



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

A família de fragmentos gênicos variáveis VH10 de camundongo apresenta características determinantes para a geração de anticorpos anti-DNA

RONNY PETTERSON DOS SANTOS ARAUJO

Orientador: Dr. MARCELO DE MACEDO BRIGIDO

BRASÍLIA/DF

2021



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

A família de fragmentos gênicos VH10 de camundongo apresenta características determinantes para a geração de anticorpos anti-DNA

RONNY PETTERSON DOS SANTOS ARAUJO

Orientador: Dr. MARCELO DE MACEDO BRIGIDO

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

BRASÍLIA/DF

2021

Agradecimentos

Aos meus pais Francisco das Chagas e Eliane Maria dos Santos pelo esforço e suporte durante toda a vida.

Aos professores Marcelo Brígido e Andrea Maranhão pela oportunidade de aprender e atuar no Laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Molecular (“Lab 1”) por compartilhar mais quatro anos dessa jornada tornando o dia a dia mais proveitoso e prazeroso.

Ao professor Napoleão Valadares pela contribuição no trabalho desenvolvido na criação dos modelos de ligação, enriquecendo a compreensão acerca do tema tratado neste trabalho.

Ao aluno de doutorado do Laboratório de Imunologia Molecular Renato Kaylan pela inclusão dos dados de produção e ligação da construção VH4-H210 necessárias para melhor compreensão dos resultados.

Aos servidores da UnB e do Instituto de Biologia (técnicos, pessoal da limpeza, segurança) por propiciarem um ambiente de trabalho adequado para o desenvolvimento das atividades.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela disponibilização da bolsa de estudos que me possibilitou cursar o Doutorado, bem como, o desenvolvimento da pesquisa.

SUMÁRIO

1	REFERENCIAL TEÓRICO	10
1.1	CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DO SISTEMA IMUNE	10
1.1.1	Imunidade Inata	11
1.1.2	Imunidade Adaptativa.....	11
1.2	IMUNOGLOBULINAS (ANTICORPOS).....	13
1.2.1	Variabilidade e estabelecimento do repertório primário.....	14
1.3	INTERAÇÃO ANTICORPO-ANTÍGENO	17
1.4	AUTOANTÍGENOS E AUTORREATIVIDADE.....	18
1.4.1	Mecanismos de tolerância nos linfócitos B	19
1.5	AUTOIMUNIDADE E DOENÇAS AUTOIMUNES	21
1.6	DNA COMO ANTÍGENO PRÓPRIO	22
1.7	ONTOGENIA DOS LINFÓCITOS B E AUTORREATIVIDADE	23
1.8	ASPECTOS ESTRUTURAIS DO PRÉ-BCR.....	25
1.9	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES	26
1.10	TRABALHOS ANTERIORES.....	28
1.11	HIPÓTESES.....	29
2	RELEVÂNCIA	31
3	OBJETIVOS.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	LINHAGENS BACTERIANAS.....	33
4.2	DESENHO DO GENE scpre-BCR	36
4.3	EXPRESSÃO DOS scFvs	37
4.4	PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	37
4.5	ENSAIO DE LIGAÇÃO AO DNA	38
4.6	AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DOS ANTICORPOS VH10.....	39
4.7	MODELAGEM DO scpre-BCR-VH10.....	39
5	RESULTADOS	40
5.1	COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS V _H	40
5.2	A EXPRESSÃO DOS scpre-BCRs SOLÚVEIS FOI IDENTIFICADA POR WB.....	40
5.3	A PURIFICAÇÃO DOS scpre-BCRs FOI ANALISADA POR SDS-PAGE.....	41

5.4	CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SEC) PARA ANÁLISE DE PERFIL CROMATOGRÁFICO.....	42
5.5	OS scpre-BCRs QUE CONTÊM VH10-CDR2 LIGAM-SE AO DNA.....	43
5.6	SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIAS COM OUTROS ANTICORPOS ANTI-DNA REPORTADOS.....	45
5.7	OS RESÍDUOS ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO COM DNA ESTÃO ENVOLVIDOS COM LIGAÇÃO AO ANTÍGENO NOS DIFERENTES MODELOS.....	47
5.8	O MODELO ESTRUTURAL DO scpre-BCR CORROBORA COM A IMPORTÂNCIA DO CDR2 PARA A LIGAÇÃO.....	48
6	DISCUSSÃO.....	51
7	CONCLUSÃO.....	55
8	PERSPECTIVAS.....	56
9	REFERÊNCIAS.....	57

Lista de Figuras

Figura 1. Receptor de células B (BCR). Formado moléculas imunoglobulina de membrana (2 x LC e 2 x μ HC) e duas subunidades de sinalização $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ (Adaptado de WAHEED, 2018).

Figura 2. Esquema estrutural de um anticorpo (IgG) (Adaptado de <https://bxcell.com/antibody-structure/>).

Figura 3. Esquema da organização gênica dos segmentos formadores de anticorpos (Ac) das cadeias leves κ e λ e da cadeia pesada (H). (Adaptada de BACKHAUS, 2018).

Figura 4. Esquema da recombinação V(D)J da cadeia pesada de imunoglobulina (IgH). A região variável é formada pela seleção e recombinação randômica de sequências germinais presentes no genoma. No final do processo as regiões variáveis ficam dispostas na extremidade do anticorpo (N-terminal) oposto a porção Fc (C-terminal) (Adaptada de BACKHAUS, 2018).

Figura 5. Representação das CDRs na região variável que se organizam estruturalmente em forma de *loops* e que se projetam para o exterior da molécula expondo os resíduos que se ligaram ao antígeno (Adaptado de WONG; LEAM; DEANE, 2019).

Figura 6. Esquema do desenvolvimento dos linfócitos B que ocorre na MO e apresenta checkpoints de seleção importantes para a definição de repertórios que serão expressos pelas células B imaturas ao deixarem a MO (Adaptado de ALMQVIST & MARTENSSON, 2012).

Figura 7. Estrutura esquemática do pré-BCR formado pelas proteínas transdutores de sinal $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, cadeias pesadas pareadas com duas SLC (Adaptado de Mårtensson *et al.*, 2010).

Figura 8. Anticorpo inteiro e fragmento no formato scFv. Os scFvs são formados por um domínio das regiões variáveis leve (VL) e pesada (VH) do anticorpo convencional unidos por um *linker* peptídico (Adaptado de RODRIGO; GRUVEGÅRD; VAN ALSTINE, 2015).

Figura 9. Após levantamento em banco de dados calculou-se as frequências das famílias de genes VH depositados que tinham sido reportados como ligantes a ácidos nucleicos. A família VH10 apresentou maior representação (59,5%) para essa característica apesar de um número relativo reduzido de sequências de depositadas (Adaptado de MARANHÃO, 2013).

Figura 10. Foram desenhados quatro segmentos gênicos que codificam para quatro scFvs que utilizam a cadeia variável pesada (VH) das famílias VH10 ou VH4, sendo duas VH germinais e 2 VH mutantes com a região do *loop* da HCDR2 trocada entre estas famílias. A HCDR3 é comum aos quatro genes. A cadeia leve (VL) é uma recombinante similar a SLC que contextualiza o reconhecimento antigênico durante as fases preliminar do desenvolvimento dos linfócitos B e formação do repertório primário.

Figura 11. Sequência da construção scpre-BCR (VH-linker-VpreBJ). (H) Segmento gênico V + CDR3. (D) Segmento D sintético. (4) Segmento gênico J_H4. (L) *Linker*. (B) VpreB. (J) λ5 J-like FW4.

Figura 12. Alinhamento dos segmentos gênicos V dos germinais VH10 e VH4 e das variantes VH10-H24 e VH4-H210. A CDR2 foi definida seguindo-se a numeração de Kabat. A definição da CDR2, a região trocada entre os germinais e a região do *loop* da CDR2 é indicada pelas setas.

Figura 13. *Western blot* confirmando a expressão dos scpre-BCRs de interesse sondados com IgG de coelho tendo como alvo *tag* de proteína A.

Figura 14. SDS-PAGE das frações purificadas dos scpre-BCRs recombinantes com tamanhos de ~37kDa.

Figura 15. Cromatografia de exclusão por tamanho do scpre-BCR VH10 após purificação por afinidade. (M) Marcador. (A) Amostra resultante da cromatografia de afinidade. (f1/f2 /f3) Frações obtidas na cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).

Figura 16. Perfil cromatográfico após SEC das proteínas recombinantes purificadas. As setas indicam a posição do pico dos 3 padrões utilizados (da esquerda para a direita, conalbumina 76 kDa, anidrase carbônica 29 kDa e ribonuclease A 13,7 kDa).

Figura 17. Ensaio de ligação dos scpre-BCRs a ss- e dsDNA por ELISA. Os scpre-BCR VH10 liga-se ao ss- e dsDNA (azul). A CDRH2 derivada do segmento VH10 é necessário para a alta capacidade de ligação aos tipos de DNA testados (laranja e marrom). As placas foram sensibilizadas com ss- e dsDNA (20 µg/mL). A ligação dos scpre-BCRs ao antígeno foi sondada com o anticorpo IgG de coelho conjugado a AP com afinidade para a tag de proteína A dos scpre-BCRs.

Figura 18. Ensaio de ligação (ELISA) dos scpre-BCRs VH10, VH4 e VH10-H24 tendo Oligo-dT com alvo. As placas foram sensibilizadas primeiramente com streptavidina (10 µg/mL) por 1 hora seguida da adição de oligo-dT biotina (5 µg/mL). A ligação dos scpre-BCRs ao antígeno foi sondada com o anticorpo IgG de coelho conjugado a AP com afinidade para a tag de proteína A dos scpre-BCRs.

Figura 19. Alinhamento das sequencias da cadeia pesada (VH) de anticorpos anti-DNA reportados BV04-01 (1CBV) e S1-S15 (4Z8F) e do scpre-BCR VH10 (BioEdit v7.2). Em destaque as CDRs 1, 2 e 3 definidas pela numeração de Kabat.

Figura 20. Superposição da estrutura tridimensional da cadeia pesada (VH) acessadas por cristalização de anticorpos formados por seguimentos VH10 (1CBV, 4Z8F, 2HKF, 3CXD, 4QWW, 3I2C, 3SGD e 4QNP). As CDRs estão indicadas e os resíduos conservados (R50, R52, S52c e N56) entre os segmentos na CDR2 estão em proeminência representados, bem como o resíduo H56 (3I2C).

Figura 21. Interação antigênica com a CDR2 de diferentes anticorpos formados pelo segmento VH10. A região dos anticorpos que compreendem os entre as posições 50 - 58 é mostrada. Os resíduos R50, R52, S52a (ou S52c para 4Z8F) e N53 estão identificados, assim como as possíveis interações estabelecidas com os seus antígenos. Para 4Z8F e 1CBV o antígeno é oligo-dT, os outros anticorpos têm peptídeos como antígeno.

Figura 22. Modelos de interações entre 4Z8F (A e C) e o scpre-BCR (B e D) e um dT₃(A e B) Interações envolvendo os resíduos da CDR2 e CDR3 com o oligonucleotídeo dT₃. É possível notar que o CDR3 no modelo 4Z8F aparece mais próximo do oligonucleotídeo com um número maior de interações. (C e D) Modelo de potencial eletrostático do anticorpo scpre-

BCR, onde é possível observar o arcabouço hidropático de carga predominante positiva (azul). As regiões de carga negativa são mostradas em vermelho.

Lista de Termos e Abreviações

APS	Persulfato de amônio
BCR	B cell receptor (receptor de células B)
BLAST	Ferramenta de busca de alinhamento local básico
Bregs	Células B regulatórias
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
CDR	Região determinante de complementariedade
cfDNA	DNA livre de células (cell free DNA)
CTH	Células-tronco hematopoiéticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fab	Fragmento ligante ao antígeno
Fc	Fragmento cristalizável
HC	Cadeia pesada (Heavy chain)
IL-10	Interleucina-10
IL-2	Interleucina-2
IL-7	Interleucina-7
IL-7R	Receptor de interleucina-7
IPTG	Isopropil-B-D-Tiogalactopiranosídeo
LB	Luria Bertani
LC	Cadeia leve (Light chain)
LES	Lupus eritematoso sistêmico
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MO	Medula óssea
NCBI	Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (<i>National Center Of Biotechnology Information</i>)
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NETs	Armadilhas extracelular dos neutrófilos (Neutrophil extracellular traps)
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RAG	Gene de ativação da recombinação

scFv	Fragmento variável de cadeia única
scpre-BCR	Fragmento recombinante de cadeia única no contexto de pre-BCR
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SEC	Cromatografia líquida por exclusão de tamanho
SLC	Cadeia leve substituta (surrogate light chain)
TCR	T cell receptor (receptor de células T)
TEMED	N, N, N', N' - Tetrametiletilenodiamina
TLR-4	Receptor Toll-like 4
Tregs	Célula T regulatórias
vdW	Interações de van der Waals
VH	Região variável da cadeia pesada
VH10	Família gênica de segmentos gênico V
V _H 10	Segmento gênico V da família VH10
VH4	Família gênica de segmentos gênico V
VL	Região variável da cadeia leve
WB	Western blot
μH	Segmento gênico codificante para a cadeia pesada

RESUMO

Anticorpos anti-DNA são um dos principais alvos para estudos de algumas doenças autoimunes uma vez que são encontradas no soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) e influenciam o aparecimento de sintomas e na progressão da doença. Apesar da importância acerca desses anticorpos sua origem e manutenção no organismo não são completamente compreendidas. A presença de linfócitos B com repertórios autorreativos no organismo pode favorecer o aparecimento de anticorpos patogênicos que interagem com estruturas próprias do organismo. Mostramos anteriormente que uma família específica de segmentos gênicos variáveis, VH10, tem a tendência a dar origem a anticorpos com capacidade de ligação ao DNA. Nesse estudo procuramos mostrar o papel dessa família VH na ligação específica ao DNA. No intuito de se investigar quais as regiões determinantes para a ligação de anticorpos formados por segmentos V provenientes da família VH10 ao DNA, foram produzidos quatro fragmentos de anticorpos no formato scFv (fragmento variável de cadeia única). As sequências germinais foram mantidas para duas construções: VH10 (descrito como ligante) e VH4 (não-ligante) foi utilizada como controle. Nas outras duas construções a região do *loop* da CDR2 foi trocada entre VH10 e VH4 formando as construções variantes VH10-H24 e VH4-H210. A parte remanescente da construção, CDR3 e cadeia leve, é compartilhada entre os scFvs. A cadeia leve utilizada é uma recombinante da cadeia leve substituta (SLC) característica de células B em desenvolvimento e expressa apenas temporariamente na medula óssea (MO). Como essas novas moléculas apresentam características únicas para estudos de ligação antigênica no contexto de desenvolvimento das células B, foram nomeadas de scpre-BCRs. A capacidade de ligação dos scpre-BCRs foi acessada por ELISA. O scpre-BCR VH10 apresentou capacidade de ligação a diferentes tipos de DNA, já o scpre-BCR VH4 não apresentou atividade de ligação. A variante VH10-H24 onde o *loop* da CDR2 foi trocado apresentou perda da atividade de ligação, enquanto a variante VH4-H210 apresentou ganho na capacidade de ligação contra os antígenos de ssDNA e dsDNA. A modelagem dos sítios de ligação do scpre-BCR VH10 sugere que um arcabouço positivamente carregado formado pelos resíduos da CDR2 é elemento estrutural responsável pela ligação. Neste trabalho nós mostramos que a reatividade contra o DNA pode estar codificada no genoma dos indivíduos haja vista o mapeamento do sítio fundamental para a ligação ao DNA localizada no *loop* estrutural da CDR2, parte integrante do gene V. Isso sugere um papel para essa reatividade germinal nas fases iniciais do desenvolvimento das células B. Dessa forma, enquanto que a autorreatividade ao DNA possa levar a autoimunidade, parece existir um *trade-off* onde a necessidade de sinalização celular nos estágios iniciais das células B age em conjunto à mecanismos autorreativos.

Palavras-chave: Anti-DNA, autorreativo, VH10, CDR2, scpre-BCR.

ABSTRACT

Anti-DNA antibodies are one of the main targets for autoimmune disease studies as they are found in the serum of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and directs the appearance of symptoms and disease progression. Despite its importance the origin and maintenance of these antibodies are not fully understood. The presence of B lymphocytes with autoreactive repertoires in the organism may favor the surge of pathogenic antibodies that interacts with organism's structures. Through a database survey, our group discovered a family of the V gene segment that is part of the antibody variable region, VH10, which is capable of giving rise to antibodies with the ability to bind to DNA. Further studies showed that antibodies formed by VH10 family V genes had some independence from CDR3 for establishing DNA affinity. In order to investigate which regions determine the binding of antibodies formed by V segments from the VH10 family to DNA, four antibody fragments in scFv format (single-chain variable fragment) were produced. germline sequences were maintained for two constructs: VH10 (described as binder) and VH4 (non-binder) was used as control. In the other two constructs the CDR2 loop region was swapped between VH10 and VH4 forming the variant constructs VH10-H24 and VH4-H210. The remaining part of the construct, CDR3 and light chain, is shared between scFvs. The light chain used is a recombinant surrogate light chain (SLC) characteristic of developing B cells and expressed only temporarily in bone marrow (MO). As these new molecules have unique characteristics for antigen binding studies in the context of B cell development, they were named scpre-BCRs. The binding capacity of scpre-BCRs was accessed by ELISA. The scpre-BCR VH10 showed binding capacity to different types of DNA, while the scpre-BCR VH4 did not show binding activity. The VH10-H24 variant where the CDR2 loop was exchanged showed loss of binding activity, while the VH4-H210 variant appears to recover its binding activity against ssDNA and dsDNA antigens. The modeling of scpre-BCR VH10 binding sites suggests that a positively charged scaffold formed by CDR2 residues is the structural element responsible for binding. In this work, we show that reactivity against DNA may be encoded in the genome of individuals in view of the mapping of the crucial site for DNA binding located in the structural loop of CDR2, an integral part of V gene. This suggests a role for this germinal reactivity in early stages of B cell development. Thus, while DNA autoreactivity can lead to autoimmunity, there appears to be a trade-off where the need for cell signaling in the early stages of B cells acts together with autoreactive mechanisms.

