

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programas de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Amanda de Castro Habka

**CARACTERIZAÇÃO DE LINFÓCITOS B1 NA COLITE DESENVOLVIDA POR
CAMUNDONGOS DEFICIENTES PARA IL-10**

Belo Horizonte

2022

Amanda de Castro Habka

**CARACTERIZAÇÃO DE LINFÓCITOS B1 NA COLITE DESENVOLVIDA POR
CAMUNDONGOS DEFICIENTES PARA IL-10**

Versão final

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Caetano Faria

Belo Horizonte

2022

Ficha Catalográfica

043 Habka, Amanda de Castro.
Caracterização de linfócitos B1 na colite desenvolvida por camundongos deficientes para IL-10 [manuscrito] / Amanda de Castro Habka. – 2022.
61 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Ana Maria Caetano Faria.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e Imunologia. 2. Subpopulações de Linfócitos B. 3. Colite. 4. Mucosa Intestinal. 5. Interleucina-10. I. Faria, Ana Maria Caetano. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1

Ata de Defesa

1056



Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE AMANDA DE CASTRO HABKA. Aos vinte e sete dias do mês de junho de 2022 às 13:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Caracterização de linfócitos B1 na colite desenvolvida por camundongos deficientes para IL-10”, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Ana Maria Caetano de Faria, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Ana Cristina Gomes Santos (Centro Universitário UNA), aprovada; Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 27 de junho de 2022.

Dra. Ana Cristina Gomes Santos (Centro Universitário UNA)

Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (UFMG)

Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (UFMG)

Profa. Leda Quercia Vieira
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica e Imunologia

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Cristina e Alberto, por me apoiarem e possibilitarem que eu corresse atrás desse sonho.

Agradeço a minha orientadora, Ana, que me aceitou como aluna e foi sempre inspiração e fonte de aprendizados. Eu não poderia ter achado uma pessoa melhor para me orientar.

Agradeço a minha irmã, Isadora, por ser a melhor companhia desde a barriga e nunca me deixar sentir tão só, mesmo durante uma pandemia e estando em cidades diferentes.

Agradeço a Maria Lucia, por sempre torcer por mim e me encher de cuidado e carinho.

Agradeço ao Rafael, por ter sido um amigo, sem o qual tudo teria sido infinitamente mais difícil.

Agradeço a todos os colegas de laboratório que ajudaram de alguma forma.

Agradeço ao Hermes e a Ildinha por cuidar do biotério.

Agradeço a Halu Gamashi, que foi um farol em meio a travessia.

Agradeço à Esfiha e Pequena, por serem fonte constante de amor, alegria e graça.

Agradeço aos guias, amigos e família espiritual, que sempre estiveram ao meu lado.

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças inflamatórias crônicas que afetam o trato gastrointestinal. Existem duas formas clínicas principais de DII: a doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (CU). De forma geral, elas se caracterizam por possuírem respostas inflamatórias desreguladas contra a microbiota residente. Embora a etiopatogênese dessas condições não esteja claramente definida, vários fatores já foram identificados como capazes de contribuir fortemente para o desenvolvimento dessas doenças, podendo ser subdivididos nas seguintes categorias: fatores genéticos, fatores relacionados ao sistema imune do indivíduo e fatores ambientais. De fato, vários modelos experimentais utilizados para estudar as DII já demonstraram que diferentes falhas nesses sistemas levam ao desenvolvimento de colite, e que a ausência da microbiota residente impede seu aparecimento. Um desses modelos, caracterizado pelo uso de camundongos geneticamente modificados e deficientes para IL-10, é particularmente importante, pois parte da população mundial que desenvolve colite apresenta mutações relacionadas a esse gene, resultando no desenvolvimento espontâneo da doença de forma semelhante ao modelo experimental, que também se desenvolve espontaneamente. Em 2012, nosso grupo realizou um estudo que buscou caracterizar novas alterações imunológicas que convergem no desenvolvimento da colite nos camundongos deficientes em IL-10. Curiosamente, houve um aumento significativo na frequência de uma célula pouco estudada na colite, o linfócito B1. O linfócito B1 pode ser dividido em duas populações gerais pela expressão (ou não) do marcador de superfície CD5. Mas dentro dessas populações existem subpopulações com diferentes marcadores de superfície e características. Portanto, este trabalho tem como objetivo, analisar as subpopulações de linfócitos B1 em relação ao desenvolvimento da doença. Nossos resultados sugerem que o microambiente intestinal na colite, gera sinais intensos e contínuos que culminam no aumento da frequência de linfócitos B2 nas placas de Peyer e de linfócitos B1a PC1^{lo} na lâmina própria do cólon. Como não houve aumento na frequência da população de linfócitos B1a PC1^{hi}, que seria a população capaz de secretar IL-10 em condições normais, o envolvimento das outras duas populações de linfócitos B citadas parecem contribuir para a exacerbação do processo inflamatório intestinal ainda que possam ser considerados também mecanismos compensatórios pela ausência de outros mecanismos reguladores.

Palavras-chave: linfócitos B1, colite, mucosa intestinal, IL-10.

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic inflammatory diseases that affect the gastrointestinal tract. There are two main clinical forms of IBD: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). In general, these diseases are characterized by having a dysregulated inflammatory response against the resident microbiota. Although the exact etiopathogenesis is not clearly defined, several factors have already been identified as capable of contributing strongly to the development of diseases, which can be subdivided into the following categories: genetic factors, factors related to the individual's immune system and environmental factors. In fact, several experimental models used to study IBD have already demonstrated that different flaws in this system lead to the development of colitis and that the absence of the microbiota prevents its appearance. One of these models, characterized by the use of genetically modified mice deficient for IL-10, is particularly important since part of the world population that develops colitis has mutations related to this gene, resulting in the spontaneous development of the disease in a similar way to the experimental model, which also develops spontaneously. In 2012, our group characterized new immunological changes that converge in the development of colitis in IL-10-deficient mice. Interestingly, there was a significant increase in a poorly studied cell in colitis, the B1 lymphocyte. The B1 lymphocyte can be divided into two general populations by the expression (or not) of the CD5 surface marker. But within these populations, there are subpopulations with different surface markers and characteristics. Therefore, the objective of this work was to analyze the subpopulations of B1 lymphocytes in relation to the development of the disease. Our results suggest that the intestinal microenvironment in colitis generates intense and continuous signals that culminate in an increase in the frequency of B2 lymphocytes in Peyer's patches and of B1a PC1lo lymphocytes in the colonic lamina propria. As there was no increase in the frequency of the population of B1a PC1hi lymphocytes, which would be the population capable of secreting IL-10 under normal conditions, the involvement of the other two populations of B lymphocytes mentioned seems to contribute to the exacerbation of the intestinal inflammatory process, even if they are also compensatory mechanisms for the absence of other regulatory mechanisms.

Key words: B1 lymphocyte, IL-10, IBD, intestinal mucosa.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Mucosa intestinal dividida em três compartimentos, do mais externo para o mais interno..... | 16 |
| Figura 2: Disfunção da mucosa associada à disbiose nas DII..... | 20 |
| Figura 3: Estratégia de quantificação da inflamação tecidual observada na colite..... | 27 |
| Figura 4: Estratégia de <i>gate</i> utilizada em todos os órgãos demonstrada através da imunofenotipagem dos linfócitos B2 e B1 no baço..... | 31 |
| Figura 5: Estratégia de <i>gates</i> para análise de SIgA da microbiota intestinal..... | 32 |
| Figura 6: Análises histológicas representativas do intestino grosso de camundongos WT e de camundongos deficientes para IL-10..... | 34 |
| Figura 7: Escore Inflamatório do cólon de camundongos WT e de camundongos deficiente para IL-10..... | 34 |
| Figura 8: Frequência de linfócitos B2 e B1 no peritônio de camundongos WT e deficientes para IL-10..... | 36 |
| Figura 9: Frequências de linfócitos B2 e B1 no baço de camundongos WT e deficientes para IL-10..... | 37 |
| Figura 10: Frequência de linfócitos B2 e B1 na lâmina própria do cólon de camundongos WT e deficientes para IL-10..... | 38 |

| | |
|--|----|
| Figura 11: Frequência de linfócitos B2 e B1 nas placas de Peyer de camundongos WT e deficientes para IL-10..... | 40 |
| Figura 12: Frequência de bactérias ligadas à SIgA em períodos de 8, 9 e 12 semanas..... | 41 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Funções da SIgA na mucosa intestinal.

Tabela 2: Distinções entre linfócitos B1a PC1^{lo} e B1a PC1^{hi}.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Breg: Linfócitos B regulador;

CEUA: Comitê de ética em experimentação animal;

CU: Colite ulcerativa;

DC: Doença de Crohn;

DII: Doenças inflamatórias intestinais;

DSS: Dextrana sulfato de sódio;

HE: Hematoxilina e eosina;

Hox11^{-/-} : Deficiente para o gene HOX11;

IgA: Imunoglobulina A;

IgG: Imunoglobulina G;

IgM: Imunoglobulina M;

IL-10: Interleucina 10;

IL-10ko: Deficiente para IL-10;

IL-1 β : Interleucina 1 beta;

IL-22: Interleucina 22;

IL-35: Interleucina 35;

ILC3: Célula linfóide inata 3 (type 3 innate lymphoid cells);

MHCII: Complexo principal de histocompatibilidade tipo II (major histocompatibility complex II);

mTORC1: Alvo mamífero do complexo 1 de rapamicina (mammalian target of rapamycin complex 1);

NLRP3: Domínio pirina da família NLR contendo 3 (NLR family pyrin domain containing 3);

PBS: Salina tamponada com fosfato;

PC1: Plasma cell alloantigen 1;

PRRs: Receptores de reconhecimento padrão (pattern recognition receptor);

SCFAs: Ácidos graxos de cadeia curta (short-chain fatty acids);

SFB: Soro fetal bovino;

SIgA: imunoglobulina secretória A;

SIgG: Imunoglobulina secretória G;

TCD4+: Linfócito auxiliar;

TGF- β : Fator de crescimento transformador beta;

Th1: Linfócito auxiliar 1;

Th17: Linfócito auxiliar 17;

Th22: Linfócito auxiliar 22;

TLRs: Receptores tipo toll (toll like receptors);

TNBS: 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid;

Treg: Linfócitos T reguladores;

WT: Wild type;

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1.INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 1.1Mucosa intestinal..... | 15 |
| 1.2Modelos experimentais e doenças inflamatórias intestinais..... | 21 |
| 1.3Linfócitos B1..... | 23 |
| 2.OBJETIVOS..... | 25 |
| 2.2Objetivo geral..... | 25 |
| 2.3Objetivos específicos..... | 25 |
| 3.MATERIAIS E MÉTODOS..... | 26 |
| 3.1Animais..... | 26 |
| 3.2Lâminas histológicas..... | 26 |
| 3.3 Análise histológica..... | 26 |
| 3.4 Isolamento de células dos órgãos e tecidos..... | 27 |
| 3.5Imunofenotipagem..... | 30 |
| 3.6Estratégia de determinação da população de interesse..... | 30 |
| 3.7Ensaio de sIgA ligada a bactérias da microbiota intestinal..... | 32 |
| 3.8Análise estatística..... | 33 |
| 4.RESULTADOS..... | 34 |
| 4.1 A histologia do cólon dos animais deficientes para IL-10 apresenta inflamação neutrofílica com mudanças teciduais..... | 34 |
| 4.2 Camundongos deficientes para IL-10 apresentaram aumento da frequência de linfócitos B2 no peritônio..... | 35 |
| 4.3 Camundongos deficientes para IL-10 apresentaram diminuição da frequência de linfócitos B2 e aumento da frequência de linfócitos B1 no baço..... | 36 |
| 4.4 Camundongos deficientes para IL-10 apresentaram diminuição da frequência de linfócitos B2 e um aumento da frequência da subpopulação de linfócitos B1a PC1lo na lâmina própria do cólon..... | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5 Camundongos deficientes para IL-10 apresentaram aumento da frequência de linfócitos B2 totais nas placas Peyer..... | 38 |
| 4.6 Camundongos deficientes para IL-10 apresentaram aumento da frequência de bactérias ligadas a SIgA com 8 semanas de vida..... | 39 |
| 5.DISSCUSSÃO..... | 40 |
| 6.CONCLUSÃO..... | 47 |
| 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 48 |

1. INTRODUÇÃO

Doenças inflamatórias intestinais (DII) são desordens inflamatórias crônicas que acometem o trato gastrointestinal. Elas são distúrbios de origem multifatorial, cuja etiopatogênese ainda não é conhecida por inteiro, mas que ocorrem em resposta à convergência da predisposição genética envolvendo vários genes, disbiose da microbiota intestinal, e fatores ambientais que influenciam as respostas imunes do indivíduo. Existem duas principais formas clínicas de DII: doença de Crohn (DC) e colite ulcerativa (CU). Apesar de haver características compartilhadas em relação a alguns sintomas e a imunopatologia dessas doenças, cada uma das condições possui suas particularidades. Além das diferenças no acometimento das várias camadas da mucosa intestinal, a CU se restringe ao cólon, enquanto a DC pode acometer qualquer parte do trato gastrointestinal, apesar de geralmente envolver os intestinos delgado e grosso (KASER et al., 2010).

As DII humana são doenças poligênicas cuja sintomatologia inclui dor abdominal, perda de peso, diarreia, fezes sanguinolentas, produção elevada de muco e fistulação intestinal, entre outros sintomas (KASER et al., 2010). A prevalência exata das DII no Brasil é difícil de estimar, mas Quaresma et al. (2019) relatam que em São Paulo, um dos estados que parece haver um dos maiores índices de ocorrências das DII, houve um aumento da prevalência de 13,3 per 100 000 para 52.6 per 100 000 desde o ano 2012 até 2018, apesar das crescentes descobertas e de novos medicamentos desenvolvidos.

