

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

MAIKEL VARAL

**ORIGEM E EVOLUÇÃO DA REDE IMUNE INTESTINAL DE SÍNTESE DE IgA:
UMA ABORDAGEM DE BIOLOGIA DE SISTEMAS**

Porto Alegre

2019

MAIKEL VARAL

**ORIGEM E EVOLUÇÃO DA REDE IMUNE INTESTINAL DE SÍNTESE DE IgA:
UMA ABORDAGEM DE BIOLOGIA DE SISTEMAS**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado como
requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Co-orientadora: Alana de Castro Panzenhagen

**Porto Alegre
2018**

Introdução estendida

A evolução dos animais foi moldada pelos diferentes tipos de interações que estabelecem com a grande diversidade e abundância de microrganismos existentes. Historicamente, os primeiros estudos destas formas de vida estiveram diretamente associados a patologias e prejuízos ao ser humano. A elucidação de mecanismos imunes complexos que existem nos animais reforçou a ideia da importância de se defender contra eles. No entanto, recentemente, a perspectiva de que a população de microrganismos que habitam as diferentes partes do corpo dos animais constitui apenas uma ameaça ao hospedeiro, tem sido gradativamente mudada perante ao corpo de evidências que demonstram a importância destes em diversos processos fisiológicos (FADLALLAH et al., 2018; SOMMER; BÄCKHED, 2013).

A população microbiana presente no trato digestório (TD) de mamíferos é extremamente complexa, composta por trilhões de microrganismos com milhares de espécies (ECKBURG et al., 2005). Esta comunidade está separada do interior do hospedeiro por apenas uma camada de células, em decorrência da função absorptiva do intestino. Esta função fisiológica torna-o uma região com alta suscetibilidade à invasão de patógenos (MICHIELAN; D'INCÀ, 2015). Mas, ao mesmo tempo, o intercâmbio metabólico, associado a grande quantidade de nutrientes, possibilitou que relações mutualísticas se estabelecessem. Enquanto que os microrganismos se beneficiam da grande quantidade de nutrientes, o hospedeiro tem o processamento de digestão otimizado, além de defesa contra patógenos. Mais do que isso, recentemente têm se demonstrado a importância desta comunidade microbiana em muitos outros processos fisiológicos do ser humano, como maturação e modulação do sistema imune e síntese de neurotransmissores, e a sua desregulação com diversas patologias (SOMMER; BÄCKHED, 2013).

A estabilidade desse ecossistema depende de vários mecanismos fisiológicos e imunes do hospedeiro. Apesar de não serem propriamente patógenos, a passagem dos organismos que compõem a microbiota intestinal, denominados de comensais, através da barreira intestinal, pode causar sérios problemas ao hospedeiro. Além disso, se fazem necessárias respostas imunes que diferenciam patógenos de comensais, atacando os primeiros e tolerando os segundos. Dessa forma, durante a evolução dos animais, mecanismos imunes específicos evoluíram de forma a atuar no intestino, mantendo a homeostase intestinal e permitindo que

estas relações complexas se estabelecessem (HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012; LEY et al., 2008).

Os mecanismos de defesa mais antigos constituem-se dos mecanismos inatos. A primeira barreira de defesa se dá por uma dupla camada de muco e de peptídeos antimicrobianos que, em conjunto, impedem o contato dos microrganismos com o epitélio intestinal. Caso essa barreira seja ultrapassada, células imunes como neutrófilos são recrutados, encapsulando os microrganismos e impedindo o contato com o epitélio (PETERSON; ARTIS, 2014). Apesar destes mecanismos serem eficientes na defesa, a resposta inflamatória associada pode comprometer a microbiota e as funções do intestino. Além disso, o reconhecimento inato não permite respostas específicas com diversidade, principalmente perante ao grande número de espécies encontradas no TD (MOLLOY et al., 2013).

A evolução do sistema imune adaptativo (SIA), em contrapartida, não apenas tornou possível o reconhecimento específico com diversidade, como também a geração de memória imunológica. Através dos MHC de classe I e II, possibilitou-se a apresentação de antígenos aos receptores de células T, que, com sua geração por rearranjo genômico, pode, virtualmente, reconhecer qualquer antígeno em potencial. Mais do que isso, com a diferenciação em seus diferentes subtipos, pode regular e direcionar respostas imunes de defesa e tolerância. As células B possuem o receptor BCR, também gerado por rearranjo genômico. Quando ativados, diferenciam-se em plasmócitos, secretando anticorpos. Estas moléculas se ligam especificamente a antígenos, possuindo diversas funções efetoras e sinalizadoras. Assim, com a evolução do SIA, houve uma mudança qualitativa na forma pela qual o hospedeiro pode lidar com patógenos e comensais (FLAJNIK; KASAHARA, 2010; ZHAO; ELSON, 2018).

O SIA pode regular os mecanismos imunes inatos, no entanto, o reconhecimento específico com diversidade no lúmen do TD é feito por anticorpos. A principal imunoglobulina secretada nas mucosas em mamíferos é a imunoglobulina A (IgA). Calcula-se que 80% dos plasmócitos em mamíferos estejam na lâmina própria do intestino e secretem IgA (FAGARASAN et al., 2010). Em seres humanos, mesmo em estado de homeostase, são secretadas quatro gramas de IgA diariamente (PABST, 2012). A IgA é extremamente importante na defesa contra patógenos. Além disso, mesmo em estados de homeostase, a IgA se liga a milhares de microrganismos, principalmente no intestino delgado. Recentemente, estudos

que associaram RNA-seq com citometria de fluxo demonstraram que a IgA se liga a táxons específicos. Apesar das funções efetoras da IgA ainda estarem longe de serem totalmente esclarecidas, diversas funções já foram observadas, e elas podem variar conforme o táxon ao qual ela se liga, assim como pelo estado do intestino. Assim, seus mecanismos envolvem a neutralização de patógenos e toxinas, inativação de antígenos, ligação e transporte de antígenos para os tecidos linfoides secundários do intestino, formação de criptas que permitem a proliferação de táxons específicos e até mesmo a modulação da expressão gênica de bactérias (BUNKER; BENDELAC, 2018).

A síntese de IgA pode ocorrer tanto de forma dependente como independente de células T. A via independente está relacionada com a geração de IgA polirreativa, que se liga extensivamente à microbiota, e pode ocorrer mesmo sem a necessidade de antígenos exógenos. Já foi demonstrada que a diferenciação e a troca de classe das células B em plasmócitos desta via pode ser estimulada por moléculas produzidas por células epiteliais do intestino quando expostas a antígenos da microbiota (BUNKER et al., 2017). A via dependente de células B ocorre nos nódulos linfáticos isolados do intestino e nas placas de Peyer. A sua síntese envolve alta hipermutação somática e maturação de afinidade. Sua função está diretamente associada com respostas a patógenos, mas também com a modulação da microbiota (FAGARASAN et al., 2010).

Apesar de, recentemente, diversos trabalhos terem sido realizados a fim de elucidar os mecanismos que regulam a síntese e as funções da IgA, poucos estudos analisaram a evolução dos genes desta via. Atualmente, com o grande aumento de organismos com o genoma totalmente sequenciado, disponibilizados em bases de dados públicas, novas abordagens em estudos evolutivos têm se tornado possíveis. As informações de quais genes estão relacionadas nas vias, bem como as interações entre proteínas, estão sendo extensivamente disponibilizadas (VON MERING et al., 2005). Frente à grande quantidade de informação presente, a biologia de sistemas têm se demonstrado uma ferramenta importante na elucidação tanto de mecanismos fisiológicos, tratamento de doenças, como em estudos evolutivos.

Dessa forma, a análise da origem evolutiva dos genes que compõem a via de IgA, comparada com outros processos imunes, poderia esclarecer suas dinâmicas evolutivas. Além disso, a análise da essencialidade de seus genes, associados com

parâmetros topológicos das redes, pode contribuir com a elucidação da via. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar, através de uma abordagem de biologia de sistemas, como os genes da via imune intestinal de síntese de IgA se inter-relacionam com outros processos do sistema imune adaptativo em termos de surgimento, plasticidade e integração.

Artigo a ser submetido para a revista *Mucosal Immunology*

A EVOLUÇÃO RECENTE DA VIA IMUNE INTESTINAL DE SÍNTESE DE IgA EM COMPARAÇÃO COM OUTROS PROCESSOS DO SISTEMA IMUNE ADAPTATIVO

Maikel Varal¹; Alana Castro Panzenhagen¹; Alexandre Kleber Silveira¹; José Cláudio Fonseca Moreira¹

¹Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

*E-mail: maikelvaral@yahoo.com.br.

