 2 horas para diferenciação em relação a *E. casseliflavus*, cujo resultado leva cerca de 24 horas para poder ser lido (Chen *et al.*, 2000).

Especificamente, *Enterococcus gallinarum* chama atenção para o estudo de imunoreatividades cruzadas pelo fato de que anticorpos naturais reagentes com seus polissacarídeos capsulares CPS-A, CPS-B, CPS-C e CPS-D são encontrados no soro de humanos que aparentemente não tiveram contato com o microrganismo, sendo o(s) antígeno(s) de ativação dos clones de células B ainda desconhecido(s) (Hufnagel *et al.* 2005).

Adicionalmente, foi observado que a translocação de *E. gallinarum* do epitélio intestinal para a corrente sanguínea leva à manifestação de sintomas semelhantes ao de Lúpus Eritematoso Sistêmico em camundongos e que parecem haver maiores indícios da presença por *E. gallinarum* em amostras de fezes e biópsias de fígado de humanos que manifestaram a doença do que em controles saudáveis (Manfredo Vieira *et al.*, 2018). Contudo, não foi avaliado se o processo autoimune está relacionado a imunoreatividades cruzadas e, se for o caso, qual o padrão de distribuição dessas reatividades nas subpopulações de células B, se ele é modificado de acordo com o estágio de desenvolvimento do animal e se a imunização com a(s) molécula(s) envolvida(s) nesse processo levaria os camundongos à mesma manifestação autoimune.

### 2.5 *Proteus mirabilis*

Pertencente ao Filo Proteobacteria, família Enterobacteriaceae, *Proteus mirabilis* é uma bactéria de formato bacilar, Gram-Negativa, capaz de viver em condições de aerobiose e anaerobiose, apresentando motilidade por *swarming*, caracterizada como uma translocação rápida (2–10  $\mu\text{m/s}$ ), coordenada e simultânea (como em um enxame, o que dá o nome ao fenômeno) de uma população bacteriana em superfícies sólidas ou semi-sólidas.

Bioquimicamente, distingue-se pela produção de urease, hidrolisando uréia a amônia, o que torna o ambiente alcalino e produz odor forte característico, bem como pela motilidade, inabilidade de metabolizar lactose (como avaliada pelo crescimento em Ágar MacConkey, o qual possui sais biliares e o corante cristal violeta, que inibem o crescimento de bactérias Gram Positivas, bem como o corante vermelho neutro, que atua como indicador de pH, sendo o crescimento de *Proteus mirabilis* observado em colônias amarelas, por não fermentar a lactose e não tornar o meio ácido), produção de sulfeto de hidrogênio, não apresentando atividade de citocromo C oxidases ou capacidade de produção de indol a partir do triptofano (Armbruster *et al.* 2018; Burrell *et al.*, 2004).

Trata-se de um dos principais agentes etiológicos das infecções de trato urinário, mas pode também ser encontrado de forma comensal no trato gastrointestinal de animais endotérmicos, bem como em amostras de solo, água e esgoto (Armbruster *et al.* 2018). Ainda que possa causar outros tipos de infecções, como oculares e gastrointestinais, a maior parte dos isolados ocorre em infecções do trato urinário, sendo a urina muito alcalina um fator de suspeita para a infecção por *Proteus mirabilis* justamente por conta da atividade de sua urease (Burrell *et al.*, 2004).

No que diz respeito ao potencial de imunoreatividade cruzada, a urease de *Proteus mirabilis* possui mimetismo molecular e sequência homóloga de aminoácidos em relação ao colágeno do tipo XI, apresentando reconhecimento por autoanticorpos contra peptídeos citrulinados cíclicos presentes em pacientes de artrite reumatóide (Wilson *et al.*, 1995). Adicionalmente, a hemolisina produzida pelo microrganismos possui sequência de aminoácidos homóloga à da cadeia DR $\beta$ 1 do MHC de classe II, sendo também alguns autoanticorpos da classe IgG de pacientes de doenças autoimunes capazes de reagir contra a molécula bacteriana (Wilson *et al.*, 1995).

## 2.6 CONSÓRCIO BACTERIANO OLIGO-MM<sup>12</sup>

A imensa diversidade da microbiota intestinal, somada à atual incapacidade de cultivo da maioria de seus constituintes, pode muitas vezes tornar seu estudo um grande desafio. Possíveis abordagens experimentais incluem o uso de extratos fecais para análises genômicas (Weinstock, 2012) e transcriptômicas (Abu-ali *et al.*, 2018), de forma similar aos métodos aplicados em microbiologia ambiental. Isso possibilita a caracterização da diversidade composicional, de nichos metabólicos e pode ser um passo importante em avaliações funcionais, como de atividade enzimática.

Contudo, para o estudo de imunoreatividades cruzadas o uso de extrato fecal pode trazer mais dúvidas do que respostas. Afinal, no extrato fecal existem tanto moléculas do hospedeiro, quanto da microbiota, e ainda moléculas provenientes da alimentação. Desta forma, seria esperada a observação de um grande número de imunoreatividades potencialmente relacionadas, mas não necessariamente cruzadas: proteínas de músculo liso do hospedeiro, por exemplo, podem ser encontradas de forma íntegra ou fragmentada tanto em extrato de músculo liso quanto nas fezes, não sendo esse reconhecimento um evento de imunoreatividade cruzada. Da mesma maneira, peptídeos das células epiteliais intestinais comumente chegam ao lúmen, sendo assim encontrados em extratos fecais, mas também em outros tipos celulares de diferentes sítios anatômicos. Afinal, por ser uma rota de excreção, o lúmen intestinal conterá antígenos endógenos e exógenos das mais diversas procedências e nas mais diversas condições de integridade ou fragmentação, o que gera uma grande quantidade de ruído de dados nas análises comparativas de reconhecimento antigênico. Além disso, no estudo de um extrato complexo como o fecal, mesmo com a caracterização de uma molécula envolvida em processo de imunoreatividade cruzada, não há garantia de que se possa traçar sua origem, dificultando estudos posteriores mais direcionados. O mesmo ocorre quando se pretende estudar a origem de estímulos moleculares que dificultam ou facilitam a replicação de patógenos intestinais. Desta forma, modelos mais minimalistas podem ser extremamente úteis na elucidação de processos mais específicos.

Com isso em mente, o consórcio bacteriano Oligo-MM<sup>12</sup> foi desenhado com o menor número de microrganismos que se conseguiu para levar à ocupação de nichos metabólicos e estimulação do sistema imune, ao ponto de conferir proteção contra *Salmonella enterica serovar Typhimurium* pelo mecanismo de Resistência por Colonização, que consiste na capacidade da microbiota intestinal de impedir a infecção por patógenos entéricos (Brugiroux *et al.*, 2016). O

consórcio é constituído por 12 cepas de espécies bacterianas, representando os cinco filos mais prevalentes e abundantes da microbiota intestinal de camundongos de laboratório: *Acutalibacter muris* KB18, *Flavonifractor plautii* YL31, *Clostridium clostridioforme* YL32, *Blautia coccoides* YL58, *Clostridium innocuum* I46, *Lactobacillus reuteri* I49, *Enterococcus faecalis* KB1, *Bacteroides caecimuris* I48, *Muribaculum intestinale* YL27, *Bifidobacterium longum subsp. animalis* YL2, *Turicimonas muris* YL45 e *Akkermansia muciniphila* YL44.

Levando em consideração a participação da microbiota na regulação do repertório pré-imune de reconhecimento antigênico (Chen *et al.*, 2018) e a prevalência dos microrganismos selecionados, bem como o provável papel de autoantígenos na formação do repertório de imunoglobulinas (Gaudin *et al.*, 2004), pode-se estipular a possível existência de processos de imunoreatividade cruzada. Uma possibilidade seria a de autoanticorpos (selecionados por antígenos endógenos) reconhecerem e favorecerem a colonização por esses microrganismos, como anteriormente descrito para SIgA (Bollinger *et al.*, 2003; Gutzeit *et al.*, 2014), o que os tornaria tão abundantes e prevalentes. Outra possibilidade, seria a de antígenos provenientes destes microrganismos auxiliarem na formação do repertório das células B, levando a produção de anticorpos que, por mimetismo molecular, levam também ao reconhecimento de autoantígenos, o que poderia ter, em diferentes conjunturas, implicações fisiológicas ou imunopatológicas.

Por ter sido elaborado no contexto do estudo de estímulos moleculares que dificultam ou facilitam a replicação de patógenos intestinais, o consórcio bacteriano Oligo-MM<sup>12</sup> ainda não foi utilizado em estudos voltados para a emergência do repertório de células B e de imunoreatividade cruzada, o que instiga investigações futuras. A maior vantagem de trabalhar com o consórcio, nesse caso, em contraposição a amostras isoladas de cada estirpe, é o fato de que muitos genes têm sua expressão condicionada à ocupação de certo nicho metabólico pela bactéria em um contexto comunitário. O uso do consórcio teria a vantagem de permitir a observação de imunoreatividades relacionadas a proteínas expressas nessas condições, eliminando a desvantagem do grande ruído de dados obtido no estudo de amostras complexas por outras estratégias, como pelo uso de extrato fecal.

## CAPÍTULO 3: IMUNOREATIVIDADES DE CÉLULAS B CONTRA ANTÍGENOS DA MICROBIOTA E DO HOSPEDEIRO

### 3.1: AUTOIMUNIDADE, MIMETISMO MOLECULAR E FISIOLOGIA

Há muitas décadas se observa a relação entre infecções e autoimunidade. Alguns experimentos importantes foram realizados com diferentes linhagens de camundongos *New Zeland White* (NZW), dotados de níveis distintos de predisposição à autoimunidade. Notavelmente, observava-se que camundongos das linhagens NZW que já possuíam certa tendência ao desenvolvimento de afecções autoimunes (como produção de anticorpos que alvejam DNA ou hemácias) tinham essa tendência exacerbada no contexto de infecção pelo Vírus da Coriomeningite Linfocítica (LCMV) (Tonietti *et al.*, 1970; Lampert e Oldstone, 1973). No entanto, camundongos de linhagens NZW que normalmente não desenvolviam respostas autoimunes também desenvolviam autoimunidade no contexto da infecção por LCMV (Lampert e Oldstone, 1973). Esse evento foi reproduzido até mesmo com outros agentes etiológicos, como diversos retrovírus (Oldstone, 1987).

Algumas possíveis explicações para esse tipo de fenômeno incluíam, além do mimetismo molecular entre antígenos próprios e exógenos, a ativação policlonal de linfócitos B e T, a exacerbção da apresentação antigênica pelo aumento da expressão de MHC de classe I e de classe II, alteração da função de células imunitárias em decorrência da infecção e ativação adjacente de células imunitárias pela presença de citocinas pró-inflamatórias (Oldstone, 1987). Em 1991, dois grupos caracterizaram de forma independente o processo de mimetismo molecular que levava uma resposta inicial à glicoproteína e à nucleoproteína de LCMV a se tornar também uma respostas contra auto-antígenos das ilhotas pancreáticas, tanto por mimetismo molecular quanto por um processo conhecido como espalhamento de epítomos (um fenômeno em que a resposta imune é expandida para além dos epítomos imunodominantes reconhecidos inicialmente por células T e B, podendo esses antígenos ser autólogos) (Ohasi *et al.*, 1991; Oldstone *et al.*, 1991).