Keywords: Anti-DNA, autoreactive, VH10, CDR3, scpre-BCR.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DO SISTEMA IMUNE

Mecanismos de proteção contra invasores externos podem ser identificados nas formas mais simples de vida até as mais complexas. Por exemplo, as membranas celulares são barreiras naturais que separam e controlam seletivamente a entrada dos componentes do meio externo para o meio interno celular, protegendo-os. Porém, mecanismos mais específicos de defesa em organismos simples já foram descritos. Teóricos trabalham com a possibilidade de diferentes organismos compartilharem habilidades de defesa contra bacteriófagos pela transferência horizontal de informação genética entre bactérias (BERNHEIM e SOREK, 2020). O próprio sistema CRISP-Cas9 atualmente utilizado como ferramenta de edição gênica (JINEK *et al.*, 2012) é derivado de um mecanismo imunitário adaptativo primitivo capaz de gerar memória de infecções por bacteriófagos em bactérias (HORVATH e BARRANGOU, 2010).

Em organismos mais complexos como os eucariotos invertebrados pode-se observar o desenvolvimento de sistemas de reconhecimento de padrões específicos de amplo espectro (HACKETT, 2003) através de proteínas de reconhecimento expressas na membrana das células. A mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster* é um modelo extensamente estudado (HOFFMANN e REICHHART, 2002) e base para o estudo desses mecanismos conhecidos como imunidade inata que será tratada adiante. Nos eucariotos vertebrados observa-se o aparecimento da imunidade adaptativa e o estabelecimento de novos mecanismos de defesa de alta complexidade envolvendo reconhecimento específico (EISEN; CHAKRABORTY, 2010), comunicação celular (HERSHKO e RIVERA, 2010) e hipermutações gênicas (DIAZ; FLAJNIK; KLINMAN, 2001).

O sistema imune é representado por várias células e componentes celulares que atuam em coordenação com a finalidade de proteger o organismo contra compostos reconhecidos como não próprios (MARSHALL *et al.*, 2018). Para fins didáticos o estudo do sistema imunológico foi dividido em imunidade inata e adaptativa, o que se observa na prática é a interação de forma dinâmica dos componentes desses dois grupos propiciando ao organismo o desenvolvimento de respostas imunológicas complexas.

1.1.1 Imunidade Inata

A imunidade inata é caracterizada por constituir as primeiras barreiras de proteção contra substâncias estranhas ao organismo. Apresenta uma resposta de amplo espectro, porém com menos especificidade quando comparada aos mecanismos de defesa adaptativos. Além do mais, barreiras físicas que impedem ou retardam o acesso de moléculas externas para dentro do organismo como a pele, mucosas, fluidos corporais são considerados componentes do sistema imune inato (RIERA ROMO; PÉREZ-MARTÍNEZ; CASTILLO FERRER, 2016). Um dos principais mecanismos de reconhecimento de componentes estranhos (não próprios) ao organismo se dá pela identificação dos Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMPs, do inglês *Pathogen Associated Molecular Patterns*) que são reconhecidos pelos Receptores de Padrões Moleculares (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*) expressos nas células que compõem a imunidade inata. Um exemplo clássico é o reconhecimento do lipopolissacarídeo (LPS, PAMP) de bactérias gram-negativas pelo *Toll-Like Receptor 4* (TLR-4, PRR) expresso nas células da imunidade inata iniciando o desenvolvimento de uma resposta imunológica contra os organismos invasores (MOGENSEN, 2009). As células *natural killer* (NK) de origem linfoide, as células de origem não-linfoide, como, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, sistema complemento e as células dendríticas são os principais componentes da imunidade inata (GASTEIGER *et al.*, 2017).

1.1.2 Imunidade Adaptativa

A imunidade adaptativa plena é encontrada apenas nos vertebrados (HIRANO *et al.*, 2011). É caracterizada pela alta especificidade da resposta gerada contra substâncias reconhecidas como não próprias ao organismo. Além disso, é bem caracterizada a possibilidade de desenvolvimento de memória imunológica o que possibilita a proteção eficiente do indivíduo no longo prazo (NETEA *et al.*, 2019), característica essa que é explorada e é base para o sucesso das aplicações de vacinas. A imunidade adaptativa permite que a resposta imunológica contra determinado componente não-próprio evolua após reexposição e atinja maior especificidade e eficiência. Na imunidade adaptativa os componentes celulares são os linfócitos T e B, estes são de origem linfoide e se desenvolvem na medula óssea (MO), sendo parte da maturação dos linfócitos T (XING *et al.*, 2016).

Toda especificidade obtida na imunidade adaptativa requer tempo para se estabelecer após a exposição ao componente identificado como estranho podendo levar dias ou semanas. O que não ocorre na imunidade inata, onde a resposta imunológica efetora é praticamente

imediate e por isso de grande importância. Não sendo a imunidade inata suficiente para debelar a ameaça externa ao organismo, através de comunicação celular, os componentes da imunidade adaptativa são acionados. A resposta imune adaptativa mediada por células é desempenhada pelos linfócitos T, enquanto a resposta imune adaptativa humoral é realizada pelos linfócitos B ativados e os anticorpos por eles secretados (BONILLA e OETTGEN, 2010).

1.1.2.1 Linfócitos T

Após a saída dos linfócitos T da MO, estes se dirigem ao timo para completar a sua maturação independente de estímulos por substâncias não próprias tornando-se um linfócito T *naive* (KURD e ROBEY, 2016). Posteriormente, são utilizados na vigilância circulando por todo o corpo pelo sistema linfático e circulação sanguínea. Os linfócitos T se apresentam em diversos subtipos celulares com suas funções bem definidas, e são identificados pelo perfil de expressão dos *clusters* de diferenciação (CD) expressos na membrana destas células. Os linfócitos T atuam na identificação e destruição de compostos estranhos ao organismo, sendo exercido principalmente por duas populações de linfócitos T, as CD4⁺ e CD8⁺. Os linfócitos CD4⁺ ou linfócitos T auxiliares (Th, do inglês, *T helper*) podem interagir com as células apresentadoras de antígenos (APCs) da imunidade inata para o reconhecimento de substâncias não-próprias e também auxiliar na ativação dos linfócitos B e produção de citocinas como o interferon- γ . A função efetora dos linfócitos T CD4⁺ se dá pelo recrutamento de células fagocíticas. Já os linfócitos T CD8⁺ ou citotóxicos atuam diretamente na destruição de células tumorais, bactérias, vírus e outros componentes estranhos ao organismo. e produção de citocinas. Os linfócitos T CD8⁺ têm sua função efetora nos mecanismos citotóxicos que culminam na destruição da célula alvo (FLYNN *et al.*, 1998; SEDER e AHMED, 2003). Células T regulatórias (Tregs) atuam na regulação ou supressão da resposta imunológica contra antígenos externos ou próprios (autoantígenos), consequentemente tendo papel importante na prevenção do surgimento de doenças autoimunes (MUCIDA *et al.*, 2005).

1.1.2.2 Linfócitos B

Assim como os linfócitos T, os linfócitos B surgem após etapas de diferenciação de células tronco hematopoiéticas (CTH) na MO. Os linfócitos são maturados na própria medula óssea e expressam em sua superfície celular o receptor de células B (BCR, do inglês, *B cell receptor*) que é composto de moléculas de imunoglobulina de membrana (mIg), sendo duas cadeias leves (LC) e duas cadeias pesadas (μ HC) e duas subunidades responsáveis pela

transdução de sinalização $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ (Figura 1). O BCR apresenta a capacidade de ligação contra antígenos específicos e cada célula expressa apenas um único perfil de BCR (FRIESS; PLUHACKOVA; BÖCKMANN, 2018). Após saírem da MO para a circulação periférica estes linfócitos estão prontos para reconhecer antígenos. Caso o reconhecimento ocorra, estas células irão passar pelo processo proliferação gerando mais clones, seguido da diferenciação em plasmócitos que são células capazes de secretar os anticorpos. Dessa forma, os linfócitos B são responsáveis pela resposta humoral que culmina na produção de anticorpos específico contra determinado antígeno. Os anticorpos secretados na circulação ligam-se aos antígenos causando a neutralização e/ou marcando-os para destruição por outros componentes do sistema imune (TSAI *et al.*, 2019).

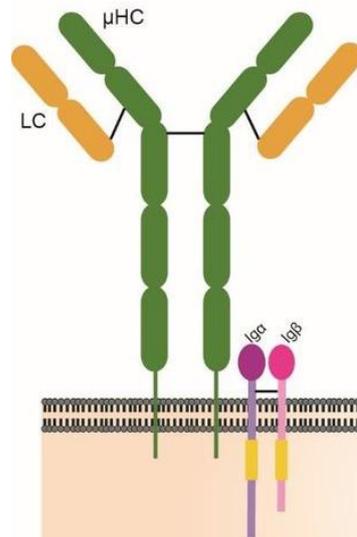


Figura 1. Receptor de células B (BCR). Formado por moléculas imunoglobulina de membrana (2 x LC e 2 x μ HC) e duas subunidades de sinalização $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ (Adaptado de WAHEED, 2018).

1.2 IMUNOGLOBULINAS (ANTICORPOS)

As imunoglobulinas são glicoproteínas heterodiméricas sendo duas cadeias pesadas (HC, do inglês, *Heavy Chain*) e duas cadeias leves (LC, do inglês, *Light Chain*). Estas cadeias estão pareadas e unidas por ligações covalentes caracterizadas pela formação de pontes dissulfeto a partir de resíduos de cisteína (S) conservados nestas proteínas. O pareamento entre a HC e LC formam em sua extremidade amino (N) terminal a porção de ligação ao antígeno, o paratopo. Funcionalmente, os anticorpos foram divididos em Fab (fragmento de ligação ao antígeno) e Fc (fragmento cristalizável). A região da dobradiça localizada na

cadeia pesada confere ao anticorpo flexibilidade nessa região, que é essencial para a dinâmica do reconhecimento antigênico e sua inativação de forma eficiente. As cadeias pesadas e leves são formadas de regiões constantes (C) e variáveis (V). As regiões constantes (C) são mais conservadas e compõem a maior parte da molécula estando relacionada a função efetora, como ligação ao sistema complemento, ligação aos receptores Fc (FcR) das células de defesa, meia-vida da molécula de anticorpo. Já a região variável é responsável pela ligação específica ao antígeno (Figura 2) (CHIU *et al.*, 2019).

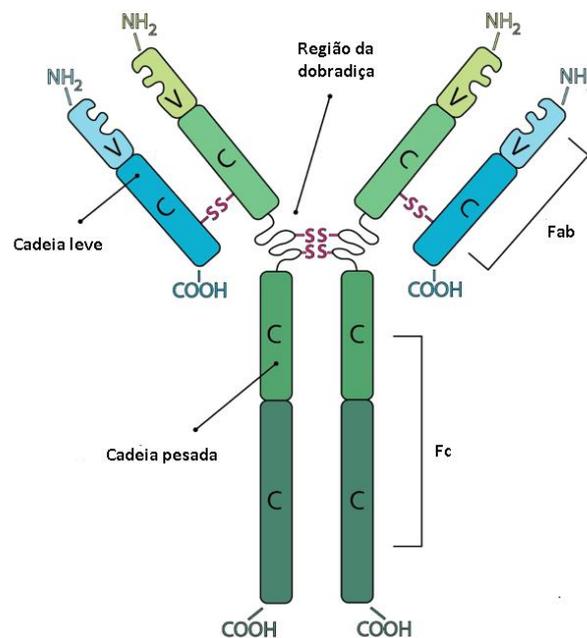


Figura 2. Esquema estrutural de um anticorpo IgG (Adaptado de www.bxcell.com/antibody-structure/).

Podem ser encontradas cinco diferentes classes (isotipos) de imunoglobulinas, identificadas por IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Cada isotipo apresenta peculiaridades no que tange ao local onde são expressos e para qual tipo de resposta imune será utilizado. A diferença estrutural entre os isotipos se dá pela utilização de cadeias pesadas estruturalmente distintas.

1.2.1 Variabilidade e estabelecimento do repertório primário

O genoma humano não tem a capacidade física para codificar a vasta possibilidade de anticorpos que os mamíferos produzem. Os genes humanos e murinos, responsáveis pela codificação e expressão dos anticorpos, apresentam um mecanismo único de recombinação somática que precede a tradução e permite a geração de um potencial de diversificação na

ordem de 10^{11} moléculas diferentes (GLANVILLE *et al.*, 2009). Os segmentos gênicos que codificam para a região variável das células B em desenvolvimento estão organizados da seguinte forma, V (variável), D (diversidade) e J (junção) para a cadeia pesada (HC) e V (variável) e J (junção) para a cadeia leve (LC), além dos segmentos para a região constante (C) encontrados tanto na HC como na LC (Figura 3) (EARLY *et al.*, 1980).

Em humanos, estas sequências gênicas encontram-se localizados em cromossomos diferentes, os segmentos da cadeia pesada no cromossomo 14 (14q32.33) e os segmentos da cadeia leve nos cromossomos 2 (*kappa*, 2p11.2) e 22 (*lambda*, 22q11.2) (WATSON e BREDEN, 2012). O *locus* gênico da cadeia pesada apresenta de 38 a 46 genes V, 23 genes D e 6 genes J, além de 9 genes para a região constante (C). O *locus* da cadeia leve *kappa* apresenta 34 a 38 genes V, 5 genes J e apenas um gene C. Já o *locus* da cadeia leve *lambda* contém de 29 a 33 genes V, 4 a 5 genes J e 4 a 5 genes C. Estes segmentos gênicos também são conhecidos como germinais já que são representados pelas sequências que ainda não sofreram mutações e são o molde para a criação de novas sequências (BACKHAUS, 2018).

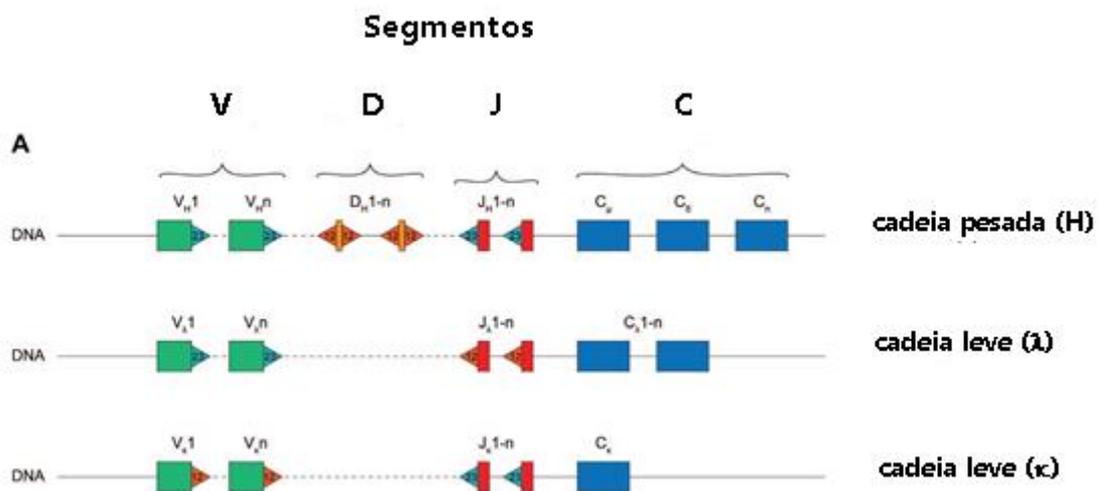


Figura 3. Esquema da organização gênica dos segmentos formadores de anticorpos (Ac) das cadeias leves κ e λ e da cadeia pesada (H). (Adaptada de BACKHAUS, 2018).

O rearranjo dos segmentos ocorre em etapas. Cada segmento é escolhido de forma randômica pelas recombinases RAG1/RAG2. Na cadeia pesada são rearranjados primeiramente os segmentos DJ, seguidos da junção com o segmento V. O domínio constante (C) é incorporado após o processamento (*splicing*) do RNA. Já na cadeia leve, inicialmente os

segmentos VJ são unidos e posteriormente o domínio C é adicionado após o processamento do RNA (Figura 4).

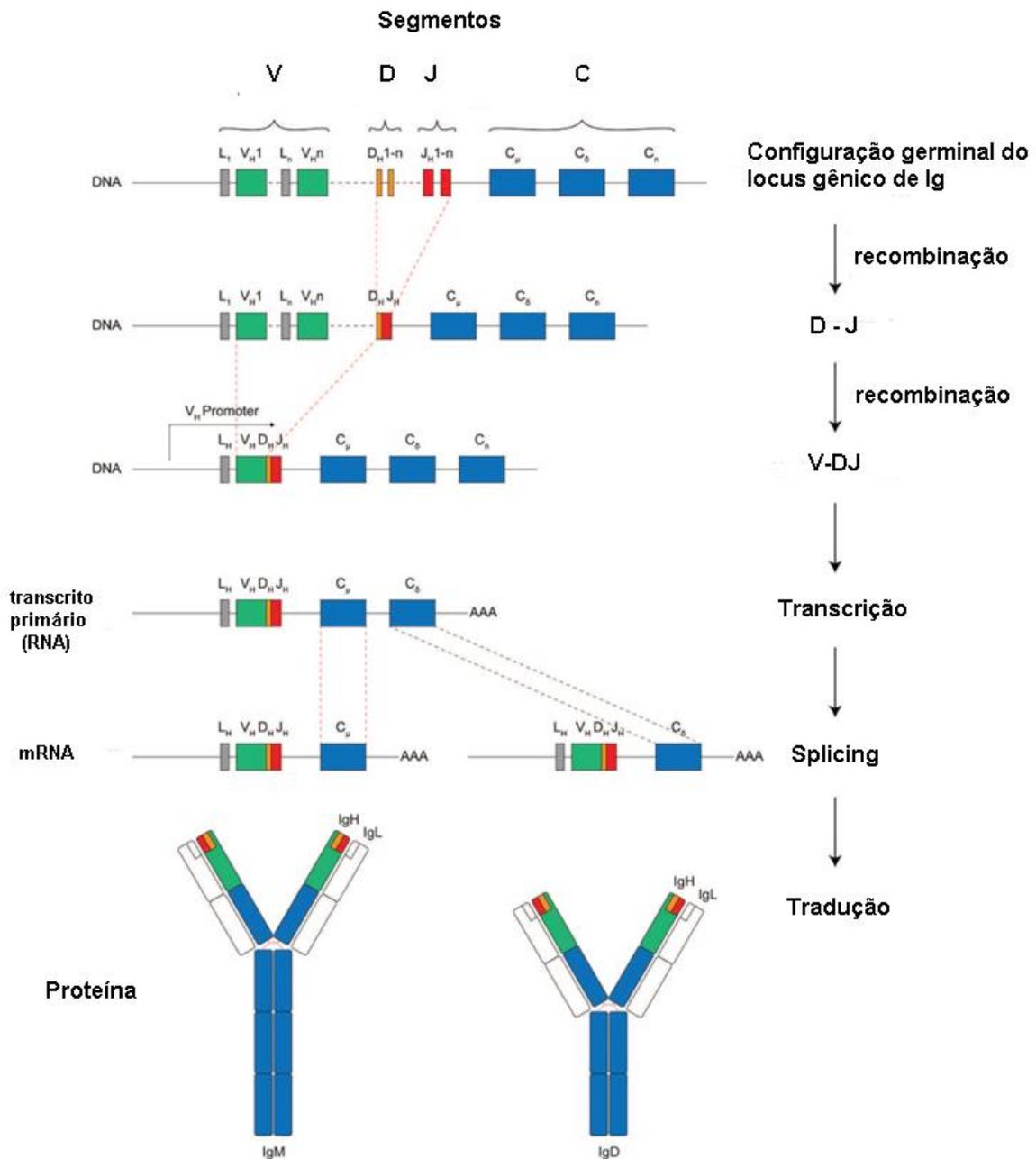


Figura 4. Esquema da recombinação V(D)J da cadeia pesada de imunoglobulina (IgH). A região variável é formada pela seleção e recombinação randômica de seqüências germinais presentes no genoma. No final do processo as regiões variáveis ficam dispostas na extremidade do anticorpo (N-terminal) oposto a porção Fc (C-terminal) (Adaptada de BACKHAUS, 2018).