De forma geral, essas doenças caracterizam-se pelo aumento da permeabilidade intestinal e pela presença de uma resposta inflamatória desregulada contra a microbiota residente (INCZEFI et al., 2022). Apesar da etiopatogênese dessas doenças não estar claramente definida, vários fatores já foram identificados como capazes de contribuir fortemente para o desenvolvimento das enfermidades, podendo ser subdivididos dentre as seguintes categorias: fatores genéticos, fatores relacionados ao sistema imune do indivíduo e fatores ambientais (KASER et al., 2010). Esses fatores também são importantes para preservar a fina homeostasia intestinal mantida pelas interações entre as células epiteliais intestinais, as células imunes associadas à mucosa intestinal e aos microrganismos comensais ali presentes (MALOY; POWRIE, 2011) (MARKANDEY et al., 2021). De fato, diversos modelos

experimentais já demonstraram que diferentes falhas nesse sistema levam ao desenvolvimento da colite, e que a ausência da microbiota residente impede seu início (PAIK et al., 2019).

Para tentar responder as questões à cerca das DII, diversos modelos experimentais são utilizados (revisado por PRATTIS; JURJUS, 2015). Um desses modelos, caracterizado por utilizar-se de camundongos deficientes para IL-10 (interleucina 10), é particularmente importante porque parte da população mundial que desenvolve colite possui mutações relacionadas a esse gene, resultando no desenvolvimento da doença de forma semelhante ao modelo experimental (BEGUE et al., 2011).

Em 2012, nosso grupo caracterizou novas mudanças imunológicas que convergem no desenvolvimento da colite em camundongos 129 Sv/Ev deficientes para IL-10. Esses camundongos desenvolvem a doença a partir da 10ª semana de vida de forma homogênea, o que nos permite acompanhar melhor os estágios dessa condição. Interessantemente, além das alterações inflamatórias associadas à colite, observou-se também que esses animais apresentavam um aumento significativo na frequência de uma célula pouco estudada na colite, o linfócito B1 (GOMES-SANTOS et al., 2012). Tendo isso em vista, essa observação importante e pouco explorada na literatura, o principal objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotipicamente as subpopulações de células B1 em diversos órgãos, assim como definir se possuíam um envolvimento regulador ou inflamatório no desenvolvimento da colite em camundongos 129 Sv/Ev deficientes para IL-10. Para elucidar essas questões, faz-se necessário compreender alguns aspectos do ambiente intestinal, assim como algumas características e funções dos linfócitos B1. Estes tópicos serão descritos abaixo.

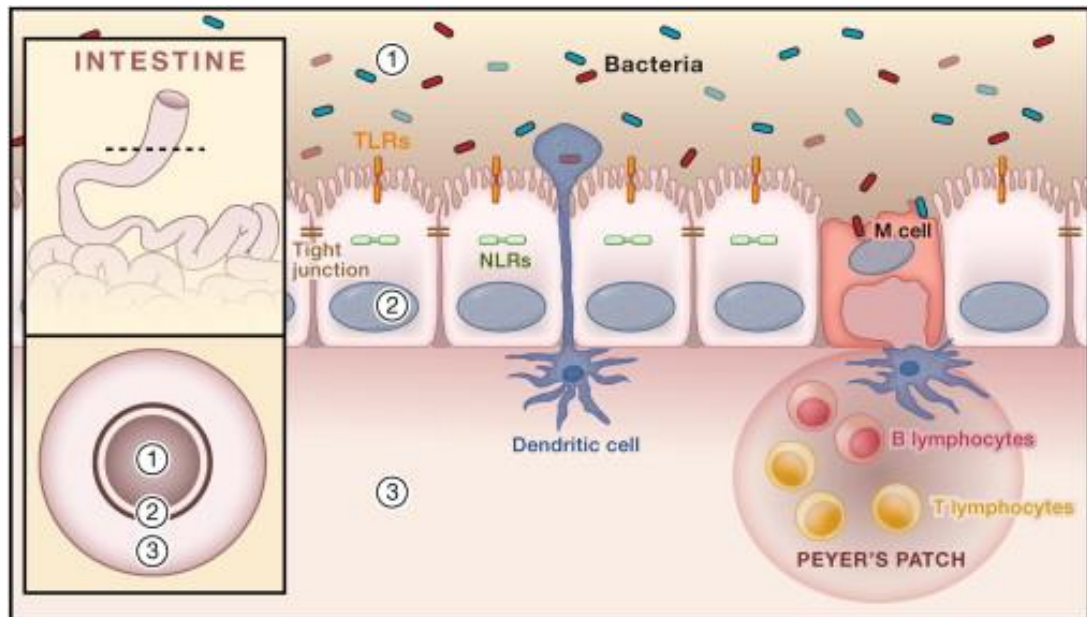
1.1 Mucosa intestinal

Considerado o maior órgão imunológico do corpo, o intestino está em constante contato com antígenos alimentares, com a microbiota intestinal e com patógenos externos (revisado por YAP; MARIÑO, 2018). Estima-se que, em um período médio de vida, cerca de 60 toneladas de comida passam pelo trato gastrointestinal e uma coleção abundante de microrganismos mantêm contato permanente com a mucosa intestinal (SENDER et al., 2016). Além disso, a microbiota residente é composta por mais de 150 espécies diferentes de microrganismos, e estima-se que em 1ml de conteúdo luminal do cólon existam cerca de 100 bilhões de bactérias. Assim sendo, a mucosa intestinal evoluiu com a microbiota há milhares de anos atrás, estabelecendo com ela uma relação integrada e mutualmente benéfica (NEISH, 2009).

Alguns estudos parecem indicar que um dos principais fatores que contribuiu para a estabilização dessa relação foi a disponibilidade energética gerada para ambas as partes (CLEMENTE et al., 2012). Sabe-se que uma microbiota saudável é capaz de digerir nutrientes que não seriam digeridos pelo nosso corpo e, com isso, são gerados compostos, como os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), que além de funcionarem como fonte energética para as células intestinais, também atuam na diferenciação de células imunes presentes na mucosa intestinal para um perfil menos inflamatório (VAN DER HEE; WELLS; 2021). Além disso, estudos com camundongos *germ-free* (nos quais não há presença da microbiota intestinal), demonstram que a microbiota é importante para impedir a colonização por microrganismos mais agressivos chamados de patobiontes (revisado por CEBRA, 1999) (ROLHION; CHASSAING, 2016), e que a falta da microbiota também impacta em um mau desenvolvimento e maturação do sistema imune (ZHENG et al., 2020). Os centros germinativos do baço (revisado por WU; WU, 2012) e das placas de Peyer (revisado por KRANICH et al. 2011) desses camundongos encontram-se diminuídos, resultando numa maior dificuldade de lidar com algum microrganismo potencialmente patogênico posteriormente (JIAO et al. 2020).

A mucosa intestinal pode ser mais bem compreendida quando separada em três compartimentos distintos: o lúmen intestinal, a barreira epitelial intestinal e o tecido linfóide associado (composto pela lâmina própria, Placas de Peyer, folículos linfóides isolados e linfonodos mesentéricos), como ilustrado a seguir na Figura 1 (FORCHIELLI; WALKER, 2005).

Figura 1: Mucosa intestinal dividida em três compartimentos



Fonte: GARRET et al. (2010).

No lúmen intestinal, a maior parte da microbiota residente é mantida distante da barreira epitelial intestinal pela secreção de duas camadas de muco – uma mais densa, próxima ao epitélio, e uma menos densa, mais afastada do epitélio (PELASEYED et al. 2014). Esse muco é secretado pelas células caliciformes presentes no epitélio intestinal e, além de funcionar como uma barreira biofísica, forma uma matriz que permite a retenção e maior concentração de outras moléculas secretadas pelo epitélio intestinal, como peptídeos antimicrobianos e IgA secretória (SIgA) (MALOY; POWRIE, 2011).

Nesse contexto, a SIgA é particularmente importante, pois desempenha uma miríade de funções que resultam tanto na restrição da microbiota ao lúmen (contribuindo essencialmente para manter o ambiente interno da mucosa intestinal praticamente estéril), como também contribui para a amostragem de antígenos que será importante para a geração de linfócitos T e B efetores. Algumas dessas funções estão resumidas na tabela 1 abaixo:

Tabela 1: Funções da SIgA na mucosa intestinal:

| Função | Mecanismo |
|--------|-----------|
|--------|-----------|

| | |
|---|---|
| Exclusão imunológica | Retenção de bactérias no lúmen |
| Ocupação de nicho | Ligação de bactérias ao muco |
| Imobilização | Ligação a flagelos e através de aglutinação celular |
| Modulação do metabolismo e da expressão gênica bacteriana | Ligação a epítomos específicos bacterianos e proteínas extracelulares secretadas pela microbiota importantes para a metabolização de carboidratos |
| Neutralização | Ligação a adesinas e toxinas |
| Amostragem de antígenos | Transcitose facilitada |

Adaptado: PIETRZAK et al. (2020)

Outra característica interessante relacionada à SIgA foi demonstrada inicialmente por Palm et al. (2014) em um estudo no qual foi observado que bactérias ligadas a SIgA definem um subgrupo de bactérias que seletivamente estimula a imunidade intestinal e que, em pacientes com DII, as bactérias ligadas a SIgA definem, preferencialmente, bactérias colitogênicas. Shapiro et al. (2021) relataram resultados semelhantes e discutem que, em pessoas saudáveis (sem disbiose intestinal), as bactérias ligadas a SIgA contribuem para os mecanismos imunorreguladores e protegem contra a exacerbação da inflamação intestinal. Então, pode-se dizer que bactérias ligadas à SIgA, dependendo do contexto, podem estimular a imunidade através de dois principais caminhos imunológicos: caminho inflamatório, no qual o resultado é a geração de linfócitos Th17 (VILADOMIU et al., 2017); e o caminho imunorregulador, no qual o resultado é a geração de linfócitos Treg (linfócitos T reguladores) (KAWAMOTO et al., 2014).

Recentemente, Nagaishi et al. (2022) relataram, em camundongos com mutações genéticas no gene da IgA, que a deficiência de IgA foi capaz de causar uma inflamação espontânea no íleo. No entanto, a linhagem de camundongos portando IgA mutada apenas na cauda citoplasmática não desenvolveram a ileíte e apresentaram resultados semelhantes aos camundongos WT. Isso sugere que a preservação de algumas funções da SIgA, principalmente as que não necessitam da interação da cauda citoplasmática, são suficientes para contribuir com a homeostase intestinal quando não há outros fatores de risco associados. Por outro lado, Sandy et

al. (2021) relataram dois estudos de casos nos quais os pacientes apresentaram o desenvolvimento precoce de DII (menos de 1 ano de vida) e possuíam níveis séricos elevados de IgA. Apesar de haver aumento dos níveis séricos de IgA, esses pacientes apresentavam mutações no receptor de IL-10. Neste caso, o aumento nos níveis de IgA parece ocorrer na ausência de outros mecanismos reguladores na mucosa indicando que a SIgA presente na mucosa intestinal é importante, mas não é suficiente para manter a homeostase intestinal.

Também é válido ressaltar que a mucosa intestinal possui diversos mecanismos de reconhecimento do microambiente e de geração de respostas efetoras. Citamos acima os mecanismos relacionados à SIgA, mas já está muito bem caracterizada a importância protetora de diversos outros componentes, como os receptores de resposta padrão (PRRs - *pattern recognition receptor*), os linfócitos intraepiteliais, células linfoides inatas, sinalização nas próprias células do epitélio intestinal, entre outros (DE LA FUENTE et al., 2019)

Dentre tantos componentes e mecanismos, para este trabalho é importante entender a relevância da IL-10 no contexto intestinal, pois sabe-se que este é um dos principais mecanismos para preservar um estado de inflamação fisiológica no intestino, de forma a não causar danos ao próprio tecido. A IL-10 presente na mucosa intestinal é secretada principalmente pelos macrófagos residentes, pelos linfócitos B1 e pelos linfócitos Treg na lâmina própria, que, por sua vez, diferenciam-se nesse perfil dependendo do contexto intestinal e dos estímulos recebidos. Como já mencionamos, os SCFAs são importantes sinais para que ocorra essa diferenciação, assim como determinados componentes da microbiota ou derivados desta, e também componentes da dieta, como o ácido retinoico, entre outros (OMENETTI; PIZARRO, 2015).