Resumo

O trato digestório humano abriga trilhões de microrganismos em seu interior. Esta comunidade microbiana, ao mesmo tempo que cumpre diversas funções ao hospedeiro, também representa uma grande ameaça. A IgA é o principal anticorpo secretado em mamíferos, e desempenha um grande papel na defesa contra patógenos e modulação da microbiota intestinal, contribuindo para a homeostase do intestino. Neste trabalho, avaliamos a origem e a plasticidade evolutiva dos genes que compõem a via imune intestinal de síntese de IgA (via de IgA), comparando com outras vias do sistema imune adaptativo (SIA), através de uma abordagem de biologia de sistemas. Para isso, foram buscados os grupos ortólogos de cada gene, bem como informações de abundância e diversidade de seus componentes. Uma rede de interação proteica da via de IgA foi construída. Nossos resultados demonstram uma origem mais recente da via de IgA quando comparada com outros processos do SIA. Os *Hubs* da via de IgA são constituídos majoritariamente por HLAs, que apresentam uma alta plasticidade evolutiva. Os *bottlenecks* são principalmente genes envolvidos na co-estimulação de células B e T, e apresentam uma plasticidade evolutiva menor. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a via de IgA foi uma adaptação secundária do SIA, constituindo-se de uma evolução a partir dos mecanismos imunes adaptativos centrais.

Introdução

O trato digestório humano (TDH) abriga uma comunidade extremamente diversa em seu interior, contabilizando trilhões de micro-organismos com mais de mil espécies diferentes.¹ Em decorrência de sua função absorptiva, apresenta uma permeabilidade relativamente alta, tornando-se uma importante via de entrada para patógenos e/ou de suas toxinas.² Ao mesmo tempo, a comunidade de organismos presentes possuem mais de nove milhões de genes únicos, e estabelece diversas relações com o hospedeiro.³ Nas últimas décadas, diversos estudos têm demonstrado a importância da microbiota intestinal em uma variedade de processos fisiológicos, contribuindo para a homeostase do trato digestório e do organismo como um todo. Dentre os principais papéis se destacam a digestão de carboidratos complexos, síntese de vitaminas, competição com patógenos e maturação e homeostase do sistema imune.⁴

Esta comunidade microbiana representa um grande desafio para os mecanismos clássicos do sistema imune. No TDH há uma grande quantidade de antígenos da dieta e de comensais. A passagem dos microrganismos e/ou de seus metabólitos através da barreira intestinal pode comprometer o hospedeiro.⁵ Além disso, existem espécies patogênicas. Para que as relações complexas observadas hoje entre a microbiota e os vertebrados pudesse existir, mecanismos imunes específicos evoluíram no intestino, de forma a permitir a separação dos microrganismos das células epiteliais, tolerar organismos comensais e se defender contra patógenos, bem como modular a composição dos diferentes táxons.⁶

Os mecanismos imunes inatos que atuam no TDH constituem-se principalmente da barreira de muco, peptídeos microbianos e células linfoides inatas. Apesar de haver diferenças no intestino grosso e delgado, esses mecanismos, em conjunto, atuam de forma a confinar os microrganismos no lúmen do TDH, impedindo a invasão, danos ao tecido, e hiperestimulação imune. Além disso, modulam a composição microbiana.⁷ Com a evolução do sistema imune adaptativo (SIA), novos mecanismos regulatórios e efetores se tornaram possíveis. Graças aos mecanismos de geração de receptores através de rearranjo genômico, possibilitou-se o reconhecimento específico com diversidade, além de memória imunológica. Além disso, através dos linfócitos T, desenvolveram-se mecanismos regulatórios capazes de inibir ou direcionar respostas imunes específicas.⁸

A imunoglobulina A (IgA) é o principal anticorpo secretado nas mucosas, e é também o anticorpo secretado em maior quantidade pelo ser humano. Ela foi encontrada em mamíferos, répteis e aves, e calcula-se que, em seres humanos, pelo menos 80% dos plasmócitos estejam na lâmina própria do intestino e secretem IgA.⁹ A sua síntese é regulada de diferentes formas, e pode ocorrer tanto de forma dependente como independente de células T. A via dependente envolve uma alta hipermutação somática e maturação de afinidade. Foi demonstrada a importância dessa via na manutenção da diversidade e estabilidade da microbiota, além da sua importância na defesa contra patógenos.¹⁰ A via independente está relacionada com a produção de IgA polirreativa, com baixa ou nenhuma mutação somática e maturação de afinidade. A IgA da via independente se liga a uma grande variedade de bactérias, principalmente no intestino delgado.¹¹ As placas de Peyer são consideradas os principais locais de indução e troca de classe, no entanto já foi evidenciado nos folículos linfáticos isolados, nódulos linfáticos mesentéricos e *in situ* na lâmina própria.¹²

A deficiência seletiva de IgA é a imunodeficiência primária mais comum em seres humanos.¹³ Nos indivíduos acometidos, ocorre a secreção de IgM de forma compensatória. Apesar de muitas vezes ser descrita como assintomática, já se evidenciou uma propensão moderada a alergias, doenças autoimunes e infecções respiratórias.¹⁴ Além disso, apresentam uma microbiota intestinal alterada, com redução da diversidade geral e modificação da proporção de táxons microbianos.^{15,16} Os mecanismos efetores da IgA no intestino são variáveis e ainda precisam ser esclarecidos, no entanto, já se demonstrou a sua participação na neutralização de patógenos e toxinas, exclusão de antígenos, transcitose de antígenos do lúmen do intestino através do epitélio, e até mesmo a modulação da expressão gênica de microrganismos.¹⁷ Assim, em conjunto, esses estudos sugerem que a via de IgA tem um grande papel na interação entre o hospedeiro e comensais, contribuindo para homeostase intestinal.

Apesar de existirem estudos que discutem a evolução das vias de células T e seus subtipos no intestino,¹⁸ os trabalhos que analisam as origens evolutivas da via de IgA são escassos e focam em poucos genes.¹⁹ Atualmente, com a disponibilização de genomas totalmente sequenciados, bem como interações entre proteínas, em bases de dados públicas, novas abordagens têm sido possíveis em estudos evolutivos. A comparação entre as origens evolutivas dos genes que

compõem a via de IgA com outros processos do SIA poderia esclarecer as dinâmicas evolutivas desta via. Além disso, informações de essencialidade de seus genes, em uma análise filogenética profunda, poderia contribuir para a elucidação de seus mecanismos. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar, através de uma abordagem de biologia de sistemas, como os genes da via imune intestinal de síntese de IgA se caracterizam em termos de surgimento, plasticidade e integração quando comparados com outros processos do SIA.

Métodos

Busca das vias e genes

Os genes correspondentes a cada processo foram coletados na base de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (www.genome.jp/kegg/pathway) e *Reactome Pathway Database* (<https://reactome.org/PathwayBrowser/>). Os processos analisados estão descritos na Tab.1.

Tab.1 Processos analisados das bases de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) e *Reactome*.

Base de dados	Entry	Nome da via
KEEG	04672	Via imune intestinal de síntese de IgA
KEEG	04662	Via de sinalização de receptores de células B
KEEG	04659	Via de sinalização de receptores de células T
KEEG	04658	Diferenciação em Th17
KEEG	04660	Diferenciação em Th1 e Th2
<i>Reactome</i>		Sistema imune adaptativo

Para verificar como os diferentes processos se inter-relacionam em termos de sobreposição e exclusividade de seus genes, foi construído um gráfico do tipo

Upset. Este gráfico permite a visualização do número de elementos únicos e compartilhados entre diferentes conjuntos de dados.²⁰

Busca dos grupos ortólogos

Os grupos ortólogos (OG) de cada gene foram coletados a partir do *String-DB*, através da busca das famílias proteicas. Esta base de dados obtém dados de homologia a partir da base de dados COG.²¹ O *String-DB* expandiu as informações de ortologia para mais espécies e genes, criando os NOG (*non supervised orthologous groups*). A metodologia de anotação de Clusters de Grupos Ortólogos de Proteínas (COG) é bastante robusta e une genes de maneira confiável com função equivalente.^{22, 23, 24}

Análise de raiz

Uma árvore de consenso de Eucariotos foi construída a partir das informações do *String-DB v.10.5*. As análises foram realizadas com o pacote *geneplast* no ambiente R, utilizando um método computacional para reconstruir o cenário evolutivo de cada processo nos eucariotos. A raiz evolutiva dos genes foi inferida a partir de suas informações de ortologia, nas quais foi definida a raiz dos diferentes genes com base em sua distribuição de ortólogos, calculando a raiz mais parcimoniosa. Essa metodologia é totalmente descrita aqui.²⁵