A variabilidade é alcançada não apenas com a seleção e fusão aleatória dos segmentos gênicos, mas é também aumentada pela adição de nucleotídeos entre os segmentos durante a junção. No segmento V estão contidas as seqüências codificadoras para as CDRs 1 e 2,

enquanto a CDR3 é formada pela junção dos três segmentos (V, D e J) na cadeia pesada e de dois (V e J) na cadeia leve. Isso faz com que a CDRH3 seja a mais variável entre todas as CDRs, seguida da CDRL3 (TSUCHIYA e MIZUGUCHI, 2016).

A adição de nucleotídeos sem molde durante a junção dos segmentos se dá pela ação da quinase Artemis que auxilia na abertura de *hairpins* formados durante a aproximação dos segmentos gênicos e a adição de nucleotídeos, chamados P-nucleotídeos (MA *et al.*, 2002). A desoxinucleotidil-transferase terminal (TdT) age posteriormente a Artemis, adicionando ainda mais nucleotídeos na sequência de forma aleatória e sem nenhum molde, por isso denominados N-nucleotídeos (*Non-template*) (REPASKY *et al.*, 2004). Por fim, uma DNA polimerase preenche o *gap* finalizando o processo de recombinação. É observada uma maior presença de N-nucleotídeos na CDRH3 do que na CDRL3. Acredita-se que a expressão de TdT atinge o pico no momento do rearranjo da cadeia pesada, evento que antecede o rearranjo da cadeia leve (WASSERMAN; LI; HARDY, 1997). As descobertas desses mecanismos moleculares de geração de variabilidade dos anticorpos garantiram ao japonês Susumu Tonegawa em 1987 o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina (TONEGAWA, 1983).

1.3 INTERAÇÃO ANTICORPO-ANTÍGENO

A ligação Ac-Ag ocorre principalmente com o envolvimento das regiões hipervariáveis, também conhecidas com Regiões Determinantes de Complementariedade (CDRs, do inglês, *Complementarity Determing Regions*), que estão localizadas dentro da região variável dos anticorpos. As CDRs se apresentam estruturalmente em forma de *loops* que se projetam para a extremidade da molécula de Ig. Os *loops* das CDR3 (H e L) apresentam maior diversidade estrutural (WONG; LEEM; DEANE, 2019) consequência da maior variabilidade e do número de resíduos de aminoácidos nessa região (Figura 5). A CDR3 é a região mais variável e conseqüentemente tem papel crucial em grande parte das interações antigênicas (TSUCHIYA e MIZUGUCHI, 2016), apesar disso, trabalhos têm mostrado que as CDR1 e CDR2 podem desempenhar protagonismo no reconhecimento antigênico independente de CDR3 (MARANHÃO *et al.*, 2013; PERSSON *et al.*, 2013).

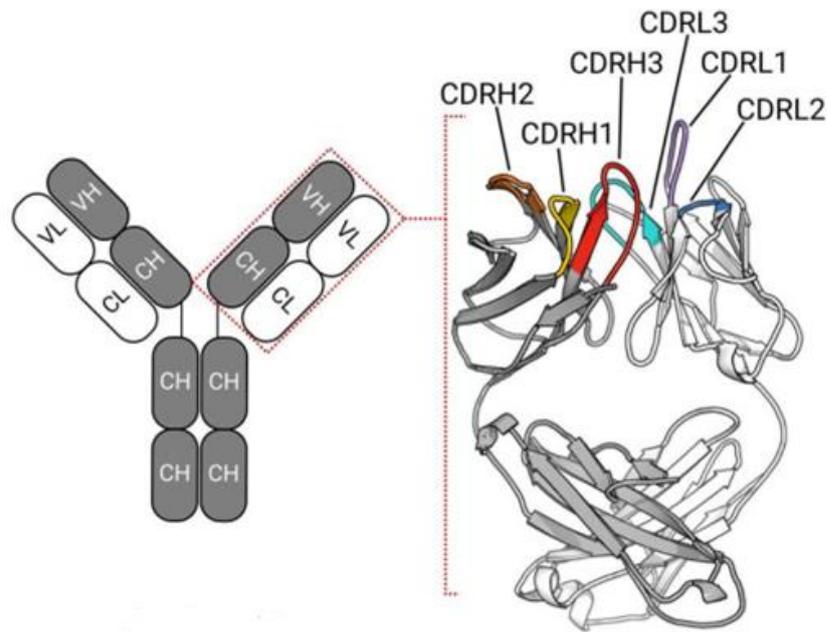


Figura 5. Representação das CDRs na região variável que se organizam estruturalmente em forma de *loops* e que se projetam para o exterior da molécula expondo os resíduos que se ligam ao antígeno (Adaptado de WONG; LEAM; DEANE, 2019).

As regiões dentro do domínio variável (V) que se encontram fora das CDRs (FR, *framework region*) além de contribuírem para formação do arcabouço da estrutura ligante também podem exercer papel direto para a ligação a determinado antígeno, sendo em alguns casos, imprescindível (MASUDA *et al.*, 2006). Constatou-se que até 20% dos resíduos que interagem com antígeno podem ser encontradas fora das CDRs (KUNIK; PETERS; OFRAN, 2012).

1.4 AUTOANTÍGENOS E AUTORREATIVIDADE

A presença de repertórios autorreativos nos estágios iniciais do desenvolvimento das células do sistema imune adaptativo parece ser um traço comum. Foi reportado que a maior parte do repertório primário de linfócitos B imaturos (55 - 75%) é composto de sequências com potencial de resposta contra antígenos próprios (WARDEMANN *et al.*, 2003). Característica essa, que também pode ser observada nos linfócitos T (STRITESKY; JAMESON; HOGQUIST, 2012). Esses achados levantam questionamentos sobre um possível papel funcional da autorreatividade nesse estágio resultando na seleção de um repertório inicialmente autorreativo.

Apesar de contraditório, a necessidade de sinalização celular (sinalização tônica) desde estágios iniciais de desenvolvimento pode em parte explicar a presença de repertórios autorreativos no repertório primário. A sinalização tônica consiste no envio de uma cascata de sinalização onde sinais de sobrevivência e multiplicação celular são gerados selecionando positivamente repertórios gênicos que atendem aos requisitos de sinalização. Os linfócitos B em desenvolvimento têm a capacidade de gerar esta sinalização a partir do receptor de células B característico deste estágio de desenvolvimento, o pré-BCR (KEREN *et al.*, 2004; MYERS; ZIKHERMAN; ROOSE, 2017)

No entanto, a seleção positiva desses repertórios pode colocar o organismo em risco já que como consequência aumenta-se a chance de aparecimento de patologias relacionadas a autoimunidade. Aparentemente, existe um *trade-off* evolutivo no qual os mecanismos de desenvolvimento requerem sinalização baseada em componentes próprios em fases iniciais de desenvolvimento resultando na seleção de repertórios com potencial autorreativo (KOHLENER *et al.*, 2008). Sendo assim, há a necessidade de mecanismos de controle que promovam a mitigação e/ou eliminação desses riscos, estes são chamados mecanismos de tolerância.

1.4.1 Mecanismos de tolerância nos linfócitos B

Os mecanismos de tolerância podem ser centrais (quando ocorrem na medula óssea) e são caracterizados pela deleção clonal e edição do receptor (NEMAZEE, 2017), ou periféricos (quando ocorrem nos órgãos linfoides secundários) e envolvem a indução de anergia e a utilização de células T regulatórias (Tregs) (WANG e ZHENG, 2013) que atuam para mitigar a possibilidade de desenvolvimento de disfunções autoimunes que ocasionem no aparecimento de doenças.

Deleção clonal (central)

A deleção clonal consiste na eliminação de linfócitos B que expressam receptores capazes de reconhecer estruturas próprias. Tal mecanismo funciona por eventos apoptóticos que atuam eliminando linfócitos B que expressam receptores autorreativos impedindo-os de compor parte das populações de linfócitos B periféricos (NEMAZEE e BUERKI, 1989). Ainda assim, alguns linfócitos B podem escapar desse mecanismo (KENNY *et al.*, 2000).

Edição de receptor (central)

Este é outro *checkpoint* importante para a eliminação de repertórios autorreativos. Os rearranjos gênicos secundários ocorrem no intuito de recuperar linfócitos B com BCR não produtivo, ou seja, não foram capazes de gerar a sinalização necessária para serem selecionados ou apresentam BCRs que reconheçam estruturas próprias e precisam ter sua especificidade modificada pela edição do receptor, edição que ocorre apenas na cadeia leve (VL). Observou-se em camundongos transgênicos que expressavam o inibidor de apoptose bcl-2, e como consequência, permitindo que estes linfócitos B com receptores autorreativos escapassem da deleção clonal, um aumento da atividade de edição dos receptores, indicado pela diminuição da expressão do BCR e aumento da expressão dos genes recombinatórios RAG1/2 (LANG *et al.*, 1997). Apesar de eficiente, a edição de receptor nem sempre promove geração de um BCR funcional ou inócuo, podendo ocorrer a manutenção da autorreatividade ou seu agravamento.

O mecanismo de edição de receptor foi melhor compreendido utilizando-se modelos de camundongos transgênicos que possuíam genes para a formação de anticorpos autorreativos contra as proteínas do MHC (anti-H-2K^k or ^b), ou mesmo anti-DNA, e não apresentavam células B na periferia específicos para estes autoantígenos. No entanto, na MO, estes linfócitos B estavam presentes e apresentavam níveis altos de expressão de genes envolvidos na recombinação gênica. A presença de linfócitos $\lambda+$ se encontrava aumentada diferentemente dos camundongos transgênicos que não produziam estes anticorpos autorreativos, o que os levou a concluir que linfócitos autorreativos quando encontravam o antígeno-próprio iniciavam um segundo rearranjo onde as cadeias κ são trocadas por cadeias λ e desta forma, mudando a especificidade do BCR destas células (CHEN *et al.*, 1994; GAY *et al.*, 1993).

Anergia (periférico)

A indução do estado de anergia de linfócitos B potencialmente autorreativos evita a geração da resposta imunológica contra antígenos próprios. A inativação funcional dos linfócitos B (anergia) torna estas células não responsivas à estimulação antigênica, ainda que continuem presentes nos órgãos linfoides periféricos (YARKONI; GETAHUN; CAMBIER, 2010). A ativação dos linfócitos B é iniciada principalmente a partir da geração de uma dupla sinalização. A primeira, gerada pelo reconhecimento antigênico a partir BCR onde é iniciada uma cascata de sinalização e a segunda pode ter origem por outros estímulos gerados por

ligantes como TLRs ou o CD40L que é expresso principalmente pelos linfócitos CD4⁺. A ausência desse segundo sinal causa uma sinalização atenuada que impacta diretamente na ativação do linfócito B e na sua sobrevivência. Porém, o estado de anergia não é irreversível, podendo ser desfeito pela dissociação ao antígeno. O destino celular dos linfócitos B inócuos ou autorreativos parece estar atrelado qualitativamente ao estabelecimento da ligação. Uma maior avidéz na ligação ao antígeno favorece a edição de receptor e deleção clonal, enquanto uma menor avidéz ativa mecanismos de indução de anergia (GAULD; MERRELL; CAMBIER, 2006).

Utilização de linfócitos regulatórios (periférico)

Os linfócitos T regulatórios (Tregs) são células CD25⁺ CD3⁺ que expressam o fator de transcrição FoxP3 que pode agir inibindo as funções de NF-kB e suprimindo vários genes importantes para desenvolvimento da resposta imune como a expressão de IL-2 (interleucina 2) e outras citocinas (SAKAGUCHI; WING; YAMAGUCHI, 2009). A IL-2 tem papel crucial na proliferação de linfócitos B ativados. Do mesmo modo, parecem haver populações de células B comprometidas com mecanismos de regulação (Bregs) da resposta imune, expressando altos níveis de IL-10 (citocina anti-inflamatória) que atua inibindo citocinas pro-inflamatórias e auxilia na diferenciação das Tregs (CHIEN e CHIANG, 2017; MIZOGUCHI *et al.*, 2002)

1.5 AUTOIMUNIDADE E DOENÇAS AUTOIMUNES

Atualmente, acredita-se que a falha em alguns dos mecanismos de tolerância é a principal causa para o surgimento da autoimunidade e o desenvolvimento de doenças autoimunes. Outros fatores como a exposição a novos antígenos podem contribuir também para a geração de anticorpos com reatividade cruzada, onde a semelhança entre epitopos próprios e não próprios resultam em montagem de resposta imunológica com mais de uma especificidade (DU PRÉ *et al.*, 2020; IVERSEN e SOLLID, 2020). Pela característica dos mecanismos de reconhecimento de antígenos próprios mais estudados das doenças autoimunes, que atuam com base na alta especificidade, os linfócitos T e B (imunidade adaptativa) são mais enfatizados na pesquisa, porém a imunidade inata também pode exercer papel para o surgimento e progressão de doenças autoimunes (SAFERDING e BLÜML, 2020; ZOUALI e LA CAVA, 2019)

A resposta imune contra antígenos próprios pode limitar-se a órgãos específicos como na esclerose múltipla (cérebro) (GHASEMI; RAZAVI; NIKZAD, 2017) ou causar inflamação generalizada como no lúpus eritematoso sistêmico (LES) (COJOCARU *et al.*, 2011). A detecção dos autoanticorpos é peça fundamental para o diagnóstico, já que mesmo o reconhecimento de estruturas próprias por determinados autoanticorpos não seja a principal causa para a origem da patologia, eles podem contribuir para a progressão da doença auxiliando na formação de complexos, ativação do sistema complemento e ativação de células de defesa (BURBELO *et al.*, 2021). Ainda que a maioria dos casos de doenças autoimunes seja diagnosticada em pacientes sem histórico familiar, fatores genéticos relacionados a ativação dos linfócitos, expressão de citocinas e o padrão de resposta contra invasores contribuem para o estabelecimento da doença (ZENEWICZ *et al.*, 2010).

Vários autoanticorpos contra diversos antígenos já foram relatados e a sua recorrência possibilitou o estabelecimento da relação entre a presença destes anticorpos e o desenvolvimento e caracterização de algumas doenças autoimunes. Dentre os antígenos próprios mais estudados, os ácidos nucleicos são relevantes visto que são moléculas comuns a todas as células, e mais especificamente, a presença de anticorpos anti-DNA no soro de pacientes com LES é bem caracterizada, além de haver evidências que estes auxiliam na progressão da doença (ARBUCKLE *et al.*, 2001).

1.6 DNA COMO ANTÍGENO PRÓPRIO

A molécula de DNA tem carga predominantemente negativa por conta dos fosfatos que a compõem, logo, muitos anticorpos anti-DNA apresentam características em comum como a presença de resíduos de aminoácidos de carga positiva nas CDRs atuando de forma crucial para o reconhecimento antigênico (ZHANG *et al.*, 2010). O DNA é encontrado no núcleo das células dos eucariotos, porém, pode ser exposto ao meio externo junto a debris celulares quando estas células morrem ou são destruídas (HOLL *et al.*, 2016). Mecanismos de defesa protagonizados pelos neutrófilos também liberam moléculas de DNA na circulação, na forma de NETs (do inglês, *Neutrophil Extracellular Traps*), de modo que estas moléculas podem facilmente ser encontradas por células T e B da imunidade adaptativa. Dito isso, o DNA pode ser encontrado circulando fora do núcleo das células sendo chamado de cfDNA (do inglês, *cell free DNA*) tendo diversas origens possíveis e podem estar aumentados na ocorrência de neoplasias (KUMAR *et al.*, 2018).

Outro indicativo que reforça o papel do DNA como autoantígeno relevante é a presença de DNases que controlam a quantidade de cfDNA na circulação sendo observado que a ausência dessas DNases está envolvida no desenvolvimento de um perfil pró-inflamatório dos indivíduos afetados (KENNY *et al.*, 2019; ZOCHLING *et al.*, 2014). A existência de linfócitos T e B com receptores celulares que se liguem a moléculas de DNA podem promover a montagem de resposta imunológica contra essas moléculas se os mecanismos de tolerância não forem capazes de inibir tal resposta, gerando anticorpos específicos contra o DNA.

1.7 ONTOGENIA DOS LINFÓCITOS B E AUTORREATIVIDADE

As primeiras células B são formadas ainda na fase embrionária a partir de células pluripotentes encontradas no fígado do feto. Porém, no indivíduo já formado os linfócitos B se desenvolvem na MO a partir células-tronco hematopoiéticas (CTH) que são direcionadas por estímulos externos ao comprometimento para a diferenciação a diversos tipos celulares. O comprometimento com a diferenciação em determinado tipo celular é considerado irreversível a partir de certo ponto. Todas as células do sistema imunológico (neutrófilos, monócitos, basófilos, eosinófilos, linfócitos, etc) são derivadas de células pluripotentes encontradas na MO (MELCHERS, 2015).

Após o comprometimento das células com linhagens de células B, alguns fatores celulares se mostram cruciais para o seu desenvolvimento completo. Uma das primeiras linhagens precursoras de células B, por exemplo, necessita da quimiocina, SDF-1, produzida pelas células estromais da MO para continuar se desenvolvendo (EGAWA *et al.*, 2001). Em fase posterior, a interleucina-7 (IL-7) se mostra fundamental para o desenvolvimento de células pró-B em estágios iniciais de desenvolvimento que não obstante apresentam a expressão aumentada do receptor de interleucina, IL-7R (KIKUCHI *et al.*, 2005).