A reatividade cruzada também parece ter papel imunopatológico nos estágios tardios da Doença de Chagas, tendo sido demonstrada a reatividade cruzada entre anticorpos que reconhecem moléculas de *Trypanosoma cruzi* e tecido cardíaco do hospedeiro (Kaplan *et al.*, 1997) e sendo a imunização com extrato proteico de *T. cruzi* suficiente para induzir essa resposta



autoimune em modelos murinos (Leon *et al.*, 2004). Ainda discute-se, contudo, se essa auto-reatividade teria relevância para o desenvolvimento da miocardite tipicamente associada à fase tardia da doença, já que o quadro se desenvolve mesmo em pacientes cujos auto-anticorpos não são detectados (Leon *et al.*, 2003).

Alguns dos fenômenos mais estudados nesse campo estão ligados à infecção por *Streptococcus* do grupo A de Lancefield (classificação sorológica baseada na imunoreatividade com carboidratos da parede celular do microrganismo). É notório, por exemplo, que o soro de pacientes com nefrite pós-estreptocócica contém anticorpos que reconhecem, simultaneamente, moléculas de *Streptococcus*, em especial epítomos da proteína M, e auto-antígenos do glomérulo renal (Fillit *et al.*, 1984). As imunoreatividades cruzadas desencadeadas pela infecção por *Streptococcus* podem também levar a autoimunidade em tecido cardíaco (Cunningham *et al.*, 1986), febre reumática (DiSciascio e Taranta, 1980) e hipotetiza-se que até mesmo a desordens neuropsiquiátricas (Swedo *et al.*, 1998).

O agente etiológico da mononucleose, Epstein-Barr virus (EBV), também pode estar associado ao desencadeamento de autoimunidade por mimetismo molecular, visto que certos anticorpos que reconhecem o antígeno nuclear-1 viral (EBNA-1) também reconhecem auto-antígenos alvejados no Lúpus Eritematoso Sistêmico, como as proteínas Ro, Sm B/B' e Sm D1 (Poole, 2006). Ademais, DNA de EBV é encontrado com muito maior frequência (49%) em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE) do que em controles saudáveis (3%) (Moon *et al.*, 2004). Vale ressaltar que fatores genéticos, como alelos de MHC, da proteína tirosina fosfatase PTN22, de receptores de citocinas e também um polimorfismo de CD40 (Zenewicz *et al.*, 2010) estão bastante implicados na patogênese de SLE. Há ainda uma forte correlação entre deficiências na ativação da via clássica do sistema complemento (nos componentes C1q, C2 e C4) e o desenvolvimento de SLE (Hauptman *et al.*, 1974; Nishino *et al.*, 1981; Pickering *et al.*, 2000; Walport, 2002). Porém, o nível mais baixo que o esperado de concordância intrafamiliar, em especial no que diz respeito à manifestação da doença em gêmeos monozigóticos, aponta para a importância dos fatores ambientais na patogênese (Salvetti, 2000).

Recentemente, a colonização por *Enterococcus gallinarum* foi correlacionada ao desenvolvimento de SLE em camundongos e humanos (Manfredo Vieira *et al.*, 2018), ao passo que a colonização por *Ruminococcus gnavus* foi implicada no desenvolvimento da Nefrite Lúpica (Azzouz *et al.*, 2019), mas não foi esclarecido se esses fenômenos estão associados a mimetismo

molecular e imunoreatividade cruzada.

Por outro lado, como antes mencionado, o mimetismo molecular e as imunoreatividades cruzadas não estão sempre associados a processos patogênicos. O exemplo anteriormente citado, dos anticorpos anti-fosforilcolina que oferecem proteção cruzada contra *Streptococcus pneumoniae* (Schenkein *et al.*, 2001), é um dos melhores compreendidos em termos de auto-reatividade fisiológica e dupla função. Mas é interessante ressaltar que essa dupla função depende de conservação evolutiva dos segmentos gênicos  $D_H$  (Vale *et al.*, 2013). Ou seja, substituindo o segmento gênico  $D_H$  em uma imunoglobulina com esse potencial duplo de reconhecimento por um segmento gênico  $D_H$  não evolutivamente conservado, ainda que se mantenha a formação de auto-anticorpos que reconhecem fosforilcolina (afinal, a disponibilidade de antígeno no hospedeiro permanece para a seleção de células B durante a ontogenia), perde-se a capacidade protetiva contra *Streptococcus pneumoniae* (Vale *et al.*, 2013). Isso mostra que o estudo das imunoreatividades cruzadas transcende as questões ligadas à autoimunidade, podendo também responder questões fundamentais sobre fisiologia e evolução.

Nesse aspecto, cabe ressaltar que a atividade de anticorpos como agonistas e antagonistas de receptores é bem descrita em diferentes contextos, sendo este artifício estudado como alternativa terapêutica para diferentes tipos de câncer (Mayes, Hance e Hoos, 2018) e distúrbios endócrinos (Chen *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2003). Contudo, a frequência fisiológica desses idiotipos, bem como a distribuição dos mesmos nos repertórios de diferentes subpopulações de células B e a capacidade dos títulos variarem de acordo com estímulos microbianos, seja por reatividade cruzada ou não, permanecem pouco compreendidas.

Além do esclarecimento dessas questões fisiológicas, o estudo das imunoreatividades cruzadas, quando implicadas em autoimunidade, especialmente nos casos em que é desencadeada por mimetismo molecular ou pelo fenômeno de espalhamento de epítomos, é de extrema importância no desenho racional de vacinas (Segal e Shoefeld, 2018). Um dos grandes desafios, porém, está na caracterização dessas imunoreatividades cruzadas, já que para tal deve ser analisado um grande número de moléculas. O desafio se torna ainda maior se além desta caracterização for pretendido delinear o perfil dessas imunoreatividades nas subpopulações de linfócitos B e nos compartimentos que abrigam as mesmas, o que é de suma importância, por exemplo, para o desenvolvimento de terapias direcionadas dos casos de afecções autoimunes

(Jin, Luo e Yang, 2020). Em certo ponto, o estudo do repertório de imunoreatividades cruzadas se torna também o estudo das vantagens e limitações dos métodos para avaliá-lo.

### 3.2: MODELOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DO REPERTÓRIO

Em muitos dos trabalhos anteriormente citados, a abordagem das imunoreatividades era ou direcionada a um antígeno específico ou ao repertório sérico, atual, de imunoglobulinas. Contudo, sabe-se que a análise do repertório de plasmócitos não é representativa da diversidade total do repertório de células B (Freitas *et al.*, 1991). Algumas das estratégias para a análise do repertório incluem avaliações sorológicas (Kearney *et al.*, 1992) e ensaios quantitativos envolvendo precursores de células B (Zouali *et al.*, 1991). Esse tipo de análise, porém, possui limitações intrínsecas, já que se foca em grupos particulares de células B, as quais representam apenas uma pequena porção do potencial de reconhecimento antigênico. Um método alternativo para o estudo do repertório pode envolver a análise genética da representatividade de diferentes segmentos gênicos VH nas células produtoras de anticorpos (Perlmutter *et al.*, 1985; Melchers *et al.*, 2000), o que pode trazer respostas interessantes sobre a seleção e composição do repertório, mas carece de elucidações funcionais acerca das imunoreatividades.

Em vista dessas limitações, nosso grupo desenvolveu um método que permite a análise global do repertório de imunoreatividades (Nóbrega *et al.*, 1993; Haury *et al.*, 1994). Resumidamente, o método combina fenotipagem e separação de subpopulações de células B de diferentes sítios anatômicos, dosagem e identificação de classes de imunoglobulinas, cultura de células B de alta e baixa densidade, cultura de células únicas, imunoblot em sistema com múltiplas canaletas (que permite avaliação simultânea de diferentes amostras contra um mesmo extrato), análises densitométricas e Análise de Componentes Principais (Figura 5), permitindo uma abordagem única para uma questão ampla (identificação de múltiplas imunoreatividades de interesse em um único método), podendo levar a resultados bastante promissores e de difícil obtenção por procedimentos mais extensivamente utilizados, como Ensaios de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) a partir de amostras séricas, hibridomas ou mesmo de culturas de células B. Porém, nenhum método é perfeito.

Dentre as limitações desta abordagem pode-se citar: o fato de que o repertório completo nunca será estudado, já que nunca serão recuperados todos os linfócitos B de todos os órgãos linfóides; o fato de que mesmo dentre os linfócitos B recuperados com sucesso nem todos

responderão aos estímulos de ativação policlonal *in vitro*; e ainda o fato de que, apesar de ser possível detectar imunoreatividades contra epítopos de naturezas sacarídica e lipídica, especialmente em glicoproteínas e lipoproteínas, o perfil de imunoreatividade analisado é primordialmente proteico. De toda forma, é um método que pode trazer respostas para muitas das questões pendentes relacionadas ao perfil de imunoreatividades de células B, a distribuição deste nas subpopulações de células B, a emergência deste ao longo do desenvolvimento e a processos de imunoreatividade cruzada entre antígenos autólogos e exógenos.

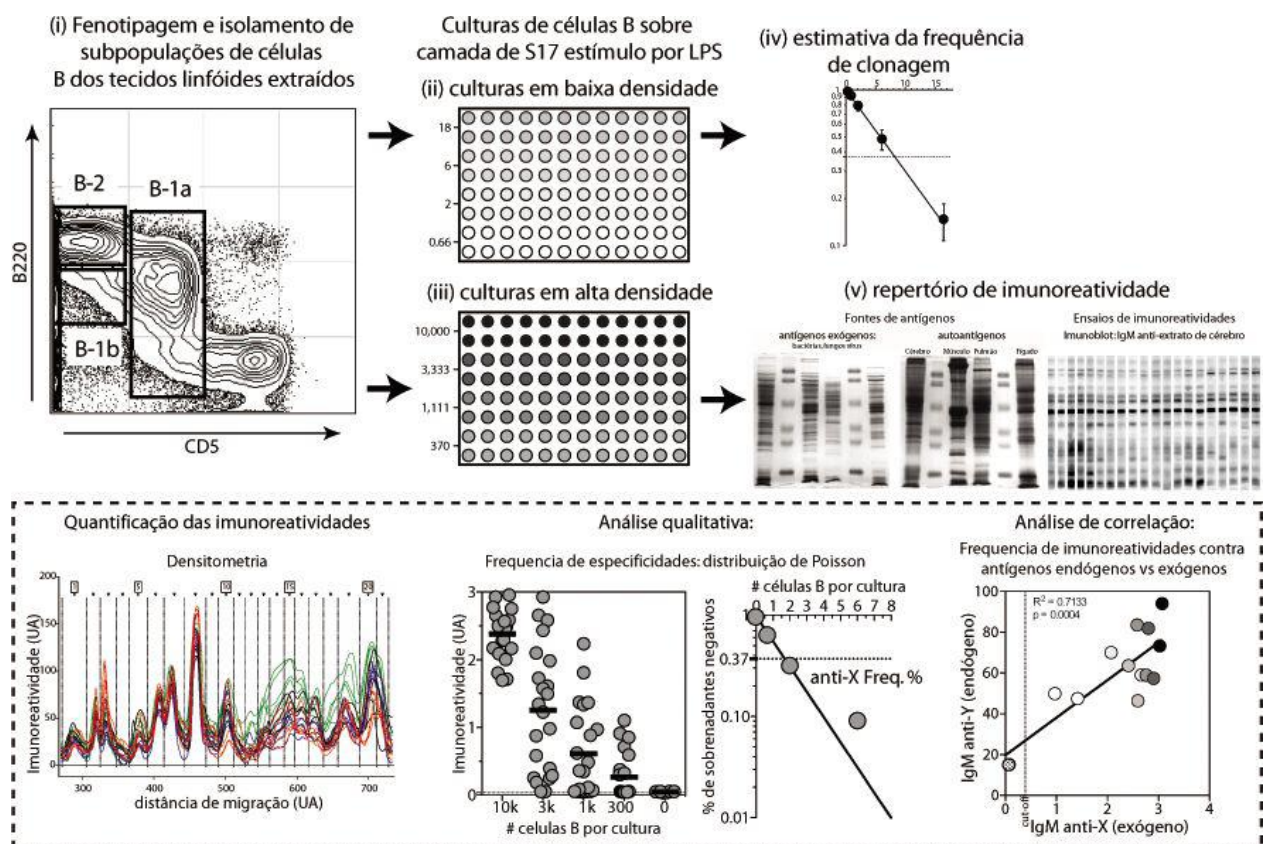


Figura 5: Resumo esquemático da adaptação do método descrito por Nobrega *et al.*, 1993 e Haury *et al.*, 1994. (i) Subpopulações de células B são separadas por citometria de acordo com marcadores de superfície característicos; (ii) As células B separadas são cultivadas em culturas de baixa densidade (estimando-se uma frequência de 18, 6, 2 e 0,66 células por poço na diluição) com células alimentadoras S17 e estímulo de LPS para ativação policlonal e secreção de imunoglobulinas; (iii) As células B separadas também podem ser utilizadas em culturas de alta densidade, estimando-se 10.000, 3.300, 1.100 e 370 células por poço, também em co-cultura com células alimentadoras S17 e estímulo com LPS; (iv)