Não estão ainda esclarecidos todos os mecanismos pelos quais a IL-10 exerce sua função reguladora na mucosa intestinal. Um dos mecanismos propostos é a atividade dessa citocina produzida por macrófagos CX3CR1+ residentes na lâmina própria na manutenção de linfócitos Treg durante a indução de tolerância oral (BAIN; Schridde, 2018). A depleção desses macrófagos leva à quebra da tolerância em camundongos tratados com um antígeno proteico (ovalbumina) por via oral (KIM et al, 2018), embora a frequência total de linfócitos Treg na mucosa não esteja alterada depois da depleção (BAIN; SCHRIDDE, 2018). Outro mecanismo que resulta no

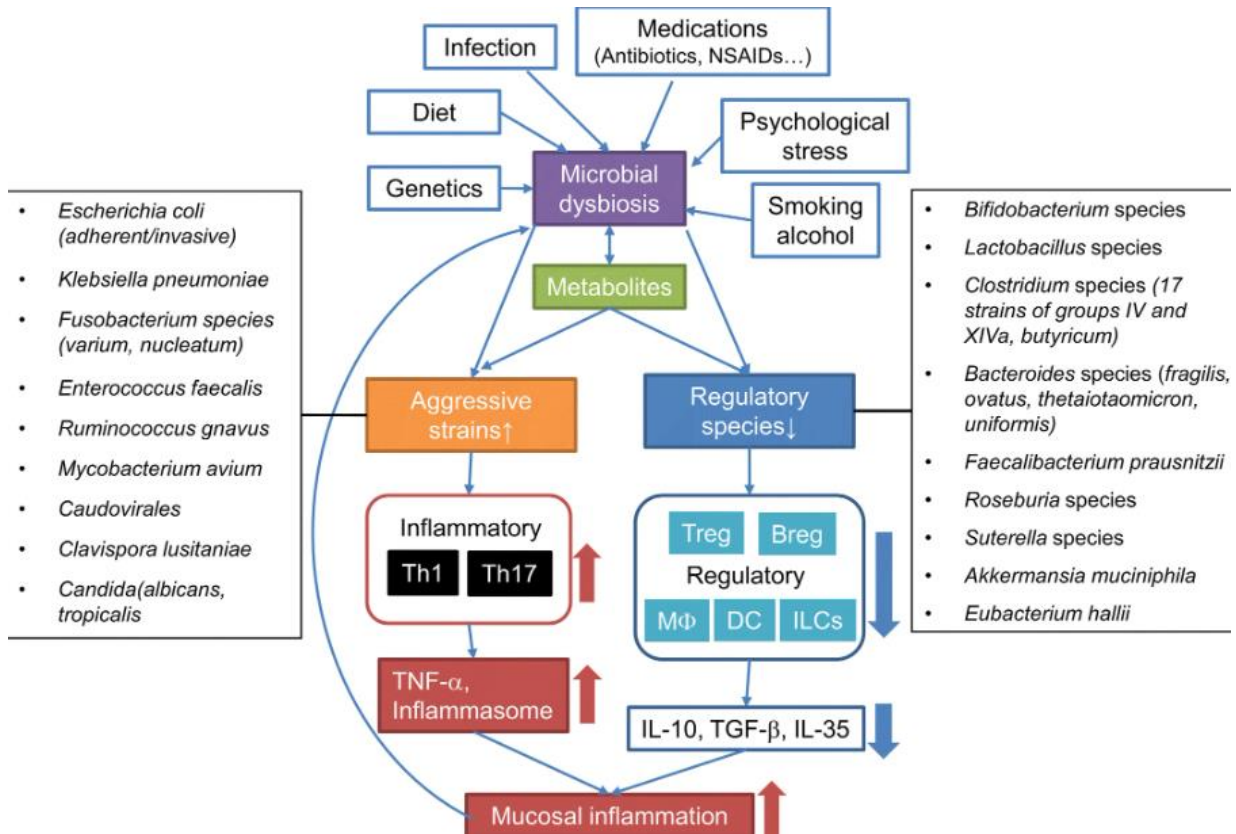
controle da inflamação intestinal é a sinalização dessa citocina nesse macrófago residente: a IL-10 suprime a atividade da quinase mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) que, conseqüentemente, leva a mitofagia, permitindo eliminar mitocôndrias disfuncionais. A relevância dessa sinalização fica evidenciada por estudos que mostram que, na ausência de sinalização de IL-10, macrófagos acumulam mitocôndrias danificadas em um modelo animal de colite, assim como pacientes com doença inflamatória intestinal, e isso resulta em uma ativação desregulada do inflamassoma NLRP3 e produção de IL-1 β , uma citocina conhecida importante para a diferenciação de linfócitos Th17 e outros mecanismos inflamatórios (IP et al., 2017).

Além disso, a sinalização da IL-10 no macrófago residente na lâmina própria também induz a supressão da sinalização de TLRs (*toll like receptors*) através de diversos mecanismos. Isso resulta na inibição da expressão de moléculas necessárias para a apresentação de antígenos, como MHCII (*major histocompatibility complex II*) e proteínas coestimulatórias (CD80, CD86, CD40). Dessa forma, a estimulação e diferenciação de linfócitos T fica limitada (MTTAL; ROCHE, 2015).

Por fim, outro efeito interessante da sinalização da IL-10 na mucosa intestinal pôde ser observado em um estudo realizado por Gunasekera et al. (2020) investigando a relação entre IL-10 e IL-22. A IL-22 é secretada por linfócitos Th17, Th22 e ILC3, sendo importante, em um contexto homeostático, para estimular a produção de peptídeos antimicrobianos por células do epitélio intestinal, assim como para induzir atividade de reparo na barreira epitelial. Porém, na falta da sinalização por IL-10, a IL-22 é expressa aberrantemente resultando em exarcebação da secreção de peptídeos antimicrobianos no lúmen provocando hiperplasia no epitélio intestinal e disbiose intestinal. Portanto, a IL-10 parece ser fundamental para limitar a atividade de linfócitos secretores de IL-22 de forma a impedir a desregulação do epitélio intestinal (GUNASEKERA et al., 2020).

Assim, a mucosa intestinal é um ambiente complexo e dinâmico, no qual falhas em quaisquer dos componentes citados podem favorecer o desenvolvimento de uma doença inflamatória intestinal. A Figura 2 a seguir ilustra resumidamente alguns fatores de risco e processos que culminam no desenvolvimento da inflamação intestinal desregulada.

Figura 2 - Disfunção da mucosa associada à disbiose nas DII



Fonte: MISHIMA; SARTOR, (2019).

1.2 Modelos experimentais de doenças inflamatórias intestinais (DII)

Vários modelos animais são utilizados para o estudo das DII. A maioria deles são camundongos e eles podem ser divididos em três classes: 1) aqueles induzidos pela administração de agentes colitogênicos, como a dextrana sulfato de sódio (DSS), a oxazolona, ou o 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS); 2) o modelo de transferência de linfócitos TCD4+ *naïve* para camundongos linfopênicos; 3) os modelos em camundongos geneticamente deficientes ou modificados que desenvolvem espontaneamente a colite. Alguns desses modelos se assemelham mais à colite ulcerative, outros à doença de Crohn embora nenhum deles apresente todas as características dessas doenças (GOYAL et al. 2014). Apesar disto, eles são ferramentas valiosas no estudo das DII.

Atualmente existem mais de 10 modelos de camundongos geneticamente deficientes que desenvolvem inflamação intestinal espontaneamente (PRATTIS; JURJUS, 2015). Apesar disso, alguns autores sugerem que determinados modelos apresentam pouca similaridade com o desenvolvimento da inflamação em humanos, pois apesar de haver o desenvolvimento espontâneo da doença, também observam

processos de cura espontâneos após algum período, ou divergências intrigantes em amostras histológicas e endoscópicas, o que não acontece na doença humana (KIM et al., 2021).

Por conta disso, o modelo experimental utilizado parece ser significativamente relevante. Os camundongos geneticamente deficientes não exibem cura espontânea e, quando não há interferências, seguem até o fim da vida com agravamento da doença. É importante notar que o desenvolvimento da colite nesse modelo depende intensamente da microbiota, tendo em vista que camundongos isentos de germes não desenvolvem a doença e também que o uso de antibióticos atenua a colite, ou, em alguns casos, até resolve a inflamação quando o antibiótico é seletivo e específico para determinada microbiota, o que mostra coerência com o que acontece em humanos (KEUBLER et al., 2015)

Esse modelo foi gerado por Kuhn et al. (1993) e consiste em uma mutação direcionada ao gene da IL-10 pela substituição de um fragmento de 500 pares de base do exon 1 por um códon de terminação e um cassete de expressão novo, introduzindo um códon de terminação no exon 3, o que resulta na deficiência de expressão da IL-10 para camundongos homocigotos.

Outro fator que evidencia a relevância desse modelo experimental para o estudo das DII é o fato de que parte da população mundial que desenvolve inflamação intestinal possui mutações relacionadas à expressão da IL-10 ou do receptor de IL-10 (SHOUVAL et al., 2016). Geralmente esses pacientes desenvolvem a doença ainda crianças e apresentam um risco relativamente alto de desenvolvimento de linfomas de células B (NEVEN et al., 2013) (ZHU et al., 2017). Esses achados são particularmente relevantes para o desenvolvimento deste trabalho, tendo em vista que pouco se fala sobre linfócitos B em doenças inflamatórias intestinais, e porque é coerente com resultados relatados por nosso grupo relativos ao aumento na frequência de linfócitos B CD19+CD5+ (linfócito B1) no peritônio e placas de Peyer de camundongos deficientes em IL-10 (GOMES-SANTOS et al., 2012). Tendo isso em vista, faz-se necessário entender o envolvimento de linfócitos B1 na colite, e isso será descrito a seguir.

1.3 Linfócitos B1

Linfócitos B1 constituem uma porção menor dos linfócitos B totais e possuem características únicas em termos de marcadores de superfície, localização, ontogênese e função (MARTIN; KEARNEY, 2001). Enquanto os linfócitos B2 contribuem para a formação de centros germinativos, participando de respostas a antígenos proteicos e dependentes de linfócitos T, os linfócitos B1 geralmente são caracterizados por secretar anticorpos rapidamente e de forma independente de linfócitos T, principalmente em resposta a polissacarídeos e lipídios. Dessa forma, os linfócitos B1 são responsáveis por secretar cerca de 90% dos anticorpos naturais circulando no corpo, incluindo antígenos próprios, como os reconhecidos em células apoptóticas e lipídios oxidados, como também IgM reativa ao vírus da influenza, e mais de 50% de IgA presente na mucosa intestinal (HOLODICK et al., 2017).

Em camundongos, esses linfócitos são encontrados em maior número na cavidade peritoneal, mas também estão presentes em menores proporções em outros órgãos como o omentum, a pleura, o baço, a lâmina própria intestinal, entre outros. Interessantemente, os linfócitos B1 são gerados em dois momentos diferentes: no período embrionário e logo após o nascimento. Portanto, eles possuem ontogênese, desenvolvimento e precursores diferentes daqueles dos linfócitos B2 que emergem apenas após o nascimento através da hematopoiese na medula óssea (revisado por BAUMGARTH, 2010). Luo et al. (2022) sugerem que a população de linfócitos B1 presente após o nascimento seja uma população heterogênea que, apesar de se manter por autorrenovação, têm funções distintas ao longo do tempo.

Assim sendo, apesar de muito autores caracterizarem os linfócitos B1 de forma geral como secretores de anticorpos naturais, secretores de citocinas reguladoras (como IL-10) e com habilidade fagocítica e microbicida, é preciso distinguir quais populações de linfócitos B1 de fato estão associados a essas características (BAUMGARTH, 2010).

Fenotipicamente, os linfócitos B1 são caracterizados como IgM^{hi}, IgD^{lo}, CD23, B220^{lo}, com expressão de Mac-1 (CD11b) em parte de células B-1 peritoneais, mas não nas células esplênicas (GHONS et al., 2008). As células B-1 são subdivididas em B-1a (CD5⁺) e B-1b (CD5⁻) com base na expressão de CD5 na superfície celular. Em relação aos linfócitos B1b, além destes responderem a antígenos não proteicos, também geram anticorpos para antígenos proteicos de forma independente de linfócitos T, conferindo proteção a longo prazo (ALUGUPALLI et al., 2004). Já os

linfócitos B1a (CD5+) ainda devem ser divididos em B1a PC1^{hi} e B1a PC1^{lo}, com base na expressão de *plasma cell alloantigen 1*, uma ectonuclease presente na membrana das células (WANG et al., 2012). A tabela 2 abaixo ilustra resumidamente as principais distinções e funções de linfócitos, B1aPC1^{lo} e B1aPC1^{hi}.

Tabela 2: Distinções entre linfócitos B1a PC1^{lo} e B1a PC1^{hi}.

| B1a PC1 ^{lo} | B1a PC1 ^{hi} |
|--|--|
| Produção de anticorpos naturais presentes no soro e na mucosa (maioria); | Produção de anticorpos naturais presentes no soro e na mucosa (minoria); |
| Capacidade de secreção específica de IgM a compostos bacterianos; | Secreção de anticorpos que reconhecem antígenos próprios; |
| Não produz IL-10 após estímulo; | Secreção de IL-10 após estímulo; |
| Não regula a diferenciação de Th1. | Auxilia na diferenciação de Th1 |

Fonte: Adaptado: WANG et al. (2012)

Apesar de compartilhar algumas semelhanças, cada uma dessas populações ocupa um nicho celular e possui suas características e funções particulares. Dessa forma, é necessário estudá-las de forma distinta (WANG et al., 2015).

Como vimos anteriormente, a ação de células reguladoras na mucosa intestinal é essencial para manter-se a homeostase. Apesar de o linfócito Treg ser mais visualizado nesse contexto, ultimamente linfócitos B reguladores (Breg) têm sido relatados como parte crucial desse sistema. Esses linfócitos foram recentemente caracterizados por sua capacidade em suprimir respostas T efetoras e secretar citocinas como IL-10, IL-35 e TGF- β (PACAUD et al., 2021). Não existe um consenso sobre os marcadores celulares que identificariam esses linfócitos, nem sobre quais seriam seus precursores. Porém um estudo de Tedder (2015) demonstra que a maior parte dessas células se encontra na população peritoneal de linfócitos B1a, apesar de também estarem presentes em meio a linfócitos B1b e em populações no baço.

Estudos recentes demonstram que a microbiota pode ter um papel na gênese desses Bregs, em particular através de seus metabólitos, incluindo ácidos graxos de cadeia curta (DAÏEN et al., 2021) e também de determinadas classes bacterianas, como *Clostridia* (ALHABBAB et al. 2015). Ademais, Polese et al. (2012) demonstraram

que pacientes com IBD apresentam uma redução no número de linfócitos B1a. Um estudo em camundongos também demonstrou que a produção de IL-10 pelos linfócitos B do peritônio reduziu significativamente a gravidade da colite em modelos experimentais espontâneo e induzido. Essa ação anti-inflamatória ocorreu pela regulação da infiltração de neutrófilos, da ativação de linfócitos efetores colitogênicos, e da produção de citocinas pró-inflamatórias durante o início da colite (MASEDA et al., 2013). Em concordância com estes achados, Fu et al., (2021) também relataram a capacidade de linfócitos B peritoniais em melhorar a colite em um modelo animal pelo aumento na produção de IgA no intestino. Esses dados, em conjunto, mostram que a subpopulação de linfócitos B1 tem função reguladora e é importante para manter a homeostase nos tecidos gastrointestinais e no sistema imune. No presente estudo, nosso objetivo foi compreender melhor a dinâmica de localização das populações de linfócitos B1 e a relação da produção de IgA secretória (SIgA) com capacidade de se ligar às bactérias da microbiota durante o desenvolvimento da colite espontânea em camundongos deficientes para IL-10.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar populações de linfócitos B1 durante o desenvolvimento da colite espontânea em camundongos deficientes para IL-10.