As células B em estágio inicial de desenvolvimento se encontram em pró-B onde iniciam a recombinação VDJ da cadeia pesada (tratada em detalhe no tópico 1.2.1), em seguida, avançam para o estágio pré-B já com a cadeia pesada recombinada e passam a expressar a cadeia pesada junto com a cadeia leve substituta que não sofre recombinação e é característica exclusiva dessa fase do desenvolvimento, conhecida como SLC (do inglês, *Surrogate Light Chain*). A expressão dessas duas cadeias pareadas junto com os domínios de

transdução de sinais $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ constitui o precursor do receptor de células B, o pré-BCR (ALMQVIST e MÅRTENSSON, 2012) (Figura 6). Só então atingem o perfil de células B imaturas ou *naive* que podem então sair da medula óssea para os órgãos linfoides periféricos.

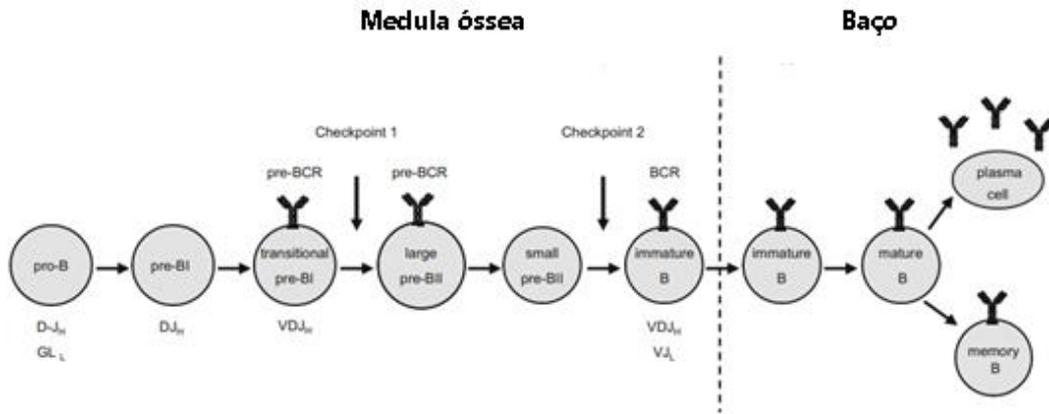


Figura 6. Esquema do desenvolvimento dos linfócitos B que ocorre na MO e apresenta pontos de controle de qualidade (*checkpoints*) de seleção importantes para a definição de repertórios que serão expressos pelas células B imaturas ao deixarem a MO (Adaptado de ALMQVIST & MARTENSSON, 2012).

A expressão do pré-BCR marca um momento importante para o desenvolvimento das células B já que a funcionalidade do receptor na geração de sinalização tônica satisfatória irá determinar o destino dessas células que podem sobreviver e passarem por expansão clonal ou serem selecionadas negativamente por deleção clonal (MÅRTENSSON *et al.*, 2010). Nesta fase do desenvolvimento com a presença do pré-BCR as células pré-B em desenvolvimento parecem responder ao reconhecimento de antígenos próprios. Curiosamente, os fatores reportados até hoje que estimulam o pré-BCR para geração de sinalização que irá ajudar na progressão do desenvolvimento são componentes celulares produzidos pelas células estromais da MO, como a galectina-1 (GAUTHIER *et al.*, 2002; ROSSI *et al.*, 2006), o *crosslinking* do pré-BCR também já foi reportado como gerador de sinalização (KUWAHARA *et al.*, 1996; ROSSI *et al.*, 2006).

Após o *checkpoint* de seleção exercido pelo pré-BCR as células B diminuem a expressão dos genes $VpreB$ e $\lambda 5$ que compõem a SLC. Em seguida é observado o aumento da expressão dos genes de recombinação RAG1/RAG2 que irão dessa vez auxiliar na recombinação dos segmentos gênicos V e J formadores da cadeia leve convencional. Após a recombinação a nova cadeia leve pode ser expressa na membrana celular pareada com a

cadeia pesada, formando o BCR. A partir desse momento essas células são consideradas linfócitos B imaturos que já estão prontos para deixar a medula óssea e seguir para a circulação periférica onde ocasionalmente poderão ser expostas a antígenos que podem estimular o início de uma resposta imune adaptativa e a produção de anticorpos específicos (PARKER et al., 2005).

1.8 ASPECTOS ESTRUTURAIS DO PRÉ-BCR

O pré-BCR tem sua expressão na membrana celular das células no estágio pré-B. A SLC é uma cadeia leve que apresenta peculiaridades que as diferenciam da cadeia leve convencional. Estas diferenças estruturais e de interação parecem desempenhar funções cruciais para o correto desenvolvimento das células B (KLINE *et al.*, 1998; WINKLER *et al.*, 1995). A SLC é formada por duas proteínas (VpreB e $\lambda 5$), seus genes são encontrados no cromossomo 16 em camundongos e no 20 em humanos, os genes são $\lambda 5$, VpreB1 e VpreB2. A junção de forma não covalente do segmento $\lambda 5$ com um dos genes VpreB formam a SLC. Curiosamente essa cadeia leve apresenta estruturas que se projetam para fora do domínio de imunoglobulina (Figura 7), que são chamadas de regiões únicas (URs, do inglês, *unique regions*). A UR da cadeia VpreB é menor e composta de 20 aminoácidos caracteristicamente de carga negativa, enquanto a UR da $\lambda 5$ é mais longa com cerca de 50 aminoácidos de carga predominante positiva na sua maioria resíduos de arginina (R) (MINEGISHI; HENDERSHOT; CONLEY, 1999) (Figura 7). Acredita-se que as URs desempenhem papéis importantes na geração de sinalização autônoma por *cross-linking* e liguem-se a autoantígenos presentes no microambiente produzidos pelas células estromais da MO, como a galectina-1 promovendo a cascata de sinalização para seleção e expansão clonal das células B (VETTERMANN e JÄCK, 2010).

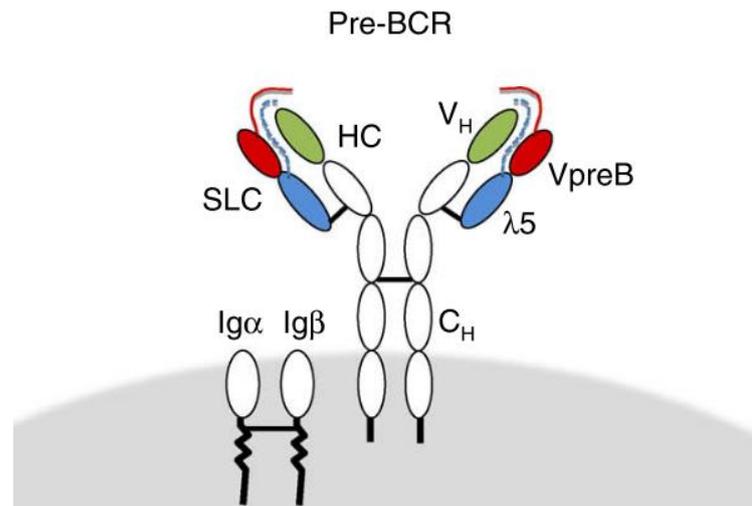


Figura 7. Estrutura esquemática do pré-BCR formado pelas proteínas transdutores de sinal $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, cadeias pesadas pareadas com duas SLC (Adaptado de Mårtensson *et al.*, 2010)

É consenso que o pré-BCR auxilia na testagem da cadeia pesada e do pareamento com a cadeia leve convencional que é expressa posteriormente. Também é claro sua influência na geração de sinalização que ajuda na progressão do desenvolvimento das células pré-B. A expressão do pré-BCR e do IL-7R são essenciais para a proliferação das células pré-B, a ausência de um desses receptores causa redução significativa da população de células pré-B e também redução dos linfócitos B fora da medula óssea (PARKER *et al.*, 2005; SAMMICHELI *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram reportados para camundongos com genes para a SLC deletados. Os animais SLC^{-} , $\lambda 5^{-}$, $VpreB^{-}$ apresentavam desenvolvimento parcial ou completamente parado resultando em uma diminuição de células B na MO e na periferia (KITAMURA *et al.*, 1992; SHIMIZU *et al.*, 2002; SU *et al.*, 2003).

1.9 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante se tornou possível a produção de moléculas que não são encontradas na natureza. De forma que é factível se desenvolver fragmentos de proteínas, proteínas fusionadas em diversas ordens de complexidade limitando-se pelo objetivo do estudo (EVENS e WITCHER, 1993; KHAN *et al.*, 2016). Sendo assim, é possível a produção de anticorpos recombinantes que em formatos não encontrados na natureza almejando-se o seu uso terapêutico, no diagnóstico de patologias, como ferramenta de pesquisa ou investigação de hipóteses na pesquisa básica. O desenvolvimento de

fragmentos de anticorpos no formato scFv (do inglês, *single-chain fragment variable*) (Figura 8) tem como objetivo a produção de moléculas ligantes a antígenos, tal fragmento recombinante têm sua produção viabilizada em quantidade significativa em cepas bacterianas, sendo *Escherichia coli* a mais utilizada para este fim (MILLER *et al.*, 2005).

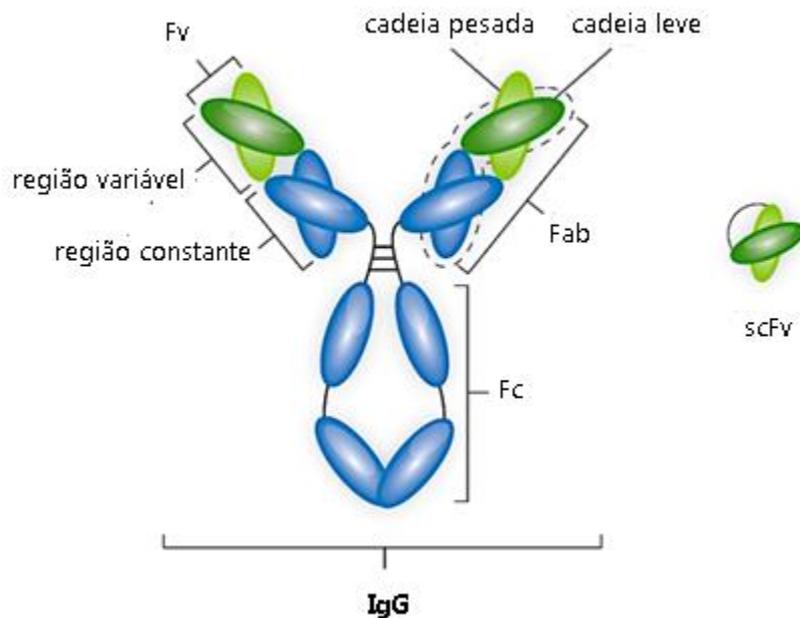


Figura 8. Anticorpo inteiro e fragmento no formato scFv. Os scFvs são formados por um domínio das regiões variáveis leve (VL) e pesada (VH) do anticorpo convencional unidos por um *linker* peptídico (Adaptado de RODRIGO; GRUVEGÅRD; VAN ALSTINE, 2015).

Os anticorpos no formato scFv são formados por 1 domínio de cada umas das regiões variáveis das cadeias leve (VL) e pesada (VH). Esses dois domínios são unidos por um *linker* peptídico flexível de 15 aminoácidos em *tandem* (GGGGS x3) (CHEN; ZARO; SHEN, 2013). Do ponto de vista terapêutico estas características estruturais dos scFvs os tornam moléculas de fácil absorção e com maior capacidade de penetração tecidual, o que parece contribuir para o reconhecimento de alvos de difícil acesso (KHANTASUP *et al.*, 2015). Na pesquisa básica os scFvs podem facilitar e viabilizar o desenvolvimento desses estudos, já que são moléculas menores e conseqüentemente de produção mais fácil e barata quando comparada a produção da molécula de anticorpo no seu formato original em sistemas de expressão complexos.

1.10 TRABALHOS ANTERIORES

Nosso grupo tem experiência no desenvolvimento de pesquisas acerca do tema sobre anticorpos anti-DNA. Os primeiros trabalhos envolveram estudos de anticorpos anti-Z-DNA (BRIGIDO e STOLLAR, 1991) e a sua produção heteróloga em bactérias no formato scFv para ensaios de ligação (BRIGIDO; POLYMENIS; STOLLAR, 1993) e também na superfície de fagos pela técnica *phage display* (MARANHÃO e BRÍGIDO, 2000). Foi identificado pelo grupo que uma família de genes V, a VH10, apresentava maior chance de se encontrar sequências de anticorpos anti-DNA quando comparada com as frequências que eram encontradas em outras famílias (Figura 9) (MARANHÃO *et al.*, 2013).

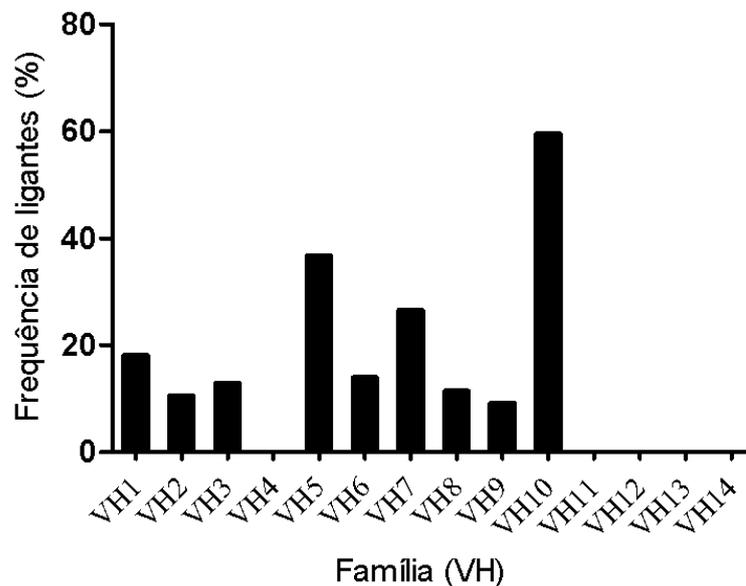


Figura 9. Após levantamento em banco de dados calculou-se as frequências das famílias de genes VH depositados que tinham sido reportados como ligantes a ácidos nucleicos. A família VH10 apresentou maior representação (59,5%) para essa característica apesar de um número relativo reduzido de sequências de depositadas (Adaptado de MARANHÃO, 2013).

Com o aprofundamento dos estudos e utilizando a técnica de *phage display* para o teste de uma biblioteca de HCDR3 no contexto VH10 (ligante) e VH4 (controle não-ligante), foi observado que anticorpos (scFv) formados por VH10 apresentavam independência da HCDR3 para a formação de anticorpos ligantes a DNA, enquanto que anticorpos (scFv) que eram formados por VH4 necessitavam da presença de um *pool* mais restrito de HCDR3 para a formação de anticorpos ligantes ao DNA (MARANHÃO *et al.*, 2013). No intuito de testar as

interações de anticorpos anti-DNA que possuem na sua composição o segmento V germinal VH10 em alguns contextos específicos, foram desenhados genes codificantes para scFvs, que posteriormente foram clonados no vetor para expressão em *E. coli*, pIg16 (Figura 10). Teste preliminares de expressão mostraram ser possível a obtenção dos scFvs para teste de atividade ligante (ARAUJO, 2016).

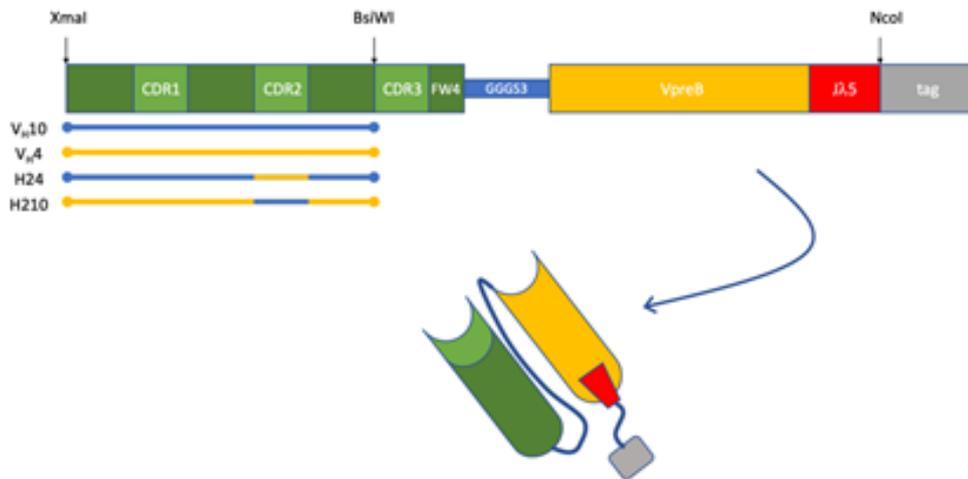


Figura 10. Foram desenhados quatro segmentos gênicos que codificam para quatro scFvs que utilizam a cadeia variável pesada (VH) das famílias VH10 ou VH4, sendo duas VH germinais e 2 VH mutantes com a região do *loop* da HCDR2 trocada entre estas famílias (VH10-H24 e VH4-H210). A HCDR3 é comum aos quatro genes. A cadeia leve (VL) é uma recombinante similar a SLC que contextualiza o reconhecimento antigênico durante as fases preliminar do desenvolvimento dos linfócitos B e formação do repertório primário. Uma tag de proteína A (cinza) foi utilizada para detecção e purificação dos scpre-BCRs.

1.11 HIPÓTESES

Considerado o exposto acima, pode-se inferir que a presença da autorreatividade parece não ser apenas aleatoriamente gerada pelos mecanismos de recombinação, mas pode ser encontrada em sequências germinais no genoma dos indivíduos. Além disso, a necessidade de sinalização tônica pré-eventos recombinatórios das células do sistema imune adaptativo baseada no reconhecimento de antígenos próprios auxiliam no desenvolvimento normal destas células.

A descoberta da alta frequência de anticorpos reportados como ligante ao DNA por moléculas que tem em sua composição o segmento gênico V da família da cadeia pesada VH10 nos levou a hipotetizar que essa família tem a capacidade intrínseca codificada em suas sequências para a geração de anticorpos anti-DNA. Visto que o segmento gênico V é responsável pela codificação das CDRs 1 e 2 na sua integralidade e baseado em estudo de similaridades de sequências ligantes ao DNA encontradas na bibliografia, a região da CDR2 é nossa candidata preferencial para o protagonismo de ligação ao DNA.