Os dados de raiz foram analisados através das curvas de Kolmogorov-Smirnov para variáveis discretas. Esta análise considerou o aparecimento de genes na função da raiz (da mais antiga à mais recente). A análise estatística e o gráfico da raiz foram feitos no aplicativo *GraphPad Prism 7*. Foram coletadas informações do tempo de divergência estimado das espécies na base de dados pública *TimeTree* (<http://www.timetree.org/>). Esta base compila estudos de tempos de divergência disponíveis na literatura, bem como um tempo estimado.²⁶

Análise de plasticidade

Também comparamos os genes de cada processo quanto a sua conservação através do cálculo de um índice de plasticidade. A plasticidade evolutiva foi estimada para cada OG associado às proteínas nas vias. Essa análise foi realizada utilizando o pacote *geneplast* no ambiente R, levando em consideração a diversidade e abundância de cada OG. A medida de diversidade utiliza informações

acerca da presença ou ausência dos OG em diferentes espécies da árvore filogenética, utilizando-se da teoria de informação de Shannon. Um OG com uma diversidade máxima indica que ele surgiu cedo na evolução e apresenta uma distribuição homogênea, ou seja, está presente em todas as espécies. A medida de abundância contabiliza o número de duplicações dos componentes de cada OG. O método é totalmente descrito previamente.²⁷

Os dados referentes à inferência de plasticidade foram avaliados através do teste de Kruskal-Wallis e *post hoc* de *Dunn*, usando o pacote R *Dunn*. Foram calculados também os genes com baixa diversidade e abundância, alta diversidade e baixa abundância, e genes com alta diversidade e abundância da via de IgA. O parâmetro utilizado foi a mediana, dado que os valores não são paramétricos.

Análise de rede

As informações das interações proteína-proteína para a via IgA foram acessadas na base de dados *String-DB v.11*. As fontes de interação ativas utilizadas foram apenas banco de dados e experimentos, e a pontuação mínima de interação necessária foi alta confiança (0,700). No *Cytoscape*, construímos a rede de interação proteína-proteína (PPI) e a analisamos através do aplicativo *Network Analyzer*.²⁸

Os parâmetros de rede utilizados foram *degree* e *betweenness centrality*. Degree é definido como o número de conexões que um nó estabelece com outros, e os nós com alto grau de conexão são denominados de *Hubs*. O parâmetro *betweenness centrality* conta a fração dos caminhos mais curtos que passam por um determinado nó, e reflete a quantidade de controle que esse nó exerce sobre as interações de outros nós na rede. Genes com alto valor de *betweenness centrality* são denominados de *Bottlenecks*.²⁹ Não há critérios únicos para definir *Hubs* e *Bottlenecks* em uma rede sem escala. Neste trabalho, eles foram definidos como as proteínas com valores de *degree* e *betweenness centrality* acima da média da rede.³⁰

Resultados

Análise de raiz

O número total de genes de cada processo, bem como o número de genes analisados e sua respectiva porcentagem são mostrados na tab.2. Isso decorre do

fato de nem todos os genes possuírem o OG identificado no *String-DB*. A via IgA possui 49 genes e apenas cinco não tiveram seus ortólogos encontrados, e, portanto, não foram analisados. Todos os processos, exceto o sistema imune adaptativo total, tiveram mais de 80% de seus genes analisados.

Tabela.1 Número de genes de cada processo nas bases de dados e o número de genes com análise de raiz e plasticidade. É demonstrado a também a porcentagem de genes analisados.

Nome da via*	Genes totais	Genes analisados	Porcentagem
Via de IgA	49	44	89,79
Células B	71	66	92,95
Células T	101	95	94,05
Th1 e Th2	92	88	95,65
Th17	107	102	95,32
Sistema imune adaptativo total	851	642	75,44

*Via de IgA: Via imune intestinal de síntese de IgA. Células B: via de sinalização de células B. Células T: via de sinalização de células T. Th1 e Th2: diferenciação celular em Th1 e Th2. Th7: diferenciação celular em Th17.

O gráfico UpSet é mostrado na fig.1. A via IgA possui 24 genes exclusivos e compartilha 14 com Th17 e Th1 e Th2. A interseção considerando apenas os genes analisados também foi feita e está disponível na FigS1. A via de IgA perde um gene exclusivo e quatro das interseções. Os genes cujo OG não foi encontrado são: *HLA-DRB3*, *ICOSL*, *HLA-DRB4*, *IGH* e *MAP3K14*.

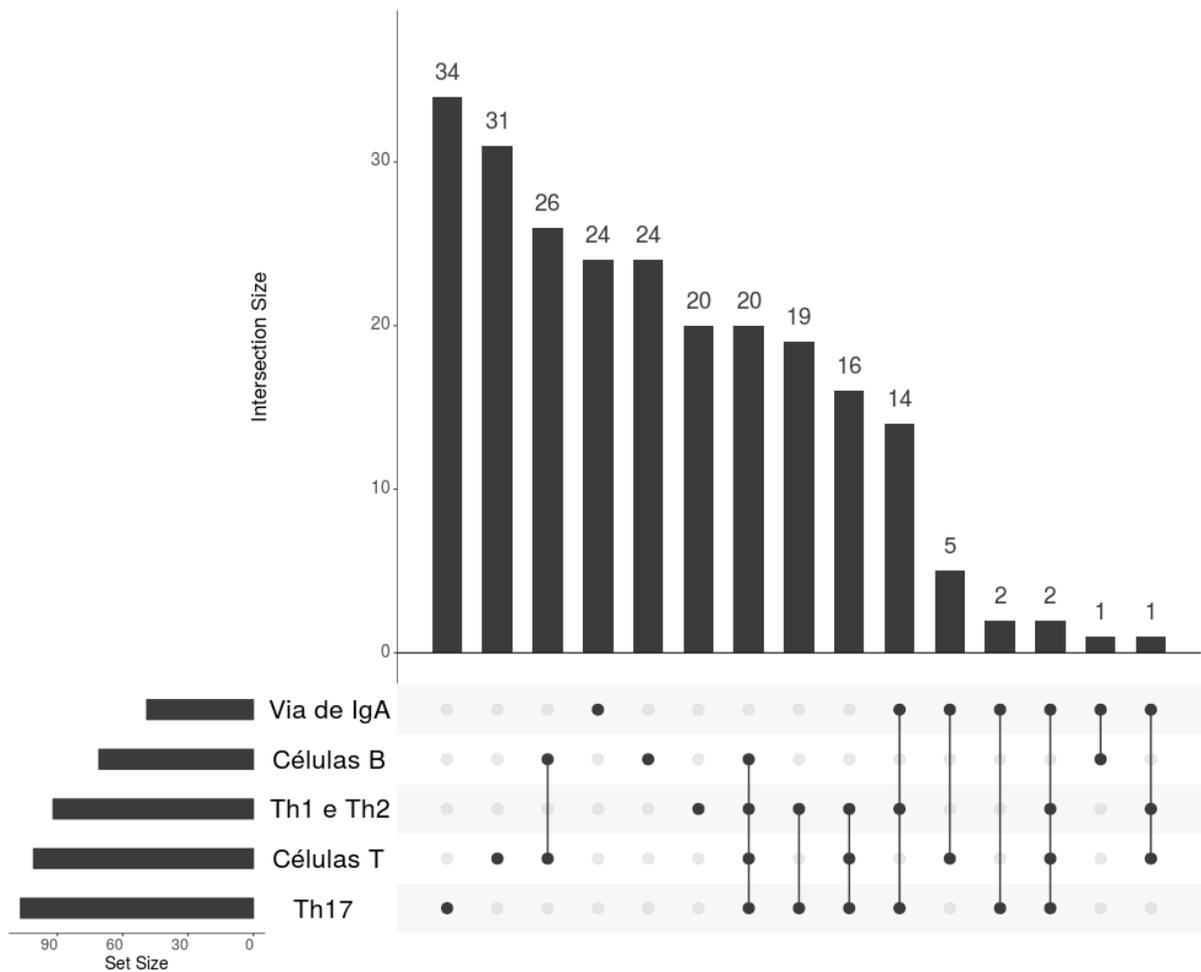


Fig.1 Gráfico UpSet demonstrado as interseções das vias. As colunas representam o número de genes exclusivos de cada processo e as interseções quando conectados pelas linhas. A via de IgA tem 24 genes exclusivos, e compartilha 14 com a via Th17 e a via Th1 e Th2. Via de IgA: Via imune intestinal de síntese de IgA. Células B: via de sinalização de células B. Células T: via de sinalização de células T. Th1 e Th2: diferenciação celular em Th1 e Th2. Th7: diferenciação celular em Th17.