2.2 Objetivos específicos

- a.** Avaliar histologicamente o desenvolvimento da colite no grupo deficiente para IL-10.
- b.** Analisar a frequência de linfócitos B totais e das subpopulações de linfócitos B1 em diferentes órgãos (baço, peritônio, placas de Peyer e cólon) em camundongos deficientes para IL-10 e em camundongos selvagens com 12 semanas de vida.
- c.** Analisar a frequência de bactérias da microbiota intestinal ligadas a SIgA camundongos deficientes para IL-10 e em camundongos selvagens controle com 8, 9 e 12 semanas de vida.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos selvagens (WT, *wild type*) e deficientes para IL-10 (IL-10^{-/-}) em um fundo genético 129 Sv/Ev foram obtidos do laboratório de Donna-Marie McCafferty (Calgary University, Calgary, Canadá). Todos os camundongos foram criados e alojados no biotério do Laboratório de Imunobiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os camundongos foram mantidos em microisoladores com ração padrão e água autoclavadas até a data dos experimentos. Os animais foram estudados com 8, 9 e 12 semanas de idade, e camundongos 129 Sv/Ev do tipo selvagem pareados por idade foram usados como controles. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG – CEUA #133 / 2020.

3.2 Lâminas histológicas

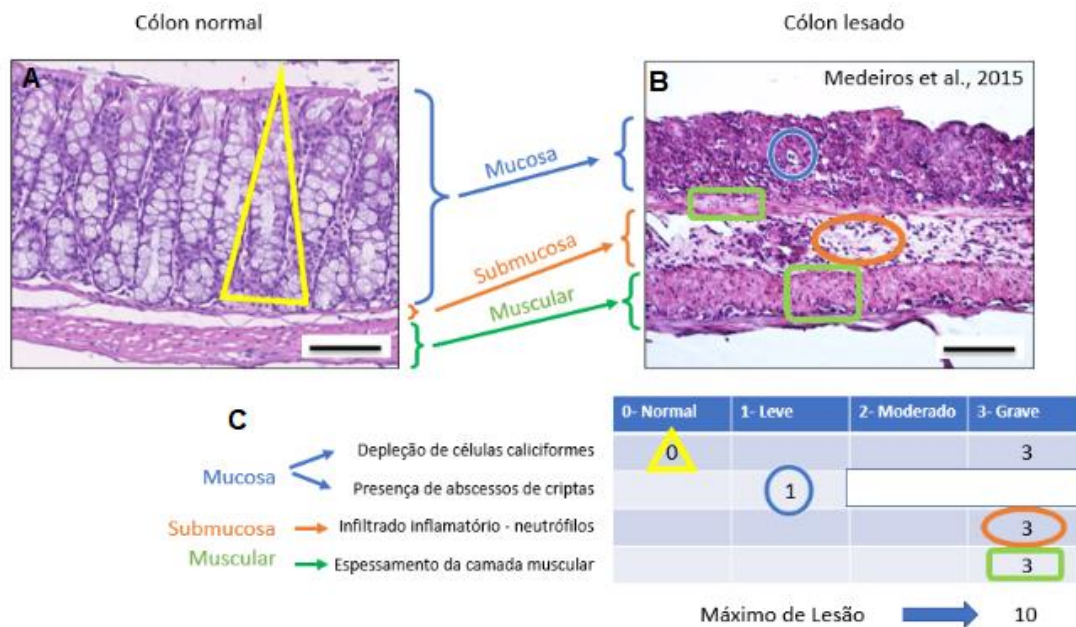
O cólon dos animais foi excisado e armazenado em cassetes previamente identificados e embebidos em solução de formol 10% para fixação tecidual. Em seguida, os tecidos foram desidratados com etanol e xilol, incluídos em parafina e cortados em micrótomo em secções histológicas de 4µm. Para coloração, os tecidos foram desparafinizados em xilol e rehidratados em banhos de concentrações decrescentes de etanol, e corados com hematoxilina e eosina.

3.3 Análise histológica

Para a análise da inflamação tecidual resultante da colite, as lâminas histológicas foram examinadas utilizando microscópio ótico na foi feita uma avaliação semiquantitativa na qual as seguintes características foram analisadas: na mucosa, depleção de células caliciformes e presença de abscessos de cripta (0 – normal, 1 – leve, 2 – moderado e 3 – grave); na submucosa, presença de infiltrado inflamatório (0 – normal, 1 – leve, 2 – moderado e 3 – grave); e na camada muscular, espessamento da camada muscular (0 – normal, 1 – leve, 2 – moderado e 3 – grave). As pontuações para cada parâmetro foram somadas até uma pontuação máxima de 12. As

comparações estatísticas foram realizadas a partir da análise do somatório de todos os parâmetros para cada animal, como exemplificado na Figura 3.

Figura 3: Estratégia de quantificação da inflamação tecidual observada na colite



(A) Histologia em HE do cólon de um camundongo WT, aumento de 40x. O triângulo amarelo está ressaltando a preservação de células caliciformes na mucosa intestinal. (B) Histologia em HE do cólon de um animal com colite induzida por DSS, aumento de 40x. O círculo azul está ressaltando a depleção de células caliciformes e o retângulo verde abaixo está ressaltando o abscesso de criptas na mucosa. O círculo laranja está ressaltando o infiltrado neutrofílico na submucosa. O retângulo verde está ressaltando o espessamento da camada muscular. (C) Descrição dos parâmetros de avaliação nas respectivas camadas intestinais e exemplificação da contabilização de escores para as imagens A e B.

3.4 Isolamento de células dos órgãos e tecidos

3.41 Peritônio

Após eutanásia, foi feita uma pequena incisão na parte abdominal inferior do camundongo, que permitiu retirar a pele e o pelo puxando-os delicadamente para cima. Em seguida, foram injetados 10ml de PBS 1x gelado no peritônio com a utilização de uma agulha de 26G. O camundongo foi levemente balançado para permitir a desagregação das células. Por fim, o volume total foi coletado, o tubo foi centrifugado a 1200 r.p.m por 10 minutos e as células foram ressuspensas em 1ml de meio RPMI 1640 completo (enriquecido com 2mM de L-glutamina, 50mM de 2-mercaptoetanol, 100 U/mL de penicilina, 1mM de piruvato de sódio, 0,1 mM de aminoácidos não-essenciais, 25 mM de HEPES e 10% de soro fetal bovino

(SFB) inativado. As células viáveis foram contadas utilizando a câmara de Neubauer após o uso do corante azul de tripano.

3.42 Baço

Após eutanásia, o baço do camundongo foi retirado e coletado em um tubo de 15ml contendo meio RPMI 1640 completo (enriquecido com 2mM de L-glutamina, 50mM de 2-mercaptoetanol, 100 U/mL de penicilina, 1mM de piruvato de sódio, 0,1 mM de aminoácidos não-essenciais, 25 mM de HEPES e 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado. Em seguida, o conteúdo foi transferido para uma placa Petri e, então, macerado com a parte fosca de lâminas histológicas. Após a maceração, o conteúdo foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos. Na sequência, o sobrenadante foi desprezado e foi acrescentado 9ml de água destilada para lisar as hemácias. Dez segundos depois, foi adicionado 1ml de PBS 10x e novamente centrifugado nas mesmas configurações. Por fim, as células foram ressuspendidas em 1ml de meio RPMI 1640 completo, e foram contadas as células viáveis utilizando câmara de Neubauer e corante azul de trypan.

3.43 Placas de Peyer

O intestino delgado foi coletado. O tecido gorduroso e o conteúdo intestinal foram removidos, permitindo melhor visualização das Placas de Peyer. Ao serem identificadas, foram coletadas delicadamente e armazenadas em um tubo contendo 1ml de meio RPMI 1640 completo. Em seguida, o conteúdo foi transferido para uma placa Petri e, então, macerado com a parte fosca de lâminas histológicas. Após a maceração, o conteúdo foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 500ul de meio RPMI 1640 completo. As células viáveis foram contadas utilizando a câmara de Neubauer e corante azul de trypan.

3.44 Lâmina Própria

O intestino grosso foi coletado, o tecido gorduroso foi removido, assim como o conteúdo luminal (muco e fezes). O intestino limpo, então, foi cortado em pedaços com cerca de 2cm e cada pedaço armazenado em 10ml de meio A (HBSS feito no próprio laboratório, enriquecido com 5% SFB e 25mM de HEPES). Cada pedaço foi posicionado em papel filtro e, então, o tecido foi canulado e invertido, expondo o compartimento luminal. Após a inversão, cada pedaço foi lavado com meio A e retornado para tubo contendo meio A fresco e, então, vortexado. Após finalizar esta etapa para todos os pedaços, o conteúdo de cada tubo foi filtrado por uma redinha de metal, e os pedaços foram coletados e armazenados em um novo tubo contendo meio C (HBSS enriquecido com 15mM de HEPES, 5mM de EDTA, 10% de SFB inativado e 1mM de DTT). Os tubos foram posicionados em um shaker por 20 minutos, à 180 rpm e 37°C. Após esse período, os tubos foram colocados no gelo para parar a reação. Em seguida, foram agitados vigorosamente para remover as células epiteliais, e novamente o

conteúdo despejado em redinha de metal. Os pedaços foram coletados e lavados com meio A em placas de Petri. Para finalizar a lavagem, cada pedaço foi coletado em um tubo contendo 10ml de meio A e centrifugado a 1600 rpm por 3 minutos. Após nova filtragem com redinha de metal, os pedaços foram armazenados em tubos contendo 600ul de meio B (HBSS enriquecido com 2mM de EDTA e 5mM de HEPES). O tecido foi picotado ao máximo possível e, então, novamente centrifugado à 5000 r.p.m por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o conteúdo foi ressuscitado em meio RPMI completo, contendo 0,17mg/ml de liberase TL e 30ug/ml de DNase I para desagregar a matriz extracelular e permitir a liberação de células. Os tubos foram posicionados horizontalmente em um shaker por 15 minutos, à 120 rpm e 37°C. Em seguida foram vortexados por 5 minutos e novamente posicionados no shaker com as mesmas configurações. Após parar a reação posicionando os tubos no gelo, o conteúdo dos tubos foi filtrado por redinhas de 100 micrômetros e completado para 35ml com meio A. Os tubos foram centrifugados à 1600 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o conteúdo foi ressuscitado em 10ml de meio B. Na sequência, o conteúdo foi filtrado com redinha de 40 micrômetros e o volume completado para 30ml com meio A. Após nova centrifugação repetindo a configuração passada, o sobrenadante foi despejado e, finalmente, ressuscitado em 500ul de meio RPMI 1640 completo com 2% SFB. As células viáveis foram contadas utilizando a câmara de Neubauer e corante azul de tripano.

3.5 Imunofenotipagem

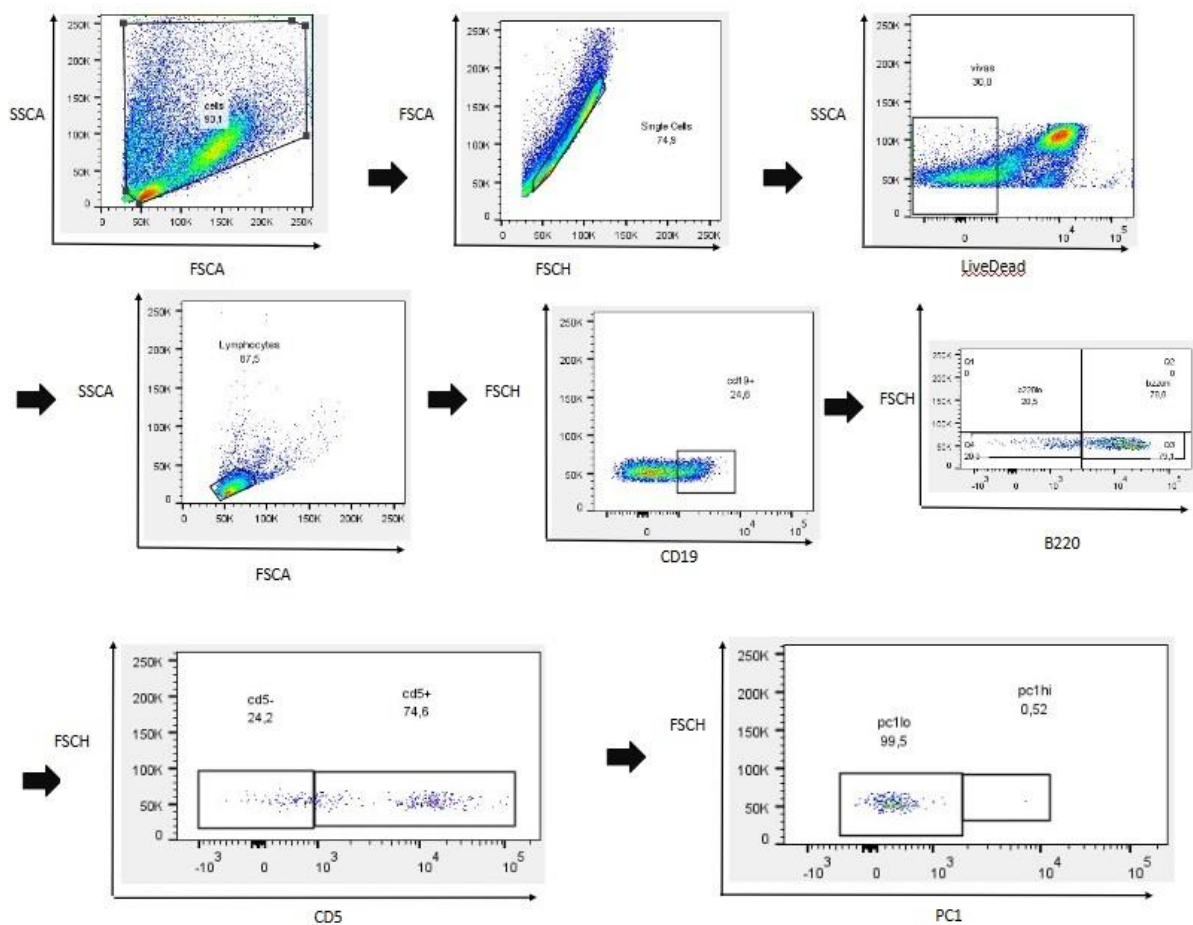
Após serem isoladas e contadas, foram incubadas 1 milhão de células dos órgãos citados anteriormente em placas de poliestileno. Primeiramente, foi adicionado o anticorpo anti-CD16 (*Fc block*, BD Bioscience, nº de catálogo 553142) por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado o marcador de viabilidade celular (LIVE / DEAD TM, Viability / Cytotoxicity Kit, Invitrogen, nº de catálogo L3224) e então as células foram encubadas por 30 minutos à 4°C e longe do alcance da luz com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos reativ. Análises posteriores foram feitas utilizando o software FlowJo para determinar as populações positivas e negativas para cada marcação além do nível de expressão das respectivas moléculas. Foram utilizados os anticorpos monoclonais conjugados reativos com moléculas de superfície. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS-wash e centrifugadas a 1200 r.p.m por 10 minutos. Na sequência, as células foram ressuscitadas com paraformaldeído 3%, incubadas à 4º novamente no escuro por 30 minutos. Por fim, as placas foram novamente lavadas e as células ressuscitadas em PBS 1x, prontas para serem passadas no citômetro. Foi utilizado o FACScanto acoplado a um computador com o software Diva. A partir de um gráfico que permite