A presença de sequências formadoras de anticorpos com capacidade de ligação a antígenos próprios encontrados em abundância, como o DNA, e codificado em sequências germinais reforçam a ideia da autorreatividade sendo utilizada como mecanismo para auxiliar no desenvolvimento dos linfócitos B. Dessa forma, nós também inferimos que a ligação de anticorpos com o gene VH10 em um contexto de desenvolvimento celular prematuro, isto é, na presença do pré-BCR, seja possível.

2 RELEVÂNCIA

Os mecanismos moleculares que atuam no reconhecimento de antígenos próprios ainda não são compreendidos em sua totalidade. O fato de indagarmos sobre o papel desenvolvido no reconhecimento de antígenos próprios para o desenvolvimento normal dos linfócitos B demonstra esta realidade. A compreensão do reconhecimento antigênico de estruturas próprias pode nos ajudar a compreender o exato papel destes mecanismos e como podem influenciar na geração de quadros autoimunes patológicos. A possibilidade de que o potencial de reconhecimento de antígenos próprios possa vir codificado no genoma pode mudar a forma como somos apresentados aos fenômenos da autoimunidade. A autorreatividade é regularmente relacionada apenas a defeitos nos sistemas de controle de qualidade celular, porém, neste trabalho podemos observar mais a fundo que a natureza autorreativa dos repertórios primários nas células B em desenvolvimento inicial faz parte de um mecanismo altamente controlado que garante a sobrevivência, multiplicação e progressão destas células para estágios posteriores do desenvolvimento. Além disso, esse conhecimento pode ajudar na compreensão de doenças autoimunes e também em mecanismos celulares que contribuem para a geração e o avanço de linfomas. Neste trabalho, nós produzimos um novo fragmento de anticorpo murino baseando-se no formato scFv para estudos de interação antigênica durante a ontogenia dos linfócitos B, por isso, chamado de scpre-BCR.

3 OBJETIVOS

- Produzir fragmentos de anticorpo no formato scFv em novo modelo, scpre-BCR, para estudos de desenvolvimento dos linfócitos B.
- Produzir fragmentos scpre-BCRs mutagenizados para investigar importância da CDRH2 para a ligação ao alvo.
- Testar a capacidade de ligação dos scpre-BCRs ao DNA fita simples (ss) e dupla-fita (ds).
- Fazer análise estrutural e de ligação do scpre-BCR VH10 a partir da geração de modelos *in silico*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS BACTERIANAS

XL1-Blue (Stratagene ®) → *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZ M15Tn10* (TetR)] (Sambrook et al., 1989).

SHuffle® T7 Express *lysY* Competent *E. Coli* → MiniF *lysY* (Cam^R) / *fhuA2 lacZ::T7 gene1* [lon] *ompT ahpC gal λatt::pNEB3-r1-cDsbC* (Spec^R, lacI^q) *ΔtrxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)²* [dcm] *R(zgb-210::Tn10 --Tet^S) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10* (New England Biolabs)

LISTA DE SOLUÇÕES E REAGENTES PARA PREPARO

Meio LB (pH 7,0)

Peptona de caseína	1% (p/v)
Extrato de Levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1% (p/v)

Meio LB Ágar

Meio LB

Ágar bacteriológico 1,4 % (p/v)

Tampão de Lise (pH 7,4)

Tris	75 mM
NaCl	300 mM

Tampão de Ligação (PB) (pH 7,2)

Fosfato de sódio	10 mM
NaCl	500 mM

Tampão de Eluição (pH 2,4)

Glicina	100 mM
NaCl	150 mM

Tampão de Transferência

Trizima-base	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0,037 % (p/v)
Metanol	20 % (v/v)

Solução de Bloqueio

Leite em pó desnatado 5% (p/v)

Dissolvido em PBS 1X

Solução de CaCl₂ (Transformação por choque térmico)

Cloreto de cálcio 50 mM

Esterilizada por filtração e estocada a 4° C

PBS 10X (para 1L pH 7,4)

NaCl	82g
Na ₂ HPO ₄	10,5g
NaH ₂ PO ₄ + H ₂ O	3,55g

PBST

Acrescentar Tween 20 0,1%

Tampão de corrida SDS-PAGE (pH 8,3)

Trizima base	125mM
Glicina	125mM
SDS	0,5% (p/v)

Tampão de amostra 5X SDS-PAGE

Tris-HCl pH 6,8 250mM

SDS	10% (p/v)
Glicerol	50% (v/v)
β -mercaptoetanol	10% (v/v)
Azul de bromofenol	0,5% (p/v)

Gel concentrador 5% SDS-PAGE

Solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1)	3,4 mL
Tris-HCl pH 6,8 1M	0,83 mL
SDS 10%	50 μ l
APS 10%	50 μ l
TEMED	5 μ l

Gel separador 12% SDS-PAGE

Solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1)	3,3 mL
Tris-HCl pH 8,8 1,5 M	4 mL
SDS 10%	100 μ l
APS 10%	100 μ l
TEMED	4 μ l

Solução descorante para coloração com Coomassie

Coomassie R-250	0,25% (p/v)
Metanol	30% (v/v)
Ácido acético	7% (v/v)

Solução de IPTG

Solução de isopropil-tio- β -D-galactosídeo (IPTG) dissolvido em água em solução estoque de 100 mM e esterilizado por filtração em membrana Millipore de 0,22 μ m.

4.3 EXPRESSÃO DOS scFvs

Plasmídeos obtidos por extração (Quiagen midiprep) de células *E.coli* XL1 blue foram transformados em células *E.coli* SHuffle® T7 Express pLysY tornadas competentes por solução de CaCl₂, seguida da transformação por choque termico. As células transformadas foram cultivadas em placas com meio LB ágar (150 µg/mL ampicilina e 10 µg/mL cloranfenicol) por 16 horas. O plasmídeo utilizado confere resistência contra ampicilina. Foi feito uma pré-seleção das colônias transformadas com intuito de obter-se as melhores produtoras dos anticorpos recombinantes. 20 colônias foram selecionadas aleatoriamente e plaqueadas para cultivo em placas com 1% glicose ou 1mM IPTG (150 µg/mL ampicilina) por pelo menos 9 horas a 37°C. Colônias com crescimento arrastado na placa de IPTG em comparação com seu clone na placa com glicose foram selecionadas para expressão. Colônias foram individualmente incubadas em 5mL de meio LB (150 µg/mL ampicilina) e cultivadas *overnight* a 37°C e 250 rpm. No dia seguinte, 2 mL do meio cultivado anteriormente foi inoculado em 200 mL de meio LB (150 µg/mL ampicilina) e incubado a 37°C e 250 rpm até que se atingisse uma OD entre 0.8-1.0. Culturas foram então induzidas com 0,5 mM IPTG *overnight* a 22°C e 250 rpm. Após a indução células foram centrifugadas a 7500 rpm por 10 min e os *pellets* foram armazenados a -20°C para uso posterior. A produção das proteínas recombinantes foi confirmada por SDS-PAGE corado com Coomassie e Western blot (WB). Para o SDS-PAGE foi utilizado o marcador BLUEye Prestained Protein Ladder (Merk, Alemanha) e para o WB foram utilizados a membrana de nitrocelulose Amersham™ Protran® 0,2 µm e o marcador Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker Full Range (Merk, Alemanha). Após a etapa de transferência, a membrana foi bloqueada com BSA 3%. As proteínas recombinantes foram sondadas com IgG de coelho conjugada a fosfatase alcalina (AP) (Thermo Fisher Scientific, MA). Entres todas a etapas houve lavagem da membrana com PBST (x3).

4.4 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Os pellets provenientes da cultura de células induzidas foram ressuspensos em 15 mL de tampão de lise (75mM Tris, 300mM NaCl) e lisados por sonicação (Q700/Qsonica, CT) em gelo. Sonicação foi feita em 10 segundos cada (amplitude 50%) seguidos por 1 minuto e 40 segundos de resfriamento cada ciclo, sendo no total 30 ciclos (5 minutos de sonicação de fato). A amostra resultante foi centrifugada a 8000 rpm por 30 min. A fração

solúvel obtida foi diluída em 1:1 no tampão de ligação (10 mM Fosfato de sódio, 500 mM NaCl), em seguida foi filtrada em filtros de 0,22 μm e direcionados para a purificação. Os scpre-BCRs recombinantes foram purificados por cromatografia de afinidade utilizando-se uma resina de IgG-Agarose (Thermo Fisher Scientific, MA), sendo a IgG proveniente de coelho. Todo o processo de purificação foi realizado no equipamento AKTA Pure System (Cytiva, MA). As etapas de ligação e eluição (0,1 M Glicina, 0,15 M NaCl, pH 2,4) foram realizadas seguindo-se os protocolos dos fornecedores. As frações foram concentradas com filtros Amicon de 3 kDa (Merk, Alemanha) e quantificados por análise da absorbância (Shimadzu UV1800, Japão). Após a purificação também foi analisado o perfil cromatográfico dos scpre-BCRs por exclusão molecular utilizando a coluna Superdex 75 Increase 10/300 GL (Cytiva, MA) em conjunto com o sistema AKTA Pure. A amostra diluída em PBS (pH 7,4) foi passada pela coluna em um fluxo constante de 0,5 mL/min. Os dados cromatográficos foram coletados para análise e comparação entre os scpre-BCRs.

4.5 ENSAIO DE LIGAÇÃO AO DNA

Os scpre-BCRs foram testados quanto a sua capacidade de ligação ao DNA. O DNA de timo de bezerro (Calf thymus DNA Thermo, Thermo Fisher Scientific, MA) foi utilizado para a preparação das amostras de ss- e dsDNA (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para fazer a sensibilização (*coating*) das placas de ELISA (Nunc, Maxisorp de 96 poços, Thermo Fisher Scientific, MA). O ssDNA foi obtido fervendo-se o DNA de timo de bezerro por 20 min e então prontamente transferido para o gelo e em seguida usado para o sensibilizar a placa. Antes do *coating* as placas de ELISA foram pré-tratadas por irradiação UV durante 25 minutos para melhorar a adsorção à placa. A etapa de sensibilização foi feita por 16 horas a 4°C. Após bloqueio com BSA 3%. Uma diluição seriada (1:1) dos scpre-BCRs nas placas foi conduzida partindo-se de uma concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resultando em concentrações decrescente de 5, 2,5, 1,25, and 0,625 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A quantidade de proteína adicionada foi normalizada por densitometria das amostras do SDS-PAGE. A concentração de cada amostra foi normalizada considerando-se a área da banda mais abundante na faixa tamanho esperado. Para a detecção da atividade de ligação a *tag* de proteína A foi sondada com IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (AP) (1:1000) (Thermo Fisher Scientific, MA). PNPP foi usado como substrato cromogênico na concentração de 1 mg/ml (Thermo Fisher Scientific, MA). Os

ensaios foram feitos em triplicata. Todas as etapas de incubação tiveram duração de 1 hora com 3x lavagens de PBST entre elas.

4.6 AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DOS ANTICORPOS VH10

A estrutura dos anticorpos compostos pelo segmento VH10 foi adquirida pelo banco de dados de proteína (PDB, www.rcsb.org) após sua identificação pela ferramenta BLAST no NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov). A sequência germinal VH10 de camundongo (IGHV10-3*01) foi usada como "dados de entrada" para a comparação com o banco de dados de proteínas (PDB). Foram escolhidos para a análise os melhores "scores" obtidos pelo IgBlast. As estruturas foram analisadas utilizando o programa Chimera (PETTERSEN *et al.*, 2004). As distâncias, contatos e pontes de hidrogênio foram obtidas usando-se o programa Cocomaps (VANGONE *et al.*, 2011). A sobreposição estrutural e os gráficos foram gerados no Chimera. A numeração de Kabat foi utilizada na ferramenta Abnm (www.bioinfo.org.uk/abs/abnum).

4.7 MODELAGEM DO scpre-BCR-VH10

A sequência, o modelo estrutural e o mapa dos coeficientes de densidade eletrônica dos fragmentos de anticorpos do anti-lipídio A S1-S15 formando complexo um oligonucleotídeo de DNA fita simples 5P-TTTTT-3P foi obtido do PDB (código 4Z8F). O modelo estrutural e de densidade eletrônica foi analisado usando o programa COOT (EMSLEY *et al.*, 2010). As moléculas de água foram removidas do modelo cristalográfico e este modelo foi usado como molde nos passos seguintes de modelagem molecular. A sequência do scpre-BCR VH10 foi manualmente alinhada a sequência do 4Z8F. O programa MODELLER 9.24 (WEBB e SALI, 2014) foi empregado para a geração comparativa de modelos moleculares do scpre-BCR-VH10. Os modelos estereoquímicos foram avaliados usando o servidor Molprobity (WILLIAMS *et al.*, 2018). O servidor I-TASSER (YANG e ZHANG, 2015) também foi utilizado para a produção de modelos de scpre-BCR-VH10. A modelagem no I-TASSER foi direcionada baseando-se na estrutura do cristal depositada do 4Z8F. Adicionalmente, I-TASSER usou LOMETS para identificar várias estruturas de cristais depositados que foram usadas como moldes. A qualidade de cada modelo foi acessada por C-score e valor do RMSD.

5 RESULTADOS

5.1 COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS V_H

O alinhamento das sequências referentes ao segmento gênico V_H das famílias VH10 e VH4 demonstra as diferenças entre os segmentos germinais e a troca da região do *loop* da CDR2 entre as duas construções derivadas. A maioria das discrepâncias entre os germinais ocorre na região da CDR2 (Numeração de Kabat) composta por 18 aminoácidos no segmento gênico da família VH10 e 16 aminoácidos no segmento da VH4 (Figura 12).

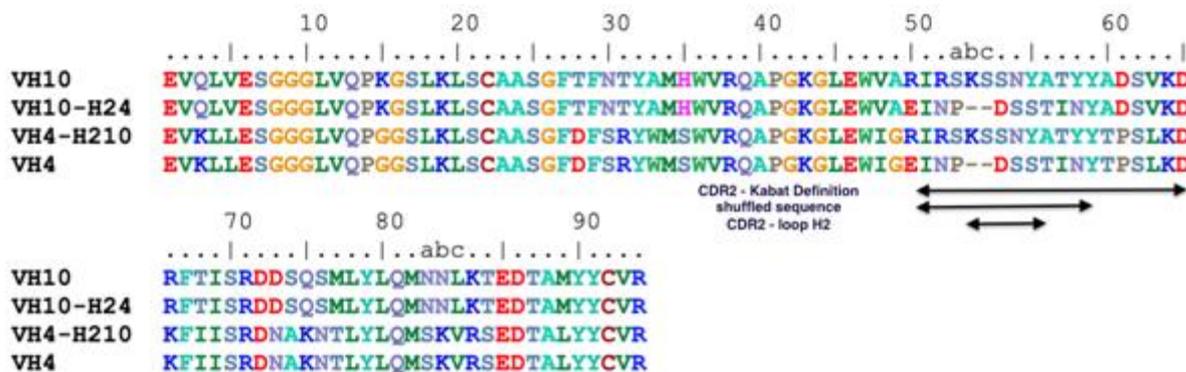


Figura 12. Alinhamento dos segmentos gênicos V dos germinais VH10 e VH4 e das variantes VH10-H24 e VH4-H210. A CDR2 foi definida seguindo-se a numeração de Kabat. A definição da CDR2, a região trocada entre os germinais e a região do *loop* da CDR2 é indicada pelas setas.

5.2 A EXPRESSÃO DOS scpre-BCRs SOLÚVEIS FOI IDENTIFICADA POR WB

Os scFvs recombinantes inéditos foram expressos na forma solúvel em células sHuffle lys Y (NEB) sob as condições de 250 rpm, 22°C e 0.5 mM IPTG como descrito nos métodos. Após a indução os scpre-BCRs tiveram suas expressões checadas por WB que foram sondadas por um anticorpo IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (AP) tendo como alvo a *tag* de proteína A localizada na extremidade N-terminal dos scpre-BCRs. As construções tinham o tamanho teórico esperado e aproximado de 37 kDa, o que foi confirmado na análise da membrana de nitrocelulose após a revelação (Figura 13). Os scpre-BCRs VH10, VH4 e VH10-H24 apresentaram bandas bem definidas e únicas indicando uma expressão satisfatória e com baixa fragmentação das proteínas expressas. O scpre-BCR VH4-H210 mostrou-se mais problemático para a expressão no sistema e nas condições testadas de

tal forma que é possível observar o desenvolvimento de uma banda de intensidade mais fraca em relação às outras construções, além disso, é possível observar uma banda menor indicando possível degradação de parte da proteína expressa. Como observado na literatura, proteínas recombinantes semelhantes apresentam diferentes níveis de expressão nas mesmas condições de indução já que pequenas diferenças na composição de aminoácidos podem afetar de forma significativa as condições de expressão (MA; LEE; PARK, 2020).

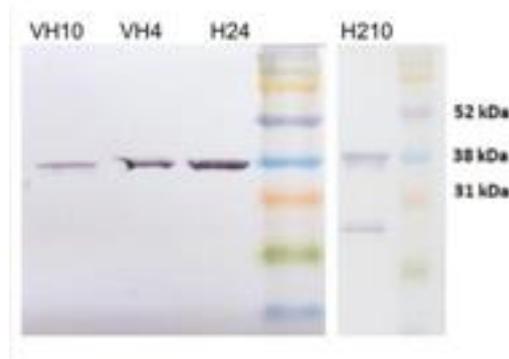


Figura 13. *Western blot* confirmando a expressão dos scpre-BCRs de interesse sondados com IgG de coelho (1:1000) tendo como alvo *tag* de proteína A.

5.3 A PURIFICAÇÃO DOS scpre-BCRs FOI ANALISADA POR SDS-PAGE

Após a confirmação da expressão dos scpre-BCRs as amostras foram purificadas e o produto das purificações foi analisado por SDS-PAGE (Figura 14). Pela análise do SDS-PAGE das frações purificadas pôde-se observar que os scpre-BCRs apresentavam-se na posição esperada em torno de 37 kDa e com um grau de pureza satisfatório de modo que passos adicionais de purificação (cromatografia de exclusão por tamanho - SEC) foram descartados e poderiam acarretar em perdas desnecessária de amostra como demonstrado com scpre-BCR VH10 (Figura 15). Como observado no WB, o scpre-BCR VH4-H210 apresenta uma expressão menor quando comparado com os outros scFvs, padrão este que não se modificou em diferentes ciclos de expressão. Indicando que a construção apresenta alguma característica peculiar que inibe a expressão em quantidade maior desse scpre-BCR.