Na curva de surgimento de genes, a via de IgA apresentou diferenças significativas entre todos os processos analisados: célula B (p-valor = 0,0002), célula T (p-valor=0,0002), Th1 e Th2 (p-valor = 0,0012), Th17 (p-valor = 0,0005) e sistema imune adaptativo total (p-valor = 0,0005). Esses resultados são demonstrados na Fig.2. Nenhuma das outras vias apresentaram diferenças entre si (Tab.S.1)

Processos do sistema imune adaptativo

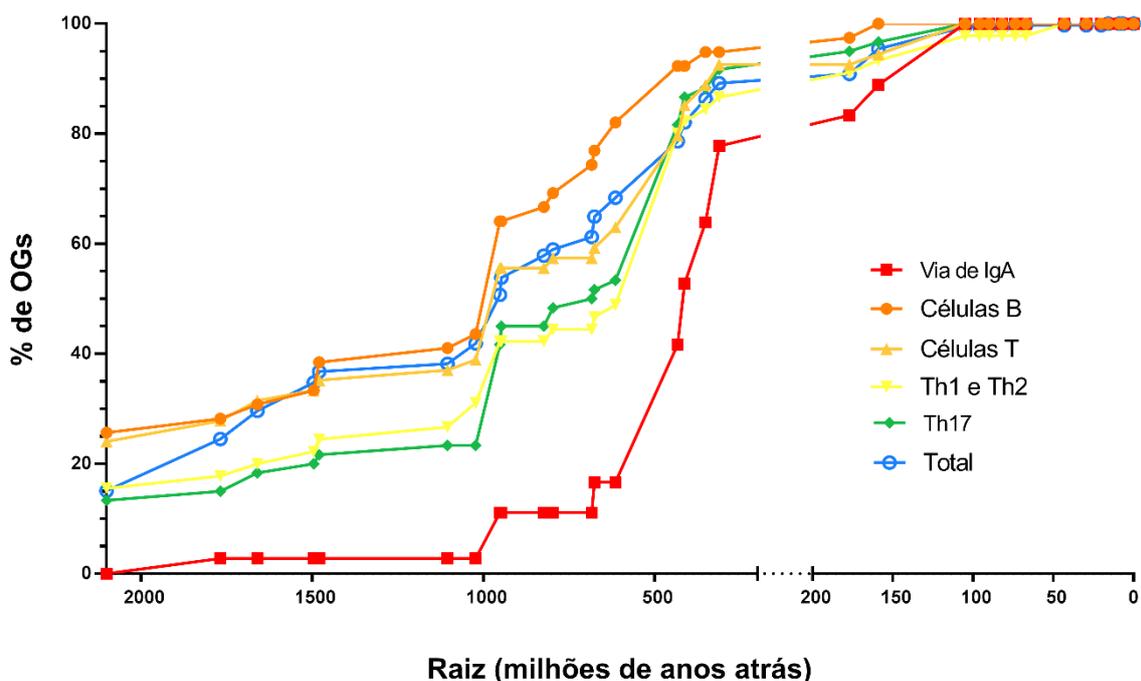


Fig.2 Aparecimento dos grupos ortólogos em porcentagem por via durante a evolução, em milhões de anos. O gráfico foi dividido em dois segmentos para uma melhor visualização. Houve diferenças entre a via de IgA com todos os processos analisados: Sistema imune adaptativo total ($p = 0.0005$), Células B ($p = 0.0002$), Células T ($p = 0.0002$), Th1 e Th2 ($p = 0.0012$), e Th17 ($p = 0.0005$). Nenhum dos outros processos apresentaram diferenças entre si. A análise estatística consistiu de um teste *Kolmogorov-Smirnov*. Via de IgA: Via imune intestinal de síntese de IgA. Células B: via de sinalização de células B. Células T: via de sinalização de células T. Th1 e Th2: diferenciação celular em Th1 e Th2. Th7: diferenciação celular em Th17.

Análise de plasticidade

A via de sinalização do receptor de células B apresentou valores de plasticidade significativamente menores quando comparada à rede imune intestinal para produção de IgA ($p = 0,036$) e o sistema imune adaptativo total ($p = 0,009$). A via de diferenciação em Th17 também diferiu do sistema imune adaptativo total ($p = 0,035$). Esses resultados são demonstrados em diagrama de caixas na Fig.3. Todos os p-valores são os que se seguem ao *post hoc* de Dunn. Os dados completos da análise de plasticidade com todas as comparações são fornecidos no Tab.S.2.

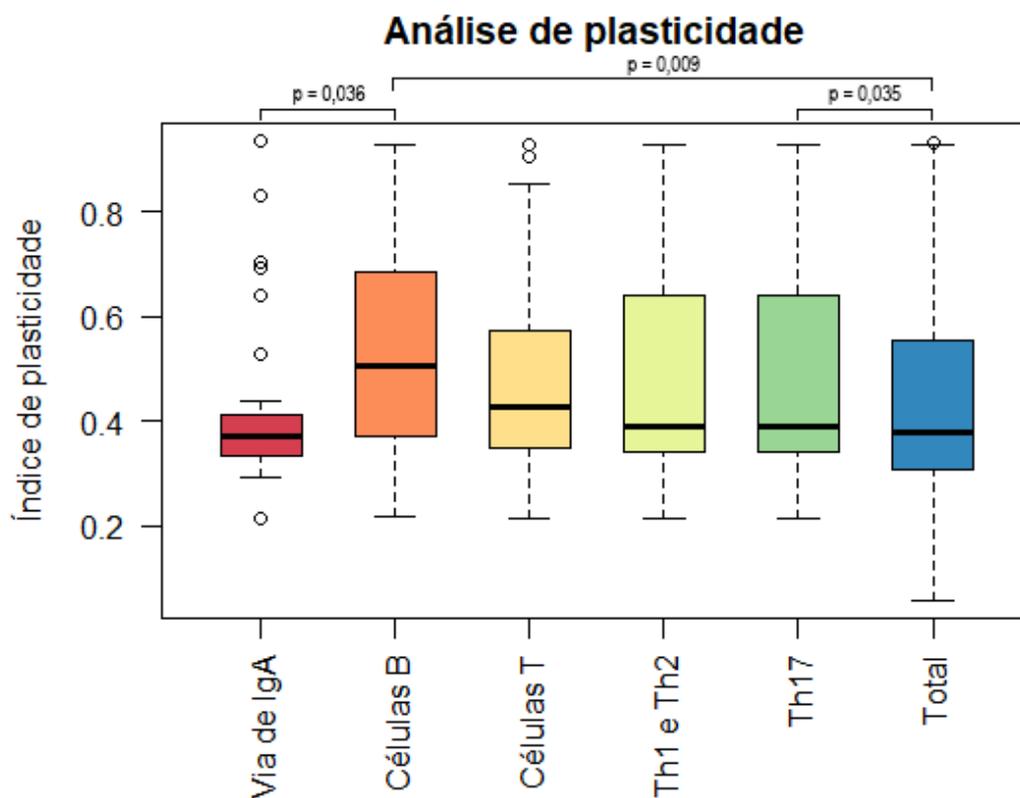


Fig. 3 Análise de plasticidade para cada processo individual representado em diagrama de caixa. Houve diferenças entre a as vias de Células B e Sistema imune adaptativo total (p-valor=0.009), e entre as células B e a Via de IgA (p-valor= 0,036). A via Th17 também diferiu do Sistema imune adaptativo total (p-valor=0,035). A análise estatística consistiu de um teste *Kruskal-Wallis* e *Dunn's post hoc*. Via de IgA: Via imune intestinal de síntese de IgA. Células B: via de sinalização de células B. Células T: via de sinalização de células T. Th1 e Th2: diferenciação celular em Th1 e Th2. Th7: diferenciação celular em Th17.

Análise da rede

As proteínas *Hubs* e *bottlenecks* com seus valores respectivos de *degree* e *betweenness centrality*, bem como informações de raiz e plasticidade, estão demonstradas na tab.3. Na fig.4 é demonstrada a rede de interação da via de IgA, em que as informações de raiz foram imputadas. Os genes *HLA-DRB4* e *HLA-DRB3* não foram encontrados no *String-DB*, e os genes *AICDA* e *TGFB1* não se conectaram a nenhuma das outras proteínas selecionadas, não aparecendo, portanto, na rede.

As informações de plasticidade evolutiva também foram imputadas na rede, demonstradas na fig.5. As proteínas dos OGs com baixa diversidade e abundância

estão em branco, as com alta diversidade e baixa abundância em preto, e genes com alta diversidade e abundância em vermelho.