identificar o tamanho e a granulosidade das células pelo padrão de dispersão do laser, foram delimitadas as populações de interesse e, a partir destas, foram gravados 100 mil eventos para análise de linfócitos. Análises posteriores foram feitas utilizando o software FlowJo para determinar as populações positivas e negativas para cada marcação, além do nível de expressão das respectivas moléculas. Foram utilizados os seguintes anticorpos conjugados: anti-B220 conjugado à PE-Cy5 (eBioscience, nº de catálogo 15045282); anti-IgM conjugado à APC-Cy7 (Biolegend, nº de catálogo 406515); anti-CD5 conjugado à BV421 (Biolegend 100617); anti-CD19 conjugado à FITC (BD Bioscience, nº de catálogo 553785); anti-CD23 conjugado à PE-Cy7 (Biolegend, nº de catálogo 101613); e anti-PC1 conjugado à PE (Biolegend, nº de catálogo 149203). A estratégia de FMO (*Fluorescence minus one*) foi utilizada para determinar as populações positivas e criar o delineamento dos *gates*.

3.6 Estratégia de determinação da população de interesse

As células extraídas dos órgãos citados anteriormente foram avaliadas por citometria de fluxo com o objetivo de quantificar linfócitos B2, linfócitos B1, subpopulações de linfócitos B1 positivos ou não para CD5, e subpopulações de linfócitos B1 CD5+ positivos ou não para PC1. A identificação foi feita através da seleção por tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) padrão (gate para linfócitos ou granulócitos) e posterior separação de populações negativas ou positivas para os marcadores utilizados como mostrado na Figura 4.

Figura 4 - Estratégias de *gate* utilizada em todos os órgãos demonstrada através da imunofenotipagem dos linfócitos B2 e B1 no baço.



Após adquirir a leitura das células no citômetro, no Flowjo foram selecionadas as populações de interesse, seguindo a estratégia ilustrada acima. Primeiro foram selecionados os eventos gerais. Dentro desses eventos, foram selecionados os *singlets*; dentro dos *singlets* foram selecionadas células vivas; dentre as células vivas, foram selecionados os linfócitos através do tamanho (FSC-A) e de granulosidade (SSC-A); dentre os linfócitos, foram selecionados linfócitos B totais através do CD19. Dentre as células positivas para CD19, foram selecionados linfócitos B2 totais, ou seja, B220 positivo, e foram selecionados linfócitos B1 totais, ou seja, B220/low ou negativo. Dentre os linfócitos *low* ou negativos para B220, foram selecionados linfócitos B1a, ou seja, positivos para CD5. Dentre os linfócitos B1a, foram selecionadas populações positivas ou negativas para PC1. Essa foi a estratégia utilizada para análise das células de todos os diferentes órgãos.

3.7 Ensaio de IgA ligada a bactérias da microbiota intestinal

3.7.1 Processamento do conteúdo fecal

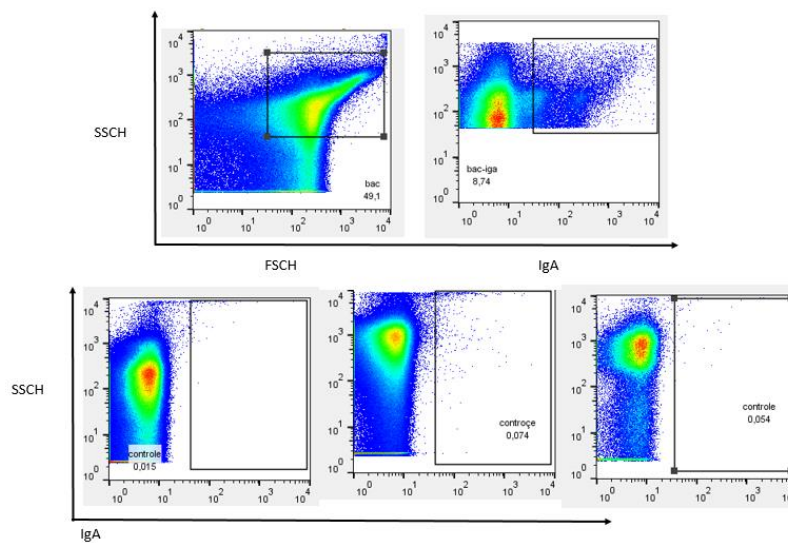
Para este ensaio, as fezes dos camundongos foram coletadas em tubos estéreis, nos quais foi adicionado o volume necessário de PBS 1x gelado e estéril para atingir a concentração de 1mg/ml de acordo com o peso fecal. Cada amostra foi homogeneizada em vórtex por 5 min para a total diluição do conteúdo fecal e em

seguida centrifugada à velocidade de 4000g por 5 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi coletado e filtrado em *cell strainer* de 40µm. O sobrenadante filtrado foi utilizado para a análise de bactérias da microbiota intestinal ligadas à SIgA.

3.72 Citometria de fluxo

Após o processamento fecal, o conteúdo foi centrifugado a 8.000g para precipitar as bactérias. O *pellet* obtido foi ressuspendido em 1ml de PBS 1x estéril gelado, e foi adicionado o anticorpo anti-IgA conjugado a PE. As amostras foram incubadas na geladeira por 40 minutos, lavadas com PBS-wash, centrifugadas novamente a 8000g e, por fim, foram adquiridas pelo citômetro FACScan. A análise foi feita utilizando o software FlowJo e a estratégia está demonstrada na Figura 5.

Figura 5: Estratégia de *gates* para análise de SIgA da microbiota intestinal



As bactérias foram isoladas do conteúdo fecal e marcadas com anticorpos anti-IgA. Em seguida, foi feita a avaliação por citometria de fluxo e pelo FlowJo. As bactérias foram selecionadas utilizando-se os parâmetros de tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), como descrito por Palm et al. 2014. No primeiro gráfico está destacada a população de interesse, e no segundo, evidencia-se as bactérias ligadas a SIgA. Nos gráficos inferiores, evidencia-se os controles negativos de cada um dos três ensaios realizados para idades diferentes dos camundongos.

3.8 Análises estatísticas

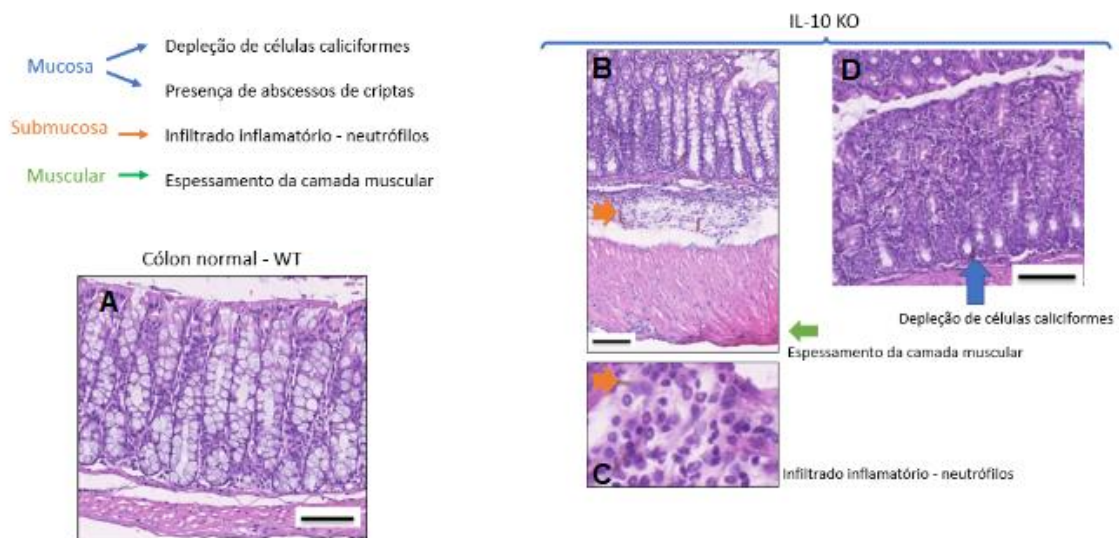
As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPadPrism® 6. As análises entre grupos foram executadas pela metodologia teste T de *Student* não-pareado para comparações entre dois grupos após a exclusão de *outliers*.

4. RESULTADOS

4.1 A histologia do cólon dos animais deficientes para IL-10 apresenta inflamação neutrofílica com mudanças teciduais.

Camundongos 129 Sv/Ev WT e deficientes para IL-10 foram mantidos no biotério até alcançarem 12 semanas de vida. Após este período, os animais foram sacrificados e foram realizados os experimentos. A análise histológica dos dois grupos de camundongos demonstrou que os camundongos WT não apresentavam inflamação ou alteração tecidual no cólon, como esperado, enquanto os camundongos deficientes para IL-10 (IL-10ko) desenvolveram uma inflamação caracterizada por infiltração neutrofílica na submucosa, com espessamento da camada muscular e depleção de algumas células caliciformes na mucosa, indicando de fato o desenvolvimento da colite (Figura 6).

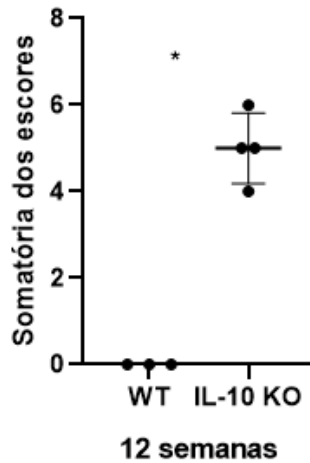
Figura 6: Análises histológicas representativas do intestino grosso de camundongos WT e de camundongos deficientes para IL-10.



(A) Histologia em HE do cólon de camundongo representativo de grupo WT, demonstrando a preservação de todos os parâmetros analisados, aumento de 40x. (B) Histologia em HE do cólon de camundongo representativo do grupo deficiente para IL-10, aumento de 10x. A seta laranja está indicando a submucosa com infiltrado inflamatório. A seta verde está indicando o espessamento da camada muscular. (C) Histologia em HE do cólon de camundongo representativo do grupo deficiente para IL-10, aumento de 40x. A seta laranja está indicando o infiltrado neutrofílico na submucosa intestinal. (D) Histologia em HE do cólon do camundongo representativo do grupo deficiente para IL-10, aumento de 40x. A seta azul está indicando a depleção de células caliciformes na mucosa intestinal.

Essas alterações se somaram para aumentar o escore inflamatório do grupo IL-10ko quando comparado com o grupo WT (Figura 7).

Figura 7: Escore Inflamatório do cólon de camundongos WT e de camundongos deficiente para IL-10.