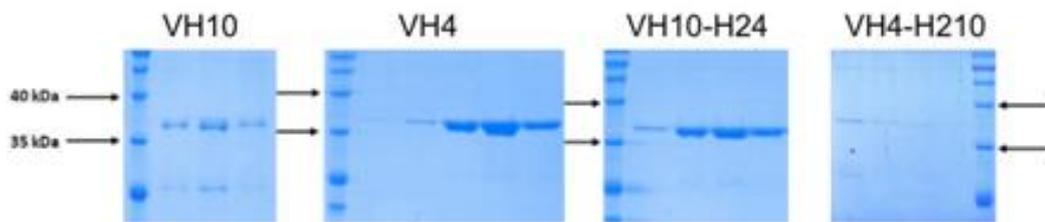


Figura 14. SDS-PAGE das frações purificadas dos scpre-BCRs recombinantes com tamanhos de ~37kDa.

Como demonstrado na figura abaixo, a cromatografia por exclusão molecular (SEC) utilizada posteriormente à cromatografia por afinidade no intuito de obter-se uma amostra mais pura, não apresentou vantagens que justificassem o seu uso. Foi observada pouca ou nenhuma mudança em relação às bandas adicionais superiores e inferiores ao padrão esperado, a aparente "limpeza" das amostras produto da SEC pode ser resultado da diluição da amostra já que a banda referente ao scpre-BCR VH10 também foi reduzida.

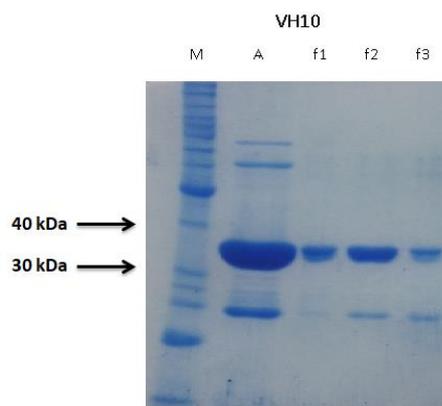


Figura 15. Cromatografia de exclusão por tamanho do scpre-BCR VH10 após purificação por afinidade. (M) Marcador. (A) Amostra resultante da cromatografia de afinidade. (f1/f2 /f3) Frações obtidas na cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).

5.4 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SEC) PARA ANÁLISE DE PERFIL CROMATOGRÁFICO

As amostras foram caracterizadas pela análise do perfil cromatográfico das amostras purificadas. Observou-se que as construções apresentaram um pico único, com exceção do scpre-BCR VH4 que apresentou dois picos (Figura 16). A presença de um pico único nos scpre-BCRs VH10, VH10-H24 e VH4-H210 indicam que essas proteínas se encontram predominantemente na forma monomérica e na posição esperada quando comparada aos

padrões utilizados para controle. Enquanto que o scpre-BCR VH4 apresenta tanto o pico para a presença de monômeros quanto um pico adicional que indica também a presença de dímeros desta proteína.

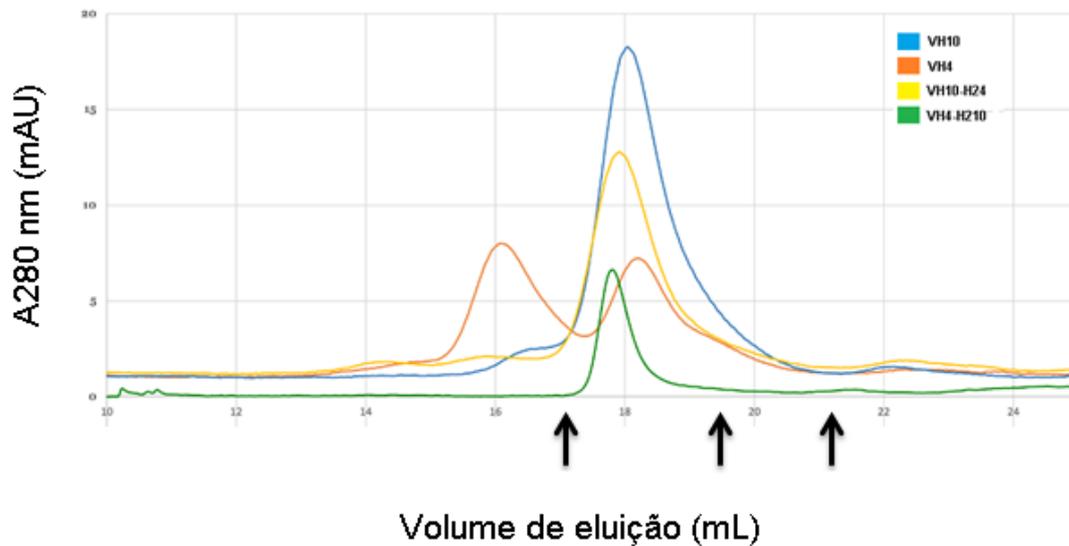


Figura 16. Perfil cromatográfico após SEC das proteínas recombinantes purificadas. As setas indicam a posição do pico dos 3 padrões utilizados (da esquerda para a direita, conalbumina 76 kDa, anidrase carbônica 29 kDa e ribonuclease A 13,7 kDa).

5.5 OS scpre-BCRs QUE CONTÊM VH10-CDR2 LIGAM-SE AO DNA

A capacidade de ligação ao ss- e dsDNA do scpre-BCR VH10 foi demonstrada pelo ensaio de ligação por ELISA. Como esperado, pode-se observar a baixa capacidade de ligação do scpre-BCR formado pelo segmento germinal da família VH4 que não apresentava sequências depositadas como ligantes a ácidos nucleicos e foi usada como controle. Outra observação importante é a confirmação da hipótese do papel da CDRH2 para a ligação ao DNA. O scpre-BCR recombinante com o segmento V proveniente de VH10, porém com a CDRH2 trocada pela mesma região da VH4, VH10-H24, tem sua capacidade de ligação ao DNA reduzida significativamente pela simples troca da região do *loop* da CDRH2, enquanto o scpre-BCR VH4-H210 apresenta um aumento da capacidade ligação ao ss- e dsDNA quando comparado com o germinal não mutado VH4 (Figura 17).

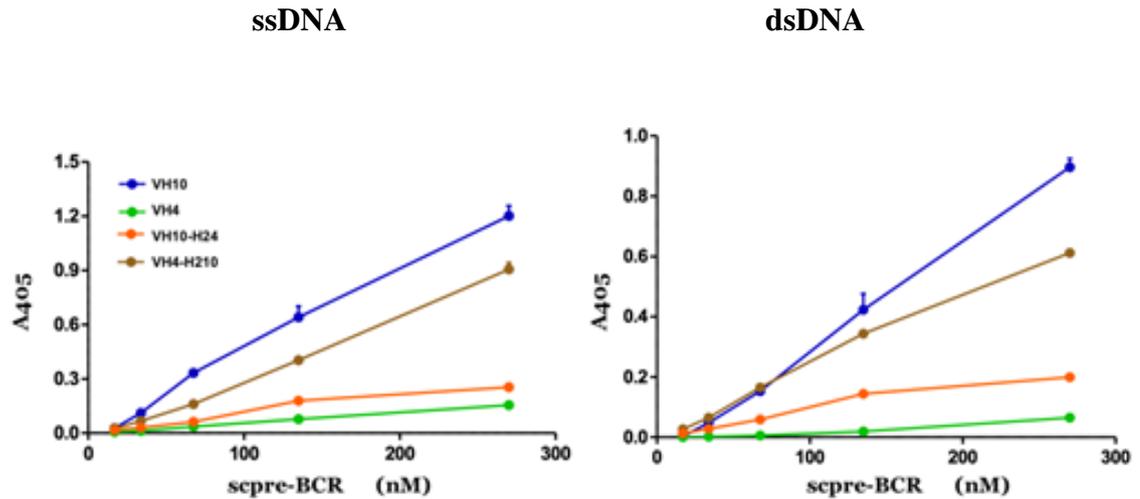


Figura 17. Ensaio de ligação dos scpre-BCRs a ss- e dsDNA por ELISA. Os scpre-BCR VH10 liga-se ao ss- e dsDNA (azul). A CDRH2 derivada do segmento VH10 é necessário para a alta capacidade de ligação aos tipos de DNA testados (laranja e marrom). As placas foram sensibilizadas com ss- e dsDNA (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A ligação dos scpre-BCRs ao antígeno foi sondada com o anticorpo IgG de coelho conjugado a AP com afinidade para a tag de proteína A dos scpre-BCRs.

Visto que sequências de VH10 e VH4 foram extraídas de bibliotecas de scFvs com diferentes CDRs 3 tendo como alvo Oligo-dT (MARANHÃO *et al.*, 2013), também foi testada a capacidade de ligação scpre-BCR VH10 para este alvo (Figura 18). Pode-se observar que o padrão de ligação é semelhante ao observado no ensaio com ss- e dsDNA. O scpre-BCR VH10 liga-se ao Oligo-dT, enquanto que o VH10-H24 não apresenta capacidade de ligação, reforçando o papel fundamental da CDR2.

Oligo-dT

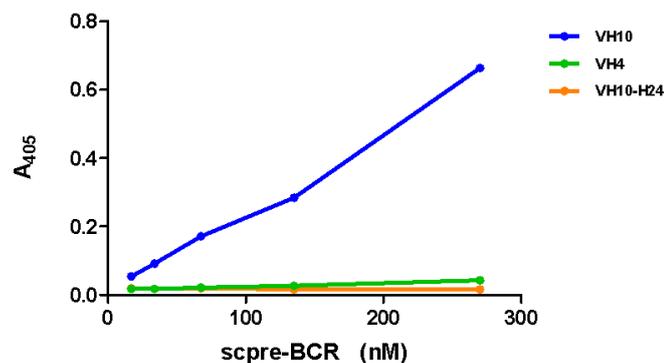


Figura 18. Ensaio de ligação (ELISA) dos scpre-BCRs VH10, VH4 e VH10-H24 tendo Oligo-dT com o alvo. As placas foram sensibilizadas primeiramente com streptavidina (10 µg/mL) por 1 hora seguida da adição de oligo-dT biotina (5 µg/mL). A ligação dos scpre-BCRs ao antígeno foi sondada com o anticorpo IgG de coelho conjugado a AP com afinidade para a tag de proteína A dos scpre-BCRs.

5.6 SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIAS COM OUTROS ANTICORPOS ANTI-DNA REPORTADOS

Outros anticorpos anti-DNA já descritos apresentam similaridades na CDRH2 com o scFv-VH10 construído neste trabalho como mostra o alinhamento abaixo (Figura 19). Os anticorpos BV04-01 (1CBV) e S1-S15 (4Z8F) já foram descritos como anticorpos ligantes ao DNA. O BV04-01 (HERRON *et al.*, 1991) representa um modelo anti-DNA conhecido e já alvo de diversas investigações no intuito de investigar a natureza das interações entre as duas moléculas. O S1-S15 foi primeiramente reportado com o anti-lipídio A, posteriormente constatou-se que também pode se ligar ao DNA com eficiência (HAJI-GHASSEMI *et al.*, 2015). Os três anticorpos apresentam alta similaridade na região que compreende o segmento gênico V e conseqüentemente as regiões da CDRH1 e CDRH2. A CDRH2 é idêntica nos anti-DNA BV04-01 e S1-S15 divergindo em apenas um único resíduo (S56) do segmento germinal variável do scFv-VH10. As CDRH3 dos três anticorpos apresentam diferenças significativas, inclusive no tamanho da CDRH3, o que reforça resultados anteriores (MARANHÃO *et al.*, 2013) que apontam para uma independência da CDRH3 para a ligação ao DNA de anticorpos formados por genes V da família VH10.

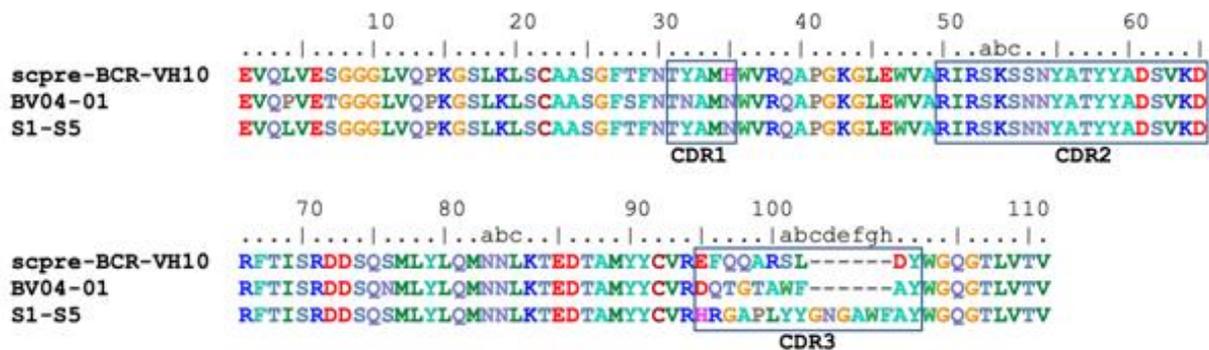


Figura 19. Alinhamento das sequências da cadeia pesada (VH) de anticorpos anti-DNA reportados BV04-01 (1CBV) e S1-S15 (4Z8F) e do scpre-BCR VH10 (BioEdit v7.2). Em destaque as CDRs 1, 2 e 3 definidas pela numeração de Kabat.

Após pesquisa em banco de dados (PDB) por anticorpos formados por segmentos gênicos V da família VH10 foram identificados 8 modelos (4Z8F, 1CBV, 2HKF, 3CXD, 3I2C, 3SGD, 4QNP, 4QWW). Quase todos os modelos apresentavam anticorpos hipermutados que resultaram em troca de resíduos, variando de 2 até 11 resíduos, com exceção do 4Z8F que se encontrava com sua sequência germinal intacta. Foi feito um alinhamento estrutural destas sequências onde é possível observar uma sobreposição significativa (Figura 20). As regiões que compreendem as CDRs 1 e 2 (segmento gênico V) apresentam grande similaridade na disposição estrutural dos *loops* mesmo após as hipermutações. Já na CDR3 dos anticorpos observa-se grande divergência estrutural que reflete a dissimilaridade entre as sequências.

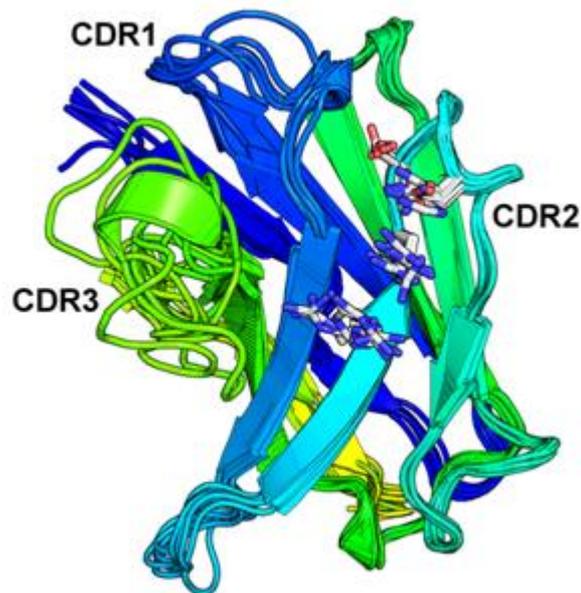


Figura 20. Superposição da estrutura tridimensional da cadeia pesada (VH) acessadas por cristalização de anticorpos formados por segmentos VH10 (1CBV, 4Z8F, 2HKF, 3CXD, 4QWW, 3I2C, 3SGD e 4QNP). As CDRs estão indicadas e os resíduos conservados (R50, R52, S52c e N56) na CDR2 estão em proeminência representados, bem como o resíduo H56 (3I2C).

5.7 OS RESÍDUOS ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO COM DNA ESTÃO ENVOLVIDOS COM LIGAÇÃO AO ANTÍGENO NOS DIFERENTES MODELOS

Nos dois modelos anti-DNA (1CBV e 4Z8F) os mesmos resíduos da CDR2 codificados pelo segmento germinal estão implicados nas interações. Os dois anticorpos ligam-se ao DNA utilizando as três CDRs para o estabelecimento dos contatos entre as moléculas. No 1CBV, um trinucleotídeo encontra-se interagindo com as CDRs, já no 4Z8F, é possível observar a ligação de 2 trinucleotídeos de forma simultânea e que compartilham alguns resíduos do paratopo para a interação. Dessa forma, o 4Z8F apresenta duas regiões de interação com os trinucleotídeos, uma envolvendo contato com as CDRs 1 e 2 e outra com as CDRs 1 e 3. As duas argininas (R50 e R52) estão envolvidas na ligação ao DNA nos dois modelos. No 1CBV a R50 estabelece interações de *Van der Waals* (VdW) com o *backbone* de açúcar do trinucleotídeo. O resíduo S52a faz uma ponte de hidrogênio com o primeiro fosfato do trinucleotídeo. Enquanto que no 4Z8F, o grupamento amino da R50 faz ponte de hidrogênio com o oxigênio 1 do fosfato. Também é observada a formação de pontes de hidrogênio protagonizadas pela R52 com um oxigênio do mesmo grupo fosfato mencionado anteriormente e da N53 com a primeira ribose (O4') (Figura 21).

Analisando os outros modelos de anticorpos formados por segmentos VH10 (2HKF, 3CXD, 4QWW), é possível observar que estes mesmos resíduos da CDR2 (R50, R52, N53 e S52a) também desempenham papel na interação desses anticorpos com os seus peptídeos alvos estabelecendo interações através da formação de pontes de hidrogênio com exceção do modelo 4QWW, onde S52a não faz contato com o antígeno.

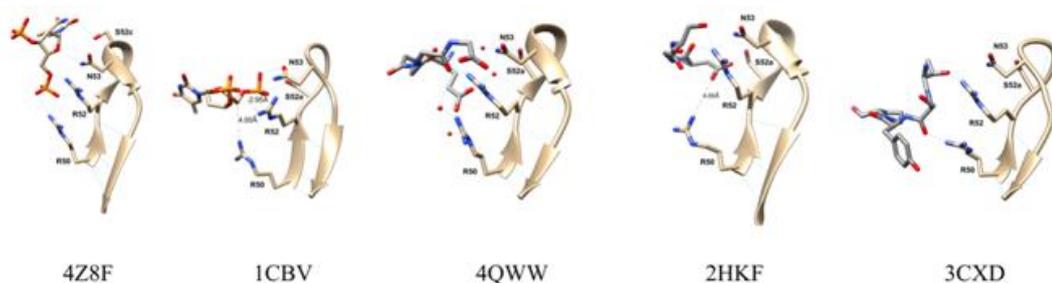


Figura 21. Interação antigênica com a CDR2 de diferentes anticorpos formados pelo segmento VH10. A região dos anticorpos que compreende as posições entre os resíduos 50 - 58 é mostrada. Os resíduos R50, R52, S52a (ou S52c para 4Z8F) e N53 estão identificados,

assim como as possíveis interações estabelecidas com os seus antígenos. Para 4Z8F e 1CBV o antígeno é oligo-dT, os outros anticorpos têm peptídeos como antígeno.

