



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Clarice Monteiro Rodrigues Santos

**Estudo da biologia das células T auxiliares foliculares circulantes
em condições imunológicas distintas: gestação, infecção pelo HIV-
1 e em pacientes com desordens do espectro da neuromielite
óptica**

Rio de Janeiro

2020

Clarice Monteiro Rodrigues Santos

Estudo da biologia das células T auxiliares foliculares circulantes em condições imunológicas distintas: gestação, infecção pelo HIV-1 e em pacientes com desordens do espectro da neuromielite óptica

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cleonice Alves de Melo Bento

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S237 Santos, Clarice Monteiro Rodrigues.
Estudo da biologia das células T auxiliares foliculares circulantes em condições imunológicas distintas: gestação, infecção pelo HIV-1 e em pacientes com desordens do espectro da neuromielite óptica/ Clarice Monteiro Rodrigues Santos. – 2020.
198f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cleonice Alves de Melo Bento.

Doutorado (Tese) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. HIV (Vírus) - Teses. 2. Neuromielite Óptica. 3. Linfócitos T CD4-Positivos. 4. Progesterona. 5. Estrogênio - Teses. I. Bento, Cleonice Alves de Melo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 617.731-002

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB/7 – 6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Clarice Monteiro Rodrigues Santos

Estudo da biologia das células T auxiliares foliculares circulantes em condições imunológicas distintas: gestação, infecção pelo HIV-1 e em pacientes com desordens do espectro da neuromielite óptica

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 14 de abril de 2020.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cleonice Alves de Melo Bento
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Alessandra Matos Saliba
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dra. Wânia Ferraz Pereira Manfro
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Dra. Fernanda de Bruycker Nogueira
Instituto Oswaldo Cruz

Dra. Claudia Cristina Ferreira Vasconcelos
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os indivíduos que já doaram amostras corporais em prol da pesquisa científica e da saúde de terceiros.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe e ao meu pai, Verônica e Tércio. Mesmo longe fisicamente, vocês me estimularam todos os dias a dar sempre o meu melhor na minha profissão e na minha vida. Vocês são as sábias palavras que me equilibram nos momentos de necessidade e a certeza de que qualquer problema pode ter solução.

A minha orientadora, Cleonice Bento, por ser um exemplo de orientação acadêmica e de amizade. Muito obrigada por ter confiado no meu potencial desde o mestrado e por ter trago a Imunologia para a minha vida. Você é um dos melhores seres humanos que eu já conheci.

A minha orientadora na UCI, Anshu Agrawal, por me ter dado liberdade para desenvolver meus projetos prévios e confiança para iniciar e conduzir projetos de pesquisa de alto padrão científico desenvolvido por ela, o que contribuiu intensamente para meu desenvolvimento como pesquisadora.

A todos os médicos que colaboraram para os projetos de pesquisa aqui desenvolvidos, por sua disposição e minuciosidade, essenciais para a qualidade de nossos resultados.

A Cristal Dias, minha amiga mais antiga, que acompanhou minha trajetória desde a alfabetização e que sempre torceu pelo meu sucesso. Obrigada por me mostrar todos os dias que eu tenho a sua amizade pra me apoiar e me confortar.

A Tayná Benzi, meu porto seguro. Obrigada por nunca soltar a minha mão. Você é uma das minhas maiores certezas. Sempre.

A Karen Padrão, por ter me aceitado como irmã e por ter me ajudado a tomar decisões importantes na minha vida quando tudo me parecia confuso.

A Priscila Mendonça, Aleida Soraia e Lana Lopes, por serem o meu pilar pessoal, acadêmico e científico por todos esses anos. Obrigada pela convivência e troca, pelo carinho e pelos momentos de desabafo e de descontração.

A todos os integrantes do LIIIiT, laboratório que sou integrante há 6 anos, por transmitirem a mim o verdadeiro valor de um trabalho em equipe.

Agradeço ao Mateus, por me transbordar de calma. Sua assídua presença e apoio foram essenciais para a conclusão desse trabalho com êxito.

Aos Programas de Pós-Graduação da UERJ e da UNIRIO, por me proporcionarem uma trajetória científica e acadêmica de qualidade insquestionáveis.

Agradeço a CAPES, pela bolsa de doutorado no país e de doutorado sanduíche, que me possibilitou realizar parte dessa tese na Universidade da Califórnia Irvine. Também às outras agências de fomento, FAPERJ e CNPq, pelo suporte financeiro aos projetos em que fui e continuo sendo integrante durante todos esses anos de pesquisa científica.

Ser grande, é abraçar uma grande causa.

William Shakespeare

RESUMO

SANTOS, Clarice Monteiro Rodrigues. **Estudo da biologia das células TFH em condições imunológicas distintas:** gestação, infecção pelo HIV-1 e em pacientes com desordens do espectro da neuromielite óptica. 2020. 198f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

As células T CD4⁺ auxiliares foliculares (T_{FH}) são um subtipo de células responsáveis por regular o desenvolvimento da imunidade humoral através da promoção da indução de plasmócitos secretores de anticorpos e células B de memória de longa duração. Classicamente, as células T_{FH} são identificadas pela alta expressão de CXCR5 associado a uma elevada produção de IL-21. Entretanto, diferentes condições ambientais e genéticas podem interferir com o status funcional dessas células. Assim, o objetivo geral dessa tese foi estudar a biologia das células T_{FH} circulantes em gestantes, infectadas ou não pelo HIV-1, e em mulheres com diagnóstico definitivo de NMOSD. Adicionalmente, avaliamos os mecanismos de atuação de dose relacionada à gestação de estrogênio e progesterona no status funcional desses linfócitos. Nesse sentido, nossos resultados mostraram que a gestação, em mulheres saudáveis, favorece a expansão das células T CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺, coexpressando ou não os marcadores CXCR3, PD-1 e ICOS. Além disso, a gestação também elevou a porcentagem de células T_{FH} CXCR3⁺ produtoras de IL-21, IL-10 e IL-6. De forma interessante, foi observado uma correlação positiva entre a porcentagem das células T_{FH} CXCR3⁺PD-1⁺, assim como do subtipo IL-21⁺, com os níveis séricos de estrogênio e dos anticorpos anti-citomegalovírus e anti-antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg). De forma interessante, a ocorrência de gestação acelerou a recuperação numérica e funcional das células T_{FH} circulantes em mulheres infectadas pelo HIV-1 após a introdução da terapia antirretroviral (TARV), amplificando sua capacidade em auxiliar as células B autólogas a produzir IgG em sistemas de cocultura. Adicionalmente, incremento na porcentagem das células T_{FH} IL-21⁺ após TARV foi diretamente correlacionado aos níveis plasmáticos de estrogênio e aos títulos de IgG anti-HBs e anti-toxoide tetânico (TT). Ao avaliar o efeito direto dos hormônios gestacionais sobre as células T_{FH}, o estrogênio elevou a porcentagem de cT_{FH}, cT_{FH}ICOS⁺, cT_{FH}IL-21⁺ e IL17⁺; e de células B de memória, enquanto a progesterona, com o auxílio do estrogênio, elevou, *in vitro*, não apenas a porcentagem de plasmócitos secretores de anticorpos, como também a porcentagem de células T_{FR} IL-10⁺, subtipo celular conhecido em evitar a produção de autoanticorpos em doenças autoimunes humorais, tal como a NMOSD. Nesse sentido, nossos resultados mostraram que pacientes com NMOSD produtores de IgG anti-AQP4 possuíam uma maior frequência de células T_{FH} IL-6⁺ e IL-17⁺, que foram diretamente correlacionadas com a atividade clínica da doença, como também menor porcentagem de células T_{FH} IL-10⁺. Em resumo, nossos resultados sugerem que elevados níveis de estrogênio e progesterona favorecem a expansão e diferenciação de células T_{FH} funcionais, o que pode estar atrelado a uma melhor resposta humoral específica contra patógenos, mas que pode impactar negativamente no desfecho de doenças autoimunes mediadas por autoanticorpos, tal como a NMOSD.

Palavras-chave: Células T CD4⁺ auxiliares foliculares. Estrogênio. Progesterona. HIV-1. Desordens do Espectro da Neuromielite Óptica.