As culturas de baixa densidade podem ser utilizadas para estimar a frequência de células que responderam ao estímulo por LPS de acordo com a distribuição de Poisson, sendo utilizada a dose de células por poço que produziu 37% de culturas negativas na dosagem de imunoglobulinas por ELISA; (v) O sobrenadante das culturas de alta densidade é utilizado em ensaios de imunoblot em sistema com canaletas, sendo a membrana de fundo adsorvida de extratos de tecidos murinos ou bacterianos.

### 3.3: PADRÃO DE IMUNOREATIVIDADES AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO

Conforme mencionado, ainda não existe um trabalho que acompanhe a emergência das imunoreatividades ao longo da vida do indivíduo. Todavia, sabe-se que em indivíduos neonatos murinos (Holmberg *et al.*, 1984, Stewart e Varela, 1989) e humanos (Barbouche *et al.*, 1992) já há a circulação de anticorpos auto-reativos e que cerca de 1/5 dessas imunoglobulinas são multi-específicas, ou seja, estariam implicadas em processos de imunoreatividade cruzada (Ternynck e Avrameas 1986; Araujo *et al.*, 1987).

A análise do repertório de Anticorpos Naturais, secretados sem estímulo antigênico, demonstra que camundongos e humanos estabelecem um espectro particular de formação especificamente de IgM no período neonatal e que esse perfil de imunoreatividade é mantido constante ao longo da vida, de maneira independente do contato com antígenos exógenos (Haury *et al.*, 1997). Acredita-se que a secreção dessas imunoglobulinas se dê pelo contato com auto-antígenos e que elas desempenhem um papel fisiológico de manutenção da homeostase.

Contudo, as repercussões imunitárias do avanço da idade do indivíduo são diretamente mensuráveis, como nos casos da menor responsividade a vacinas (Dorrington e Bowdish, 2013; Lord, 2013), da maior propensão a doenças autoimunes (Vadasz *et al.*, 2013) e até mesmo da diminuição da diversidade do repertório de reconhecimento antigênico de células B (Troutaud *et al.*, 1999). Ou seja, existem características conservadas com a idade no repertório de reconhecimento antigênico, mas também modificações expressivas.

Não se sabe exatamente quando ou como ocorrem essas mudanças no perfil global de imunoreatividades e se, nesse espectro mais amplo, há também relações de causa e efeito entre essas mudanças nas imunoreatividades autólogas e indução de imunoreatividade por moléculas exógenas. Resultados preliminares do nosso grupo, utilizando abordagens descritas pelo mesmo (Nóbrega *et al.*, 1993; Haury *et al.*, 1994), parecem demonstrar que o perfil intenso e difuso de imunoreatividades observado nas subpopulações de células B secretoras de IgM provenientes de animais de 8 semanas ainda não está presente aos 3 dias de vida (Figuras 6 e 7).

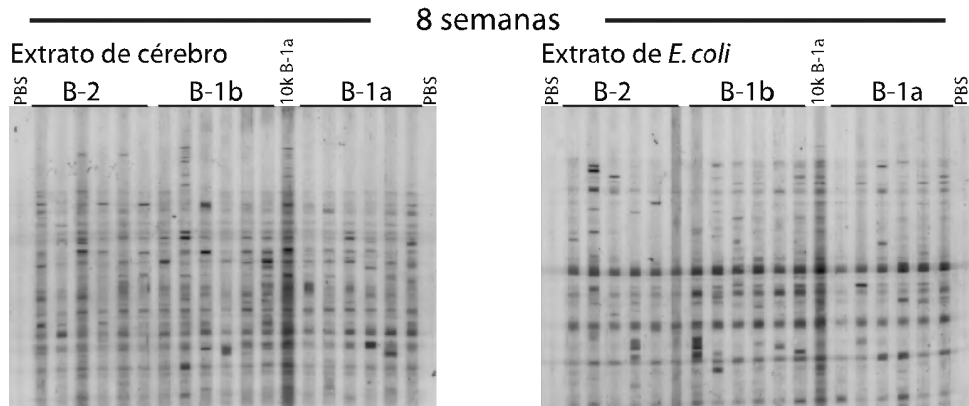


Figura 6: Ensaios de imunoblot a partir dos sobrenadantes das culturas de subpopulações de células B contra extrato de cérebro murino e *Escherichia coli*. Detecção de IgM. Método descrito por Nobrega *et al.*, 1994.

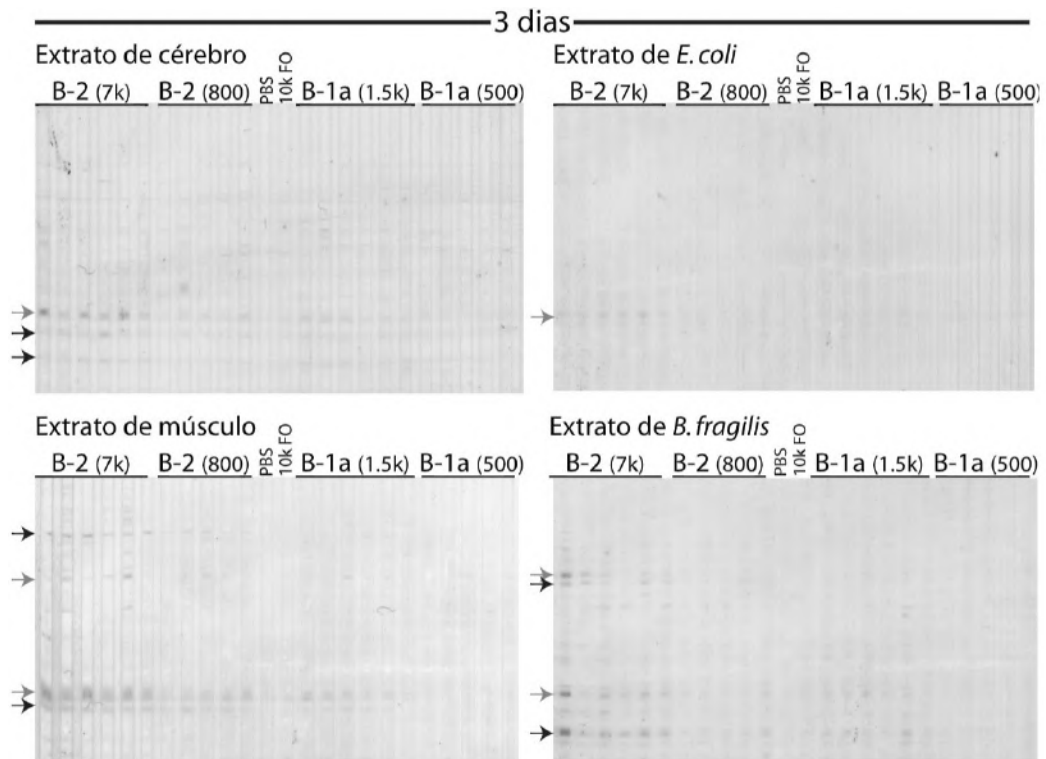


Figura 7: Ensaios de imunoblot a partir dos sobrenadantes das culturas de subpopulações de células B (do animal com 3 dias de vida) contra extratos de cérebro murino, *Escherichia coli*, músculo estriado murino e *Bacteroides fragilis*. Detecção de IgM. Método descrito por Nobrega *et al.*, 1994.

Interessantemente, o perfil de reconhecimento por IgM nesses ensaios preliminares com animais de 3 dias de vida foi muito mais intenso nos tecidos autólogos que nos bacterianos. Adicionalmente, pode-se perceber que o reconhecimento de *Bacteroides fragilis*, um microrganismo comensal cuja relação co-evolutiva com o hospedeiro mamífero é mais ancestral (Lee e Sarkis, 2010; Tito *et al.*, 2012), foi mais intenso que o reconhecimento de *Escherichia coli*, se assemelhando mais ao padrão de reconhecimento dos tecidos autólogos.

Surpreendentemente, observou-se maior reatividade nos sobrenadantes de cultura de células B-2 do que B-1a, apesar de se tratarem de células provenientes do baço de um animal de 3 dias de vida, em que predominam os linfócitos B-1a. Caso esse resultado seja observado de maneira consistente no futuro, pode-se formular duas hipóteses contrastantes a serem testadas. Uma primeira especulação seria a de que fenômenos de tolerância estejam envolvidos, talvez por fatores ambientais da fisiologia do neonato, em especial no que diz respeito ao fígado fetal e ao desenvolvimento das células B-1a, favorecendo a expressão de programas transcricionais mais tolerogênicos. Isso poderia suprimir a ativação policlonal, induzida nas culturas de células B pela presença de LPS, a qual estimula a secreção dos anticorpos que se encontrarão nos sobrenadantes utilizados nos ensaios de immunoblot. Desta forma, as células B-1a do neonato seriam mais dificilmente ativadas do que as do adulto. Como as células B-1a são mantidas no adulto por mitoses das células provenientes do fígado fetal, espera-se que o repertório seja semelhante ao do neonato, o que fortalece a ideia de que a predisposição à ativação policlonal dependeria de fatores ambientais que mudam com a idade. Outra possibilidade, é a de neutralização dessas reatividades pelo princípio da rede idiotípica (Hurez *et al.*, 1997; Spalter *et al.*, 1999), isto é, anticorpos que neutralizam outros anticorpos em uma espécie de processo regulatório, uma vez que os anticorpos envolvidos neste fenômeno parecem ser mais predominantes nos estágios iniciais de vida (Holmberg *et al.*, 1986) e no repertório das células B-1a (Yang *et al.*, 2012). Seguindo esta segunda hipótese, as células B-1a envolvidas em reconhecimento idiotípico (observadas por Holmberg *et al.*, 1986, mais frequentemente em neonatos que em adultos) se ligariam a imunoglobulinas, impedindo a atuação das mesmas e levando a uma menor observação de imunoreatividade. Análises com culturas de baixa densidade (diminuindo probabilidade de interferência) e anticorpos isolados (eliminando o fator celular) poderiam ajudar a solucionar essa questão, assim como o uso de outros ativadores policlonais além do LPS.