5.8 O MODELO ESTRUTURAL DO scpre-BCR CORROBORA COM A IMPORTÂNCIA DO CDR2 PARA A LIGAÇÃO

Neste trabalho foram desenvolvidos modelos estruturais no intuito de se investigar os determinantes estruturais para a ligação ao DNA do scpre-BCR VH10. Foi feita modelagem por homologia baseada na estrutura do anti-DNA 4Z8F. Todos os modelos apresentaram o pareamento normal para a formação de um domínio variável de imunoglobulina. Quando comparada com outra estrutura pre-BCR encontrada em banco de dados (PDB code: 2H32) observou-se a formação de estrutura similar as encontradas no domínio VpreB e no segmento J na formação da VL. O modelo scpre-BCR VH10 com um único oligonucleotídeo mostrou que os contatos foram estabelecidos pela VH com a ocorrência de vários contatos e formação de pontes de hidrogênio, assim como observado no molde 4Z8F.

Na tabela abaixo é mostrado os contatos formados gerando interações de Van der Waals (vdW) e pontes de hidrogênio protagonizados pelos resíduos que formam as CDRs 1, 2 e 3 nos 10 melhores modelos encontrados quando em interação com seu antígeno. É possível observar que a formação das pontes de hidrogênio deve-se exclusivamente aos resíduos localizados na CDR2.

Resíduo	Contatos	Pontes de H	Localização
T31	10	0	CDR1
A33	10	0	
R50	10	4	CDR2
R52	10	5	
S52c	10	6	
S53	3	0	
E95	8	0	CDR3
Q98	1	0	
R100	3	0	
R237	1	0	VpreB

Tabela 1. Informação sobre os resíduos envolvidos no contato direto com o antígeno e na formação de interações de Van der Waals (vdW) e pontes de hidrogênio nos dez melhores

modelos. A coluna Contatos indica o número de modelos onde aquele resíduo faz contato com o antígeno (distância <math>< 5 \text{ \AA}</math>); a coluna Pontes de H indica o número de modelos onde aquele resíduo faz ponte de hidrogênio com o antígeno.

O resíduo E95 encontrado na CDR3 do scpre-BCR VH10 apesar de não interagir diretamente com o oligonucleotídeo parece contribuir estruturalmente para a região ligante. Já no molde 4Z8F três resíduos da CDR3 (R96, P90 e L100) interagem diretamente com o antígeno (Figura 22A e B). Os resíduos da CDR2 estudados nos modelos similares (Figura 15) também aparecem na modelagem do scpre-BCR VH10. Os resíduos R50 e R52 e S52c formam um arcabouço de ligação e interagem diretamente com o oligonucleotídeo através de pontes salinas e de hidrogênio. O modelo com informações acerca da superfície eletrostática mostra uma predominância de carga positiva desde a base do arcabouço de ligação até o *loop* da CDR2 (Figura 22C e D).

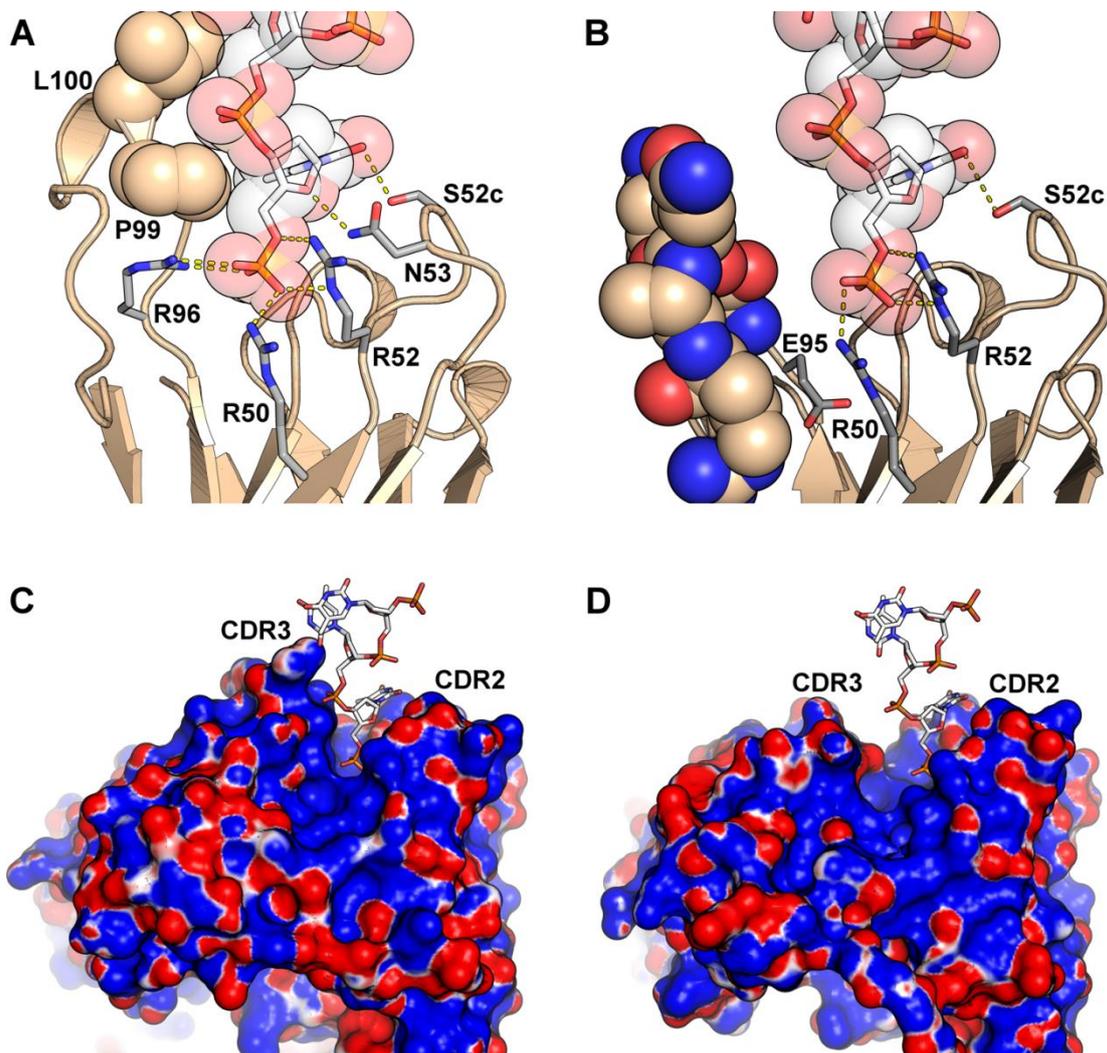


Figura 22. Modelos de interações entre 4Z8F (A e C) e o scpre-BCR (B e D) e um dT₃.(A e B) Interações envolvendo os resíduos da CDR2 e CDR3 com o oligonucleotídeo dT₃. É possível notar que o CDR3 no modelo 4Z8F aparece mais próximo do oligonucleotídeo com um número maior de interações. (C e D) Modelo de potencial eletrostático do anticorpo scpre-BCR, onde é possível observar o arcabouço hidropático de carga predominante positiva (azul). As regiões de carga negativa são mostradas em vermelho.

6 DISCUSSÃO

A expressão de anticorpos inteiros e suas modificações pós-traducionais são desafios encontrados para a expressão heteróloga dessas moléculas. Já a expressão de fragmentos de anticorpos em formatos menos complexos e com poucas ou nenhuma modificação pós-tradução é possível em bactérias como *E.coli* e representam um avanço no que diz respeito ao custo, tempo e quantidade de produção dessas moléculas. O que faz deste, um sistema de expressão indicado para a produção de moléculas de menor complexidade como os scFvs. Fragmentos de anticorpos no formato scFv consistem da região variável dos anticorpos que interagem com seu antígeno alvo. Se o objetivo do estudo for investigar a interação entre epitopo e paratopo os scFvs são ferramentas poderosas para tal estudo (TAPRYAL *et al.*, 2013). Os scFvs também podem ser ferramentas poderosa para diagnóstico e mapeamento do epitopos por scFvs neutralizantes quando usado em conjunto com técnica como o *phage display* (CHITRAY *et al.*, 2020).

Aqui, nós conseguimos demonstrar a viabilidade da produção dos scpre-BCRs recombinantes em sistema de expressão bacteriano. As diferenças nos níveis de expressão entre as proteínas recombinantes similares também puderam ser observadas, mais claramente com a expressão do scpre-BCR VH4-H210 onde uma menor quantidade de proteína foi obtida, perfil este que se manteve mesmo após vários ciclos de produção, o que exclui as particularidades de cada transformação e da seleção de colônias e reforça o perfil individual de expressão mesmo para proteínas com poucas diferenças na composição de aminoácidos.

Os scpre-BCRs produzidos nesse trabalho representam um modelo inédito para o estudo de interações anticorpo-antígeno no contexto de desenvolvimento dos linfócitos B durante a expressão do pré-BCR que envolvem o teste funcional da cadeia pesada, a ocorrência de exclusão alélica e seleção de repertórios. Ainda que um sistema similar no formato semelhante a Fab tenha sido proposto anteriormente (XU *et al.*, 2008). O formato da construção apresentado neste trabalho é menos complexo simplificando os processos de expressão e manipulação das proteínas recombinantes.

Os mecanismos envolvidos na seleção das células B precursoras que irão compor o repertório primário ainda não são compreendidos em sua totalidade, bem como o papel de antígenos próprios auxiliando na geração da sinalização tônica responsável pela sobrevivência e expansão das células selecionadas positivamente, o que faz do scpre-BCR uma ferramenta pertinente para esses estudos. Neste trabalho, para as nossas construções, a SLC recombinante

foi destituída das URs. Isso só foi possível porque o modelo estrutural utilizado para o SLC recombinante já ter sido produzido isoladamente onde teve confirmada, por cristalização, a formação de um domínio de imunoglobulina estável (MORSTADT *et al.*, 2008). Além disso, sabe-se do papel destas estruturas como responsáveis por parte da sinalização gerada pelo pré-BCR (KNOLL *et al.*, 2012), as duas URs da SLC, de VpreB e $\lambda 5$, apresentam vários resíduos de carga negativa e positiva, respectivamente, o que deve favorecer as interações a outros fatores celulares e o *crosslinking* do receptor que poderia interferir na avaliação do papel do segmento germinal VH10. Sendo assim, a exclusão das URs na SLC do scpre-BCR permite a caracterização correta e mais precisa acerca do papel dos domínios de imunoglobulina para a ligação ao antígeno e aqui mais especificamente o mapeamento da região e dos resíduos diretamente envolvidos na ligação ao DNA excluindo-se a possibilidade de uma análise enviesada pelo componente eletrostático das URs que poderia ser um fator gerador de interações inespecíficas,

Em trabalhos anteriores do grupo foi reportada após levantamento em banco de dados de uma maior frequência de integrantes da família VH10 em formar anticorpos ligantes à DNA em comparação a outras famílias (MARANHÃO *et al.*, 2013). Fragmentos de anticorpos recombinantes no formato scFv foram testados no contexto das famílias VH10 e VH4 aliados a uma biblioteca de CDRH3 expressas em fagos pela técnica de *phage display* onde observou-se uma menor influência da CDRH3 para scFvs ligantes ao DNA em scFvs que continham o segmento V proveniente da família VH10 (MARANHÃO *et al.*, 2013). Tal achado nos levou a hipotetizar que determinantes estruturais de maior relevância para a ligação se encontrariam dentro do segmento gênico V que contém as CDRs 1 e 2 em sua totalidade. Nesse mesmo levantamento de dados foi observado que a família VH4 apresentava a menor frequência de anticorpos anti-DNA reportados o que nos levou a utilizá-la como controle negativo nos trabalhos que se seguiram (ARAÚJO, 2016).

Neste trabalho ficou demonstrado que o segmento gênico V germinal da família VH10 tem a capacidade de formar anticorpos anti-DNA com um envolvimento crucial da CDRH2. Sendo estes segmentos germinais, essas características determinantes para a ligação estão presentes naturalmente no genoma dos indivíduos. Esse achado é importante, pois a ideia de segmentos gênicos com potencial autorreativo no *pool* gênico dos segmentos formadores de anticorpos levanta discussões relevantes sobre possível papel desenvolvido pela autorreatividade nos mecanismos de desenvolvimento em estágios iniciais das células do sistema imune adaptativo. Outros trabalhos nessa linha já demonstraram através de

experimentos com camundongos transgênicos que a seleção positiva de linfócitos B autorreativos ocorre mesmo utilizando-se segmentos V germinais com afinidade contra antígenos próprios (e.g. Thy-1 glicoproteína) resultando na expansão clonal e aumento das titulações do autoanticorpo secretado (HAYAKAWA *et al.*, 1999). A estrutura da cadeia SLC do pré-BCR com suas URs compostas de resíduos com cargas positivas que também facilitam interações com antígenos próprios, indica a existência de mecanismo selecionado evolutivamente para tal, sendo a autorreatividade requerida nesse estágio, porém não necessariamente o único mecanismo (KÖHLER *et al.*, 2008).

A participação dos resíduos de arginina da CDR2 envolvidos na ligação ao DNA já foi reportada anteriormente (RADIC e SEAL, 1997; RADIC e WEIGERT, 1995). No modelo scpre-BCR VH10, observa-se que há uma conservação estrutural do *loop* de CDR2 que promovem a formação de um arcabouço de aminoácidos hidropáticos com uma carga positiva acentuada devido a dois resíduos de arginina. Proteínas ricas em arginina conseguem se ligar eficientemente ao grupo fosfato do DNA em complexo com histonas pela formação de pontes de hidrogênio e pontes salinas (YUSUFALY *et al.*, 2014). Além disso, a interação forte entre grupos fosfato e de grupamento de argininas já foi demonstrada (JACKSON; WANG; WOODS, 2005).

Ainda que uma parte relevante dos anticorpos formados por VH10 depositados em banco de dados sejam reportados como anti-DNA, outros ficam de fora dessa categoria. Isso pode acontecer pelo fato de alguns desses anticorpos apresentarem reatividade cruzada com outros antígenos como é o caso do 4Z8F que foi primeiramente identificado como um anticorpo contra lipídeo A e posteriormente descobriu-se que também se ligava ao DNA (HAJI-GHASSEMI *et al.*, 2015). Outra possibilidade é a perda do arcabouço de ligação ao DNA provocada pela CDR3 selecionada e suas modificações após a recombinação da μ H que podem influenciar as interações e conformação final das CDRs (PEWZNER-JUNG; SIMON; EILAT, 1996), além da atuação da cadeia leve pareada para a formação do BCR (KALININA *et al.*, 2014).

A existência da autorreatividade apresentada por segmentos gênicos germinais, como os VH10, pode funcionar não apenas como viabilizadora da sinalização tônica necessária para proliferação, como também de forma indireta através de reatividade cruzada ao promover alguma proteção ao organismo contra organismos simbiotes ou patobiontes, visto que a reatividade contra o lipídeo A do 4Z8F foi observada anteriormente a sua capacidade de

ligação ao DNA. Do mesmo modo, a formação de anticorpos anti-fosfatidilcolina por segmentos murinos germinais da família VHQ52 reforça esta possibilidade (SEIDL *et al.*, 1999) já que estes dois componentes fazem parte da estrutura de membrana de vários microrganismos, muitos destes, presentes na microbiota o que explicaria a necessidade de existência de anticorpos com certa especificidade para estes antígenos antes da ocorrência das mutações somáticas e maturação de afinidade. Corroborando com a importância dos segmentos germinais, ou seja, segmentos não recombinados, e ainda que não reportada como geradora de anticorpos autorreativos, a família humana VH3-53 apresenta a capacidade de gerar anticorpos contra uma subunidade (RBD) da proteína S do SARS-Cov-2 capazes de promover a neutralização da atividade viral (YAN *et al.*, 2021). Esses achados demonstram a importância dos segmentos germinais V no desenvolvimento dos linfócitos B e na formação de anticorpos eficientes com certa independência da CDR3 para a ligação contra determinados antígenos.

7 CONCLUSÃO

As hipóteses iniciais deste trabalho acerca da tendência de formação de anticorpos anti-DNA por segmentos germinais oriundos da família VH10 e da participação crucial da CDR2 foram confirmadas pelos resultados experimentais e abordam questões importantes sobre o papel da autorreatividade no desenvolvimento do sistema imunológico adaptativo, aqui mais especificamente, dos linfócitos B. A compreensão completa acerca dos mecanismos que regem o desenvolvimento das células B são essenciais para o desenvolvimento de terapias para patologias derivadas de falhas no percurso normal desses mecanismos, como o surgimento de doenças autoimunes ou mesmo a utilização das vias utilizadas e especificidades desses mecanismos para tratamento de linfomas (RICKERT, 2013).

8 PERSPECTIVAS

São necessários mais estudos que testem nossa hipótese em outros cenários. O desenho de trabalhos que avaliem o potencial autorreativo de sequências germinais das outras famílias VH contra outros antígenos próprios poderia revelar se essa característica se faz presente de modo mais abrangente. Ensaio com camundongos transgênicos que expressem em suas regiões variáveis do receptor sequências como o scpre-BCR VH10 podem auxiliar em estudos de sinalização celular, expressão de genes alvos característico para expansão clonal que favoreçam a continuação do desenvolvimento e consequentemente a seleção positiva de repertórios autorreativos.