Tab. 3 *Hubs* e *bottlenecks* da via de IgA, com seus respectivos valores de raiz e *degree* ou *betweenness centrality*. O parâmetro utilizado foi valores de *degree* e *betweenness centrality* acima da média.

<i>Bottlenecks</i>			<i>Hubs</i>		
Gene	Raiz	<i>Betweenness centrality</i>	Gene	Raiz	<i>Degree</i>
<i>CD28</i>	19	0,51505376	<i>HLA-DRA</i>	20	14
<i>ICOSL</i>		0,4516129	<i>HLA-DRB1</i>	20	14
<i>ICOS</i>	17	0,42580645	<i>HLA-DQB1</i>	20	11
<i>CD40LG</i>	19	0,41075269	<i>HLA-DQA1</i>	20	11
<i>HLA-DRA</i>	20	0,21505376	<i>HLA-DRB5</i>	20	11
<i>HLA-DRB1</i>	20	0,21505376	<i>HLA-DPB1</i>	20	11
<i>TNFSF13B</i>	20	0,18172043	<i>HLA-DPA1</i>	20	11
<i>CD80</i>	17	0,13870968	<i>HLA-DMA</i>	18	11
<i>IL10</i>	20	0,12473118	<i>HLA-DOA</i>	14	11
<i>CD86</i>	18	0,07741935	<i>HLA-DOB</i>	20	11
			<i>HLA-DMB</i>	18	11
			<i>HLA-DQA2</i>	20	11
			<i>CD80</i>	17	7
			<i>CD28</i>	19	7
			<i>TNFSF13B</i>	20	6
			<i>CD40LG</i>	19	6

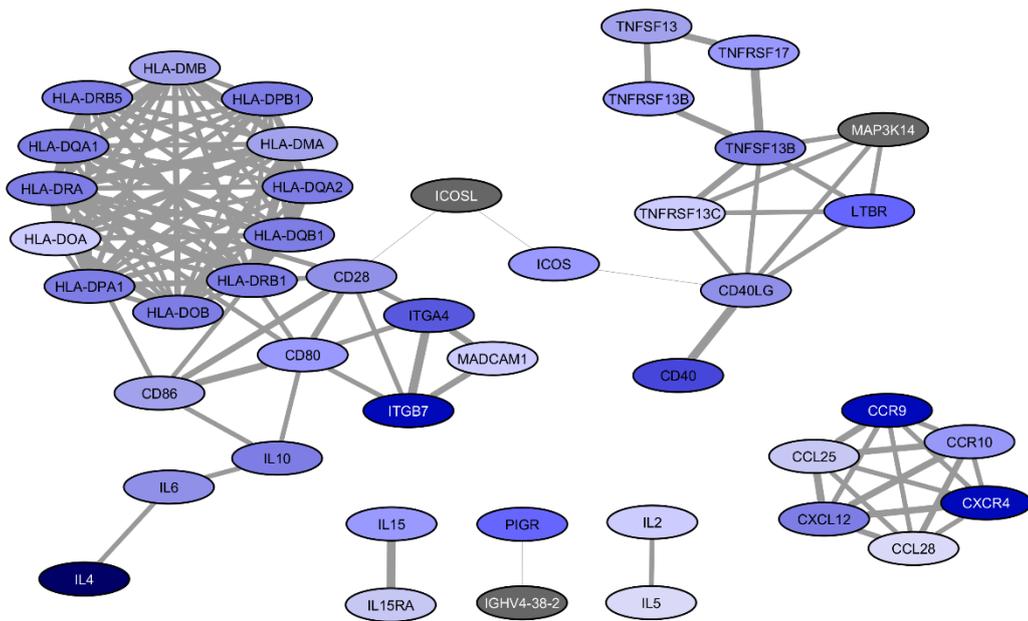


Fig. 4 Rede de interação proteína-proteína da via de IgA. As informações de raiz foram imputadas na rede: quanto mais escura a coloração do nó, mais antiga é a proteína. Nós cinzas são aqueles cuja raiz não foi encontrada. As grossuras das arestas representam o grau do score combinado de String (String-DB).

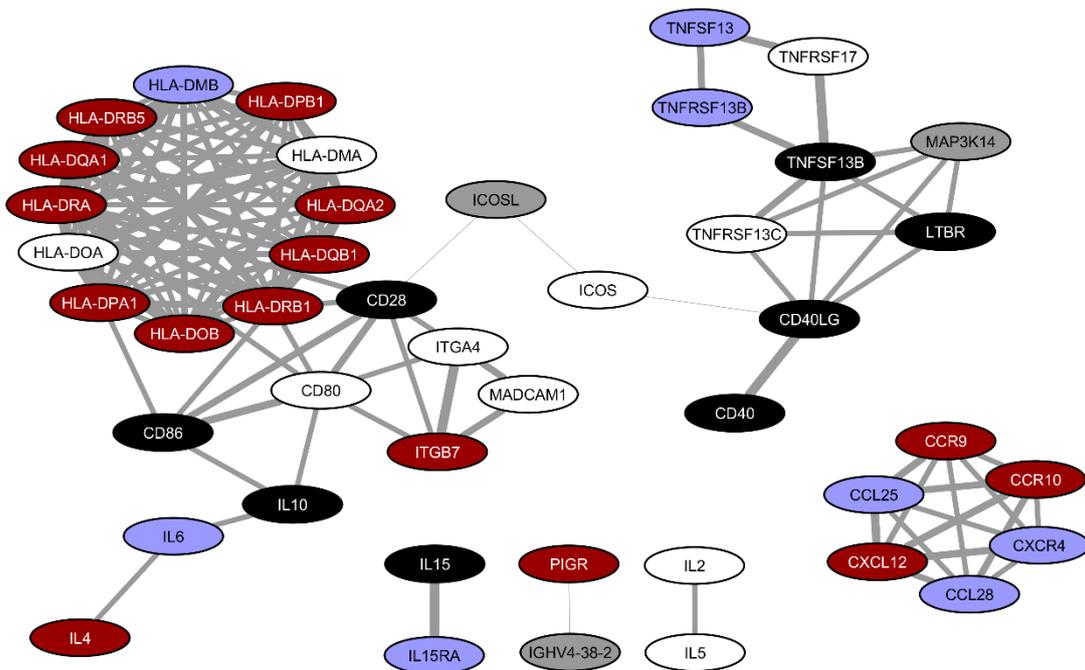


Fig. 4 Rede de interação proteína-proteína da via de IgA. As informações de abundância e diversidade foram imputadas na rede. Em branco (a) genes com baixa abundância e baixa plasticidade, em preto (b) genes com alta diversidade e baixa abundância, e vermelho (c) genes com

alta diversidade e baixa abundância. As grossuras das arestas representam o grau do score combinado do *String* (*String-DB*).

Discussão

A via de IgA é a via mais recente

Neste trabalho, avaliamos as raízes evolutivas e parâmetros de plasticidade da via intestinal de síntese de IgA, comparando com outros processos do SIA. Os processos escolhidos foram as vias do SIA presentes na base de dados *Kegg*. A fim de comparar com o SIA como um todo, foram coletados os genes da base de dados *Reactome*. Esta comparação permitiu analisar a via de IgA em termos de surgimento e plasticidade de seus genes.

Na Fig. 2 pode-se observar que os ortólogos dos genes que compõem a via de IgA como um todo apresentam uma raiz mais recente que todos os processos analisados. Na base de Eukaryota, onde nossa análise se inicia, a via de IgA não possuía nenhum ortólogo presente, ao passo que os outros processos apresentavam em torno de 20%. No clado dos Euteleostomi, onde o SIA já estava presente, a via de IgA possuía um pouco mais de 40% dos ortólogos, enquanto a via de células B possuía mais de 90%, e a via de células T mais de 80%. Com a diversificação de Vertebrata, a via de IgA tem novos genes surgindo gradativamente, atingindo sua totalidade dentro de Mammalia.

Estima-se que a evolução do SIA acontece no clado dos *Gnathostomata*. Como não há nenhum *Chondrichthyes* na árvore utilizada, todos os genes com raiz neste clado se agrupam no clado seguinte, *Euteleostomi*. Os *Agnatha* também possuem um SIA, no entanto, trata-se de uma evolução convergente. A evolução dos mecanismos centrais do SIA ocorre de forma súbita e é denominada de hipótese *big bang*.³¹ Neste ponto, nossos resultados demonstram que, tanto o sistema imune total, como os outros processos, apresenta mais de 78% dos ortólogos presentes. Na via de IgA, no entanto, a maior parte de seus ortólogos têm sua raiz após este evento. Estes resultados sugerem que, com o estabelecimento dos mecanismos centrais do SIA, ou seja, o sistema TCR-BCR-MHC, a via de IgA pode surgir e se incrementar.