ABSTRACT

SANTOS, Clarice Monteiro Rodrigues. **Biologic study of follicular helper T cells in immunologically differentiated conditions:** pregnancy, HIV-1 infection, and individuals with neuromyelitis optical spectrum disorder. 2020. 198f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Follicular helper T (T_{FH}) cells are a subtype of lymphocytes responsible for regulating the development of humoral immunity by promoting the induction of antibody-secreting plasma cells and long-term memory B cells. Classically, T_{FH} cells are identified by the high expression of CXCR5 associated with an elevated production of IL-21. However, different environmental and genetic conditions can interfere with the functional status of these cells. Thus, the general objective of this thesis was to study the biology of circulating T_{FH} cells in pregnant women, infected or not with HIV-1, and in women with a definitive diagnosis of NMOSD. Additionally, we also evaluated the mechanisms of effect of pregnancy-related dose of estrogen and progesterone on the functional status of these lymphocytes. In this context, our results showed that pregnancy, in healthy women, favors the expansion of $CD45RO^+CXCR5^+CD4^+$ T cells, coexpressing or not CXCR3, PD-1 and ICOS markers. In addition, pregnancy also increased the percentage of $CXCR3^+$ T_{FH} cells that produce IL-21, IL-10 and IL-6. Interestingly, a positive correlation was observed between the percentage of $CXCR3^+$ $PD-1^+$ T_{FH} cells, as well as IL-21⁺ subtype, with serum levels of both estrogen and IgG directed against cytomegalovirus and hepatitis B virus (HBsAg). In HIV-1-infected women, the occurrence of pregnancy accelerated the numerical and functional recovery of circulating T_{FH} cells after the introduction of antiretroviral therapy (ART), amplifying their ability to assist autologous B cells to produce IgG in coculture systems. Additionally, an increase in the percentage of IL-21⁺ T_{FH} cells after ART was directly correlated with plasma estrogen levels and anti-HBs and anti-tetanus toxoid (TT) IgG titers. When we evaluated the direct effect of gestational hormones on the *in vitro* T_{FH} cells, estrogen increased the percentage of cT_{FH} , $ICOS^+cT_{FH}$, IL-21⁺ and IL-17⁺ cT_{FH} , and memory B cells, while progesterone, with along estrogen, increased not only the proportion of antibody-secreting plasma cells, but also the percentage of IL-10⁺ T_{FR} cells, a cell subtype known to prevent autoantibody production in humoral autoimmune diseases, such as NMOSD. In this sense, our results showed that NMOSD patients who produce anti-AQP4 IgG had a higher frequency of IL-6⁺ and IL-17⁺ T_{FH} cells, which were directly correlated with the clinical activity of the disease, as well as a lower percentage of cells IL-10⁺ T_{FH} . In summary, our results suggest that high levels of estrogen and progesterone favor the expansion and differentiation of functional T_{FH} cells, which may be linked to a better specific humoral response against pathogens, but it can negatively impact the outcome of autoimmune diseases mediated by autoantibodies, such as NMOSD.

Keywords: Follicular helper T cells. Estrogen. Progesterone. HIV-1. Neuromyelitis Optical Spectrum Disorder.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Diferenciação das células T_{FH} e geração de células B de memória e plasmócitos.....	23
Figura 2 –	Auxílio das células T_{FH} às células B em diferentes fases da resposta imune humoral.....	25
Figura 3 –	Subtipos de células T_{FH} circulantes.....	29
Figura 4 –	Plasticidade das células T foliculares.....	32
Figura 5 –	Resumo da imunomodulação materna em decorrência dos hormônios gestacionais.....	41
Figura 6 –	História Natural da infecção pelo HIV na ausência de terapia....	43
Figura 7 –	Mielite Transversa Aguda (MTA) e Neurite Óptica (NO) em pacientes com NMOSD.....	57
Figura 8 –	Lesão na região dorsal do bulbo (A, seta) e lesões agudas associadas à síndrome clínica de área postrema (B e C)	58
Figura 9 –	Lesões típicas de síndrome do tronco cerebral.....	58
Figura 10 –	Lesões cerebrais e de diencefalo típicas de NMOSD.....	59
Figura 11 –	Possíveis diferenças entre os mecanismos imunopatológicos da NMO em pacientes soropositivos para anti-AQP4 ou para anti-MOG.....	66

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 - Grupos de antirretrovirais utilizados na terapia anti-HIV disponibilizados pelo Ministério da Saúde do Brasil	48
Quadro 1 - Os sistemas funcionais avaliados no âmbito da escala EDSS.....	54
Quadro 2 - A Escala EDSS	54
Quadro 3 - Atual critério de diagnóstico da NMOSD.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3TC	Lamivudine
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
APC	Célula apresentadora de antígeno
AQP4	Aquaporina 4
AZT	Zidovudine
BAFF	Fator ativador de células B
BATF	Fator de transcrição de zíper de leucina
BCL-6	B-cell lymphoma 6
BHE	Barreira Hematoencefálica
BLIMP	Proteína de maturação induzida por linfócitos B
bNab	Anticorpos amplamente neutralizantes
CBA	Cell Based Assay
CD	Grupo de diferenciação
CD40L	Ligante de CD40
CG	Centro germinativo
CMV	Citomegalovírus
cT _{FH}	Células T folicular circulante
CTL	Célula T citotóxica
CXCR	Receptor com motivos C-X-C
CXCL	Ligante com motivos C-X-C
CTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
DC	Célula dendrítica
DDII	Doenças desmielinizantes inflamatórias idiopáticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E2	17 β -estradiol
EAAT2	Transportador excitatório de aminoácidos 2
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EFV	Efavirenz
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimático
ER	Receptor de estrogênio

FASL	Ligante de FAS
Foxp3	X-linked Forkhead box P3
GATA	Globin transcription factor
GITR	Receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoides
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
GR	Receptor de Glicocorticoide
HBsAg	Antígeno da superfície do vírus da hepatite B
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HO-1	Heme oxigenase-1
HRP	Horseradish peroxidase
ICAM	Molécula de adesão intercelular
ICOS	Coestimulador induzível de célula T
ICOS L	Ligante do coestimulador induzível de célula T
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IL-2R	Cadeia α do receptor de IL-2
IO	Ionomicina
IRF4	Fator 4 regulador de interferon
iTreg	Treg induzidas
ITRN	Inibidor da transcriptase análogo sintético de nucleosídeos
ITRNN	Inibidor da transcriptase não análogo sintético de nucleosídeo
LAG-3	Gene 3 de ativação linfocitária
LETM	Mielite transversa longitudinalmente extensa
LIF	Fator inibidor de leucemia
LT	Linfotoxina
mAbs	Anticorpos monoclonais
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MOG	Glicoproteína do Oligodendrócito da Mielina
MTA	Mielite transversa aguda
NK	Célula assassina natural

NMO	Neuromielite óptica
NMOSD	Desordens do espectro da neuromielite óptica
NO	Neurite Óptica
nTreg	Treg naturais
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PD-1	Receptor de morte programada 1
PD-L1	Ligante de PD-1
PGE2	Prostaglandina E2
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PMA	Acetato miristato de forbol
PR	Receptor de progesterona
RAL	Raltegravir
RR	Remitente-recorrente
SAP	Proteína associada ao SLAM
SFB	Soro fetal bovino
SIV	Vírus da imunodeficiência Símia
SLAM	Molécula de ativação da sinalização de linfócito
SLE	Lúpus Eritematoso Sistêmico
SNC	Sistema Nervoso Central
STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TARV	Terapia antirretroviral
TCR	Receptor de célula T
TDF	Tenofovir
TFH	Célula T helper folicular
TFR	Célular T folicular regulatória
TGF	Fator transformador de crescimento
Th	Célula T helper ou do tipo auxiliadora
TIM3	Domínio de mucina e imunoglobulina em células T
TLR	Receptores do tipo toll
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
Tr1	Célula T regulatória do tipo 1
Treg	Célula T regulatória
TSLPR	Receptor de linfopoietina derivado do estroma tímico

TT	Toxóide tetânico
uNK	Células assassinas naturais uterinas
VCAM	Molécula de adesão celular vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
ml	Mililitro
Ng	Nanograma
Mg	Micrograma

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1. REVISÃO DE LITERATURA	20
1.1 Considerações gerais	20
1.2 Linfócitos T auxiliares foliculares.....	21
1.2.1 <u>Linfócitos T foliculares circulantes</u>	26
1.2.2 <u>Linfócitos T reguladores foliculares</u>	29
1.3 Imunomodulação materna no ciclo gestatório	33
1.3.1 <u>Eventos iniciais na concepção</u>	33
1.3.2 <u>Células T e a interface materno-fetal</u>	35
1.3.3 <u>Imunomodulação pelos hormônios gestacionais e seus receptores</u>	37
1.3.4 <u>A infecção pelo HIV-1 durante a gestação e risco de transmissão vertical</u>	42
1.3.5 <u>Células T_{FH} na infecção pelo HIV-1</u>	50
1.4 Desordens do Espectro da Neuromielite Óptica	52
1.4.1 <u>Critérios de diagnóstico</u>	53
1.4.2 <u>Imunopatogênese da NMOSD</u>	60
1.4.3 <u>Tratamento da NMOSD</u>	67
2. OBJETIVOS	69
2.1 Geral	69
2.2 Específicos	69
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	73
3.1 Artigo 1 - Pregnancy favors the expansion of circulating functional follicular helper T cells (Artgo Publicado)	73
3.2 Artigo 2 – Pregnancy favors circulating IL-21-secreting TFH –like cell recovery in ARV-treated HIV-1-infected women (Artigo publicado)	83
3.3 Artigo 3 – The expansion of circulating IL-6 and IL-17-secreting follicular helper T cells is associated with neurological disabilities in neuromyelitis optica spectrum disorders. (Artigo publicado)	92
3.4 Artigo 4 – Pregnancy levels of estrogen and progesterone contribute to humoral immunity by activating B /T_{FH} cell axis (Artigo submetido)	99
4. DISCUSSÃO.....	146
CONCLUSÕES	158
REFERÊNCIAS.....	160

ANEXO A - Parecer consubstanciado do CEP 01	194
ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	195
ANEXO C - Parecer consubstanciado do CEP 02.....	197

INTRODUÇÃO

No contexto da imunidade humoral contra agentes infecciosos, a produção de anticorpos neutralizantes de alta afinidade é de vital importância para eliminar/neutralizar o invasor e/ou seus antígenos. A produção sustentada desses anticorpos, no entanto, depende da interação produtiva das células B com um subtipo particular de células T CD4⁺, as células T auxiliares foliculares (T_{FH} - do inglês, *T follicular helper*). As células T_{FH} são fundamentais para auxiliar na diferenciação dos linfócitos B em células B de memória e em plasmócitos de longa-vida secretores de anticorpos com troca de cadeia pesada (CHEVALIER *et al.*, 2011).