9 REFERÊNCIAS

- ALMQVIST, N.; MÅRTENSSON, I.-L. The pre-B cell receptor; selecting for or against autoreactivity. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 76, n. 3, p. 256–262, set. 2012.
- ARAUJO, R. P. DOS S. **Construção e produção de fragmentos de anticorpos anti-ssDNA em um contexto de desenvolvimento de linfócitos B**. Master—Brasília: Universidade de Brasília, 25 fev. 2016.
- ARBUCKLE, M. R. et al. Development of anti-dsDNA autoantibodies prior to clinical diagnosis of systemic lupus erythematosus. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 54, n. 1–2, p. 211–219, ago. 2001.
- BACKHAUS, O. Generation of Antibody Diversity. In: BÖLDICKE, T. (Ed.). . **Antibody Engineering**. [s.l.] InTech, 2018.
- BERNHEIM, A.; SOREK, R. The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 113–119, fev. 2020.
- BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. C. Adaptive immunity. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S33-40, fev. 2010.
- BRIGIDO, M. M.; POLYMENIS, M.; STOLLAR, B. D. Role of mouse VH10 and VL gene segments in the specific binding of antibody to Z-DNA, analyzed with recombinant single chain Fv molecules. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 150, n. 2, p. 469–479, 15 jan. 1993.
- BRIGIDO, M. M.; STOLLAR, B. D. Two induced anti-Z-DNA monoclonal antibodies use VH gene segments related to those of anti-DNA autoantibodies. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 146, n. 6, p. 2005–2009, 15 mar. 1991.
- BURBELO, P. D. et al. Autoantibodies Targeting Intracellular and Extracellular Proteins in Autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 548469, 2021.
- CHEN, C. et al. Deletion and editing of B cells that express antibodies to DNA. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 152, n. 4, p. 1970–1982, 15 fev. 1994.

CHEN, X.; ZARO, J. L.; SHEN, W.-C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 10, p. 1357–1369, out. 2013.

CHIEN, C.-H.; CHIANG, B.-L. Regulatory T cells induced by B cells: a novel subpopulation of regulatory T cells. **Journal of Biomedical Science**, v. 24, n. 1, p. 86, dez. 2017.

CHITRAY, M. et al. Diagnostic and Epitope Mapping Potential of Single-Chain Antibody Fragments Against Foot-and-Mouth Disease Virus Serotypes A, SAT1, and SAT3. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 475, 2020.

CHIU, M. L. et al. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. **Antibodies (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 4, 3 dez. 2019.

COJOCARU, M. et al. Manifestations of systemic lupus erythematosus. **Maedica**, v. 6, n. 4, p. 330–336, out. 2011.

DIAZ, M.; FLAJNIK, M. F.; KLINMAN, N. Evolution and the molecular basis of somatic hypermutation of antigen receptor genes. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 356, n. 1405, p. 67–72, 29 jan. 2001.

DU PRÉ, M. F. et al. B cell tolerance and antibody production to the celiac disease autoantigen transglutaminase 2. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 2, 3 fev. 2020.

EARLY, P. et al. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. **Cell**, v. 19, n. 4, p. 981–992, abr. 1980.

EGAWA, T. et al. The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor. **Immunity**, v. 15, n. 2, p. 323–334, ago. 2001.

EISEN, H. N.; CHAKRABORTY, A. K. Evolving concepts of specificity in immune reactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 52, p. 22373–22380, 28 dez. 2010.

EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v. 66, n. Pt 4, p. 486–501, abr. 2010.

EVENS, R. P.; WITCHER, M. Biotechnology: an introduction to recombinant DNA technology and product availability. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 15, n. 6, p. 514–520, dez. 1993.

FLYNN, S. et al. CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 2, p. 297–304, 20 jul. 1998.

FRIESS, M. D.; PLUHACKOVA, K.; BÖCKMANN, R. A. Structural Model of the mIgM B-Cell Receptor Transmembrane Domain From Self-Association Molecular Dynamics Simulations. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2947, 2018.

GASTEIGER, G. et al. Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. **Journal of Innate Immunity**, v. 9, n. 2, p. 111–125, 2017.

GAULD, S. B.; MERRELL, K. T.; CAMBIER, J. C. Silencing of autoreactive B cells by anergy: a fresh perspective. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 3, p. 292–297, jun. 2006.

GAUTHIER, L. et al. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 20, p. 13014–13019, 1 out. 2002.

GAY, D. et al. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 4, p. 999–1008, 1 abr. 1993.

GHASEMI, N.; RAZAVI, S.; NIKZAD, E. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. **Cell Journal**, v. 19, n. 1, p. 1–10, jun. 2017.

GLANVILLE, J. et al. Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 48, p. 20216–20221, 1 dez. 2009.

HACKETT, C. J. Innate immune activation as a broad-spectrum biodefense strategy: prospects and research challenges. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 4, p. 686–694, out. 2003.

HAJI-GHASSEMI, O. et al. Structural Basis for Antibody Recognition of Lipid A: INSIGHTS TO POLYSPECIFICITY TOWARD SINGLE-STRANDED DNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 32, p. 19629–19640, 7 ago. 2015.

HAYAKAWA, K. et al. Positive selection of natural autoreactive B cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 285, n. 5424, p. 113–116, 2 jul. 1999.

HERRON, J. N. et al. An autoantibody to single-stranded DNA: comparison of the three-dimensional structures of the unliganded Fab and a deoxynucleotide-Fab complex. **Proteins**, v. 11, n. 3, p. 159–175, 1991.

HERSHKO, A. Y.; RIVERA, J. Mast cell and T cell communication; amplification and control of adaptive immunity. **Immunology Letters**, v. 128, n. 2, p. 98–104, 16 fev. 2010.

HIRANO, M. et al. The evolution of adaptive immunity in vertebrates. **Advances in Immunology**, v. 109, p. 125–157, 2011.

HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J.-M. Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. **Nature Immunology**, v. 3, n. 2, p. 121–126, fev. 2002.

HORVATH, P.; BARRANGOU, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, n. 5962, p. 167–170, 8 jan. 2010.

IVERSEN, R.; SOLLID, L. M. Autoimmunity provoked by foreign antigens. **Science (New York, N.Y.)**, v. 368, n. 6487, p. 132–133, 10 abr. 2020.

JACKSON, S. N.; WANG, H.-Y. J.; WOODS, A. S. Study of the fragmentation patterns of the phosphate-arginine noncovalent bond. **Journal of Proteome Research**, v. 4, n. 6, p. 2360–2363, dez. 2005.

JINEK, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 17 ago. 2012.

KALININA, O. et al. Light chain editors of anti-DNA receptors in human B cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 2, p. 357–364, 10 fev. 2014.

KENNY, E. F. et al. Dnase1-deficient mice spontaneously develop a systemic lupus erythematosus-like disease. **European Journal of Immunology**, v. 49, n. 4, p. 590–599, abr. 2019.

KENNY, J. J. et al. Autoreactive B cells escape clonal deletion by expressing multiple antigen receptors. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 164, n. 8, p. 4111–4119, 15 abr. 2000.

KEREN, Z. et al. Modification of ligand-independent B cell receptor tonic signals activates receptor editing in immature B lymphocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 14, p. 13418–13424, 2 abr. 2004.

KHAN, S. et al. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. **International Journal of Genomics**, v. 2016, p. 2405954, 2016.

KHANTASUP, K. et al. Design and Generation of Humanized Single-chain Fv Derived from Mouse Hybridoma for Potential Targeting Application. **Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy**, v. 34, n. 6, p. 404–417, dez. 2015.

KIKUCHI, K. et al. IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 8, p. 1197–1203, 18 abr. 2005.

KITAMURA, D. et al. A critical role of lambda 5 protein in B cell development. **Cell**, v. 69, n. 5, p. 823–831, 29 maio 1992.

KLINE, G. H. et al. Pre-B cell receptor-mediated selection of pre-B cells synthesizing functional mu heavy chains. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 161, n. 4, p. 1608–1618, 15 ago. 1998.

KNOLL, M. et al. The non-Ig parts of the VpreB and λ 5 proteins of the surrogate light chain play opposite roles in the surface representation of the precursor B cell receptor. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 188, n. 12, p. 6010–6017, 15 jun. 2012.

KÖHLER, F. et al. Autoreactive B cell receptors mimic autonomous pre-B cell receptor signaling and induce proliferation of early B cells. **Immunity**, v. 29, n. 6, p. 912–921, 19 dez. 2008.

KUMAR, S. et al. Neutrophil Extracellular Traps: Formation and Involvement in Disease Progression. **Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology**, v. 17, n. 3, p. 208–220, jun. 2018.

KUNIK, V.; PETERS, B.; OFRAN, Y. Structural consensus among antibodies defines the antigen binding site. **PLoS computational biology**, v. 8, n. 2, p. e1002388, 2012.

KURD, N.; ROBEY, E. A. T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. **Immunological Reviews**, v. 271, n. 1, p. 114–126, maio 2016.

KUWAHARA, K. et al. Cross-linking of B cell antigen receptor-related structure of pre-B cell lines induces tyrosine phosphorylation of p85 and p110 subunits and activation of phosphatidylinositol 3-kinase. **International Immunology**, v. 8, n. 8, p. 1273–1285, ago. 1996.

LANG, J. et al. Enforced Bcl-2 expression inhibits antigen-mediated clonal elimination of peripheral B cells in an antigen dose-dependent manner and promotes receptor editing in autoreactive, immature B cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 9, p. 1513–1522, 3 nov. 1997.

MA, Y. et al. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. **Cell**, v. 108, n. 6, p. 781–794, 22 mar. 2002.

MARANHÃO, A. Q. et al. A Mouse Variable Gene Fragment Binds to DNA Independently of the BCR Context: A Possible Role for Immature B-Cell Repertoire Establishment. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e72625, 2 set. 2013.

MARANHÃO, A. Q.; BRÍGIDO, M. M. Expression of anti-Z-DNA single chain antibody variable fragment on the filamentous phage surface. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 5, p. 569–579, maio 2000.

MARSHALL, J. S. et al. An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma, and Clinical Immunology: Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology**, v. 14, n. Suppl 2, p. 49, 2018.

MÅRTENSSON, I.-L. et al. The pre-B cell receptor checkpoint. **FEBS letters**, v. 584, n. 12, p. 2572–2579, 18 jun. 2010.

MASUDA, K. et al. The role of interface framework residues in determining antibody V(H)/V(L) interaction strength and antigen-binding affinity. **The FEBS journal**, v. 273, n. 10, p. 2184–2194, maio 2006.

MELCHERS, F. Checkpoints that control B cell development. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 6, p. 2203–2210, jun. 2015.

MILLER, K. D. et al. Production, purification, and characterization of human scFv antibodies expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 42, n. 2, p. 255–267, ago. 2005.

MINEGISHI, Y.; HENDERSHOT, L. M.; CONLEY, M. E. Novel mechanisms control the folding and assembly of lambda5/14.1 and VpreB to produce an intact surrogate light chain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 6, p. 3041–3046, 16 mar. 1999.

MIZOGUCHI, A. et al. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. **Immunity**, v. 16, n. 2, p. 219–230, fev. 2002.

MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 240–273, Table of Contents, abr. 2009.

MORSTADT, L. et al. Engineering and characterization of a single chain surrogate light chain variable domain. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 17, n. 3, p. 458–465, mar. 2008.

MUCIDA, D. et al. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 7, p. 1923–1933, jul. 2005.

MYERS, D. R.; ZIKHERMAN, J.; ROOSE, J. P. Tonic Signals: Why Do Lymphocytes Bother? **Trends in Immunology**, v. 38, n. 11, p. 844–857, nov. 2017.

NEMAZEE, D. Mechanisms of central tolerance for B cells. **Nature Reviews. Immunology**, v. 17, n. 5, p. 281–294, maio 2017.

NEMAZEE, D.; BUERKI, K. Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 20, p. 8039–8043, out. 1989.

NETEA, M. G. et al. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. **Cell Host & Microbe**, v. 25, n. 1, p. 13–26, 9 jan. 2019.

PARKER, M. J. et al. The pre-B-cell receptor induces silencing of VpreB and lambda5 transcription. **The EMBO journal**, v. 24, n. 22, p. 3895–3905, 16 nov. 2005.

PERSSON, H. et al. CDR-H3 diversity is not required for antigen recognition by synthetic antibodies. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 4, p. 803–811, 22 fev. 2013.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.

PEWZNER-JUNG, Y.; SIMON, T.; EILAT, D. Structural elements controlling anti-DNA antibody affinity and their relationship to anti-phosphorylcholine activity. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 156, n. 8, p. 3065–3073, 15 abr. 1996.

RADIC, M. Z.; SEAL, S. N. Selection of recurrent V genes and somatic mutations in autoantibodies to DNA. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 11, n. 1, p. 20–26, jan. 1997.

RADIC, M. Z.; WEIGERT, M. Origins of anti-DNA antibodies and their implications for B-cell tolerance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 764, p. 384–396, 29 set. 1995.

REPASKY, J. A. E. et al. Mutational analysis of terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated N-nucleotide addition in V(D)J recombination. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 172, n. 9, p. 5478–5488, 1 maio 2004.

RICKERT, R. C. New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. **Nature Reviews. Immunology**, v. 13, n. 8, p. 578–591, ago. 2013.

RIERA ROMO, M.; PÉREZ-MARTÍNEZ, D.; CASTILLO FERRER, C. Innate immunity in vertebrates: an overview. **Immunology**, v. 148, n. 2, p. 125–139, jun. 2016.

RODRIGO, G.; GRUVEGÅRD, M.; VAN ALSTINE, J. Antibody Fragments and Their Purification by Protein L Affinity Chromatography. **Antibodies**, v. 4, n. 3, p. 259–277, 11 set. 2015.

ROSSI, B. et al. Clustering of pre-B cell integrins induces galectin-1-dependent pre-B cell receptor relocalization and activation. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 177, n. 2, p. 796–803, 15 jul. 2006.

SAFERDING, V.; BLÜML, S. Innate immunity as the trigger of systemic autoimmune diseases. **Journal of Autoimmunity**, v. 110, p. 102382, jun. 2020.

SAKAGUCHI, S.; WING, K.; YAMAGUCHI, T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 9, p. 2331–2336, set. 2009.

SAMMICHELI, S. et al. IL-7 modulates B cells survival and activation by inducing BAFF and CD70 expression in T cells. **Journal of Autoimmunity**, v. 38, n. 4, p. 304–314, jun. 2012.

SEDER, R. A.; AHMED, R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. **Nature Immunology**, v. 4, n. 9, p. 835–842, set. 2003.

SEIDL, K. J. et al. Predominant VH genes expressed in innate antibodies are associated with distinctive antigen-binding sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 5, p. 2262–2267, 2 mar. 1999.

SHIMIZU, T. et al. VpreB1/VpreB2/lambda 5 triple-deficient mice show impaired B cell development but functional allelic exclusion of the IgH locus. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 168, n. 12, p. 6286–6293, 15 jun. 2002.

STRITESKY, G. L.; JAMESON, S. C.; HOGQUIST, K. A. Selection of self-reactive T cells in the thymus. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 95–114, 2012.

SU, Y.-W. et al. Identification of a pre-BCR lacking surrogate light chain. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 11, p. 1699–1706, 1 dez. 2003.

TAPRYAL, S. et al. Structural evaluation of a mimicry-recognizing paratope: plasticity in antigen-antibody interactions manifests in molecular mimicry. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 191, n. 1, p. 456–463, 1 jul. 2013.

TONEGAWA, S. Somatic generation of antibody diversity. **Nature**, v. 302, n. 5909, p. 575–581, 14 abr. 1983.

TSAI, D.-Y. et al. Regulatory mechanisms of B cell responses and the implication in B cell-related diseases. **Journal of Biomedical Science**, v. 26, n. 1, p. 64, 1 set. 2019.

TSUCHIYA, Y.; MIZUGUCHI, K. The diversity of H3 loops determines the antigen-binding tendencies of antibody CDR loops. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 25, n. 4, p. 815–825, abr. 2016.

VANGONE, A. et al. COCOMAPS: a web application to analyze and visualize contacts at the interface of biomolecular complexes. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 27, n. 20, p. 2915–2916, 15 out. 2011.

VETTERMANN, C.; JÄCK, H.-M. The pre-B cell receptor: turning autoreactivity into self-defense. **Trends in Immunology**, v. 31, n. 5, p. 176–183, maio 2010.

WANG, P.; ZHENG, S. G. Regulatory T cells and B cells: implication on autoimmune diseases. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 6, n. 12, p. 2668–2674, 2013.

WARDEMANN, H. et al. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 301, n. 5638, p. 1374–1377, 5 set. 2003.

WASSERMAN, R.; LI, Y. S.; HARDY, R. R. Down-regulation of terminal deoxynucleotidyl transferase by Ig heavy chain in B lineage cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 158, n. 3, p. 1133–1138, 1 fev. 1997.

WATSON, C. T.; BREDEN, F. The immunoglobulin heavy chain locus: genetic variation, missing data, and implications for human disease. **Genes and Immunity**, v. 13, n. 5, p. 363–373, jul. 2012.

WEBB, B.; SALI, A. Protein structure modeling with MODELLER. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1137, p. 1–15, 2014.

WILLIAMS, C. J. et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 27, n. 1, p. 293–315, jan. 2018.

WINKLER, T. H. et al. Precursor B cells of mouse bone marrow express two different complexes with the surrogate light chain on the surface. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 2, p. 446–450, fev. 1995.

WONG, W. K.; LEEM, J.; DEANE, C. M. Comparative Analysis of the CDR Loops of Antigen Receptors. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2454, 2019.

XING, Y. et al. Late stages of T cell maturation in the thymus involve NF- κ B and tonic type I interferon signaling. **Nature Immunology**, v. 17, n. 5, p. 565–573, maio 2016.

YAN, Q. et al. Germline IGHV3-53-encoded RBD-targeting neutralizing antibodies are commonly present in the antibody repertoires of COVID-19 patients. **Emerging Microbes & Infections**, v. 10, n. 1, p. 1097–1111, dez. 2021.

YARKONI, Y.; GETAHUN, A.; CAMBIER, J. C. Molecular underpinning of B-cell anergy. **Immunological Reviews**, v. 237, n. 1, p. 249–263, set. 2010.

YUSUFALY, T. I. et al. Arginine-phosphate salt bridges between histones and DNA: intermolecular actuators that control nucleosome architecture. **The Journal of Chemical Physics**, v. 141, n. 16, p. 165102, 28 out. 2014.

ZENEWICZ, L. A. et al. Unraveling the genetics of autoimmunity. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 791–797, 19 mar. 2010.

ZHANG, W. et al. Specific cross-reaction of anti-dsDNA antibody with platelet integrin GPIIIa49-66. **Autoimmunity**, v. 43, n. 8, p. 682–689, dez. 2010.

ZOCHLING, J. et al. An Immunochip-based interrogation of scleroderma susceptibility variants identifies a novel association at DNASE1L3. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 5, p. 438, 21 out. 2014.

ZOUALI, M.; LA CAVA, A. Editorial: Innate Immunity Pathways in Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1245, 2019.