Uma complexificação recente da via de IgA é suportada também por estudos comparativos da evolução de tecidos linfáticos secundários. A ativação das células B em plasmócitos IgA⁺ pode ocorrer em nódulos linfáticos isolados, nas placas de

Peyer e na lâmina própria do intestino. Apesar de tecidos linfoides secundários associados ao intestino serem conservados em Vertebrata, os nódulos linfáticos e as placas de Peyer parecem ser uma inovação evolutiva de Amniota.³² Estes órgãos são cruciais na coordenação da diferenciação e proliferação de células T em plasmócitos IgA⁺.

O ancestral comum dos mamíferos é tido como carnívoro, se alimentando de insetos. Com a extinção dos dinossauros herbívoros, houve uma grande diversificação alimentar, devido à evolução de dietas onívoras e herbívoras em diferentes linhagens de forma independente.³³ Atualmente, cerca de 80% das espécies são herbívoras. A evolução da herbivoria envolveu diversas adaptações morfológicas do TD e na dentição, bem como da composição microbiana, sendo esta crucial para tamanha diversificação. A microbiota intestinal de mamíferos herbívoros não só é diferente como também muito mais diversa que a de onívoros e carnívoros.^{34,35} Esse processo de diversificação alimentar dos mamíferos foi acompanhado de uma grande diversificação filogenética do grupo.³⁶ Além disso, os mamíferos, ao amamentarem os filhotes, liberam uma grande quantidade de IgA, que é essencial para a modulação da microbiota intestinal enquanto ela está se estabelecendo, além da manutenção da diversidade microbiana. Dado que, dos anticorpos secretados em mamíferos, 80% são da classe IgA, e os genes da via humana atingem a totalidade de seus ortólogos em *Mammalia*, talvez a evolução desta via tenha desempenhado um papel importante na modulação da microbiota e defesa intestinal, contribuindo para diversificação alimentar e filogenética dos mamíferos.

Em conjunto, nossos resultados da raiz dos genes que compõem a via de IgA sugerem uma evolução mais recente quando comparado com o SIA. Com o estabelecimento dos mecanismos centrais do SIA, novos genes surgiram e parecem ter sido cooptados para esta via durante a diversificação de *Tetrapoda*. Dada a importância da via de IgA na defesa, modulação e manutenção da diversidade da microbiota, sua evolução pode ter contribuído enormemente para a aquisição de novas dietas e diversificação de mamíferos.

Os Hubs são constituídos principalmente por HLAs e os Bottlenecks por moléculas co-estimulatórias

A abordagem de biologia de sistemas permite encontrar genes mais importantes de processos biológicos utilizando-se das conexões que estes estabelecem. Os *hubs* e *bottlenecks* da via de IgA foram calculados. A fim de compreender a história evolutiva desses genes, foram imputadas informações de raiz (Fig.4), de abundância e diversidade (Fig.5). As informações de abundância e diversidade foram divididas em três grupos: (a) em branco, genes com baixos valores de diversidade e abundância, indicando que seu ortólogo está presente em poucos organismos e seus componentes tiveram poucos eventos de duplicação, sugerindo também uma origem mais recente; (b) genes com alta diversidade e baixa abundância, ou seja presente em várias espécies (mais antigos) e poucos componentes, representados em preto, o que indica baixa plasticidade evolutiva; e genes marcados em cinza (c), que possuem alta diversidade e abundância, sugerindo genes antigos, presentes em várias espécies, mas com maior plasticidade, dado que eventos de duplicação foram tolerados.

Os *hubs* e *bottlenecks* constituem-se, majoritariamente, de genes relacionados com a ativação (diferenciação e proliferação) das células B e T. A ativação das células T envolve a ligação de seu receptor TCR aos MHC (denominados de HLA no ser humano) das células apresentadoras de antígenos, como também diversas moléculas co-estimulatórias. Já a ativação das células B dependentes de células T envolve a ligação de seus MHC de classe II ao TCR, e também outras moléculas co-estimulatórias. Estes mecanismos são processos centrais do SIA e essenciais para a sua função.³⁷

Os HLAs se apresentaram como as proteínas com maiores valores de *degree*. A via de IgA possui quatorze HLA, todos de classe II, e doze foram analisados. Destes, nove apresentam sua raiz no clado *Euteleostomi*, coincidindo com a evolução do SIA, enquanto os outros três (*HLA-DOA*, *HLA-DMB* e *HLA-DMA*) são mais recentes (Fig.4). Apesar da origem mais antiga, a maioria destes genes apresentam alta plasticidade evolutiva. A plasticidade destes genes já foi demonstrada de diversas formas. Os MHC são considerados os *loci* mais polimórficos no genoma nuclear de vertebrados, sendo que, em seres humanos, já foram identificados mais de 3000 alelos do MHC de classe II.³⁸ Além disso, a existência de seleção positiva já foi evidenciada em estudos que avaliaram as proporções de mutações sinônimas e não sinônimas.³⁹ As variantes dos MHC estão associadas com diferentes respostas a infecções.⁴⁰⁻⁴² Assim, esta alta diversidade

de variantes pode ser mantida por uma pressão balanceada dirigida por patógenos em que há favorecimento de heterozigotos, seleção dependente de frequência negativa e pressão impostas por patógenos que variam no tempo e no espaço.^{41,43,44}

Os *bottlenecks* são constituídos, em sua maior parte, por genes que codificam proteínas envolvidas na co-estimulação das células T e B. O gene *CD28* apresentou o maior valor de *betweenness centrality*. Este gene é expresso em células T e é um dos principais co-estimuladores da diferenciação e proliferação das células T, sendo essencial para a sobrevivência e regulação destas células.⁴⁵ Ele se liga às proteínas CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), expressos em células dendríticas, que também foram identificados como *bottlenecks*. Ratos deficientes para o *CD28* apresentam uma série de defeitos imunes, incluindo uma ativação de células T prejudicada, problemas na ajuda de células T a células B, bem como uma memória de células T defeituosa.⁴⁶ Este gene apresenta sua raiz no clado *Sarcopterygii*. Os genes *CD28* e *CD86* são genes mais antigos e com menor plasticidade, ao passo que o *CD80* é um gene mais recente. De fato, o *CD86* parece ser mais importante para a iniciação de respostas imunes do que o *CD80*.^{45,47}

O gene *ICOS*, expresso em células T, e seu ligante, o *ICOS-L*, fazem parte da família *CD28* e estão relacionados com a diferenciação em Th2, formação dos centros germinativos e troca de classe para IgA.⁴⁸⁻⁵¹ Trata-se de um gene mais recente, tendo sua origem em *Amniota*. O *CD40LG* também é um gene envolvido na interação entre células T e B, promovendo ativação, diferenciação e proliferação. Através do CD40L, e interleucinas (IL) 4, IL10 e TGF β , células T CD4⁺ induzem a troca de classe para IgA nos centros germinativos das placas de Peyer.^{52,53} Trata-se de um gene antigo dentro de IgA e com pouca plasticidade.

A interleucina 10 (IL-10) e o TNFSF13B foram as únicas citocinas tidas como *bottlenecks*. A IL-10 é extremamente importante na comunicação entre a microbiota intestinal e o sistema imune do hospedeiro.⁵⁴ Estudos com ratos deficientes para a *IL-10* apresentaram enterocolite que progressivamente se espalhava por todo o intestino.⁵⁵ Sua raiz está no clado 20, coincidindo com a evolução do SIA, e trata-se de um gene com baixa plasticidade evolutiva. O gene *TNFSF13B* (*BAFF*) é expresso por diferentes células, e é essencial para a sobrevivência de linfócitos B, bem como para a secreção de anticorpos.⁵⁶ No intestino, já se demonstrou a indução da expressão deste gene por células epiteliais estimuladas por antígenos

de bactérias comensais, sendo uma via importante na diferenciação de células B e na troca de classe para IgA.⁵⁷

Em suma, os genes com menor plasticidade são genes relacionados com a co-estimulação necessários para a ativação, diferenciação e proliferação de células B e T, identificados como *bottlenecks*. Os MHCs, em contrapartida, apesar de essenciais na ativação de células T e B, apresentam uma maior plasticidade, provavelmente em decorrência de sua função de apresentação de antígenos e multiplicidade de respostas possíveis na defesa contra infecções.