Apesar de sua origem ser primariamente nos gânglios linfáticos, contrapartes circulantes dessas células podem ser detectadas. Essas células T_{FH} circulantes (cT_{FH}) expressam vários comuns às T_{FH} dos linfonodos, tais como a expressão superficial do receptor de quimiocina CXCR5 e produção de interleucina (IL)-21 (BENTEBIBEL *et al.*, 2013; CHEVALIER *et al.*, 2011; MORITA *et al.*, 2011). Ademais, a expressão do receptor de morte programada-1 (PD-1) e do coestimulador induzível (ICOS) (SIMPSON *et al.*, 2010), associada à marcação de CCR6 e/ou CXCR3 (MA *et al.*, 2015; MORITA *et al.*, 2011), tem auxiliado na identificação de subtipos de células T_{FH} periféricas mais funcionais (MA *et al.*, 2014; MORITA *et al.*, 2011; SIMPSON *et al.*, 2010).

A identificação dessas células no sangue periférico tem permitido aos pesquisadores avaliar a biologia das cT_{FH} em diferentes contextos, como na gestação, aonde a produção de anticorpos é sabidamente favorecida (KANDA;TAMAKI, 1999). Nesse sentido, nosso grupo tem se dedicado a estudar o comportamento dessas células em gestantes saudáveis (artigo 1) e infectadas pelo vírus da imunodeficiência adquirida do tipo 1 (HIV-1) (artigo 2), bem como em pacientes com desordens do espectro da neuromielite óptica (NMOSD) (artigo 3) - uma doença autoimune muito prevalente em mulheres cuja imunopatogênese envolve a produção de autoanticorpos (LENNON *et al.*, 2004). Finalmente, uma vez que os resultados publicados nos artigos 1 e 2 demonstraram uma relação direta entre os níveis plasmáticos de estrogênio e a expansão das células T_{FH}, nossa

equipe dedicou-se a desvendar o efeito das doses de estrogênio e progesterona relacionadas à gestação em modular, *in vitro*, o comportamento de diferentes subtipos desses linfócitos como também de células B circulantes (artigo 4, submetido).

No geral, os resultados obtidos no contexto dos 4 artigos nos levam a sugerir que a expansão equilibrada de diferentes subtipos de células T_{FH} no contexto da gestação deve favorecer a produção de anticorpos protetores contra diferentes patógenos, ao mesmo tempo que evita a ativação de células B autorreativas implicadas em doenças autoimunes humorais, tais como a NMOSD.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Considerações gerais

O sistema imunológico é formado por células e moléculas que atuam juntas a fim de identificar e eliminar ou confinar potenciais microorganismos invasores causadores de doenças. A defesa contra esses microorganismos é mediada por reações iniciais da imunidade inata e por respostas tardias da imunidade adaptativa (ABBAS, 2012). Na hierarquia das funções imunes, os linfócitos T CD4⁺ ocupam uma posição de destaque por regular a função de todas as células da imunidade natural, tais como macrófagos e neutrófilos, bem como as outras células da imunidade adquirida: os linfócitos T CD8⁺ e as células B. Apesar da participação majoritária das células T CD4⁺ nas fases eferentes da resposta imune, a indução e o estabelecimento da resposta imune primária específica mediada por estes linfócitos são dependentes das células apresentadoras de antígeno (APC - do inglês, *Antigen Presenting Cells*), particularmente das células dendríticas (DCs - do inglês, *Dendritic Cells*) (WAN;FLAVELL, 2009).

Portanto, seguindo os eventos iniciais da resposta imune mediada pelas células da imunidade natural no local de infecção, e sob a ação de diferentes estímulos inflamatórios, as DCs adquirem mobilidade e direcionam-se para os tecidos ou órgãos linfoides secundários regionais, aonde irão iniciar a ativação dos linfócitos T. Durante sua trajetória, as DCs maduras tornam-se, através da expressão de diferentes moléculas de superfície, extremamente eficientes em apresentar diferentes antígenos para os linfócitos T (VERBOOGEN *et al.*, 2016).

Uma eficiente ativação primária das células T CD4⁺ depende de diferentes sinais cognitivos e solúveis acionados pelas DCs maduras durante a sinapse imunológica nos órgãos linfoides secundários (DUSTIN *et al.*, 2006) (Figura 1). O primeiro sinal fornecido pelas DCs é a apresentação de peptídeos antigênicos acoplados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC - do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) de classe II. Essa fase da resposta imune é fundamental, pois permite o reconhecimento, por parte dos linfócitos T CD4⁺ específicos, de peptídeos antigênicos. Entretanto, uma ativação eficiente dos

linfócitos T CD4⁺ contra microorganismos requer que as DCs maduras enviem um segundo sinal, que é inespecífico ao tipo de antígeno. Esse segundo sinal é mediado por pares de moléculas coestimuladoras como, por exemplo, moléculas pertencentes aos membros da família B7 (B7.1/CD80 e B7.2/CD86) expressos na superfície das DCs, que se ligam às moléculas CD28 dos linfócitos T CD4⁺. O engajamento desses dois sinais, primeiro e segundo, permite a produção de IL-2 pelas células T CD4⁺-antígeno específicas. A IL-2, conhecida também como fator de crescimento de células T, permite a proliferação de clones ativados de linfócitos T CD4⁺ (DUSTIN *et al.*, 2006; HENRICKSON; VON ADRIAN, 2007).

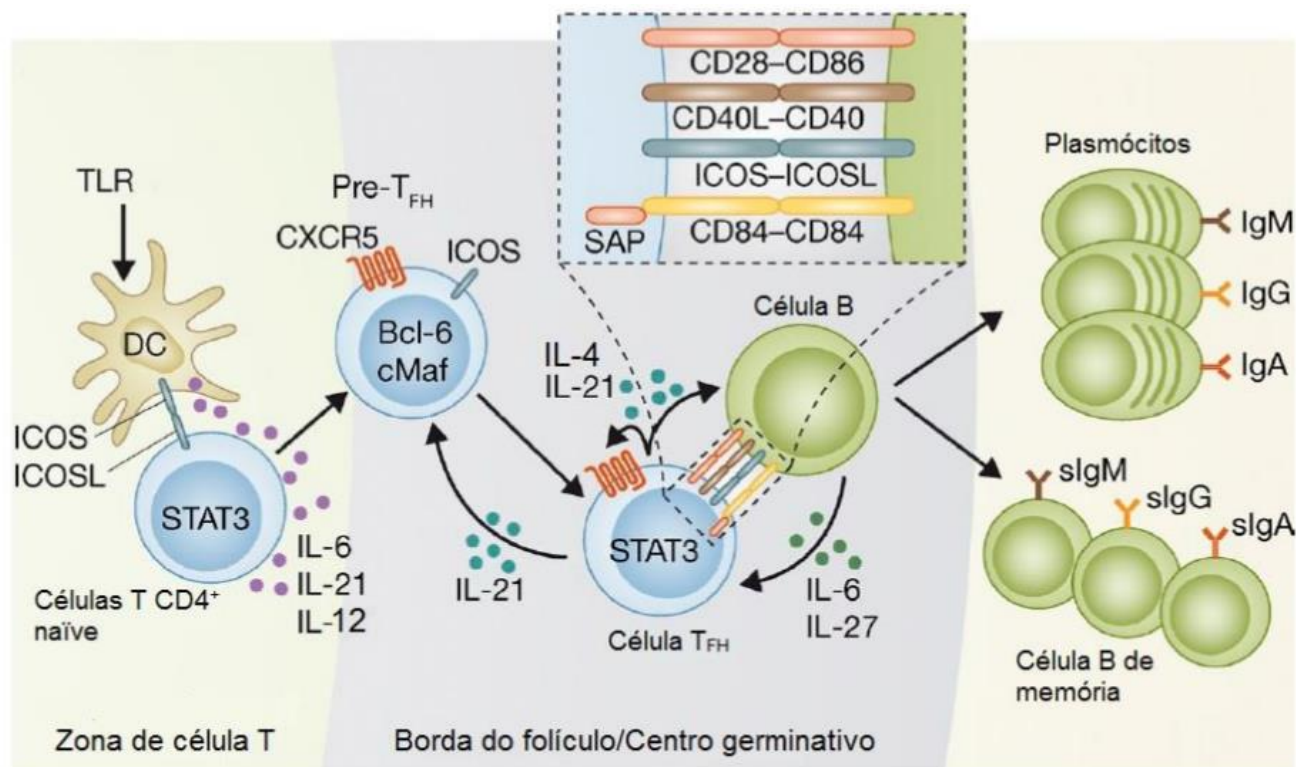
Seguindo ativação, um terceiro sinal, deflagrado principalmente por mediadores solúveis secretados pelas DCs, induz a diferenciação desses linfócitos T CD4⁺ clássicos em fenótipos que produzirão padrões polarizados de citocinas capazes de coordenar e regular uma variedade de eventos da resposta imune (VERBOOGEN *et al.*, 2016). Vários fatores influenciam na diferenciação final de linfócitos T CD4⁺ pelas DCs, mas citocinas e hormônios parecem ser imperativos no destino do fenótipo diferenciado (WAN; FLAVELL, 2009).