#### 4. CONCLUSÕES

Ainda que muito tenha-se avançado na compreensão dos fenômenos de diferenciação e ativação das diferentes subpopulações de linfócitos B, lacunas importantes permanecem em relação ao direcionamento da ontogenia e à potencial atuação de ligantes desconhecidos neste processo. Particularmente, no que diz respeito à constituição do repertório de reconhecimento antigênico, não se sabe até que ponto o contato com antígenos da microbiota intestinal participa dos processos de seleção positiva e negativa de células B.

Conforme mencionado, é bem estabelecido que o chamado repertório atual, composto por imunoglobulinas circulantes (séricas), varia em diferentes estágios de vida de indivíduos e que, com a idade, há um aumento de auto-reatividade. Esse aumento se dá principalmente pelo enriquecimento de auto-reatividades autólogas já anteriormente presentes, mas há também uma maior probabilidade de surgimento de novas auto-reatividades. Contudo, há poucos estudos acompanhando a emergência desse padrão auto-reativo ao longo do desenvolvimento e tais estudos não traçam correlações entre esse padrão e o desenvolvimento de afecções autoimunes, nem demonstram como esse padrão se distribui nas subpopulações de linfócitos B no decorrer da maturação dos indivíduos. Além disso, faltam estudos sobre a participação de processos de imunoreatividade cruzada no enriquecimento de auto-reatividades patogênicas nas subpopulações de linfócitos B e nos diferentes estágios de formação do repertório.

Em relação às recentes observações de associação entre colonização microbiana e afecções autoimunes, ficam pendentes esclarecimentos acerca de como um processo levaria ao outro e se há participação de imunoreatividade cruzada, mimetismo molecular e/ou espalhamento de epítopos. Especificamente, experimentos de imunização dos animais com antígenos de interesse ou extratos dos microrganismos estudados poderiam facilmente demonstrar se há ou não essa relação. Nos casos em que já há delineamento de antígenos de interesse, processos de imunoreatividade cruzada podem também ser investigados por métodos simples, como ELISA. Adicionalmente, métodos baseados em cultura de células B e immunoblot podem revelar múltiplos antígenos de interesse implicados em processos de imunoreatividade cruzada, seja por mimetismo molecular ou por características químicas, tais como carga e hidrofobicidade. Tais métodos, além de gerar uma grande quantidade de dados relevantes, criam um vínculo entre o



estudo das imunoreatividades implicadas em autoimunidade e o perfil global de repertório de reconhecimento antigênico, associado à fisiologia e homeostase.

Resultados preliminares do nosso grupo parecem indicar que a auto-reatividade fisiológica predomina no repertório do indivíduo neonato e que, nesse contexto, o reconhecimento de microrganismos se dá com mais intensidade quão mais ancestral é a relação destes com o hospedeiro. Caso isso se confirme, pode-se especular sobre a implicação da conservação evolutiva dos segmentos gênicos V(D)J, que darão origem aos anticorpos, na colonização do hospedeiro por microrganismos comensais e no controle populacional da microbiota. Adicionalmente, a compreensão do padrão de reatividade no contexto da homeostase pode auxiliar na elucidação dos processos que levam ao desequilíbrio imunopatológico.

A continuidade dessa linha investigativa pode ser de grande relevância na descrição etiológica de afecções autoimunes, no desenvolvimento de tratamentos direcionados para afecções autoimunes (alvejando, por exemplo, uma subpopulação de células B que esteja mais implicada na produção dos auto-anticorpos de interesse), no melhoramento de vacinas existentes (provendo os estímulos moleculares para a ativação preferencial de certa população de células B mais associada às imunoreatividades de interesse), no desenho racional para vacinas futuras (garantindo a segurança em relação a processos de imunoreatividade cruzada), em abordagens de imunoterapia e na compreensão da ontogenia e atuação das células B.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Abu-Ali, G.S., Mehta, R.S., Lloyd-Price, J., Mallick, H., Branck, T., Ivey, K.L., Drew, D.A., DuLong, C., Rimm, E., Izard, J., Chan, A.T. e Huttenhower, C. (2018). Metatranscriptome of human faecal microbial communities in a cohort of adult men. *Nat Microbiol.* 356-366
- Armbruster, C. E., Mobley, H., e Pearson, M. M. (2018). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus*, 8(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017
- Ansel, K. M., Harris, R. B., e Cyster, J. G. (2002). CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity*, 16, 67–76.
- Alt, F. W., e Baltimore, D. (1982). Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 4118–4122.
- Alt, F. W., Yancopoulos, G. D., Blackwell, T. K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S., e Baltimore, D. (1984). Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *The EMBO journal*, 3, 1209–1219.
- Sverinson E., Andersson, J., Sjöberg, O. e Möller, G. (1972). Induction of immunoglobulin and antibody synthesis in vitro by lipopolysaccharides. *European journal of immunology*, 2, 349–353.
- Andoh, A., Nishida, A., Takahashi, K., Inatomi, O., Imaeda, H., Bamba, S., Kito, K., Sugimoto, M., e Kobayashi, T. (2016). Comparison of the gut microbial community between obese and lean peoples using 16S gene sequencing in a Japanese population. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 59, 65–70
- Araujo, P. M., Holmberg, D., Martinez-A, C., & Coutinho, A. (1987). Idiotypic multireactivity of 'natural' antibodies. 'Natural' anti-idiotypes also inhibit helper cells with cross-reactive clonotypes. *Scandinavian journal of immunology*, 25, 497–505.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., e Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473, 174–180.
- Baaklini, I., Gonçalves, C. C., Lukacs, G. L., e Young, J. C. (2020). Selective Binding of HSC70 and its Co-Chaperones to Structural Hotspots on CFTR. *Scientific reports*, 10, 4176.
- Bai D, Ueno L, Vogt PK. Akt-mediated regulation of NFκB and the essentialness of NFκB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int J Cancer* (2009) 125(12):2863–70.10.1002/ijc.24748
- Barbouche, R., Forveille, M., Fischer, A., Avrameas, S., & Durandy, A. (1992). Spontaneous IgM autoantibody production in vitro by B lymphocytes of normal human neonates. *Scandinavian journal of immunology*, 35(6), 659–667.
- Barton, G.M. e Medzhitov, R. (2003). Toll-like receptor signaling pathways. *Science*. 300:1524–5.
- Bentolila, L.A., Olson, S., Marshall, A., Rougeon, F., Paige, C.J., Doyen, N. e Wu, G.E. (1999). Extensive junctional diversity in Ig light chain genes from early B cell progenitors of mu MT mice. *J Immunol.* 162:2123-8.
- Benson, M. J., Erickson, L. D., Gleeson, M. W., e Noelle, R. J. (2007). Affinity of antigen encounter and other early B-cell signals determine B-cell fate. *Current opinion in immunology*, 19, 275–280.
- Bentley, R., e Meganathan, R. (1982). Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiological reviews*, 46(3), 241–280.
- Berek, C., Berger, A., e Apel, M. (1991). Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*, 67, 1121–1129.
- Bergqvist, P., Stensson, A., Lycke, N. Y., e Bemark, M. (2010). T cell-independent IgA class switch recombination is restricted to the GALT and occurs prior to manifest germinal center formation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 184, 3545–3553.

- Berland, R. e Wortis, H.H. (2002). Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol.* 20:253-300.
- Bernasconi, N. L., Traggiai, E., e Lanzavecchia, A. (2002). Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science (New York, N.Y.)*, 298, 2199–2202.
- Bernasconi, N. L., Onai, N., e Lanzavecchia, A. (2003). A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood*, 101, 4500–4504. .
- Bernstein, A., Forrester, L., Reith, A. D., Dubreuil, P., & Rottapel, R. (1991). The murine W/c-kit and Steel loci and the control of hematopoiesis. *Seminars in hematology*, 28(2), 138–142.
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: An overview. *Mol. Immunol.* 40, 845–859.
- Blink, E. J., Light, A., Kallies, A., Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., e Tarlinton, D. M. (2005). Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *The Journal of experimental medicine*, 201, 545–554.
- Boekel, E., Melchers, F., e Rolink, A. G. (1997). Changes in the V(H) gene repertoire of developing precursor B lymphocytes in mouse bone marrow mediated by the pre-B cell receptor. *Immunity*, 7, 357–368.
- Bollinger, R. R., Everett, M. L., Palestrant, D., Love, S. D., Lin, S. S., e Parker, W. (2003). Human secretory immunoglobulin A may contribute to biofilm formation in the gut. *Immunology*, 109, 580–587.
- Bossie, A., e Vitetta, E. S. (1991). IFN-gamma enhances secretion of IgG2a from IgG2a-committed LPS-stimulated murine B cells: implications for the role of IFN-gamma in class switching. *Cellular immunology*, 135(1), 95–104.
- Ben Braïek, O., e Smaoui, S. (2019). Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *BioMed research international*, 2019, 5938210.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., e Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441, 235–238.
- Brandtzaeg, P. (2010). Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation [published correction appears in *Immunol Invest.* 303-355.
- Brière, F., Servet-Delprat, C., Bridon, J. M., Saint-Remy, J. M., e Banchereau, J. (1994). Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (sIgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3. *The Journal of experimental medicine*, 179(2), 757–762.
- Britt, N. S., e Potter, E. M. (2016). Clinical epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* bloodstream infections. *Journal of global antimicrobial resistance*, 5, 57–61. .
- Browne E. P. (2012). Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. *Immunology*, 136, 370–379.
- Browne, H. P., Forster, S. C., Anonye, B. O., Kumar, N., Neville, B. A., Stares, M. D., Goulding, D., e Lawley, T. D. (2016). Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature*, 53, 543–546.
- Brugiroux, S., Beutler, M., Pfann, C., Garzetti, D., Ruscheweyh, H. J., Ring, D., Diehl, M., Herp, S., Lötscher, Y., Hussain, S., Bunk, B., Pukall, R., Huson, D. H., Münch, P. C., McHardy, A. C., McCoy, K. D., Macpherson, A. J., Loy, A., Clavel, T., Berry, D., e Stecher, B. (2016). Genome-guided design of a defined mouse microbiota that confers colonization resistance against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Nature microbiology*, 2, 16215.
- Bryant, R. W. Jr, e Bentley, R. (1976). Menaquinone biosynthesis: conversion of o-succinylbenzoic acid to 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid and menaquinones by *Escherichia coli* extracts. *Biochemistry*, 15, 4792–4796.
- Burall, L. S., Harro, J. M., Li, X., Lockatell, C. V., Himpfl, S. D., Hebel, J. R., Johnson, D. E., e Mobley, H. L. (2004). *Proteus mirabilis* genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold. *Infection and immunity*, 72, 2922–2938.
- Burnet F. M. (1957). A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA: a cancer journal for clinicians*, 26, 119–121.