Quando se analisa a plasticidade das vias como um todo, a via de células B e Th17 se demonstraram os processos com maior plasticidade, quando comparado com o sistema imune total (Fig.3). Dado que estes processos não diferem em termos de surgimento com o total, os OGs aos quais estes genes pertencem provavelmente passaram por maiores ou mais numerosos eventos de duplicação, bem como de perda em algumas linhagens. Isso indica menor número de genes essenciais e maior plasticidade da rede dessas vias. Mais estudos são necessários para compreender as dinâmicas evolutivas dessas vias.

Nossos resultados demonstram que a via de IgA apresentou uma evolução mais recente quando comparada com outros processos do sistema imune adaptativo. Os *Hubs* da via de IgA se constituíram majoritariamente por HLA, apresentando alta plasticidade evolutiva. Os *Bottlenecks* são, principalmente, genes co-estimulatórios da ativação de células B e T, mas também algumas citocinas, constituindo-se principalmente por moléculas com baixa plasticidade.

Este trabalho apresenta algumas limitações a serem levadas em consideração. Primeiramente, os genes descritos em cada via nas bases de dados *Kegg* e *Reactome*, bem como as interações entre as proteínas da base *String*, são o reflexo do conhecimento atual. Assim, as vias escolhidas podem, em termos de genes, não ser totalmente representativas. Uma maior elucidação da via de IgA e das interações entre seus componentes permitirá maior acuidade em estudos evolutivos como este. Além disso, apesar dos OGs identificarem homologias em uma grande quantidade de organismos, nem sempre há uma distinção eficiente de ortólogos e parálogos. Isso faz com que a inferência funcional através dos clados se torne menos confiável, ainda que seja uma boa ferramenta atual para comparação de grandes grupos de genes pertencentes a vias e processos com moderado a baixo custo computacional. Não obstante, mais estudos se fazem necessários para

compreender as dinâmicas evolutivas desta via e a sua relação com a microbiota e defesa contra patógenos.

Bibliografia

1. Eckburg, P. B. *et al.* Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635–1638 (2005).
2. Michielan, A. & D’Incà, R. Intestinal permeability in inflammatory bowel disease: pathogenesis, clinical evaluation, and therapy of leaky gut. *Mediators Inflamm.* **2015**, 628157 (2015).
3. Yang, X., Xie, L., Li, Y. & Wei, C. More than 9,000,000 unique genes in human gut bacterial community: estimating gene numbers inside a human body. *PLoS ONE* **4**, e6074 (2009).
4. Lynch, S. V. & Pedersen, O. The human intestinal microbiome in health and disease. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2369–2379 (2016).
5. Bunker, J. J. & Bendelac, A. Iga responses to microbiota. *Immunity* **49**, 211–224 (2018).
6. Honda, K. & Littman, D. R. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* **535**, 75–84 (2016).
7. Brown, E. M., Sadarangani, M. & Finlay, B. B. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat. Immunol.* **14**, 660–667 (2013).
8. Kato, L. M., Kawamoto, S., Maruya, M. & Fagarasan, S. The role of the adaptive immune system in regulation of gut microbiota. *Immunol. Rev.* **260**, 67–75 (2014).
9. Fagarasan, S., Kawamoto, S., Kanagawa, O. & Suzuki, K. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 243–273 (2010).
10. Kawamoto, S. *et al.* Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* **41**, 152–165 (2014).
11. Bunker, J. J. *et al.* Natural polyreactive IgA antibodies coat the intestinal microbiota. *Science* **358**, (2017).

12. Suzuki, K., Kawamoto, S., Maruya, M. & Fagarasan, S. GALT: organization and dynamics leading to IgA synthesis. *Adv. Immunol.* **107**, 153–185 (2010).
13. Cucca, F. *et al.* Evaluation of IgA deficiency in Sardinians indicates a susceptibility gene is encoded within the HLA class III region. *Clin. Exp. Immunol.* **111**, 76–80 (1998).
14. Ludvigsson, J. F., Neovius, M. & Hammarström, L. Association between IgA deficiency & other autoimmune conditions: a population-based matched cohort study. *J. Clin. Immunol.* **34**, 444–451 (2014).
15. Fadlallah, J. *et al.* Microbial ecology perturbation in human IgA deficiency. *Sci. Transl. Med.* **10**, (2018).
16. Catanzaro, J. R. *et al.* IgA-deficient humans exhibit gut microbiota dysbiosis despite secretion of compensatory IgM. *Sci. Rep.* **9**, 13574 (2019).
17. Pabst, O., Cerovic, V. & Hornef, M. Secretory iga in the coordination of establishment and maintenance of the microbiota. *Trends Immunol.* **37**, 287–296 (2016).
18. Weaver, C. T. & Hatton, R. D. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 883–889 (2009).
19. Fagarasan, S. Evolution, development, mechanism and function of IgA in the gut. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 170–177 (2008).
20. Conway, J. R., Lex, A. & Gehlenborg, N. UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics* **33**, 2938–2940 (2017).
21. Tatusov, R. L. *et al.* The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* **4**, 41 (2003).
22. Natale, D. A., Galperin, M. Y., Tatusov, R. L. & Koonin, E. V. Using the COG database to improve gene recognition in complete genomes. *Genetica* **108**, 9–17 (2000).
23. Galperin, M. Y., Kristensen, D. M., Makarova, K. S., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. Microbial genome analysis: the COG approach. *Brief. Bioinformatics* **20**, 1063–1070 (2019).
24. Koonin, E. V. Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 309–338 (2005).

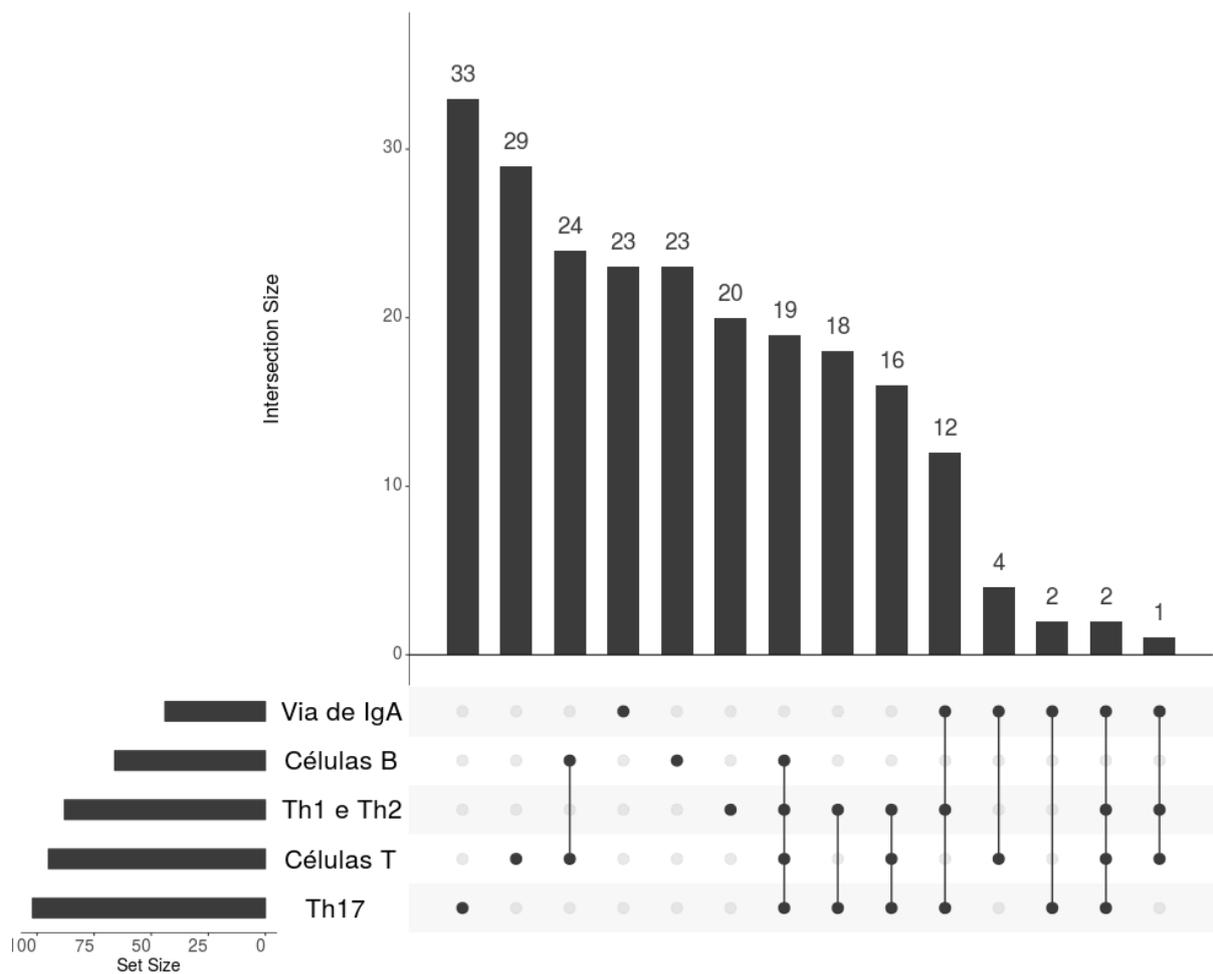
25. Castro, M. A. A., Dalmolin, R. J. S., Moreira, J. C. F., Mombach, J. C. M. & Almeida, R. M. C. de Evolutionary origins of human apoptosis and genome-stability gene networks. *Nucleic Acids Res.* **36**, 6269–6283 (2008).
26. Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M. & Hedges, S. B. Timetree: A resource for timelines, timetrees, and divergence times. *Mol. Biol. Evol.* **34**, 1812–1819 (2017).
27. Dalmolin, R. J. S. *et al.* Evolutionary plasticity determination by orthologous groups distribution. *Biol. Direct* **6**, 22 (2011).
28. Assenov, Y., Ramírez, F., Schelhorn, S.-E., Lengauer, T. & Albrecht, M. Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics* **24**, 282–284 (2008).
29. Yu, H., Kim, P. M., Sprecher, E., Trifonov, V. & Gerstein, M. The importance of bottlenecks in protein networks: correlation with gene essentiality and expression dynamics. *PLoS Comput. Biol.* **3**, e59 (2007).
30. Ekman, D., Light, S., Björklund, A. K. & Elofsson, A. What properties characterize the hub proteins of the protein-protein interaction network of *Saccharomyces cerevisiae*? *Genome Biol.* **7**, R45 (2006).
31. Flajnik, M. F. & Kasahara, M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 47–59 (2010).
32. Boehm, T., Hess, I. & Swann, J. B. Evolution of lymphoid tissues. *Trends Immunol.* **33**, 315–321 (2012).
33. Collinson, M. E. & Hooker, J. J. Fossil evidence of interactions between plants and plant-eating mammals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci* **333**, 197–207, discussion 207 (1991).
34. Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R. & Gordon, J. I. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 776–788 (2008).
35. Ley, R. E. *et al.* Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* **320**, 1647–1651 (2008).
36. Price, S. A., Hopkins, S. S. B., Smith, K. K. & Roth, V. L. Tempo of trophic evolution and its impact on mammalian diversification. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 7008–7012 (2012).