1.2 Linfócitos T auxiliares foliculares

Apesar de a biologia das células T CD4⁺ ser complexa, alguns aspectos funcionais dessa população referentes à definição de diferentes fenótipos são bem caracterizados (SCHIMITT; UENO, 2015). Os linfócitos T_{FH} são um importante subtipo de linfócitos T CD4⁺ especializado em auxiliar os linfócitos B (CROTTY, 2015). A existência desse fenótipo foi primeiramente proposta por alguns pesquisadores entre 2000 e 2001 (SCHAERLI *et al.*, 2000; BREITFELD *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2001). Entretanto, a aceitação como uma nova linhagem de células T CD4⁺ ocorreu em 2009, quando o Bcl-6 (do inglês, *B-cell lymphoma 6*) foi identificado como o fator de transcrição único desse subtipo celular (JOHNSTON *et al.*, 2009; NURIEVA *et al.*, 2009). Desde então, os linfócitos T_{FH} têm sido descritos como células capazes de auxiliar os linfócitos B no desenvolvimento do centro germinativo e na troca de classe de anticorpos (JOHNSTON *et al.*, 2009; NURIEVA *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2009) (Figura 1).

As células T_{FH} humanas localizadas nos órgãos linfoides secundários são caracterizadas pela alta expressão do fator de transcrição Bcl-6, do PD-1, do ICOS, do receptor de quimiocina CXCR5 e da produção de IL-21; e pela baixa expressão do receptor de quimiocina CCR7 (ONABAJO *et al.*, 2013). A diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ virgens (naïves) em linfócitos T_{FH} (Figura 1) requer principalmente a indução do fator de transcrição Bcl-6. Entretanto, o fator regulador de interferon 4 (IRF4 - do inglês, *Interferon Regulatory Factor 4*), fator de transcrição de zíper de leucina básica (BATF - do inglês, *Basic leucine zipper Transcription Factor*), c-MAF e os transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT - do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription*)-1, STAT-3 e STAT-4 também estão envolvidos na indução desse fenótipo (VINUESA *et al.*, 2016). A IL-6, assim como a IL-21, ativam os STAT-1 e STAT-3 que, juntos, induzem a expressão do Bcl-6 e c-MAF (CHOI; YANG; CROTTY, 2013; MA *et al.*, 2009a; PALLIKUTH; PARMIGIANI; PAHWA, 2012). A IL-6, secretada por DCs convencionais, DCs foliculares e por linfócitos B ativados (TANGYE *et al.*, 2013) induz a produção de IL-21 pelos próprios linfócitos T_{FH} (CHOI; YANG; CROTTY, 2013), o que também contribui para o estabelecimento do fenótipo celular. Em humanos, as citocinas IL-12, IL-23 e fator de crescimento transformador (TGF – transforming growth factor)- β , também são capazes de ativar os fatores de transcrição STAT-3 e STAT-4 que, por sua vez, induzem a expressão de Bcl-6 (MA *et al.*, 2009b; SCHMITT *et al.*, 2013, 2014). Além de citocinas, a interação célula-célula é importante para a indução dos fatores de transcrição nas células T_{FH}. A interação entre ICOS e seu ligante (ICOSL), presente nas DCs, também é necessária para induzir a expressão do Bcl-6 durante a fase inicial de diferenciação (CHOI *et al.*, 2011). Uma vez expresso, o Bcl-6 reprime a expressão do CCR7 e de fatores de transcrição, como a proteína de maturação induzida em linfócito B (Blimp - do inglês, *B lymphocyte induced maturation protein*)-1, envolvida na diferenciação de outros fenótipos de linfócitos T CD4⁺ não T_{FH}, enquanto regula positivamente a expressão de CXCR5, PD-1 e ICOS (CHOI *et al.*, 2011; KROENKE *et al.*, 2012). Em humanos, enquanto a IL-12 e IL-23, favorecem a diferenciação das células T_{FH} (SCHMITT *et al.*, 2013), a IL-2 inibe esse fenótipo celular por ativar STAT-5 que reprime a expressão de Bcl-6 (BALLESTEROS-TATO *et al.*, 2012; JOHNSTON *et al.*, 2012; LOCCI *et al.*, 2016; PEPPER *et al.*, 2011).

Figura 1 - Diferenciação das células T_{FH} e geração de células B de memória e plasmócitos



Legenda: As células T CD4⁺ naíve são ativadas na zona de células T dos tecidos linfoides secundários após o reconhecimento do complexo peptídeo-MHC de classe II nas DCs. As DCs fornecem sinais, através das citocinas IL-6, IL-21 e IL-12 e pela interação ICOS-ICOSL, que induzem a expressão de Bcl-6, c-MAF e CXCR5, permitindo que as células T CD4 pré T_{FH} migrem para os folículos de células B. Na borda do folículo, as células pré-T_{FH} interagem com as células B que apresentam o seu peptídeo cognato através do SAP (CD84), CD40/CD40L e ICOS/ICOSL. Essa interação permite a completa diferenciação das células T_{FH} e a formação dos centros germinativos. As células T_{FH} produzem IL-21 e IL-4 que auxiliam na diferenciação das células B em células de memória e em plasmócitos secretores de anticorpos.

Fonte: Adaptado de MA e colaboradores, 2012.

Classicamente, a função dos linfócitos T_{FH} é promover e sustentar a resposta imune humoral através do auxílio aos linfócitos B nos folículos dos órgãos linfoides secundários (Figura 2). Nesse sentido, a alta expressão de CXCR5 associada à baixa expressão do CCR7, permite que os linfócitos T_{FH} migrem, seguindo um gradiente de concentração formado pela quimiocina CXCL13, para os folículos; aonde irão coordenar a formação dos centros germinativos (CGs) - estruturas localizadas nos órgãos linfoides secundários caracterizadas pela intensa proliferação e diferenciação de linfócitos B (CROTTY, 2011). A interação ICOS-ICOSL também parece desempenhar um papel na migração das células T_{FH} em direção aos folículos

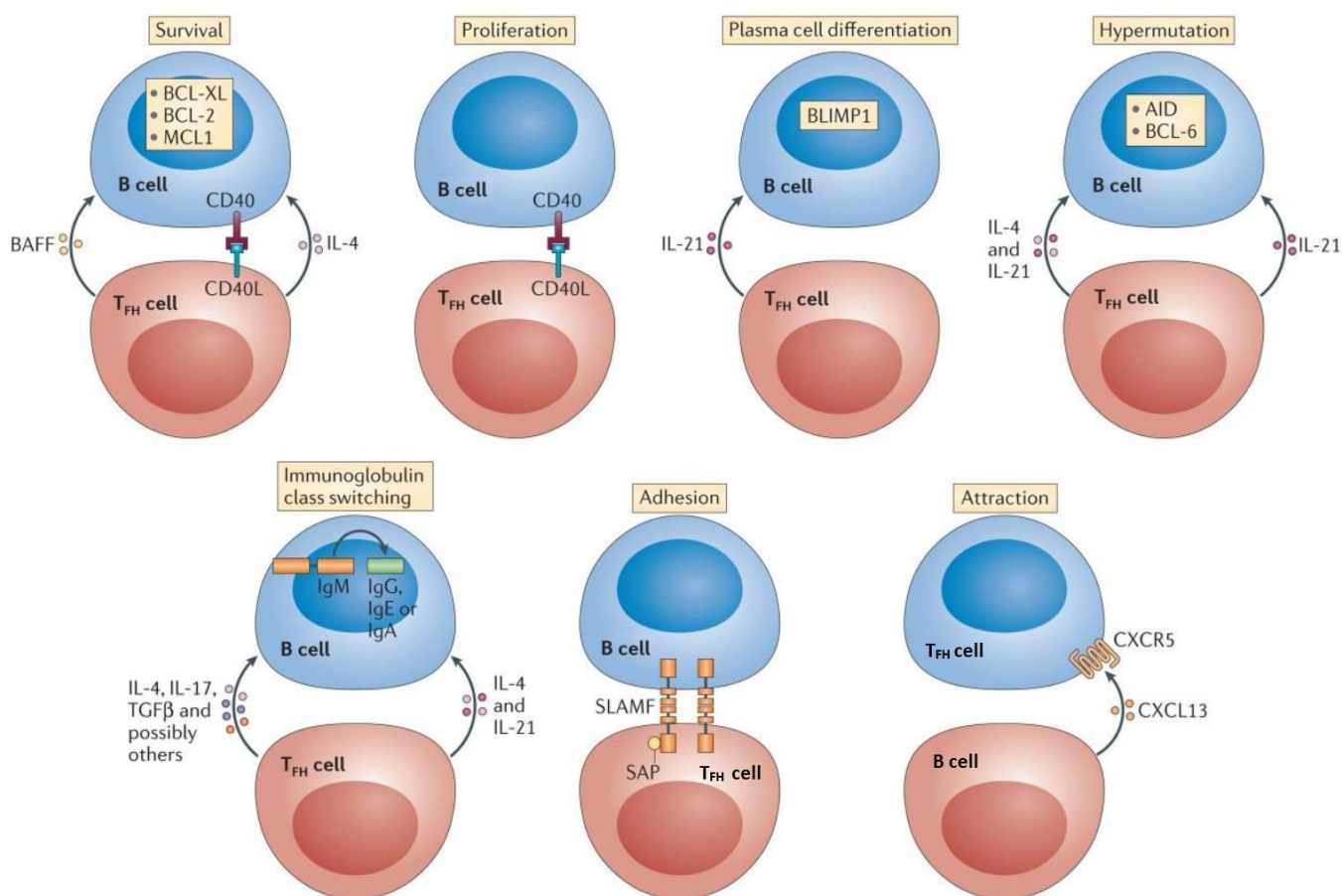
(XU *et al.*, 2013), provavelmente por estabilizar a expressão do CXCR5. Além disso, a interação entre as células T_{FH} e as células B mantém a expressão de Bcl-6 estável, o que promove a manutenção funcional do fenótipo T_{FH} (BAUMJOHANN *et al.*, 2013; CHOI *et al.*, 2011).