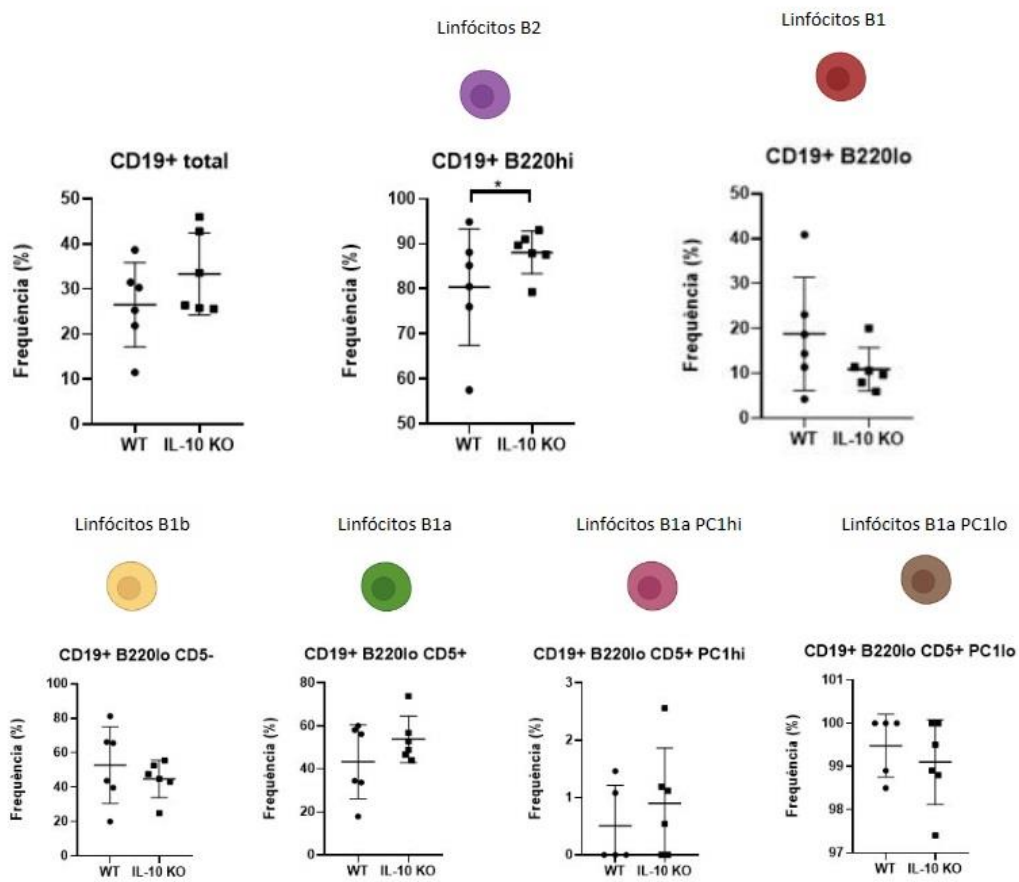


Os camundongos foram sacrificados na 12ª semana de vida, os cólons isolados e fixados com solução de formol 10% para preparação de lâminas histológicas. As lâminas foram coradas por HE e examinadas em microscópio óptico em aumento de 40X para quantificação dos parâmetros que compõem o escore histológico como descrito nos materiais e métodos. As barras representam a média + SD dos valores de cada grupo. As diferenças entre os grupos foram calculadas utilizando ANOVA. * $P < 0.05$.

4.2 Camundongos deficientes para IL-10 apresentaram aumento da frequência de linfócitos B2 no peritônio.

A cavidade peritoneal é um dos compartimentos corporais no qual, em condições normais, se aloja a maior parte dos linfócitos B1 (revisado por BAUMGARTH, 2010). Por conta disso, um dos objetivos iniciais foi quantificar as populações de linfócitos B2 e B1 e também de determinadas subpopulações de linfócitos B1 nesse compartimento, interessante, não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências de linfócitos B1 ou de suas subpopulações entre o grupo WT e IL-10ko. No entanto, houve um aumento da frequência de linfócitos B2 totais nos camundongos deficientes para IL-10 (Figura 8).

Figura 8: Frequência de linfócitos B2 e B1 no peritônio de camundongos WT e deficientes para IL-10.

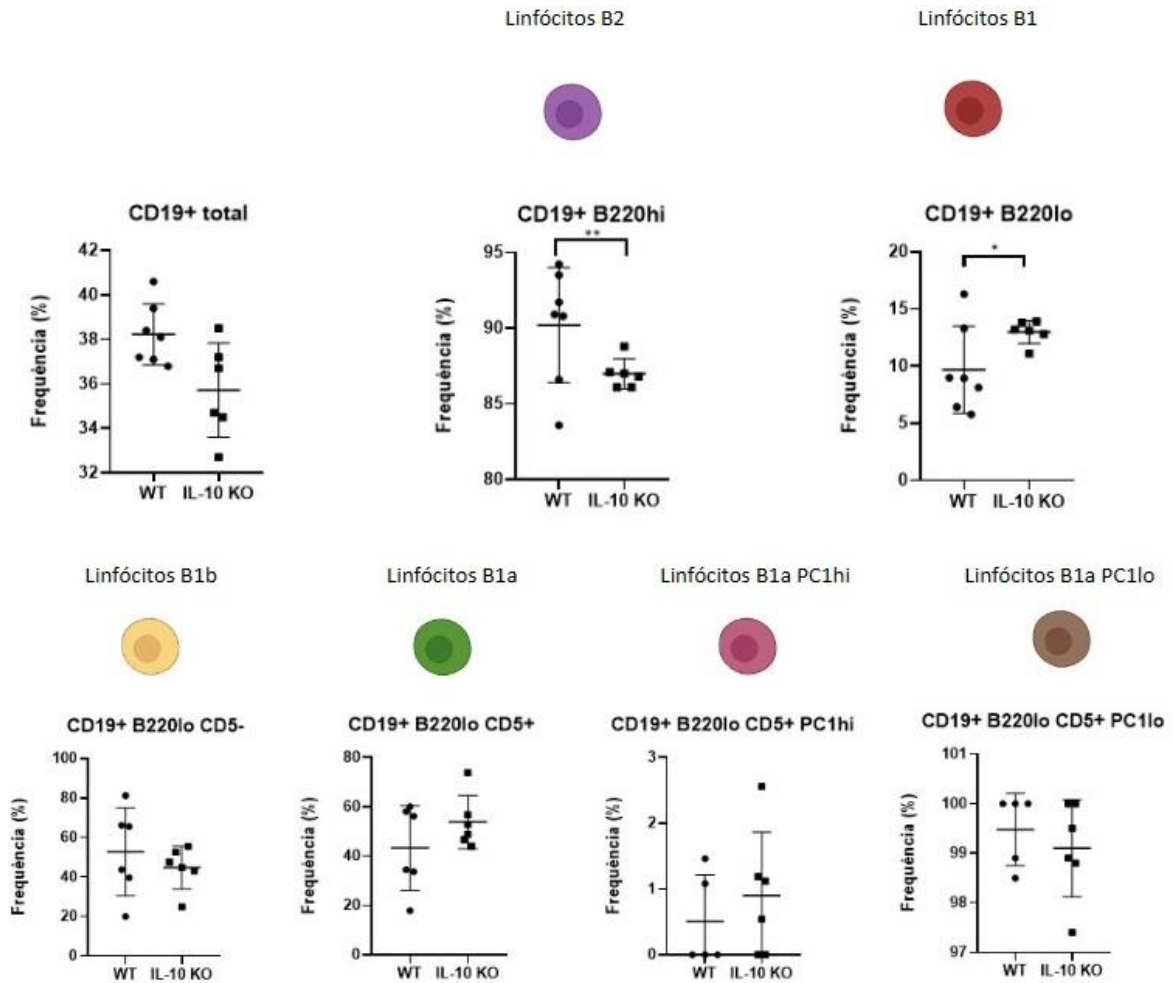


Os camundongos WT e IL-10ko foram sacrificados na 12ª semana de vida, foram isoladas células do peritônio, marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo para determinação das frequências de linfócitos B2, B1 e suas subpopulações. As barras representam a média + SD dos valores de cada grupo. As diferenças entre os grupos foram calculadas utilizando ANOVA. * $P < 0.05$.

4.3 Camundongos deficientes para IL-10 apresentaram diminuição da frequência de linfócitos B2 e aumento da frequência de linfócitos B1 no baço.

A relevância do baço para os linfócitos B1 não está totalmente elucidada, porém Wardemann et al., (2002) demonstraram que a esplenectomia se acompanhava da depleção de linfócitos B1a da cavidade peritoneal. Outros estudos também demonstraram que os linfócitos B1 presentes no peritônio secretam anticorpos de forma espontânea, mas significativamente menos que os linfócitos B1 presentes no baço (revisado por BAUMGARTH, 2010). Isso demonstra a importância de investigar conjuntamente a frequência de linfócitos B1 presentes no peritônio e também no baço. A Figura 9 ilustra o resultado obtido através dos experimentos.

Figura 9: Frequências de linfócitos B2 e B1 no baço de camundongos WT e deficientes para IL-10.



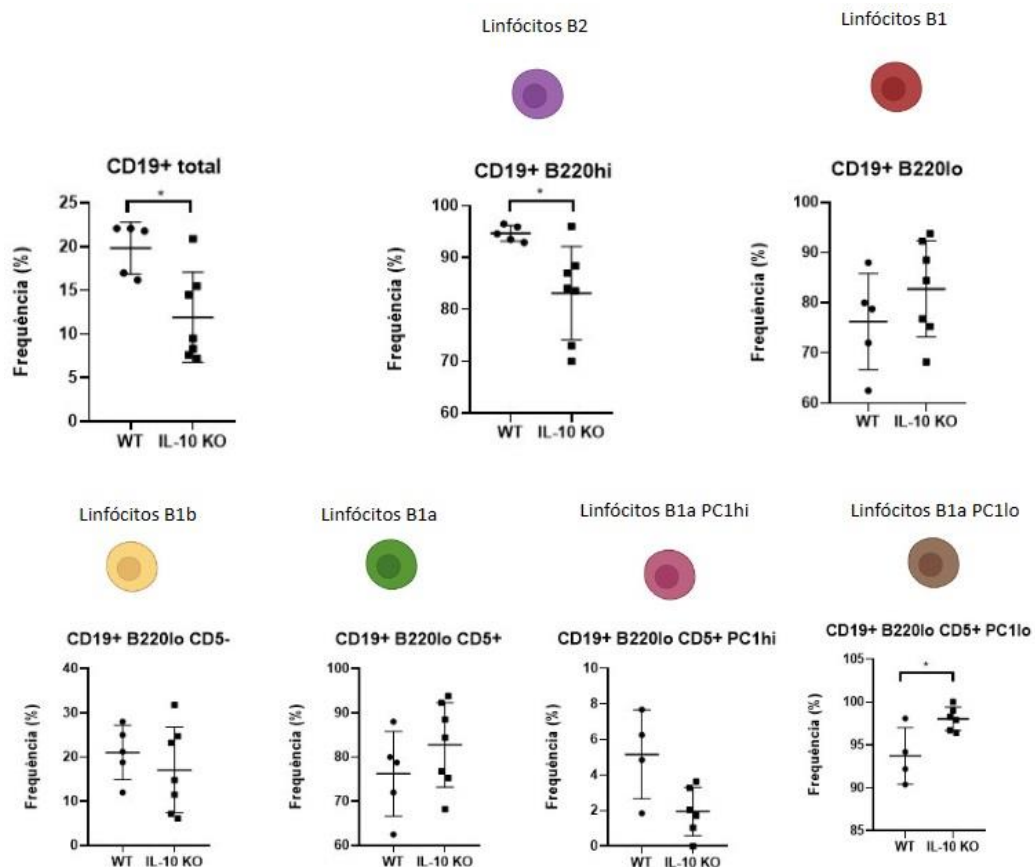
Os camundongos WT e IL-10ko foram sacrificados na 12ª semana de vida, foram isoladas células do baço, marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo para determinação das frequências de linfócitos B2, B1 e suas subpopulações. As barras representam a média + SD dos valores de cada grupo. As diferenças entre os grupos foram calculadas utilizando ANOVA. * $P < 0.05$.

Observamos uma diminuição na frequência de linfócitos B2 e um aumento da frequência de linfócitos B1 no baço de camundongos deficientes para IL-10. Porém, curiosamente, não observamos diferenças nas frequências das subpopulações de linfócitos B1 entre os dois grupos de camundongos. Isso pode indicar que talvez haja uma subpopulação não pesquisada que esteja contribuindo para a diferença entre a frequência de linfócitos B1 totais, ou o número de camundongos não foi o suficiente para gerar uma diferença estatisticamente significativa. Uma tendência de aumento da frequência de linfócitos B1a PC1^{hi} nos camundongos deficientes para IL-10 pode ser observada na figura.

4.4 Camundongos deficientes para IL-10 apresentaram diminuição da frequência de linfócitos B2 e um aumento da frequência da subpopulação de linfócitos B1a PC1lo na lâmina própria do cólon.

Sabe-se que mais de 50% da SIgA presente na lâmina própria intestinal, é produzida por linfócitos B1 originários do baço (ROSADO et al., 2009). Além disso, Berberich et al. (2007) demonstraram que o microambiente peritoneal possibilita maior capacidade de migração de linfócitos B para lâmina própria e, em menores proporções, para as placas de Peyer. Nossos resultados mostram uma diminuição na frequência de linfócitos B2 e um aumento na frequência de linfócitos B1a PC1^{lo} na lâmina própria do cólon dos camundongos deficientes para IL-10, em comparação com os animais do grupo controle WT (Figura 10).

Figura 10: Frequência de linfócitos B2 e B1 na lâmina própria do cólon de camundongos WT e deficientes para IL-10.