37. Simon, A. K., Hollander, G. A. & McMichael, A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc. Biol. Sci.* **282**, 20143085 (2015).
38. Robinson, J. *et al.* The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res.* **43**, D423-31 (2015).
39. Bergström, T. & Gyllensten, U. Evolution of Mhc class II polymorphism: the rise and fall of class II gene function in primates. *Immunol. Rev.* **143**, 13–31 (1995).
40. Wellcome Trust Case Control Consortium Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* **447**, 661–678 (2007).
41. Prugnolle, F. *et al.* Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Curr. Biol.* **15**, 1022–1027 (2005).
42. Matzaraki, V., Kumar, V., Wijmenga, C. & Zhernakova, A. The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome Biol.* **18**, 76 (2017).
43. Minias, P. *et al.* Contrasting evolutionary histories of MHC class I and class II loci in grouse-- effects of selection and gene conversion. *Heredity* **116**, 466–476 (2016).
44. Eizaguirre, C., Lenz, T. L., Kalbe, M. & Milinski, M. Rapid and adaptive evolution of MHC genes under parasite selection in experimental vertebrate populations. *Nat. Commun.* **3**, 621 (2012).
45. Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A. & Bluestone, J. A. CD28 costimulation: from mechanism to therapy. *Immunity* **44**, 973–988 (2016).
46. Krueger, J., Jules, F., Rieder, S. A. & Rudd, C. E. CD28 family of receptors inter-connect in the regulation of T-cells. *Receptors Clin. Investig.* **4**, (2017).
47. Borriello, F. *et al.* B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* **6**, 303–313 (1997).
48. Tafuri, A. *et al.* ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* **409**, 105–109 (2001).
49. McAdam, A. J. *et al.* ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* **409**, 102–105 (2001).

50. Mak, T. W. *et al.* Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses. *Nat. Immunol.* **4**, 765–772 (2003).
51. Watanabe, S. *et al.* Expression level of costimulatory receptor ICOS is critical for determining the polarization of helper T cell function. *Transpl. Immunol.* **15**, 255–263 (2006).
52. Fayette, J. *et al.* Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA1 and IgA2. *J. Exp. Med.* **185**, 1909–1918 (1997).
53. Coffman, R. L., Lebman, D. A. & Shrader, B. Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1989. 170: 1039-1044. *J. Immunol.* **182**, 8–13 (2009).
54. Kole, A. & Maloy, K. J. Control of intestinal inflammation by interleukin-10. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **380**, 19–38 (2014).
55. Berg, D. J. *et al.* Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J. Clin. Invest.* **98**, 1010–1020 (1996).
56. Kalled, S. L. The role of BAFF in immune function and implications for autoimmunity. *Immunol. Rev.* **204**, 43–54 (2005).
57. He, B. *et al.* Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* **26**, 812–826 (2007).

Material Suplementar

As tabelas dos genes presentes em cada via com seus respectivos valores de raiz, abundância, diversidade e plasticidade é disponibilizada aqui <https://drive.google.com/drive/folders/1O6VNgjnCnZYOSrEALbVEW6S7kNsEGKNQ?usp=sharing>. São disponibilizadas também as árvores de todos os ortólogos analisados por via.



FigS.1 Gráfico UpSet demonstrando as intersecções das vias somente com os genes cujas análises de raiz e plasticidade foram feitas. Comparando com o total, a Via de IgA perdeu um gene exclusivo e 4 das intersecções.

TabS.1 P-valores da análise de raiz.

	Sistema imune adaptativo total	Th1 e Th2	Th17	Células B	Células T
IgA	0,0005*	0,0012*	0,0005*	0,0002*	0,0002*
Células T	0,2501	0,2501	0,2564	0,2308	
Células B	0,0899	0,2501	0,1539		
Th17	0,2501	0,5562			
Th1 e Th2	0,2501				

TabS.2 P-valores da análise de plasticidade.

	Sistema imune adaptativo total	Th1 e Th2	Th17	Células B	Células T
Via de IgA	0,4640	0,1684	0,1133	0,0362*	0,1650
Células T	0,0897	0,4752	0,4235	0,1640	
Células B	0,0089*	0,1689	0,2273		
Th17	0,0349*	0,3943			
Th1 e Th2	0,1043				

REFERÊNCIAS

- BUNKER, J. J. et al. Natural polyreactive IgA antibodies coat the intestinal microbiota. **Science**, v. 358, n. 6361, 20 Oct. 2017.
- BUNKER, J. J.; BENDELAC, A. Iga responses to microbiota. **Immunity**, v. 49, n. 2, p. 211–224, 21 Aug. 2018.
- ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635–1638, 10 Jun. 2005.
- FADLALLAH, J. et al. Microbial ecology perturbation in human IgA deficiency. **Science Translational Medicine**, v. 10, n. 439, 2 May 2018.
- FAGARASAN, S. et al. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 243–273, 2010.
- FLAJNIK, M. F.; KASAHARA, M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. **Nature Reviews. Genetics**, v. 11, n. 1, p. 47–59, Jan. 2010.
- HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1268–1273, 8 Jun. 2012.
- LEY, R. E. et al. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 776–788, 2008.
- MICHIELAN, A.; D'INCÀ, R. Intestinal permeability in inflammatory bowel disease: pathogenesis, clinical evaluation, and therapy of leaky gut. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 628157, 25 Oct. 2015.
- MOLLOY, M. J. et al. Intraluminal containment of commensal outgrowth in the gut during infection-induced dysbiosis. **Cell Host & Microbe**, v. 14, n. 3, p. 318–328, 11 Sep. 2013.
- PABST, O. New concepts in the generation and functions of IgA. **Nature Reviews. Immunology**, v. 12, n. 12, p. 821–832, Dec. 2012.
- PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews. Immunology**, v. 14, n. 3, p. 141–153, Mar. 2014.
- SOMMER, F.; BÄCKHED, F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 227–238, Apr. 2013.
- VON MERING, C. et al. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Database issue, p. D433-7, 1 Jan. 2005.

ZHAO, Q.; ELSON, C. O. Adaptive immune education by gut microbiota antigens.
Immunology, v. 154, n. 1, p. 28–37, 8 Feb. 2018.