Uma vez nos folículos, os linfócitos T_{FH} auxiliam na formação dos CGs através do fornecimento de sinais necessários para a diferenciação, proliferação e sobrevivência dos linfócitos B (TANGYE *et al.*, 2013; CROTTY, 2011) (Figura 2). Esses sinais são fornecidos através da interação de moléculas de superfícies nas células T_{FH}, como ICOS, ligante de CD40 (CD40L), proteínas associadas ao SLAM (SAP) e PD-1, aos seus respectivos ligantes expressos nas células B e pela produção de IL-21 e IL-4 (MOIR; FAUCI, 2009; PALLIKUTH; PARMIGIANI; PAHWA, 2012). A interação da SAP com membros da família de moléculas de sinalização para ativação linfocítica (SLAM – do inglês, *Signaling Lymphocytic Activation Molecule*) permite a adesão entre as células T_{FH} e células B (YUSUF *et al.*, 2010), enquanto que a ligação do PD-1 ao PD-L1 em células B regula negativamente a formação do CG (WANG; HILLSAMER; KIM, 2011). Já a interação entre CD40 e CD40L é responsável pela proliferação e sobrevivência dos linfócitos B, além de promover a expressão da citidina desaminase induzida por ativação (AID – do inglês, *Activation-Induced cytidine Deaminase*) - enzima responsável por regular os processos de troca de classe e a hipermutação somática - e de ICOSL, que ao se ligar ao ICOS presente nas células T_{FH}, induzindo a produção de IL-21 (BAUQUET *et al.*, 2009; CROTTY, 2015; LIU *et al.*, 2015). A IL-21, por sua vez, induz a expressão de Bcl-6 nos linfócitos B, permitindo a diferenciação dessas células em plasmócitos secretores de anticorpos e em células B de memória (PALLIKUTH, 2012; CROTTY, 2011). A IL-4, produzida em baixos níveis pelas células T_{FH}, promove a sobrevivência dos linfócitos B, prevenindo a apoptose (CROTTY, 2011; YUSUF *et al.*, 2010). Ademais, IL-21 e IL-4, provavelmente por estabilizar a expressão de CD40 e CD40L, são importantes para os processos de hipermutação somática, maturação de afinidade e troca de classe da cadeia pesada do anticorpo (TANGYE *et al.*, 2013; CROTTY, 2011; SHULMAN *et al.*, 2013).

Nesse sentido, com a ajuda de sinais cognitivos e solúveis providos das células T_{FH}, outras classes de anticorpos, além de IgM, são produzidas, contendo nas regiões variáveis mutações pontuais que culminam com o aumento da afinidade de reconhecimento do anticorpo contra o antígeno. Consequentemente, quanto

maior a afinidade, maior a capacidade dessa molécula em neutralizar antígenos. Sendo assim, o estudo da biologia das células T_{FH} é fundamental, uma vez que a produção de anticorpos neutralizantes é necessária tanto para o desenvolvimento de uma imunidade protetora contra patógenos como para o sucesso de diversas vacinas (TANGYE *et al.*, 2013).

Figura 2 - Auxílio das células T_{FH} às células B em diferentes fases da resposta imune humoral



Legenda: Com o objetivo de simplificar, apenas alguns exemplos de fatores de transcrição, sinais cognitivos (moléculas de superfície) e solúveis (citocinas) importantes em cada processo da ativação das células B estão evidenciados na figura. Fonte: Adaptado de CROTTY, 2015.

1.2.1 Linfócitos T foliculares circulantes

Por muitos anos, estudos no que diz respeito às células T_{FH} eram limitados, pois, por questões éticas, acessá-las nos órgãos linfoides secundários de humanos era muito difícil. Entretanto, com as recentes descobertas de subtipos funcionais de células T_{FH} no sangue periférico de humanos (KING; TANGYE; MACKAY, 2008; UENO, 2016), o conhecimento sobre a biologia das células T_{FH} e a sua contribuição em doenças, tem aumentado nas últimas décadas.

Estudos têm mostrado que, uma vez diferenciadas, as células T_{FH} auxiliam em todos os eventos associados ao desenvolvimento dos CGs. Em seguida, elas podem deixar os folículos secundários e transitar pelos folículos vizinhos (SHULMAN *et al.*, 2013), ou podem passar a compor o contingente de células T de memória circulante, caracterizadas por expressarem CD45RO (KITANO *et al.*, 2011). Essas células T_{FH} circulantes são fenotipicamente identificadas pela expressão de CXCR5, apesar de apresentarem baixíssima expressão de Bcl-6 (BOSSALLER *et al.*, 2006), e possuem a habilidade em auxiliar os linfócitos B, pelo menos em parte, por secretar grandes quantidades de IL-21 e IL-10 (BENTEBIBEL *et al.*, 2013; CHEVALIER *et al.*, 2011; MORITA *et al.*, 2011). Ademais, a expressão de ICOS e PD-1 (SIMPSON *et al.*, 2010), associada à marcação de CCR6 e/ou CXCR3 (MA *et al.*, 2015; MORITA *et al.*, 2011), tem auxiliado na identificação de subtipos de células T_{FH} periféricas mais funcionais (MA *et al.*, 2015; MORITA *et al.*, 2011; SIMPSON *et al.*, 2010) (Figura 3).

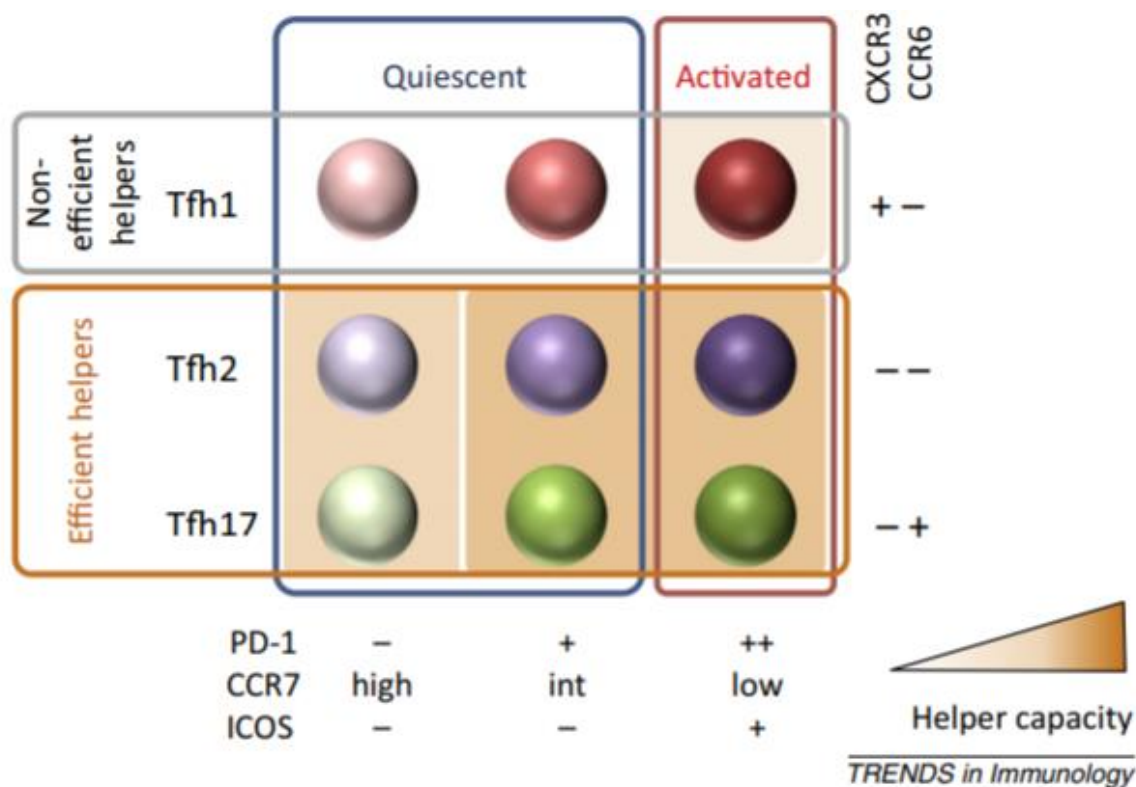
Dessa forma, a expressão de ICOS e PD-1 permite definir as células T_{FH} de acordo com o seu estado de ativação. A maioria das células T_{FH} circulantes são ICOS⁻PD-1⁻, seguido das células ICOS⁻PD-1⁺ e uma pequena porcentagem é ICOS⁺PD-1⁺⁺ (HE *et al.*, 2013; LOCCI *et al.*, 2013). As células T_{FH} circulantes ICOS⁺PD-1⁺⁺ expressam Ki-67, um marcador indicativo de proliferação celular, enquanto que as células T_{FH} circulantes ICOS⁻PD-1⁺ e ICOS⁻PD-1⁻ são negativas para Ki-67, ou seja, estão em um estado quiescente (MA *et al.*, 2015; MORITA *et al.*, 2011; SIMPSON *et al.*, 2010). Entre as células quiescentes, as ICOS⁻PD-1⁺ parecem mais eficientes em auxiliar as células B do que o subtipo ICOS⁻PD-1⁻, que parecem necessitar de um tempo maior ou mais sinais de ativação (SCHMITT; BENTEBIBEL; UENO, 2014).