- Carter, R.H., Fearon, D.T. (1992) CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science*. 256(5053):105-107.
- Clark, M. R., Mandal, M., Ochiai, K., e Singh, H. (2014). Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nature reviews. Immunology*, 14,69–80.
- Claassen, J. L., Levine, A. D., e Buckley, R. H. (1990). Recombinant human IL-4 induces IgE and IgG synthesis by normal and atopic donor mononuclear cells. Similar dose response, time course, requirement for T cells, and effect of pokeweed mitogen. *Journal of immunology (Baltimore, Md)*, 144,2123–2130.
- Clements, A., Young, J. C., Constantinou, N., e Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut microbes*, 3, 71–87.
- Cochi, S.L., Broome, C.V. e Hightower, A.W. (1985). Immunization of US Children With Haemophilus influenzae Type b Polysaccharide Vaccine: A Cost-effectiveness Model of Strategy Assessment. *JAMA* 253:521–529.
- Cooper, M. D., & Alder, M. N. (2006). The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, 124, 815–822.
- Cox, D., Chang, P., Kurosaki, T. e Greenberg, S. (1996) Syk tyrosine kinase is required for immunoreceptor tyrosine activation motif-dependent actin assembly. *J. Biol. Chem.*, 271, 16597–16602.
- Chen, Y., Chaudhary, N., Yang, N., Granato, A., Turner, J. A., Howard, S. L., Devereaux, C., Zuo, T., Shrestha, A., Goel, R. R., Neuberger, D., e Wesemann, D. R. (2018). Microbial symbionts regulate the primary Ig repertoire. *The Journal of experimental medicine*, 215, 1397–1415. <https://doi.org/10.1084/jem.20171761>
- Chen, D.K., Pearce, L., McGeer, A., Low, D.E. e Willey, B.M. (2000). Evaluation of D-xylose and 1% methyl-alpha-D-glucopyranoside fermentation tests for distinguishing *Enterococcus gallinarum* from *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 38:3652-5.
- Chen, C. R., McLachlan, S. M., e Rapoport, B. (2009). A monoclonal antibody with thyrotropin (TSH) receptor inverse agonist and TSH antagonist activities binds to the receptor hinge region as well as to the leucine-rich domain. *Endocrinology*, 150, 3401–3408.
- Chen, H. C., Eling, N., Martinez-Jimenez, C. P., O'Brien, L. M., Carbonaro, V., Marioni, J. C., Odom, D. T., e de la Roche, M. (2019). IL-7-dependent compositional changes within the  $\gamma\delta$  T cell pool in lymph nodes during ageing lead to an unbalanced anti-tumour response. *EMBO reports*, 20, e47379.
- Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A.Y. e Germain, R.N. (2006). Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J Exp Med*. 203:2841–2852.
- Chung, Y.W., Gwak, H.J., Moon, S., Rho, M. e Ryu, J.H. (2020). Functional dynamics of bacterial species in the mouse gut microbiome revealed by metagenomic and metatranscriptomic analyses. *PLoS One*. 24;15:0227886.
- Cunningham, M. W., Hall, N. K., Krisher, K. K., & Spanier, A. M. (1986). A study of anti-group A streptococcal monoclonal antibodies cross-reactive with myosin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 136(1), 293–298. *ococcal monoclonal antibodies cross-reactive with myosin. 1 Immunol* 136: 293-298
- Cyster, J. G., Healy, J. I., Kishihara, K., Mak, T. W., Thomas, M. L., e Goodnow, C. C. (1996). Regulation of B-lymphocyte negative and positive selection by tyrosine phosphatase CD45. *Nature*, 381,325–328.
- Dai, Y., Wong, B., Yen, Y.M., Oettinger, M.A., Kwon, J., Johnson, R.C. (2005). Determinants of HMGB proteins required to promote RAG1/2-recombination signal sequence complex assembly and catalysis during V(D)J recombination. *Mol Cell Biol*. 25:4413-4425.
- Darland, G. e Davis, B. R. (1974). Biochemical and serological characterization of hydrogen sulfide-positive variants of *Escherichia coli*. *Applied microbiology*, 27, 54–58.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H. e Gotoh, Y. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91(2):231–41.10.1016/S0092-8674(00)80405-5
- Dekkers, G., Bentlage, A., Stegmann, T. C., Howie, H. L., Lissenberg-Thunnissen, S., Zimring, J., Rispens, T., & Vidarsson, G. (2017). Affinity of human IgG subclasses to mouse Fc gamma receptors. *mAbs*, 9, 767–773.
- Devriese, L. A., Pot, B., Kersters, K., Lauwers, S., e Haesebrouck, F. (1996). Acidification of methyl-alpha-D-glucopyranoside: a useful test to differentiate *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus*

*gallinarum* from *Enterococcus faecium* species group and from *Enterococcus faecalis*. *Journal of clinical microbiology*, 34, 2607–2608.

DiSciascio, G. e Taranta, A. (1980). Rheumatic fever in children. *Am Heart J* 99: 635

Dorrington, M.G. e Bowdish, D.M. (2013). Immunosenescence and novel vaccination strategies for the elderly. *Front Immunol.* 4:171.

Draper, D.L. e Barry, A.L. (1977). Rapid identification of *Bacteroides fragilis* with bile and antibiotic disks. *J Clin Microbiol.*;5:439-43.

Edberg, S.C., Rice, E.W., Karlin, R.J. e Allen, M.J. (2000). *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Symp Ser Soc Appl Microbiol.* 106S-116S.

Ellis, J.R., Glover, J. (1968). Some aspects of menaquinone biosynthesis in *Escherichia coli* E 106. *Biochem J.* 110:22P–22P.

Engel, P., Zhou, L.J., Ord, D.C., Sato, S., Koller, B. e Tedder, T.F. (1995). Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity* 39-50.

Faria, A. M., Gomes-Santos, A. C., Gonçalves, J. L., Moreira, T. G., Medeiros, S. R., Dourado, L. P., e Cara, D. C. (2013). Food components and the immune system: from tonic agents to allergens. *Frontiers in immunology*, 4, 102.

Faro, J., e Or-Guil, M. (2013). How oligoclonal are germinal centers? A new method for estimating clonal diversity from immunohistological sections. *BMC bioinformatics*, 14 Suppl 6, S8.

Feeney, A.J. e Riblet, R. (1993). D ST4 : a new, and probably the last, functional D H gene in the BALB/c mouse. *Immunogenetics* 37, 217–221.

Fillit, H.M., Damle, S.P., Gregory, J.D., Volin, C., Poon-King, T. e Zabriskie, J.B. (1984). Sera from patients with poststreptococcal glomerulonephritis contain antibodies to glomerula heparan sulphate proteoglycan. *J Exp Med* 161: 277

Freitas, A. A., e Rocha, B. (2000). Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annual review of immunology*, 18, 83–111.

Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., e De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International journal of food microbiology*, 106, 1–24.

Fousteri, G., e Dave Jhatakia, A. (2019). Viral Infections and Autoimmune Disease: Roles of LCMV in Delineating Mechanisms of Immune Tolerance. *Viruses*, 11(10), 885.

Freitas, A. A., Viale, A. C., Sundblad, A., Heusser, C., e Coutinho, A. (1991). Normal serum immunoglobulins participate in the selection of peripheral B-cell repertoires. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 5640–5644.

Fu, C. e Chan, A.C. (1997). Identification of two tyrosine phosphoproteins, pp70 and pp68, that interact with PLC $\gamma$ , Grb2, and Vav following B cell antigen receptor activation. *J. Biol. Chem.*, 272, 27362–27368.

Funk, P. E., Varas, A., e Witte, P. L. (1993). Activity of stem cell factor and IL-7 in combination on normal bone marrow B lineage cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 150, 748–752.

Garcia, B., Rodríguez, R., Angulo, I., Heath, A. W., Howard, M. C., e Subiza, J. L. (1996). Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on IgA vs. IgG2b production by lipopolysaccharide-stimulated lymph node B cells: a comparative study with spleen B cells. *European journal of immunology*, 26, 2364–2370.

Gaudin, E., Hao, Y., Rosado, M. M., Chaby, R., Girard, R., e Freitas, A. A. (2004). Positive selection of B cells expressing low densities of self-reactive BCRs. *The Journal of experimental medicine*, 199, 843–853.

Garside, P., Ingulli, E., Merica, R. R., Johnson, J. G., Noelle, R. J., e Jenkins, M. K. (1998). Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science (New York, N.Y.)*, 281, 96–99.

Gleeson, M., e Cripps, A. W. (2004). Development of mucosal immunity in the first year of life and relationship to sudden infant death syndrome. *FEMS immunology and medical microbiology*, 42, 21–33.

- Good-Jacobson, K.L., Szumilas, C.G., Chen, L., Sharpe, A.H., Tomayko, M.M., Shlomchik, M.J. (2010). PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol.* 535-42.
- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blehman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J. T., Spector, T. D., Clark, A. G., e Ley, R. E. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, 159, 789–799.
- Gorman, J. R., e Alt, F. W. (1998). Regulation of immunoglobulin light chain isotype expression. *Advances in immunology*, 69, 113–181.
- Gould, H.J. e Wu, Y.B. (2018). IgE repertoire and immunological memory: compartmental regulation and antibody function. *Int Immunol.* 403-412.
- Graf, R., Seagal, J., Otipoby, K. L., Lam, K. P., Ayoub, S., Zhang, B., Sander, S., Chu, V. T., e Rajewsky, K. (2019). BCR-dependent lineage plasticity in mature B cells. *Science (New York, N.Y.)*, 363(6428), 748–753.
- Grozdanov, L., Raasch, C., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., e Dobrindt, U. (2004). Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Journal of bacteriology*, 186, 5432–5441.
- Grumont, R.J., Strasser, A. e Gerondakis, S. (2002). B cell growth is controlled by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent induction of Rel/NF- $\kappa$ B regulated c-myc transcription. *Mol Cell* 10(6):1283–94
- Gu, H., D. Tarlinton, W. Müller, K. Rajewsky, e Förster, I. (1991). Most peripheral B cells in mice are ligand selected. *J. Exp. Med.* 173:1357–1371.
- Gutzeit, C., Magri, G. e Cerutti, A. (2014). Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol Rev.* 76-85.
- Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Müller, W., Sparwasser, T., Förster, R., e Pabst, O. (2011). Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity*, 34, 237–246.
- Hayakawa, K., Hardy, R.R., Parks, D.R. e Herzenberg, L.A. (1983). The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med.* 202-18.
- Hayakawa, K., Hardy, R.R. e Herzenberg, L.A. (1985). Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J Exp Med.* 1554-1568.
- Hardy, R. R., Kishimoto, T. e Hayakawa, K. (1987). Differentiation of B cell progenitors in vitro: generation of surface IgM<sup>+</sup> B cells, including Ly-1 B cells, from Thy-1- asialoGM1<sup>+</sup> cells in newborn liver. *Eur. J. Immunol.* 1769–1774.
- Hardy, R.R. (1990). Development of murine B cell subpopulations. *Semin Immunol.* 2:197-206.
- Hardy, R.R., Hayakawa, K. (2001). B cell development pathways. *Annu Rev Immunol.* 19:595-621.
- Hauptmann, G., Grosshans, E., E Heid, E. (1974). Lupus erythematosus syndrome and complete deficiency of the fourth component of complement. *Bollettino dell'Istituto sieroterapico milanese*, 53, 228.
- Haury, M., Grandien, A., Sundblad, A., Coutinho, A., Nobrega, A. (1994). Global analysis of antibody repertoires. I. An immunoblot method for the quantitative screening of a large number of reactivities. *Scand J Immunol.* 79-87.
- Haury, M., Sundblad, A., Grandien, A., Barreau, C., Coutinho, A., e Nobrega, A. (1997). The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. *European journal of immunology*, 27, 1557–1563.
- He, X., Kläsener, K., Iype, J. M., Becker, M., Maity, P. C., Cavallari, M., Nielsen, P. J., Yang, J., e Reth, M. (2018). Continuous signaling of CD79b and CD19 is required for the fitness of Burkitt lymphoma B cells. *The EMBO journal*, 37, e97980.
- Hebenstreit, D., Wirnsberger, G., Horejs-Hoeck, J., e Duschl, A. (2006). Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine & growth factor reviews*, 17, 173–188.

- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., e Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313–1318.
- Hoffmann, C., Dollive, S., Grunberg, S., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., Lewis, J. D., e Bushman, F. D. (2013). Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PloS one*, 8, e66019.
- Hollenbeck, B.L. e Rice, L.B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*. 421-33.
- Holmberg, D., Forsgren, S., Ivars, F., e Coutinho, A. (1984). Reactions among IgM antibodies derived from normal, neonatal mice. *European journal of immunology*, 14, 435–441.
- Holmberg, D., Wennerström, G., Andrade, L., e Coutinho, A. (1986). The high idiotypic connectivity of "natural" newborn antibodies is not found in adult mitogen-reactive B cell repertoires. *European journal of immunology*, 16, 82–87.
- Hooper, L.V. e Gordon, J.I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*. 1115-1118.
- Hufnagel, M., Kropec, A., Theilacker, C. e Huebner, J. (2005). Naturally acquired antibodies against four *Enterococcus faecalis* capsular polysaccharides in healthy human sera. *Clin Diagn Lab Immunol*. 930-4.
- Ishiai, M., Kurosaki, M., Pappu, R., Okawa, K., Ronko, I. e Fu, C. (1999). BLNK required for coupling Syk to PLC $\gamma$ 2 and Rac1-JNK in B cells. *Immunity* 10:117–25.10.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. e Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 169:5429-5433.
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J., Su, B. (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell*. 127:125-37.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54, 1–13.
- Jin, W., Luo, Z., & Yang, H. (2020). Peripheral B Cell Subsets in Autoimmune Diseases: Clinical Implications and Effects of B Cell-Targeted Therapies. *Journal of immunology research*, 2020, 9518137.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337:816-821.
- Jongh-Leuvenink, J., Bouter, A. S., Marcelis, J. H., Schellekens, J., e Verhoef, J. (1986). Cross-reactivity of monoclonal antibodies against lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. *European journal of clinical microbiology*, 5, 148–151.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. P., Rochat, F., e Chassard, C. (2014). Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environmental microbiology*, 16, 2891–2904.
- Kantor, A. B., Merrill, C. E., Herzenberg, L. A., e Hillson, J. L. (1997). An unbiased analysis of V(H)-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 158, 1175–1186.
- Kaplan, D., Ferrari, I., Bergami, P. L., Mahler, E., Levitus, G., Chiale, P., Hoebeke, J., Van Regenmortel, M. H., e Levin, M. J. (1997). Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 10301–10306.
- Karasuyama, H., Kudo, A. e Melchers, F. (1990). The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. *J Exp Med*. 172:969-972
- Kawahara, T., Ohdan, H., Zhao, G., Yang, Y. G., e Sykes, M. (2003). Peritoneal cavity B cells are precursors of splenic IgM natural antibody-producing cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171, 5406–5414.
- Kawasaki, T. e Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*, 5, 461.

- Kearney, J. F., Bartels, J., Hamilton, A. M., Lehuen, A., Solvason, N., e Vakil, M. (1992). Development and function of the early B cell repertoire. *International reviews of immunology*, 8, 247–257.
- Kelly, D.F., Moxon, E.R. e Pollard, A.J. (2004). Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. *Immunology*. 113:163-174. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01971.x
- Kim, I., T. L. Saunders, S. J. Morrison. (2007). Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells. *Cell* 130: 470–483.
- Kim, J. W., Kwok, S. K., Choe, J. Y., e Park, S. H. (2019). Recent Advances in Our Understanding of the Link between the Intestinal Microbiota and Systemic Lupus Erythematosus. *International journal of molecular sciences*, 20, 4871.
- Klaasen, H. L., Van der Heijden, P. J., Stok, W., Poelma, F. G., Koopman, J. P., Van den Brink, M. E., Bakker, M. H., Eling, W. M., e Beynen, A. C. (1993). Apathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune system of mice. *Infection and immunity*, 61, 303–306.
- Klein, U., Rajewsky, K., e Küppers, R. (1998). Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *The Journal of experimental medicine*, 188, 1679–1689.
- Kondo, M., Weissman, I.L. e Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 91:661-672.
- Knox W. F. (1986). Restricted feeding and human intestinal plasma cell development. *Archives of disease in childhood*, 61, 744–749.
- Kordy, K., Gaufin, T., Mwangi, M., Li, F., Cerini, C., Lee, D. J., Adisetiyo, H., Woodward, C., Pannaraj, P. S., Tobin, N. H., e Aldrovandi, G. M. (2020). Contributions to human breast milk microbiome and enteromammary transfer of *Bifidobacterium breve*. *PloS one*, 15, e0219633.
- Kövesdi, D., Bell, S.E. e Turner, M. (2010). The development of mature B lymphocytes requires the combined function of CD19 and the p110 $\delta$  subunit of PI3K. *Self Nonself*. 2:144-153.
- Kyle-Cezar, F., Echevarria-Lima, J., dos Santos Goldenberg, R. C., e Rumjanek, V. M. (2007). Expression of c-kit and Sca-1 and their relationship with multidrug resistance protein 1 in mouse bone marrow mononuclear cells. *Immunology*, 121(1), 122–128.
- Labrie, J. E., 3rd, Borghesi, L., e Gerstein, R. M. (2005). Bone marrow microenvironmental changes in aged mice compromise V(D)J recombinase activity and B cell generation. *Seminars in immunology*, 17, 347–355.
- Lalor, P. A., Herzenberg, L.A., Adams, A. e Stall, M. (1989a). Feedback regulation of murine Ly-1 B cell development. *Eur. J. Immunol.* 507–513.
- Lalor, P. A., Stall, M., Adams, A. e Herzenberg, L.A.. (1989b). Permanent alteration of the murine Ly-1 B repertoire due to selective depletion of Ly-1 B cells in neonatal animals. *Eur. J. Immunol* 501-6.
- Lam, K. P., Kühn, R., e Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell*, 90, 1073–1083.
- Lampert, P. W., e Oldstone, M. B. (1973). Host immunoglobulin G and complement deposits in the choroid plexus during spontaneous immune complex disease. *Science (New York, N.Y.)*, 180(4084), 408–410.
- Law C.-L., Chandra, K.A., Sidorenko, S.P. e Clark, E.A. (1996) Phospholipase C- $\gamma$ 1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 1305–1315.
- Lawrence, J. G., e Roth, J. R. (1996). Evolution of coenzyme B12 synthesis among enteric bacteria: evidence for loss and reacquisition of a multigene complex. *Genetics*, 142, 11–24.
- Leclercq, R., Dutka-Malen, S., Duval, J., e Courvalin, P. (1992). Vancomycin resistance gene vanC is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 36, 2005–2008.
- Lee-Chang, C., Bodogai, M., Moritoh, K., Chen, X., Wersto, R., Sen, R., Young, H. A., Croft, M., Ferrucci, L., e Biragyn, A. (2016). Aging Converts Innate B1a Cells into Potent CD8+ T Cell Inducers. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 196, 3385–3397



- Lee, Y. K., & Mazmanian, S. K. (2010). Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system?. *Science (New York, N.Y.)*, 330, 1768–1773.
- Lefranc, M. P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V., e Lefranc, G. (2003). IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Developmental and comparative immunology*, 27, 55–77.
- Leon, J. S., Wang, K., e Engman, D. M. (2003). Myosin autoimmunity is not essential for cardiac inflammation in acute Chagas' disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171, 4271–4277.
- Leon, J. S., Daniels, M. D., Toriello, K. M., Wang, K., e Engman, D. M. (2004). A cardiac myosin-specific autoimmune response is induced by immunization with *Trypanosoma cruzi* proteins. *Infection and immunity*, 72, 3410–3417.
- Levine, M. H., Haberman, A. M., Sant'Angelo, D. B., Hannum, L. G., Cancro, M. P., Janeway, C. A., Jr, e Shlomchik, M. J. (2000). A B-cell receptor-specific selection step governs immature to mature B cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 2743–2748.
- Lewis, S. e Gellert, M. (1989). The mechanism of antigen receptor gene assembly. *Cell* 59:585–588.
- Lewis, S.M. (1994a). The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, comparative analyses. *Adv Immunol* 56:27–150.
- Lewis, S.M. (1994b). P nucleotide insertions and the resolution of hairpin DNA structures in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1332–1336.
- Littman, D. R., e Pamer, E. G. (2011). Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell host & microbe*, 10, 311–323.
- Lord, J.M.(2013). The effect of ageing of the immune system on vaccination responses. *Hum Vaccin Immunother.* 9:1364-1367.
- Lortan, J.E., Roobottom, C.A., Oldfield, S. e MacLennan, I.C. (1987). Newly produced virgin B cells migrate to secondary lymphoid organs but their capacity to enter follicles is restricted. *Eur J Immunol*, 17, 1311-6.
- Macpherson, A. J., Lamarre, A., McCoy, K., Harriman, G. R., Odermatt, B., Dougan, G., Hengartner, H., e Zinkernagel, R. M. (2001). IgA production without mu or delta chain expression in developing B cells. *Nature immunology.*, 625–631.
- Macpherson, A. J., e Harris, N. L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 4, 478–485. <https://doi.org/10.1038/nri1373>
- Manero, A., e Blanch, A. R. (1999). Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4425–4430.
- Manfredo Vieira, S., Hiltensperger, M., Kumar, V., Zegarra-Ruiz, D., Dehner, C., Khan, N., Costa, F., Tiniakou, E., Greiling, T., Ruff, W., Barbieri, A., Kriegel, C., Mehta, S. S., Knight, J. R., Jain, D., Goodman, A. L., e Kriegel, M. A. (2018). Translocation of a gut pathobiont drives autoimmunity in mice and humans. *Science (New York, N.Y.)*, 359, 1156–1161.
- Martin, J. D., e Mundt, J. O. (1972). Enterococci in insects. *Applied microbiology*, 24(4), 575–580.
- Martin, F., e Kearney, J. F. (2001). B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Current opinion in immunology*, 13, 195–201.
- Matzinger P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology*, 12, 991–1045.
- Mayer, P. A., Hance, K. W. e Hoos, A. (2018). The promise and challenges of immune agonist antibody development in cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, 17, 509–527.
- Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O. e Kasper, D. L. (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122(1), 107–118.
- Mazmanian, S. K., e Kasper, D. L. (2006). The love-hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system. *Nature reviews. Immunology*, 6(11), 849–858.

- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449,819–826.
- Melchers, F., Strasser, A., Bauer, S.R., Kudo, A., Thalmann, P. e Rolink, A. (1991). B cell development in fetal liver. *Adv Exp Med Biol.* 292:201-205.
- Melchers, F., Ten Boekel, E., Seidl, T., Kong, X. C., Yamagami, T., Onishi, K., Shimizu, T., Rolink, A. G., e Andersson, J. (2000). Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunological reviews*, 175, 33–46.
- Mellander, L., Carlsson, B., e Hanson, L. A. (1984). Appearance of secretory IgM and IgA antibodies to *Escherichia coli* in saliva during early infancy and childhood. *The Journal of pediatrics*, 104, 564–568.
- Miller, D.J., Hanson, K.D., Carman, J.A., Hayes, C.E. (1992). A single autosomal gene defect severely limits IgG but not IgM responses in B lymphocyte-deficient A/WySnJ mice. *Eur J Immunol.* 22:373-379.
- Mond, J. J., Vos, Q., Lees, A., e Snapper, C. M. (1995). T cell independent antigens. *Current opinion in immunology*, 7, 349–354.
- Montecino-Rodriguez, E., H. Leathers, K. Dorshkind. (2006). Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat. Immunol.* 7: 293–301.
- Montecino-Rodriguez, E., e Dorshkind, K. (2012). B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity*, 36, 13–21.
- Moon, U. Y., Park, S. J., Oh, S. T., Kim, W. U., Park, S. H., Lee, S. H., Cho, C. S., Kim, H. Y., Lee, W. K., e Lee, S. K. (2004). Patients with systemic lupus erythematosus have abnormally elevated Epstein-Barr virus load in blood. *Arthritis research & therapy*, 6, R295–R302.
- Morowitz, M. J., Carlisle, E. M., e Alverdy, J. C. (2011). Contributions of intestinal bacteria to nutrition and metabolism in the critically ill. *The Surgical clinics of North America*, 91, 771–viii.
- Murakami, M. e Honjo, T. (1995). B-1 cells and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci.* 764:402-409.
- Murray B. E. (1990). The life and times of the Enterococcus. *Clinical microbiology reviews*, 3, 46–65.
- Nagpal, R., Mainali, R., Ahmadi, S., Wang, S., Singh, R., Kavanagh, K., Kitzman, D. W., Kushugulova, A., Marotta, F., e Yadav, H. (2018). Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutrition and healthy aging*, 4, 267–285.
- Niess, J. H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B. A., Vyas, J. M., Boes, M., Ploegh, H. L., Fox, J. G., Littman, D. R., e Reinecker, H. C. (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science (New York, N.Y.)*, 307, 254–258.
- Niiri, H., Clark, E.A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* 2:945.10.1038/nri955
- Nilsson, L., Khalid, B., Olafsson, O., Zalcborg, I., Samakovlis, C., Hammarström, L., Smith, C., e Sideras, P. (1991). Structure of TGF- $\beta$ 1-induced human immunoglobulin C $\alpha$ 1 and C $\alpha$ 2 germ-line transcripts. *International Immunology*, 1107–1115.
- Nikawa, T., Ikemoto, M., Kano, M., Tokuoka, K., Hirasaka, K., Uehara, S., Takatsu, K., Rokutan, K., e Kishi, K. (2001). Impaired vitamin A-mediated mucosal IgA response in IL-5 receptor-knockout mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 285, 546–549.
- Nishino, H., Shibuya, K., Nishida, Y., e Mushimoto, M. (1981). Lupus erythematosus-like syndrome with selective complete deficiency of C1q. *Annals of internal medicine*, 95, 322–324.
- Nobrega, A., Haury, M., Grandien, A., Malanchère, E., Sundblad, A. e Coutinho, A. (1993). Global analysis of antibody repertoires. II. Evidence for specificity, self-selection and the immunological "homunculus" of antibodies in normal serum. *European journal of immunology*, 23, 2851–2859.
- Nobrega, A., Haury, M., Gueret, R., Coutinho, A., e Weksler, M.E. (1996). The age-associated increase in autoreactive immunoglobulins reflects a quantitative increase in specificities detectable at lower concentrations in young mice. *Scand J Immunol*, 437-443.

- Noelle, R. J., e Snow, E. C. (1990). Cognate interactions between helper T cells and B cells. *Immunology today*, 11, 361–368.
- Notarangelo, L. D., Lanzi, G., Peron, S., e Durandy, A. (2006). Defects of class-switch recombination. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 117(4), 855–864.
- Nurieva, R. I., Chung, Y., Martinez, G. J., Yang, X. O., Tanaka, S., Matskevitch, T. D., Wang, Y. H., e Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science (New York, N.Y.)*, 325, 1001–1005.
- 43 Ohira, H., Tsutsui, W., e Fujioka, Y. (2017). Are Short Chain Fatty Acids in Gut Microbiota Defensive Players for Inflammation and Atherosclerosis?. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 24, 660–672.
- Ogier, J. C., e Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *International journal of food microbiology*, 126, 291–301.
- Ohashi, P. S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C. T., Odermatt, B., Malissen, B., Zinkernagel, R. M., e Hengartner, H. (1991). Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell*, 65, 305–317.
- Okada, T., Maeda, A., Iwamatsu, A., Gotoh, K. e Kurosaki, T. (2000) BCAP: the tyrosine kinase substrate that connects B cell receptor to phosphoinositide 3-kinase activation. *Immunity*, 13, 817–827.
- Okada, T., Miller, M.J., Parker, I., Krummel, M.F., Neighbors, M., Hartley, S.B., O'Garra, A., Cahalan, M.D. e Cyster, J.G.(2005). Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biol.* e150.
- Oldstone M. B. (1987). Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell*, 50(6), 819–820.
- Otero, D.C., Omori, S.A. e Rickert, R.C. (2001). Cd19-dependent activation of Akt kinase in B-lymphocytes. *J Biol Chem.* 276:1474-8.
- Patrick, S., Blakely, G. W., Houston, S., Moore, J., Abratt, V. R., Bertalan, M., Cerdeño-Tárraga, A. M., Quail, M. A., Corton, N., Corton, C., Bignell, A., Barron, A., Clark, L., Bentley, S. D., e Parkhill, J. (2010). Twenty-eight divergent polysaccharide loci specifying within- and amongst-strain capsule diversity in three strains of *Bacteroides fragilis*. *Microbiology (Reading, England)*, 156, 3255–3269.
- Parker, D.C. (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol.*, 11:331-60.
- Pascual, V., Chaussabel, D., e Banchereau, J. (2010). A genomic approach to human autoimmune diseases. *Annual review of immunology*, 28, 535–571.
- Perlmutter, R. M., Kearney, J. F., Chang, S. P., e Hood, L. E. (1985). Developmentally controlled expression of immunoglobulin VH genes. *Science (New York, N.Y.)*, 227, 1597–1601.
- Perkkiö, M., e Savilahti, E. (1980). Time of appearance of immunoglobulin-containing cells in the mucosa of the neonatal intestine. *Pediatric research*, 14, 953–955.
- Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Adv Immunol.* 2000;76:227-324.
- Plaut, A. G., Wistar, R., Jr, e Capra, J. D. (1974). Differential susceptibility of human IgA immunoglobulins to streptococcal IgA protease. *The Journal of clinical investigation*, 54(6), 1295–1300.
- Poole, B. D., Scofield, R. H., Harley, J. B., & James, J. A. (2006). Epstein-Barr virus and molecular mimicry in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 39(1), 63–70.
- Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B. G., McKenzie, A. N., Menon, S., Zurawski, G., de Waal Malefyt, R., e de Vries, J. E. (1993). Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(8), 3730–3734.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., e Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 59–65.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, 381(6585), 751–758.

- Ramsden, D.A., Baetz, K., Wu, G.E. (1994) Conservation of sequence in recombination signal sequence spacers. *Nucleic Acids Res.* 22:1785-1796.
- Rengaraj, R., Mariappan, S., Sekar, U., e Kamalanadhan, A. (2016). Detection of Vancomycin Resistance among *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 10, DC04–DC6.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., e Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology*, 2, 361–367.
- Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature* (1989) 338:383.
- Rodriguez-Zhurbenko, N., Quach, T. D., Hopkins, T. J., Rothstein, T. L., e Hernandez, A. M. (2019). Human B-1 Cells and B-1 Cell Antibodies Change With Advancing Age. *Frontiers in immunology*, 10, 483.
- Rohlke, F., e Stollman, N. (2012). Fecal microbiota transplantation in relapsing *Clostridium difficile* infection. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 5, 403–420.
- Rolink, A. G., Winkler, T., Melchers, F., e Andersson, J. (2000). Precursor B cell receptor-dependent B cell proliferation and differentiation does not require the bone marrow or fetal liver environment. *The Journal of experimental medicine*, 191, 23–32.
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., e Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European journal of nutrition*, 57(1), 1–24.
- Roychoudhury, R., Jay, E. e Wu, R. (1976). Terminal labeling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Nucleic Acids Res.* 3:101-116.
- Rüde, E. (1970). Structure and immunogenicity of synthetic antigens. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 206-219.
- Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., Nakagami-Yamaguchi, E., Hamada, Y., Aizawa, S., e Hirai, H. (2003). Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity*, 18, 675–685.
- Salveti, M., Ristori, G., Bomprezzi, R., Pozzilli, P., & Leslie, R. D. (2000). Twins: mirrors of the immune system. *Immunology today*, 21, 342–347.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. e Sabatini, D.M.(2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 307:1098-1101.
- Sayos, J., Wu, C., Morra, M., Wang, N., Zhang, X., Allen, D., van Schaik, S., Notarangelo, L., Geha, R., Roncarolo, M. G., Oettgen, H., De Vries, J. E., Aversa, G., e Terhorst, C. (1998). The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature*, 395(6701), 462–469.
- Schelonka, R. L., Tanner, J., Zhuang, Y., Gartland, G. L., Zemlin, M., e Schroeder, H. W., Jr (2007). Categorical selection of the antibody repertoire in splenic B cells. *European journal of immunology*, 37, 1010–1021.
- Schenkein, H.A., Berry, C.R., Purkall, D., Burmeister, J.A., Brooks, C.N. e Tew, J.G. (2001). Phosphorylcholine dependent cross-reactivity between dental plaque bacteria and oxidized low-density lipoproteins. *Infect Immun.* 2001 Nov;69(11):6612-7. doi: 10.1128/IAI.69.11.6612-6617.2001. PMID: 11598029; PMCID: PMC100034.
- Schroeder H. W., Jr (2006). Similarity and divergence in the development and expression of the mouse and human antibody repertoires. *Developmental and comparative immunology*, 30, 119–135.
- Schweighoffer, E., Vanes, L., Nys, J., Cantrell, D., McCleary, S., Smithers, N., e Tybulewicz, V. L. (2013). The BAFF receptor transduces survival signals by co-opting the B cell receptor signaling pathway. *Immunity*, 38, 475–488.
- Segal, Y., & Shoenfeld, Y. (2018). Vaccine-induced autoimmunity: the role of molecular mimicry and immune crossreaction. *Cellular & molecular immunology*, 15(6), 586–594.
- Sender, R., Fuchs, S., e Milo, R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol.* 14:e1002533.