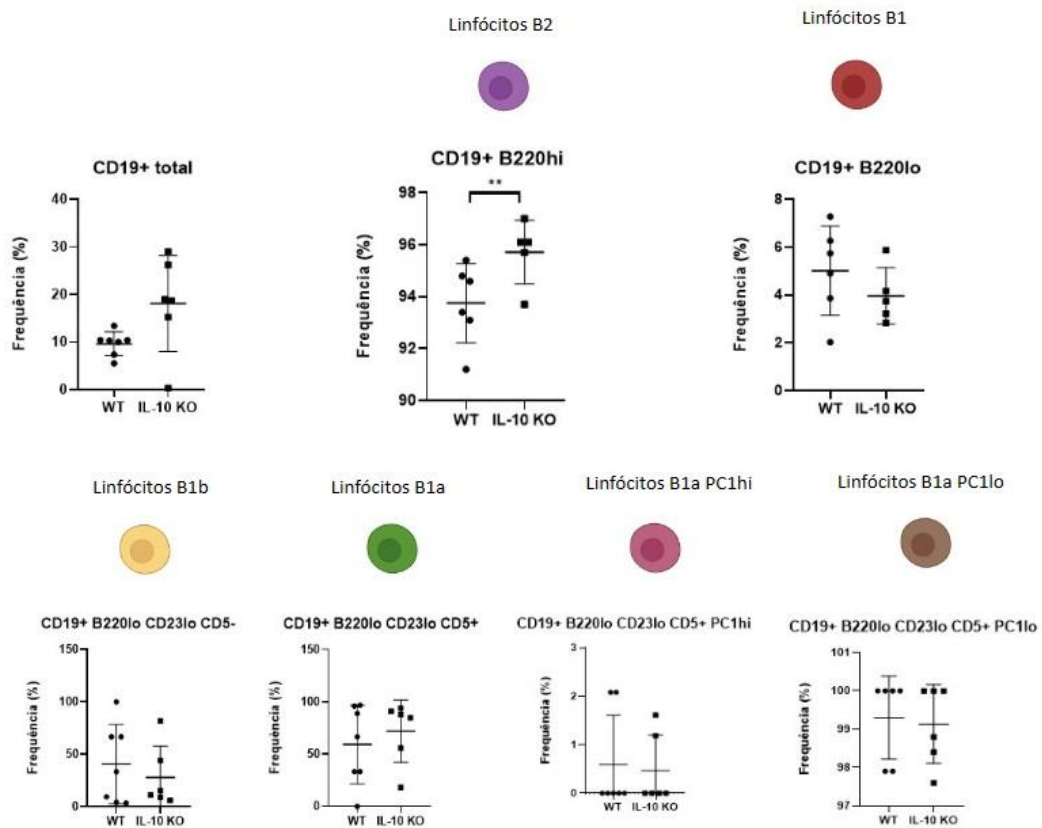
Os camundongos WT e IL-10ko foram sacrificados na 12ª semana de vida, foram isoladas células da lâmina própria do cólon, marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo para determinação das frequências de linfócitos B2, B1 e suas subpopulações. As barras

representam a média + SD dos valores de cada grupo. As diferenças entre os grupos foram calculadas utilizando ANOVA. * $P < 0.05$.

4.5 Camundongos deficientes para IL-10 apresentaram aumento da frequência de linfócitos B2 totais nas placas Peyer.

Khun et al. (1993) foram os primeiros autores a relatar o desenvolvimento espontâneo da colite neste modelo animal. No artigo original, eles descrevem que a colite desenvolvida por esses camundongos se restringe ao cólon proximal quando os animais são mantidos em condições livres de patógenos específicos, como nos biotérios. Porém, já foi relatado que, mesmo nessas condições, também podem ocorrer alterações no intestino delgado, especificamente no íleo (GOMES-SANTOS et al., 2012). Além disso, em humanos, há evidências que sugerem que o início das lesões da doença de Cronh ocorre no epitélio que recobre as placas de Peyer (CHASSAING et al., 2011). Tendo isso em vista, se fez necessário analisar as células de interesse também nesses compartimentos. As placas de Peyer são caracterizadas por formar centros germinativos. Dessa forma, não esperávamos observar diferenças entre as frequências de linfócitos B1 entre os dois grupos de camundongos (KOMBAN et al., 2019). Ainda assim, é interessante observar que houve aumento na frequência de linfócitos B2 nas placas de Peyer dos camundongos deficientes para IL-10 (Figura 11).

Figura 11: Frequência de linfócitos B2 e B1 nas placas de Peyer de camundongos WT e deficientes para IL-10.



Os camundongos WT e IL-10ko foram sacrificados na 12ª semana de vida, foram isoladas células das placas de Peyer, marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo para determinação das frequências de linfócitos B2, B1 e suas subpopulações. Diferentemente dos outros órgãos. As barras representam a média + SD dos valores de cada grupo. As diferenças entre os grupos foram calculadas utilizando ANOVA. * $P < 0.05$.

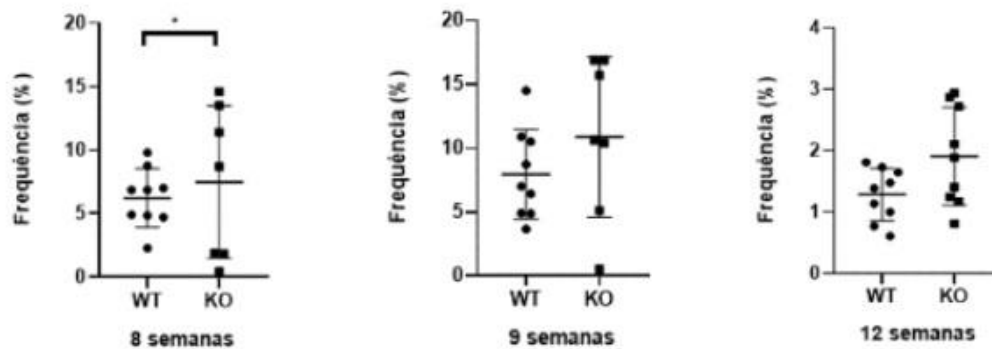
4.6 Camundongos deficientes para IL-10 apresentaram aumento da frequência de bactérias ligadas a SIgA com 8 semanas de vida.

Rosado et al. (2009) mostraram que, sem imunização intencional, toda a SIgA presente no intestino é produzida por linfócitos B1a. Além disso, está consolidada a relevância da SIgA na manutenção da homeostase intestinal através de diversos mecanismos (CORTHÉSI, 2013). Assim sendo, achamos interessante observar se haveria diferença na frequência de bactérias da microbiota ligadas a SIgA ao longo do desenvolvimento da colite. Curiosamente, observamos um leve aumento da frequência de bactérias ligadas a SIgA no período de 8 semanas de vida, porém esse

dado não se repetiu uma semana depois e não houve diferença no período de 12 semanas de vida, momento em que a doença já estava estabelecida (Figura 12).

Nos animais de 12 semanas de vida, as frequências de bactérias ligadas à SIgA foram muito mais baixas que o esperado. Isso sugere que provavelmente a marcação com o anticorpo não aconteceu de forma adequada (Figura 12). Para confirmar este dado seria preciso realizar novamente o experimento.

Figura 12: Frequência de bactérias ligadas à SIgA em períodos de 8, 9 e 12 semanas.



Os camundongos WT e IL-10ko foram sacrificados na 12^a semana de vida, foram isolados as fezes e o conteúdo do sobrenadante de centrifugação destas foi marcado com anticorpo fluorescente para IgA e analisadas por citometria de fluxo para determinação das frequências de bactérias da microbiota ligadas à SIgA. As barras representam a média + SD dos valores de cada grupo. As diferenças entre os grupos foram calculadas utilizando ANOVA. * P<0.05.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho buscou inicialmente confirmar um dado experimental previamente descrito pelo nosso grupo. Gomes-Santos et al. (2012) realizaram estudos que detalharam as diversas alterações imunológicas que convergem no desenvolvimento da colite espontânea nos camundongos deficientes para IL-10. Interessantemente, foi observado que, além das diversas anomalias inflamatórias na mucosa intestinal dos camundongos IL-10ko, houve aumento na frequência de linfócitos CD19+CD5+ no peritônio e na lâmina própria intestinal dos animais com colite. Foi sugerido, baseado na marcação com anticorpos anti-CD5, que esses linfócitos eram linfócitos B1a. Porém, Wang et al. (2012) demonstraram que não é correto abordar os linfócitos B1a como sendo uma população de células única e homogênea, tendo em vista que é possível - e faz-se necessário - distinguir pelo menos duas populações diferentes de linfócitos B1a, com base na expressão de PC1. Ademais, Kaplan et al. (2001) argumentam que linfócitos B2 também pode expressar CD5 em níveis baixos. Além disso, Wang et al. (2012) demonstraram que essas subpopulações de linfócitos B1a possuem características únicas e distintas entre si e, portanto, cada uma possui um nicho celular específico e funções particulares, devendo ser analisadas separadamente.

Interessantemente, ao utilizar os marcadores celulares descrito por Wang et al. (2012) foi possível separar mais adequadamente as populações de linfócito B1. No entanto, ao analisarmos a frequência das subpopulações de linfócitos B no peritônio, não observamos aumento da frequência de linfócitos B1 nem de suas subpopulações (linfócito B1b, B1a PC1^{hi} e B1a PC1^{lo}). Porém observamos aumento de linfócitos B2 (CD19+ B220^{hi}) nesse compartimento. De fato, Tedder, (2015) demonstrou que, em condições normais, existe um pequeno número de linfócitos B2 no peritônio. Interessantemente, Vale et al. (2015) demonstraram que o repertório de linfócitos B2 presentes no peritônio se assemelha ao repertório de linfócitos B1 e Hasting et al. (2006) sugerem que os linfócitos B2 do peritônio representam uma população distinta de linfócitos B2 com características comuns aos linfócitos B1b. Além disso, Barberich et al. (2007) demonstraram que o microambiente peritoneal compromete a migração de linfócitos B para o intestino. Tendo isso em vista, o resultado apresentando neste trabalho parece mostrar coerência com os estudos citados, confirmando a existência

de linfócitos B2 na cavidade peritoneal e o aumento na frequência dessas células durante a colite.

Aos analisarmos as frequências das populações de linfócitos B no baço, observamos diminuição da frequência de linfócitos B2 e aumento da frequência de linfócitos B1 nos camundongos deficientes para IL-10. Curiosamente, nenhuma das subpopulações de linfócitos B1 apresentou divergência estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Em relação aos linfócitos B2, esse resultado mostra coerência com os resultados observados no peritônio e nas placas de Peyer, tendo em vista que, enquanto no baço observou-se diminuição das frequências dos linfócitos B1, no peritônio e nas placas de Peyer observou-se aumento dessas células, sugerindo que possa estar havendo de fato migração de linfócitos B2 para o peritônio, de forma que estes possam posteriormente alcançar a mucosa intestinal. Em relação aos linfócitos B1, também parece estar havendo migração para outros órgãos, tendo em vista o resultado das frequências dessas células na lâmina própria do cólon. Porém, parece que a população identificada no baço talvez não seja de fato nenhuma das subpopulações pesquisadas de linfócitos B1. Interessantemente, McHeyzer-Williams et al. (2000) e Driver et al. (2001) descrevem populações de linfócitos B de memória representados entre linfócitos B220^{lo}, justamente a população com frequência aumentada no baço. Por fim, um estudo interessante em humanos mostrou que um linfócito B de memória expressando IgM e funcionalmente equivalentes aos linfócitos B1a murinos apresentou drástica redução na circulação sanguínea após esplenectomia. A cirurgia também resultou na diminuição de células positivas para IgA na mucosa intestinal. Esses estudos sugerem que pode haver um eixo baço-mucosa intestinal ainda não completamente elucidado, tanto em camundongos como em humanos (CARSETTI et al., 2020).

A análise da lâmina própria do cólon mostrou uma diminuição da frequência de linfócitos B2 e aumento de linfócitos B1a PC1^{lo} no grupo de camundongos deficiente para IL-10. A diminuição de linfócitos B2 na lâmina própria sugere, novamente, migração dessas células para outros órgãos. O aumento de linfócitos B2 (mas não de B1) nas placas de Peyer mostra-se coerente, tendo em vista ser este um microambiente rico em centros germinativos, sendo importante para o desenvolvimento destes linfócitos B2 (REBOLDI; CYSTER, 2016). Os linfócitos B1, por outro lado, não são encontrados normalmente em centros germinativos, devido às peculiaridades da sua ativação que não requer o auxílio de linfócitos T (HAYAKAWA

et al., 1986) (FISCHER et al., 1997). Ademais, o aumento da frequência de linfócitos B1a PC1^{lo} na lâmina própria do cólon dos camundongos IL-10ko mostra-se coerente, tendo em vista os dados do estudo de Rosado et al. (2009). Neste estudo, os autores demonstraram que, em camundongos que não foram imunizados intencionalmente, a maior parte da SIgA no epitélio intestinal é produzida por linfócitos B1a. O estudo partiu da análise de camundongos Hox11^{-/-}. Nesses camundongos, a asplenia congênita causa o esgotamento do *pool* de linfócitos B1a, deixando intactos os linfócitos B1b e B2. Assim, demonstraram que, no intestino de camundongos Hox11^{-/-}, o número de plasmócitos secretores de IgA é reduzido em 70%. Mais importante ainda, nenhum transporte de IgA pôde ser detectado através das células epiteliais, e o filme de SIgA no lado luminal estava ausente. Como a estrutura de linfonodos e as reações T dependentes são normais em camundongos Hox11^{-/-}, os autores levantaram a hipótese de que a falta de linfócitos B1a poderia ser responsável pelo defeito na produção de SIgA. De fato, o transplante de linfócitos B1a restaurou o filme de SIgA em camundongos deficientes. Além disso, o relato de casos de Sandy et al. (2021), no qual pacientes que desenvolveram colite por deficiência da resposta de IL-10 apresentaram aumento dos níveis circulantes de IgA converge com estes estudos.

Outra questão relevante é o aumento da frequência de linfócitos B2 nas placas de Peyer tendo em vista um estudo recente demonstrando a existência de um mecanismo natural e independente de antígenos exógenos que possibilita a diferenciação de plasmablastos secretores de IgA reativos à microbiota e polirreativos a outros antígenos. Esse mecanismo ocorre nas placas de Peyer e depois esses plasmablastos migram para lâmina própria intestinal, ou outros tecidos, como o baço (BUNKER et al. 2017). No contexto das DII, esse mecanismo é importante pois pacientes com DII geralmente possuem defeitos na barreira epitelial intestinal apresentando maior translocação bacteriana para tecidos extra intestinais (LINARES et al., 2021).