Classicamente, as moléculas de superfície CCR6 e CXCR3 são receptores de quimiocina associados aos subtipos efetores de linfócitos T CD4⁺, os linfócitos T auxiliares do tipo 17 (Th17) e linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1), respectivamente. A ausência de ambos os marcadores de superfície, por sua vez, ajuda a identificar os linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2). Resumidamente, as células Th1, através da produção de elevados níveis de IL-2 e IFN- γ , medeiam o combate a microorganismos intracelulares obrigatórios ou facultativos por ativar fagócitos, células assassinas naturais (células NK - do inglês *natural killer*) e linfócitos T CD8⁺ (MCKINSTRY *et al.*, 2010). A principal citocina liberada pelas DCs responsável pela indução desse fenótipo é IL-12 (MANETTI *et al.*, 1993), apesar do IFN- γ também contribuir para a diferenciação das células Th1 (FARRAR *et al.*, 2002). A IL-12 e o IFN- γ , por induzirem a expressão do STAT-4, favorecem o estabelecimento do fenótipo Th1 através da elevação da expressão de T-bet, considerado o principal fator de transcrição envolvido na estabilidade das células Th1 (FARRAR *et al.*, 2002). As células Th1 são caracterizadas pela expressão de elevados níveis dos receptores de quimiocinas CXCR3 e CCR5 em sua superfície celular, o que permite o seu recrutamento para os sítios inflamatórios que produzem as quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 (ligantes do CXCR3); CCL2, CCL8 e CCL5 (ligantes do CCR5) (ANTONELLI *et al.*, 2014). Em contrapartida, na presença de elevados níveis de IL-4, as DCs favorecem a diferenciação das células Th2. Esse processo de comprometimento se dá pela capacidade da IL-4 induzir nas células T CD4⁺ a expressão de STAT-6 que, por sua vez, eleva a expressão de GATA (do inglês, *globin transcription factor*)-3. No núcleo, a proteína GATA-3 induz a transcrição de genes que codificam as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (FARRAR *et al.*, 2002). A liberação dessas citocinas tem sido implicada na resposta imune protetora contra infestações por helmintos e na patogênese das reações de hipersensibilidade do tipo I (ZHU *et al.*, 2010a; ZHU *et al.*, 2010b). Diferente das células Th1, as células Th2 humanas têm sido caracterizadas pela expressão dos receptores de quimiocinas CCR3, CCR4 e CCR8 que as direcionam para áreas ricas em certas quimiocinas, tais como CCL11, CCL26, CCL3, CCL5 e CCL1 (COSMI *et al.*, 2001). No que diz respeito ao fenótipo Th17, a sua indução depende das citocinas IL-1 β e, principalmente, IL-23 em associação com o fator transformador de crescimento (TGF - do inglês, *Transforming Growth Factor*)- β , que induzem o transativador RORC,

envolvido na regulação da expressão de diferentes genes implicados em sua manutenção (GUTCHER;BECHER, 2007). Amplamente implicados na resposta imune contra bactérias extracelulares e fungos (Annunziato, 2015; Szulc-Dąbrowska, 2015), os linfócitos Th17 classicamente sintetizam IL-17A (IL-17), IL-17F, IL-21 e IL-22 que induzem as células imunes e parenquimatosas a secretar IL-8, principal citocina envolvida no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção (MIOSSEC, 2009; ANNUNZIATO *et al.*, 2012). Na superfície celular, as células Th17 humanas expressam elevados níveis dos receptores de quimiocina CCR6 e CCR4, o que facilita esses linfócitos a migrarem para áreas de inflamação ricas nas quimiocinas CCL3, CCL5 e CCL20 (ACOSTA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007; ANNUNZIATO *et al.*, 2007).

Nesse contexto, levando em consideração a habilidade em expressar CXCR3 e/ou CCR6, SCHIMITT e colaboradores (2014) propuseram, adicionalmente, outra classificação das células T_{FH} circulantes, todas capazes de produzir IL-21, em três subtipos: CXCR3⁺CCR6⁻, CXCR3⁻CCR6⁺ e CXCR3⁻CCR6⁻ (SCHMITT; BENTEBIBEL; UENO, 2014) (Figura 3). O subtipo CXCR3⁺CCR6⁻, por produzir a citocina interferon (IFN)- γ e expressar T-bet, é chamado de T_{FH1}, enquanto que o subtipo CXCR3⁻CCR6⁺, por produzir IL-17 e expressar ROR γ t, é designado T_{FH17}. Finalmente, o subtipo celular CXCR3⁻CCR6⁻ é conhecido como T_{FH2} devido sua habilidade em produzir IL-4 e expressar GATA-3 (ACOSTA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2015; MORITA *et al.*, 2011).

Em relação ao status funcional, SCHIMITT e colaboradores (2014) classificaram as células T_{FH} circulantes como eficientes (T_{FH2} e T_{FH17}) e não eficientes (T_{FH1}) em auxiliar na resposta primária de anticorpos (SCHMITT; BENTEBIBEL; UENO, 2014). Neste estudo, quando linfócitos B virgens (naïves) foram colocados em cocultura com células T_{FH2} ou T_{FH17} periféricas, diferenciaram-se em plasmócitos capazes de sofrer o processo de troca de classe de anticorpo e produzir IgG e IgE ou IgG e IgA, respectivamente (MORITA *et al.*, 2011). Por outro lado, as células T_{FH1} não foram capazes em auxiliar os linfócitos B naïve *in vitro*, mas sim, em induzir a diferenciação das células B de memória em plasmócitos (BENTEBIBEL *et al.*, 2013). Por outro lado, em algumas situações patológicas, tais como nas reações de hipersensibilidades, uma persistente reação dos CGs é observada, sendo indicativo de falta de regulação local (SAGE; SHARPE, 2016).

Figura 3 -Subtipos de células T_{FH} circulantes

Legenda: Os marcadores CXCR3 e CCR6 diferencia a capacidade em auxiliary das células T_{FH} em não eficientes (T_{FH1}) e em eficientes (T_{FH2} e T_{FH17}). A expressão de ICOS define as subpopulações celulares quiescentes e ativadas de cada subtipo. A capacidade em auxiliar das células T_{FH1} é limitada ao subtipo de células B de memória. Embora ambos os subtipos quiescentes das células T_{FH2} e T_{FH17} serem capazes de auxiliar as células B, o subtipo ICOS⁺PD-1⁺ CCR7^{int} promove auxílio imediato as células B de memória. As células T_{FH2} e T_{FH17} produzem diferentes citocinas que regulam diferentemente a troca de isotipo. A intensidade da cor laranja em cada subtipo de T_{FH} está relacionada à capacidade em auxiliar as células B.

Fonte: Adaptado de SCHMITT *et al.*, 2014.

1.2.2 Linfócitos T reguladores foliculares

Apesar de não serem completamente elucidados até o momento, os mecanismos envolvidos no controle dos CGs devem contar com a participação de um subtipo de células T_{FH}, as células T reguladoras foliculares (T_{FR} - do inglês, *Follicular Regulatory*) (WOLLENBERG *et al.*, 2011). A definição dessa nomenclatura provém de outra subpopulação de células T CD4⁺, fundamental para o restabelecimento da homeostase imune, os linfócitos TCD4⁺ reguladores (Treg) (PANKRATZ *et al.*, 2016).

Os linfócitos Treg são essenciais na manutenção da autotolerância imune e no controle das respostas inflamatórias contra patógenos, suprimindo a ação de diversos linfócitos efetores, especialmente os linfócitos Th1, Th2, Th17 e T foliculares (OHKURA *et al.*, 2013). Existem diferentes subtipos de células Treg descritos na literatura, entretanto, a maioria dos estudos são centrados na descrição fenotípica e funcional dessas células que expressam o marcador Foxp3 (do inglês, *X-linked Forkhead box P3*), um fator de transcrição essencial para seu desenvolvimento, manutenção e função (VIGNALI *et al.*, 2008). Outros marcadores que podem ser expressos são associados à capacidade funcional dessas células, tais como o CD39 e o antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4 - do inglês, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) (FONTENOT *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2009). Os mecanismos pelos quais essas células suprimem as respostas inflamatórias são variados e envolvem tanto a inibição das células efetoras através de contato célula-célula, incluindo a via Fas/FasL e o complexo granzimas B/perforina, quanto a liberação de altos níveis de citocinas antiinflamatórias, tais como IL-10 e TGF- β (RAIMONDI *et al.*, 2007; JONULEIT *et al.*, 2001; RONCAROLO *et al.*, 2001).