- Sigvardsson, M., Clark, D. R., Fitzsimmons, D., Doyle, M., Akerblad, P., Breslin, T., Bilke, S., Li, R., Yeaman, C., Zhang, G., e Hagman, J. (2002). Early B-cell factor, E2A, and Pax-5 cooperate to activate the early B cell-specific mb-1 promoter. *Molecular and cellular biology*, 22(24), 8539–8551.
- Simon, T., e Rajewsky, K. (1990). Antibody domain mutants demonstrate autonomy of the antigen binding site. *The EMBO journal*, 9(4), 1051–1056.
- Sims, I. M., Ryan, J. L., e Kim, S. H. (2014). In vitro fermentation of prebiotic oligosaccharides by *Bifidobacterium lactis* HN019 and *Lactobacillus* spp. *Anaerobe*, 25, 11–17a.
- Smigiel, K. S., Srivastava, S., Stolley, J. M., & Campbell, D. J. (2014). Regulatory T-cell homeostasis: steady-state maintenance and modulation during inflammation. *Immunological reviews*, 259, 40–59.
- Snapper, C. M., Finkelman, F. D., e Paul, W. E. (1988). Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *The Journal of experimental medicine*, 167, 183–196.
- Snapper, C. M., McIntyre, T. M., Mandler, R., Pecanha, L. M., Finkelman, F. D., Lees, A., e Mond, J. J. (1992). Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *The Journal of experimental medicine*, 175, 1367–1371.
- Snydman, D. R., Jacobus, N. V., McDermott, L. A., Golan, Y., Hecht, D. W., Goldstein, E. J., Harrell, L., Jenkins, S., Newton, D., Pierson, C., Rihs, J. D., Yu, V. L., Venezia, R., Finegold, S. M., Rosenblatt, J. E., e Gorbach, S. L. (2010). Lessons learned from the anaerobe survey: historical perspective and review of the most recent data (2005-2007). *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50 Suppl 1, S26–S33.
- Spencer, J., MacDonald, T. T., Finn, T., e Isaacson, P. G. (1986). The development of gut associated lymphoid tissue in the terminal ileum of fetal human intestine. *Clinical and experimental immunology*, 64, 536–543.
- Stadtmueller, B. M., Huey-Tubman, K. E., López, C. J., Yang, Z., Hubbell, W. L., e Bjorkman, P. J. (2016). The structure and dynamics of secretory component and its interactions with polymeric immunoglobulins. *eLife*, 5, e10640.
- Stepanek, O., Draber, P., Drobek, A., Horejsi, V., e Brdicka, T. (2013). Nonredundant roles of Src-family kinases and Syk in the initiation of B-cell antigen receptor signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190, 1807–1818.
- Stewart, J., e Varela, F. J. (1989). Exploring the meaning of connectivity in the immune network. *Immunological reviews*, 110, 37–61.
- Stewart, L., D M Edgar, J., Blakely, G., e Patrick, S. (2018). Antigenic mimicry of ubiquitin by the gut bacterium *Bacteroides fragilis*: a potential link with autoimmune disease. *Clinical and experimental immunology*, 194(2), 153–165.
- Suzuki, K., Meek, B., Doi, Y., Muramatsu, M., Chiba, T., Honjo, T., e Fagarasan, S. (2004). Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 1981–1986.
- Sverinson E. e Larsson E.L. (1986) Lymphocyte response to polyclonal B and T cell activators. *HEI*, 2.63.1
- Swedo, S. E., Leonard, H. L., Garvey, M., Mittleman, B., Allen, A. J., Perlmutter, S., Lougee, L., Dow, S., Zamkoff, J., E Dubbert, B. K. (1998). Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections: clinical description of the first 50 cases. *The American journal of psychiatry*, 155, 264–271.
- Taams, L. S., van Amelsfort, J. M., Tiemessen, M. M., Jacobs, K. M., de Jong, E. C., Akbar, A. N., Bijlsma, J. W., e Lafeber, F. P. (2005). Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Human immunology*, 66, 222–230.
- Takata, M., Sabe, H.AH., Inazu, T., Homma, Y., Nukada, T., Yamamura, H. e Kurosaki, T. (1994) Tyrosine kinases lyn and syk regulate B cell receptor-coupled Ca<sup>2+</sup> mobilization through distinct pathways. *EMBO J.*, 13, 1341–1349.

- Takemura, T., e Eishi, Y. (1985). Distribution of secretory component and immunoglobulins in the developing lung. *The American review of respiratory disease*, 131, 125–130.
- Tonegawa S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302(5909), 575–581.
- Tonietti, G., Oldstone, M. B., e Dixon, F. J. (1970). The effect of induced chronic viral infections on the immunologic diseases of New Zealand mice. *The Journal of experimental medicine*, 132, 89–109.
- Tornberg, U. C. e Holmberg, D. (1995). B-1a, B-1b and B-2 B cells display unique VHDJH repertoires formed at different stages of ontogeny and under different selection pressures. *The EMBO journal*, 14, 1680–1689.
- Ternynck, T., e Avrameas, S. (1986). Murine natural monoclonal autoantibodies: a study of their polyspecificities and their affinities. *Immunological reviews*, 94, 99–112.
- Tiegs, S. L., Russell, D. M., e Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *The Journal of experimental medicine*, 177, 1009–1020.
- Tito, R. Y., Knights, D., Metcalf, J., Obregon-Tito, A. J., Cleeland, L., Najar, F., Roe, B., Reinhard, K., Sobolik, K., Belknap, S., Foster, M., Spicer, P., Knight, R., & Lewis, C. M., Jr (2012). Insights from characterizing extinct human gut microbiomes. *PloS one*, 7(12), e51146.
- Troutaud, D., Drouet, M., Decourt, C., Le Morvan, C. e Cogné, M.(1999). Age-related alterations of somatic hypermutation and CDR3 lengths in human V $\kappa$ 4-expressing B lymphocytes. *Immunology*.97:197-203. doi:10.1046/j.1365-2567.1999.00779.x
- Tsuneto, M., Tokoyoda, K., Kajikhina, E., Hauser, A. E., Hara, T., Tani-Ichi, S., Ikuta, K., e Melchers, F. (2013). B-cell progenitors and precursors change their microenvironment in fetal liver during early development. *Stem cells* (Dayton, Ohio), 31, 2800–2812.
- Vadasz, Z., Haj, T., Kessel, A. e Toubi, E. Age-related autoimmunity. *BMC Med*. 2013;11:94.
- Vale, A. M., Kapoor, P., Skibinski, G. A., Elgavish, A., Mahmoud, T. I., Zemlin, C., Zemlin, M., Burrows, P. D., Nobrega, A., Kearney, J. F., Briles, D. E., e Schroeder, H. W., Jr (2013). The link between antibodies to OxLDL and natural protection against pneumococci depends on D(H) gene conservation. *The Journal of experimental medicine*, 210, 875–890.
- Vale, A. M., Cavazzoni, C. B., Nobrega, A., e Schroeder, H. W., Jr (2016). The Global Self-Reactivity Profile of the Natural Antibody Repertoire Is Largely Independent of Germline DH Sequence. *Frontiers in immunology*, 7, 296.
- Vale, A.M., Kearney, J.F., Nobrega, A. e Schroeder, H.W.(2015). Development and Function of B Cell Subsets. *Molecular Biology of B Cells* (Second Edition), Academic Press, 99-119.
- Vale, A. M., Tanner, J. M., Schelonka, R. L., Zhuang, Y., Zemlin, M., Gartland, G. L., e Schroeder, H. W., Jr (2010). The peritoneal cavity B-2 antibody repertoire appears to reflect many of the same selective pressures that shape the B-1a and B-1b repertoires. *Journal of immunology*, 185, 6085–6095.
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., e Stockinger, B. (2006). TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24(2), 179–189.
- Vidarsson G, Dekkers G, Rispen T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*. 2014 Oct 20;5:520. doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.
- Vitetta, E. S., Fernandez-Botran, R., Myers, C. D., e Sanders, V. M. (1989). Cellular interactions in the humoral immune response. *Advances in immunology*, 45, 1–105.
- Volpe, J.M. e Kepler, T.B. (2008). Large-scale analysis of human heavy chain V(D)J recombination patterns. *Immunome Res*. 4:3.
- Walker, L.S. e Sansom, D.M. (2011). The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol*. 25;11:852-63.
- Walport M. J. (2002). Complement and systemic lupus erythematosus. *Arthritis research*, 4 Suppl 3(Suppl 3), S279–S293.

- Wan, Y., Zheng, Y. Z., Harris, J. M., Brown, R., e Waters, M. J. (2003). Epitope map for a growth hormone receptor agonist monoclonal antibody, MAb 263. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 17, 2240–2250.
- Wang, S., Ryan, C. A., Boyaval, P., Dempsey, E. M., Ross, R. P., e Stanton, C. (2020). Maternal Vertical Transmission Affecting Early-life Microbiota Development. *Trends in microbiology*, 28, 28–45
- Wedemayer, G. J., Patten, P. A., Wang, L. H., Schultz, P. G., Stevens, R. C. (1997). Structural insights into the evolution of an antibody combining site. *Science*. 276:1665–1669.
- Weinstock, G. M. (2012). Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature*, 489(7415), 250–256
- Weltzin, R., Lucia-Jandris, P., Michetti, P., Fields, B. N., Kraehenbuhl, J. P., e Neutra, M. R. (1989). Binding and transepithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cells: demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. *The Journal of cell biology*, 108(5), 1673–1685.
- Wexler H. M. (2007). Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clinical microbiology reviews*, 20(4), 593–621.
- Whitfield, C., e Roberts, I. S. (1999). Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 31, 1307–1319.
- Wilson, C., Ebringer, A., Ahmadi, K., Wrigglesworth, J., Tiwana, H., Fielder, M., Binder, A., Ettelaie, C., Cunningham, P., e Joannou, C. (1995). Shared amino acid sequences between major histocompatibility complex class II glycoproteins, type XI collagen and *Proteus mirabilis* in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 54, 216–220.
- Xavier, D.B., Bernal, F.E.M., e Almeida, R.T.. (2008). Prevalência de enterococos isolados de frangos caipiras em diferentes regiões do Distrito Federal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60, 1550-1553.
- Yang, Y., Ghosn, E. E., Cole, L. E., Obukhanych, T. V., Sadate-Ngatchou, P., Vogel, S. N., Herzenberg, L. A., e Herzenberg, L. A. (2012). Antigen-specific antibody responses in B-1a and their relationship to natural immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 5382–5387.
- Yamagata, K., Daitoku, H., Takahashi, Y., Namiki, K., Hisatake, K., Kako, K., Mukai, H., Kasuya, Y., e Fukamizu, A. (2008). Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. *Molecular cell*, 32, 221–231.
- Yamamoto, T., Yamanashi, Y., e Toyoshima, K. (1993). Association of Src-family kinase Lyn with B-cell antigen receptor. *Immunological reviews*, 132, 187–206.
- Yamanashi, Y., Kakiuchi, T., Mizuguchi, J., Yamamoto, T., e Toyoshima, K. (1991). Association of B cell antigen receptor with protein tyrosine kinase Lyn. *Science (New York, N.Y.)*, 251(4990), 192–194.
- Yokomizo, T., Ng, C. E., Osato, M., e Dzierzak, E. (2011). Three-dimensional imaging of whole midgestation murine embryos shows an intravascular localization for all hematopoietic clusters. *Blood*, 117(23), 6132–6134.
- Yokozeki, T., Adler, K., Lankar, D., e Bonnerot, C. (2003). B cell receptor-mediated Syk-independent activation of phosphatidylinositol 3-kinase, Ras, and mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 171(3), 1328–1335.
- Yordanova, I. A., Cortés, A., Klotz, C., Köhl, A. A., Heimesaat, M. M., Cantacessi, C., Hartmann, S., e Rausch, S. (2019). ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> Treg to Th17 ratios correlate with susceptibility to *Giardia* infection. *Scientific reports*, 9, 20328.
- Yuan, J., Nguyen, C. K., Liu, X., Kanellopoulou, C., e Muljo, S. A. (2012). Lin28b reprograms adult bone marrow hematopoietic progenitors to mediate fetal-like lymphopoiesis. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6073), 1195–1200.
- Zenewicz, L. A., Abraham, C., Flavell, R. A., e Cho, J. H. (2010). Unraveling the genetics of autoimmunity. *Cell*, 140, 791–797.
- Zouali, M., Fournié, G. J., e Thèze, J. (1991). Quantitative clonal analysis of the B cell repertoire in human lupus. *Cellular immunology*, 133, 161–177.
- Zhang, Z., Burrows, P. D., e Cooper, M. D. (2004). The molecular basis and biological significance of VH replacement. *Immunological reviews*, 197, 231–242.

Zhou, Y., Li, Y. S., Bandi, S. R., Tang, L., Shinton, S. A., Hayakawa, K., e Hardy, R. R. (2015). Lin28b promotes fetal B lymphopoiesis through the transcription factor Arid3a. *The Journal of experimental medicine*, 212(4), 569–580.

Zriwil, A., Böiers, C., Kristiansen, T. A., Wittmann, L., Yuan, J., Nerlov, C., Sitnicka, E., e Jacobsen, S. (2018). Direct role of FLT3 in regulation of early lymphoid progenitors. *British journal of haematology*, 183, 588–600.