Por fim, Gomes-Santos et al. (2012) relataram aumento dos níveis de SIgA nas fezes de camundongos deficientes para a IL-10 de 10 semanas idade, momento em que a inflamação intestinal já está estabelecida. Porém, antes do desenvolvimento da doença, com 4 e 6 semanas de vida, e com 16 semanas de vida, quando a colite é mais intensa, não há diferença entre os grupos. No presente estudo, não avaliamos os níveis de SIgA nas fezes dos camundongos, mas observamos o aumento da frequência de bactérias ligadas à SIgA em camundongos IL-10ko com 8 semanas de

vida, mas não com 9, nem com 12 semanas de vida. Examinando os dois resultados em conjunto, podemos propor duas hipóteses. A primeira seria que o aumento da frequência de bactérias ligadas à SIgA na oitava semana de vida pode ser paralelo a um aumento dos níveis dessa imunoglobulina no muco intestinal (e nas fezes), e isto indicaria uma mudança na dinâmica temporal do desenvolvimento da doença, sugerindo um início mais precoce, tendo em vista que o desenvolvimento da colite neste modelo animal depende fortemente das condições ambientais nas quais o animal está inserido. A outra hipótese é que o aumento da frequência dessas bactérias ligadas à SIgA pode estar relacionado a mudanças na composição da microbiota nesse período (disbiose) que precedem o surgimento da colite (10 semanas), e representar um mecanismo imunorregulador importante que, embora não consiga interromper o curso da doença, contribui em algum grau para controlar sua intensidade. Nesse caso, o aumento dos níveis totais de SIgA que se segue, como descrito no estudo de Gomes-Santos e colaboradores, representaria um mecanismo adicional de imunorregulação em um momento em que ocorre um aumento na produção de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-17A) e anti-inflamatórias (TGF- β) na mucosa intestinal dos camundongos IL-10ko. Em humanos com a doença ativa, observa-se o aumento da frequência de bactérias ligadas à SIgA, assim como de bactérias ligadas à SIgG em períodos muito posteriores ao desenvolvimento da doença. Ao contrário da SIgA, as bactérias ligadas à SIgG não são encontradas em indivíduos saudáveis. O aumento da porcentagem de bactérias conjugadas à SIgG está correlacionado com o aumento de SIgG fecal livre no lúmen intestinal, sugerindo que a quebra da barreira epitelial da mucosa seja um fator importante que leva a esse resultado (RENGARAJAN et al., 2019). Além disso, outros estudos sugerem que, no contexto de infecções e de doenças inflamatórias crônicas do intestino, a SIgG possui uma função crucial na contenção e eliminação de patógenos, que sobrepõe e substitui o envolvimento de SIgA e SIgM (revisado por CASTRO-DOPICO; CLATWORTHY, 2019).

Assim, nossos resultados sugerem que o microambiente intestinal na colite gera sinais intensos e contínuos que culminam no aumento da frequência de linfócitos B2 nas placas de Peyer e de linfócitos B1a PC1lo na lâmina própria do cólon. Como não houve aumento na frequência da população de linfócitos B1a PC1^{hi}, que seria a população capaz de secretar IL-10 em condições normais, o envolvimento das outras duas populações de linfócitos B parecem contribuir para a exacerbação do processo

inflamatório intestinal, ainda que sejam também mecanismos compensatórios pela ausência de outros mecanismos reguladores.

6. CONCLUSÃO

Este estudo contribuiu para desvendar alguns detalhes dos resultados do nosso grupo que demonstra a implicação de linfócitos CD19+ CD5+ na colite (Gomes-Santos et al. 2012). Com a utilização de outros marcadores de superfície de linfócitos B2 e B1 foi possível determinar que as duas populações de linfócitos parecem ser relevantes no desenvolvimento da colite neste modelo animal. Outros experimentos seriam necessários para determinar a função que estes linfócitos estão realizando de fato no presente contexto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHABBAB, R. et al. Diversity of gut microflora is required for the generation of B cell with regulatory properties in a skin graft model. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2015.

ALUGUPALLI, Kishore R. et al. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. **Immunity**, v. 21, n. 3, p. 379-390, 2004.

BAIN, Calum C.; SCHRIDDE, Anika. Origin, differentiation, and function of intestinal macrophages. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2733, 2018.

BAUMGARTH, Nicole. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 1, p. 34-46, 2011.

BEGUE, Bernadette et al. Defective IL10 signaling defining a subgroup of patients with inflammatory bowel disease. **Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG**, v. 106, n. 8, p. 1544-1555, 2011.

BERBERICH, Simon; FÖRSTER, Reinhold; PABST, Oliver. The peritoneal micromilieu commits B cells to home to body cavities and the small intestine. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 109, n. 11, p. 4627-4634, 2007.

CEBRA, John J. Influences of microbiota on intestinal immune system development. **The American journal of clinical nutrition**, v. 69, n. 5, p. 1046s-1051s, 1999.

CHASSAING, Benoit et al. Crohn disease-associated adherent-invasive E. coli bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 3, p. 966-975, 2011.

CLEMENTE, Jose C. et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1258-1270, 2012.

DAÏEN, Claire I. et al. Gut-derived acetate promotes B10 cells with antiinflammatory effects. **JCI insight**, v. 6, n. 7, 2021.

DE LA FUENTE, Marjorie; MACDONALD, Thomas Thornton; HERMOSO, Marcela A. Intestinal homeostasis and disease: a complex partnership between immune cells, non-immune cells, and the microbiome. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2775, 2019.

FORCHIELLI, Maria Luisa; WALKER, W. Allan. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. **British Journal of Nutrition**, v. 93, n. S1, p. S41-S48, 2005.

FU, Ying et al. Intestinal CD11b+ B Cells Ameliorate Colitis by Secreting Immunoglobulin A. **Frontiers in immunology**, v. 12, 2021.

GARRETT, Wendy S.; GORDON, Jeffrey I.; GLIMCHER, Laurie H. Homeostasis and inflammation in the intestine. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 859-870, 2010.

GOMES-SANTOS, Ana Cristina et al. New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

GOYAL, Nidhi et al. Animal models of inflammatory bowel disease: a review. **Inflammopharmacology**, v. 22, n. 4, p. 219-233, 2014.

GUNASEKERA, Dilini C. et al. The development of colitis in Il10^{-/-} mice is dependent on IL-22. **Mucosal immunology**, v. 13, n. 3, p. 493-506, 2020.

HOLODICK, Nichol E.; RODRÍGUEZ-ZHURBENKO, Nely; HERNÁNDEZ, Ana María. Defining natural antibodies. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 872, 2017.

INCZEFI, Orsolya et al. The Influence of Nutrition on Intestinal Permeability and the Microbiome in Health and Disease. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 2022.

IP, WK Eddie et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Science**, v. 356, n. 6337, p. 513-519, 2017.

JIAO, Yuhao et al. Crosstalk between gut microbiota and innate immunity and its implication in autoimmune diseases. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 282, 2020.

KASER, Arthur; ZEISSIG, Sebastian; BLUMBERG, Richard S. Genes and environment: how will our concepts on the pathophysiology of IBD develop in the future. **Digestive diseases**, v. 28, n. 3, p. 395-405, 2010.

KAWAMOTO, Shimpei et al. Foxp3⁺ T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 152-165, 2014.

KEUBLER, Lydia M. et al. A multihit model: colitis lessons from the interleukin-10⁻ deficient mouse. **Inflammatory bowel diseases**, v. 21, n. 8, p. 1967-1975, 2015.

KIM, Myunghoo et al. Critical role for the microbiota in CX3CR1+ intestinal mononuclear phagocyte regulation of intestinal T cell responses. **Immunity**, v. 49, n. 1, p. 151-163. e5, 2018.

KIM, Seung Young et al. Interleukin-10 knockout mice do not reliably exhibit macroscopic inflammation: a natural history endoscopic surveillance study. **bioRxiv**, 2021.

KOMBAN, Rathan Joy et al. Activated Peyer' s patch B cells sample antigen directly from M cells in the subepithelial dome. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2019.

KRANICH, Jan; MASLOWSKI, Kendle M.; MACKAY, Charles R. Commensal flora and the regulation of inflammatory and autoimmune responses. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2011. p. 139-145.

KÜHN, Ralf et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 263-274, 1993.

LUO, Yao et al. Single-cell genomics identifies distinct B1 cell developmental pathways and reveals aging-related changes in the B-cell receptor repertoire. **Cell & bioscience**, v. 12, n. 1, p. 1-17, 2022.

MALOY, Kevin J.; POWRIE, Fiona. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 298-306, 2011.

MARKANDEY, Manasvini et al. Gut microbiota: sculptors of the intestinal stem cell niche in health and inflammatory bowel disease. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, p. 1990827, 2021.

MARTIN, Flavius; KEARNEY, John F. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. **Current opinion in immunology**, v. 13, n. 2, p. 195-201, 2001.

MASEDA, Damian et al. Peritoneal cavity regulatory B cells (B10 cells) modulate IFN- γ + CD4+ T cell numbers during colitis development in mice. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 5, p. 2780-2795, 2013.

MISHIMA, Yoshiyuki; SARTOR, Ryan Balfour. Manipulating resident microbiota to enhance regulatory immune function to treat inflammatory bowel diseases. **Journal of gastroenterology**, v. 55, n. 1, p. 4-14, 2020.

MITTAL, Sharad K.; ROCHE, Paul A. Suppression of antigen presentation by IL-10. **Current opinion in immunology**, v. 34, p. 22-27, 2015.

NAGAISHI, Takashi et al. Immunoglobulin A-specific deficiency induces spontaneous inflammation specifically in the ileum. **Gut**, v. 71, n. 3, p. 487-496, 2022.

NEISH, Andrew S. Microbes in gastrointestinal health and disease. **Gastroenterology**, v. 136, n. 1, p. 65-80, 2009.

NEVEN, Bénédicte et al. A Mendelian predisposition to B-cell lymphoma caused by IL-10R deficiency. *Blood*, **The Journal of the American Society of Hematology**, v. 122, n. 23, p. 3713-3722, 2013.

OMENETTI, Sara; PIZARRO, Theresa T. The Treg/Th17 axis: a dynamic balance regulated by the gut microbiome. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 639, 2015.

PACAUD, Margaux; COLAS, Luc; BROUARD, Sophie. Microbiota and immunoregulation: A focus on regulatory B lymphocytes and transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 21, n. 7, p. 2341-2347, 2021.

PAIK, Jisun et al. Validation studies for germ-free Smad3^{-/-} mice as a bio-assay to test the causative role of fecal microbiomes in IBD. **Gut microbes**, v. 11, n. 1, p. 21-31, 2020.

PALM, Noah W. et al. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. **Cell**, v. 158, n. 5, p. 1000-1010, 2014.

PELASEYED, Thaher et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. **Immunological reviews**, v. 260, n. 1, p. 8-20, 2014.

PIETRZAK, Bernadeta et al. Secretory IgA in intestinal mucosal secretions as an adaptive barrier against microbial cells. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 23, p. 9254, 2020.

PRATTIS, Susan; JURJUS, Abdo. Spontaneous and transgenic rodent models of inflammatory bowel disease. **Laboratory animal research**, v. 31, n. 2, p. 47-68, 2015.

QUARESMA, Abel B.; KAPLAN, Gilaad G.; KOTZE, Paulo G. The globalization of inflammatory bowel disease: the incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Brazil. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 35, n. 4, p. 259-264, 2019.

ROLHION, Nathalie; CHASSAING, Benoit. When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1707, p. 20150504, 2016.

ROSADO, M. M. et al. From the fetal liver to spleen and gut: the highway to natural antibody. **Mucosal immunology**, v. 2, n. 4, p. 351-361, 2009.

SANDY, Natascha Silva et al. Elevated IgA and IL-10 levels in very-early-onset inflammatory bowel disease secondary to IL-10 receptor deficiency. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 40, 2021.

SENDER, Ron; FUCHS, Shai; MILO, Ron. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. **PLoS biology**, v. 14, n. 8, p. e1002533, 2016.

SHAPIRO, Jason M. et al. Immunoglobulin A targets a unique subset of the microbiota in inflammatory bowel disease. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 1, p. 83-93. e3, 2021.

SHOUVAL, Dror S. et al. Large B-cell lymphoma in an adolescent patient with IL-10 receptor deficiency and history of infantile inflammatory bowel disease. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 63, n. 1, p. e15, 2016.

TEDDER, Thomas F. B10 cells: a functionally defined regulatory B cell subset. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 4, p. 1395-1401, 2015.

VAN DER HEE, Bart; WELLS, Jerry M. Microbial regulation of host physiology by short-chain fatty acids. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 700-712, 2021.

VILADOMIU, Monica et al. IgA-coated E. coli enriched in Crohn's disease spondyloarthritis promote TH17-dependent inflammation. **Science translational medicine**, v. 9, n. 376, p. eaaf9655, 2017.

WANG, Hongsheng et al. Expression of plasma cell alloantigen 1 defines layered development of B-1a B-cell subsets with distinct innate-like functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 49, p. 20077-20082, 2012.

WANG, Hongsheng et al. New insights into heterogeneity of peritoneal B-1a cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1362, n. 1, p. 68-76, 2015.

WARDEMANN, Hedda et al. B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. **The Journal of experimental medicine**, v. 195, n. 6, p. 771-780, 2002.

WU, Hsin-Jung; WU, Eric. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. **Gut microbes**, v. 3, n. 1, p. 4-14, 2012.

YAP, Yu Anne; MARIÑO, Eliana. An insight into the intestinal web of mucosal immunity, microbiota, and diet in inflammation. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2617, 2018.

ZHENG, Danping; LIWINSKI, Timur; ELINAV, Eran. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. **Cell research**, v. 30, n. 6, p. 492-506, 2020.

ZHU, Lei et al. IL-10 and IL-10 receptor mutations in very early onset inflammatory bowel disease. **Gastroenterology research**, v. 10, n. 2, p. 65, 2017.