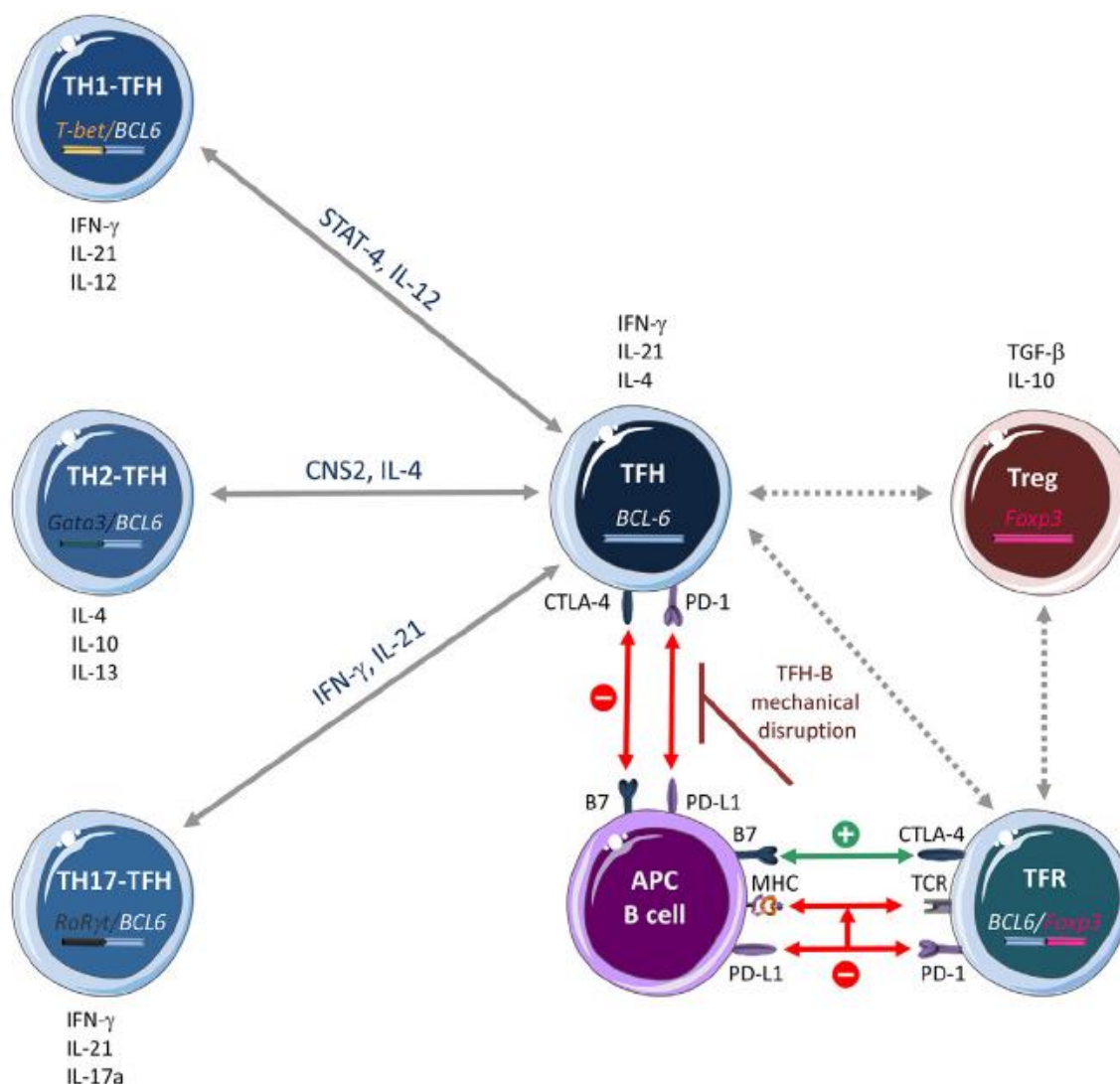
No que diz respeito às células T_{FR}, assim como as células T_{FH}, são caracterizadas pela alta expressão de CXCR5, PD-1 e ICOS, porém expressam Bcl-6 em níveis inferiores e são capazes de expressar os fatores de transcrição Blimp1 e FoxP3. Além disso, também expressam CTLA-4, o receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoides (GITR - do inglês, *Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor*) e é capaz de produzir IL-10 (CHUNG *et al.*, 2011; LINTERMAN *et al.*, 2011; WOLLENBERG *et al.*, 2011) (Figura 4).

Ao contrário das células T_{FH}, que são diferenciadas a partir de células T CD4⁺ naíves, a maioria das células T_{FR} tem como precursoras as células Treg naturais (CHUNG *et al.*, 2011; LINTERMAN *et al.*, 2011) (Figura 4). De fato, análises do repertório do receptor das células T (TCR - do inglês, *T Cell Receptor*) mostraram que as células T_{FR} apresentam especificidades diferentes das células T_{FH} do mesmo CG, respondendo mais fortemente a antígenos próprios do que a antígenos estranhos (MACEIRAS *et al.*, 2017; RITVO *et al.*, 2018). Entretanto, outros estudos têm demonstrado que as células T_{FR} também podem ser induzidas a partir de células naíves após imunização com antígenos próprios ou não-próprios (ALLOULOU *et al.*, 2016). Os mecanismos pelos quais as células T_{FR} executam seus efeitos

reguladores nos CGs não estão totalmente elucidados, porém devem envolver interações diretas com as células T_{FH} e células B locais (SAGE; SHARPE, 2016; ZHU; ZOU; LIU, 2015). Estudos *in vitro*, tanto em modelo animal como em humanos, mostraram que as células T_{FR} podem inibir a proliferação e a produção de citocinas pelas células T_{FH} , assim como a proliferação e produção de imunoglobulinas pelas células B (FONSECA *et al.*, 2017; SAGE *et al.*, 2013, 2014a; WING *et al.*, 2017). Em animais nocauteados para o gene que codifica PD-1, as células T_{FR} apresentaram maior atividade supressora sobre as células T_{FH} e as células B (SAGE *et al.*, 2013), indicando que a ligação PD-1/PD-L1 atenua a função dos linfócitos T_{FR} . Por outro lado, a depleção do CTLA-4 das células T_{FR} diminuiu a sua capacidade supressiva, resultando no aumento de células T_{FH} e de CGs (SAGE *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015). De forma interessante, animais com células T_{FR} incapazes de produzir IL-10 apresentaram uma redução no número de células B no CG e nos níveis de anticorpos específicos, sugerindo que a IL-10 apresenta um papel na manutenção do CG (LAIDLAW *et al.*, 2017).

Apesar de a dinâmica e a caracterização das células T_{FR} circulantes não estarem ainda bem definidas, estudo realizado por SAGE e colaboradores (2014) mostrou que as células T_{FR} circulantes, caracterizadas como $CD4^+CXCR5^+FoxP3^+$, apresentam características de células de memória, mas com menor capacidade supressiva em relação às células efetoras encontradas nos órgãos linfoides de camundongos. Em humanos, FONSECA e colaboradores (2017) demonstraram que as células caracterizadas como $CD4^+CXCR5^+FoxP3^+$ podem ser localizadas tanto no sangue periférico como nos CGs. Além disso, a maioria dessas células encontradas na circulação não expressam PD-1, ICOS nem Bcl-6 e apresentam menor atividade supressora em comparação a sua contraparte encontrada nos CGs. Sendo assim, a descoberta das células T_{FH} e T_{FR} circulantes forneceram ferramentas experimentais que possibilitam o estudo da biologia dessas células em diferentes contextos que envolvem a produção de anticorpos como, por exemplo, em gestantes - infectadas ou não pelo HIV-1 - e em doenças autoimunes humorais, como a neuromielite óptica (LENNON *et al.*, 2004).

Figura 4 - Plasticidade das células T foliculares



Legenda: Subtipos de células T_{FH} e células Treg foram classificadas previamente baseadas na produção específica de citocinas (em preto) e na expressão dos fatores de transcrição. Entretanto, estudo recente demonstrou que os subtipos de células T CD4⁺ tem uma grande capacidade de trans-diferenciação e inter-coversão. Evidências indicam que as células Treg e T_{FH} estão no centro de um sistema interconectado onde as células estão em um estado multifuncional e podem responder a citocinas e fatores de transcrição que influenciam em sua função e diferenciação. Células T_{FH} podem se diferenciar em T_{FH1} e T_{FH2}, que expressam dois fatores de transcrição (Bcl-6 e T-bet ou GATA3, respectivamente) e moléculas específicas, bem como STAT-4 e IL-12 (T_{FH1}) e CNS2 e IL-4 (T_{FH2}). A adaptação refinada ao microambiente é possibilitada através de um complexo processo de remodelação epigenética regulado por fatores de transcrição específicos para cada subtipo celular. Neste complexo sistema celular, os mecanismos de interação das células T_{FH} e Treg não são totalmente conhecidos. PD-1/CTLA-4 em conjunto contribuem para a regulação das células T_{FR}/T_{FH}. PD-1, que é altamente expressa em ambas as células, exercem um efeito inibitório na diferenciação/função das células T_{FR}. Através da limitação da sinalização via TCR, PD-1 aumenta o número de células B que encontram as células T_{FH}, prevenindo a sua proliferação acelerada e permitindo a ativação adequada de células B. CTLA-4 é altamente expresso pelas células T_{FR} e controla negativamente sua

diferenciação e expansão e, conseqüentemente, o destino das células T_{FH} . A interação de alta afinidade de CTLA-4 nas células T_{FR} com B7 nas células B pode prevenir a ligação de células T_{FH} com as células B. De acordo com a natureza e do microambiente do estímulo, PD-1 e CTLA-4 podem modular o programa folicular de forma distinta. Verde: ativação; Vermelho: inibição. Setas tracejadas: interações que ainda não foram confirmadas experimentalmente.

Fonte: Adaptado de SAGE *et al.* 2013, 2014 e 2016.

1.3 Imunomodulação materna no ciclo gestatório

Durante a gestação, o feto, por ser semi-alogênico, deveria induzir fortes respostas imunes maternas, o que levaria a sua rejeição. Entretanto, múltiplos mecanismos moleculares e celulares evoluíram a fim de permitir o início e a manutenção da gestação (HUNT; LANGAT, 2009; TAGLAUER *et al.*, 2010). Dentre eles, estão a diminuição da expressão de aloantígenos polimórficos na placenta e as alterações locais e sistêmicas na resposta imune materna durante a gravidez (DE MESTRE *et al.*, 2010).

1.3.1 Eventos iniciais na concepção

A resposta imune materna aos antígenos paternos inicia-se quando antígenos presentes no líquido seminal entram em contato com o epitélio da mucosa cervical/vaginal (MOLDENHAUER *et al.*, 2009). Fatores solúveis contidos no sêmen induzem a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pelas células epiteliais do cérvix e do útero (BEAMAN *et al.*, 2011; ROBERTSON *et al.*, 1996; ROBERTSON, 2005; ROBERTSON, 2007; SHARKEY *et al.*, 2007), o que leva ao recrutamento de macrófagos (JAISWAL *et al.*, 2012), DCs, granulócitos (ROBERTSON *et al.*, 1996) e linfócitos (SHARKEY *et al.*, 2012a) que acabam por acumular-se neste sítio anatômico por dias (ROBERTSON *et al.*, 1996; SHARKEY *et al.*, 2012).

No entanto, a indução e a manutenção das respostas inflamatórias maternas contra os antígenos seminais paternos são incompatíveis com a manutenção da fertilidade, já que o conceito expressa alguns alelos do complexo MHC de origem paterna (TROWSDALE *et al.*, 2006), além da possível expressão de antígenos de

histocompatibilidade menores relacionados ao cromossomo sexual (H-Y), no caso do conceito ser um menino (BERTRAMS *et al.*, 1971; FERNANDEZ *et al.*, 1999; HUTTER;DOHR, 1998; MARTÍN-VILLA *et al.*, 1996; TAFURI *et al.*, 1995; THALER *et al.*, 1989; ZHOU;MELLOR, 1998). Logo, uma manobra para bloquear o avanço dessa resposta inflamatória é a presença, no líquido seminal, de agentes imunomoduladores, como a prostaglandina E2 (PGE2) e TGF- β (ROBERTSON *et al.*, 2002; KELLY;CRITCHLEY, 1997).

A PGE2 é abundante no sêmen humano (Robertson *et al.*, 2002) e, dando continuidade à fertilização e ao desenvolvimento inicial do conceito, exerce um papel importante na mobilidade do embrião, na sua implantação e na função placentária (KLEIN, 2015). O TGF- β é sintetizado em altos níveis na forma latente e é ativado após a ejaculação (TREMELLEN, 1998). Apesar de sua conhecida função imunossupressora, no líquido seminal, o TGF- β contribui para desencadear a resposta das células cervicais ao sêmen, atuando através da via de sinalização convencional do TGF- β para induzir a expressão do fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF - do inglês, *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) e IL-6, duas citocinas com funções-chave no estabelecimento da gravidez (SHARKEY *et al.*, 2012b). Estudos mostraram que uma redução da expressão da IL-6 nos tecidos reprodutivos femininos está relacionada ao aborto espontâneo precoce (JASPER *et al.*, 2007; VON WOLFF *et al.*, 2000) e determinou o GM-CSF como fator-chave na regulação da fertilidade, através das suas ações nas DCs do trato reprodutivo e no desenvolvimento do embrião (ROBERTSON, 2007).

Acredita-se que o intenso recrutamento de monócitos para o útero gravídico induzido pelo GM-CSF e IL-6 ajude na eliminação de resíduos potencialmente deletérios à gestação gerados durante os processos de nidação e invasão do blastocisto (MOLDENHAUER *et al.*, 2009; ROBERTSON, 2005; ROBERTSON *et al.*, 2009a; ROBERTSON *et al.*, 2009b). Entretanto, no curso natural da gestação, eventos inflamatórios maternos devem ser atenuados para que o desenvolvimento do conceito possa ocorrer. Esse evento pode ter início precoce com a presença de TGF- β e IL-10 no líquido seminal (DENISON *et al.*, 1999).

Na decídua do primeiro trimestre, a população de células imunes maternas é dominada por células assassinas naturais uterinas (uNK - do inglês, *uterine Natural Killer*) não citotóxicas, imunomoduladoras e reguladoras do trofoblasto (KING, 2000;

STARKEY *et al.*, 1988). Ademais, um abundante número de macrófagos maternos com um fenótipo alternativo, conhecidos como M2, tem sido associado ao sucesso da gestação (GUSTAFSSON *et al.*, 2008). Ao contrário das células uNK, os macrófagos M2 permanecem em níveis elevados no útero gravídico até o término da gravidez (ABRAHAMS *et al.*, 2004b; FEST *et al.*, 2007). Acredita-se que essas células possam desempenhar um papel-chave na limpeza local por remover células trofoblásticas em apoptose, reduzindo assim o tempo de exposição de células semi-alogênicas potencialmente imunogênicas (HUANG *et al.*, 2006). Outra função provável é a de controlar possíveis invasores externos, os patógenos, que podem ter efeitos adversos ao desenvolvimento da gestação (FEST *et al.*, 2007). Apesar de representarem uma população minoritária no útero gravídico, as células T, sob a influência dos hormônios gestacionais, desempenham uma função-chave na regulação da resposta imune na interface materno-fetal (TRUNDLEY; MOFFETT, 2004).

1.3.2 Células T e a interface materno-fetal

Há mais de 50 anos, Medawar e colaboradores propuseram pela primeira vez a existência de mecanismos de regulação mediados pelas células T que suprimem o sistema imunitário materno (BILLINGTON, 2003; MEDAWAR, 1953). Após a descoberta da dicotomia funcional das células T auxiliares, na década de 1980, por vários anos a tolerância materna aos aloantígenos fetais foi explorada no contexto do eixo Th1/Th2, sendo protetoras ao feto as citocinas liberadas pelas células Th2, por anular a resposta imunitária materna do tipo Th1, que seria responsável pelo aborto (RAGHUPATHY, 1997; WEGMANN *et al.*, 1993). No entanto, esta explicação se tornou insuficiente e agora, o paradigma Th1/Th2, foi expandido para o paradigma Th1/Th2/Th17/Treg (SAITO, 2010).

Na dinâmica das citocinas, acredita-se que citocinas inflamatórias são necessárias em várias fases da gravidez, em particular, durante o período inicial da implantação (WILCZNSKI, 2005). Neste período, as citocinas, tais como IL-1 e TNF- α , tornam o estabelecimento da gravidez possível, estimulando, por exemplo, a produção de fator inibidor de leucemia (LIF - do inglês, *Leukemia Inhibitory Factor*)

ou aumentando a angiogênese. No entanto, níveis excessivos dessas citocinas e do IFN- γ , produzidos pelas células Th1, são deletérios para o sucesso da gravidez (KWAK-KIM *et al.*, 2014).

Outro fenótipo inflamatório de células T que tem sido implicado no curso da gestação é o Th17 (PONGCHAROEN, 2009). Em muitas mulheres que sofrem abortos espontâneos recorrentes, uma elevada frequência de células Th17 tem sido detectada no sangue periférico e na decídua, seguindo a interrupção da gestação (SAITO, 2010; WANG *et al.*, 2010).

Por outro lado, apesar de estudos em camundongos terem relatado o papel protetor da imunidade do tipo Th2 na gravidez (PICCINNI *et al.*, 1998; SAITO, 2000; WEGMANN, 1993), em humanos, IL-4 e IL-5 não parecem ser críticas para o desenvolvimento bem sucedido do conceito (SAITO, 2010). Entretanto, parece menos questionável o papel das citocinas antiinflamatórias no sucesso da gestação (GUERIN *et al.*, 2009). Acreditamos que os achados contraditórios sobre o envolvimento das citocinas típicas Th2 no sucesso da gestação em camundongos (PICCINNI *et al.*, 1998; SAITO, 2000; WEGMANN, 1993) deva-se a capacidade de células Th2 murinas de produzirem IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória produzida em grandes quantidades pelas células Treg humanas (RUBTSOV, 2008).

Nesse sentido, as células Treg estão envolvidas na tolerância fetal e, a enzima heme oxigenase-1 (HO-1), uma molécula produzida diretamente na interface materno-fetal, parece estar envolvida na geração desses linfócitos no útero gravídico (SOLLWEDELL *et al.*, 2005). Ademais, o líquido seminal e os espermatozoides promovem a indução, a expansão e a atividade regulatória das células Treg (ROBERTSON *et al.*, 2009; GUERIN *et al.*, 2011; BALANDYA *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013; TELES *et al.*, 2013). Em humanos, diversos estudos mostram um aumento da frequência das Tregs na decídua e no sangue periférico durante o primeiro e o segundo trimestre da gestação (HEIKKINEN *et al.*, 2004; XIONG; YUAN; HE, 2013). Entretanto, no terceiro trimestre, os níveis das Tregs no sangue periférico começam a diminuir (SEOL *et al.*, 2008). Essa diminuição, no entanto, pode estar associada ao recrutamento desses linfócitos para o útero gravídico (JASPER; TREMELLEN; ROBERTSON, 2006). Adicionalmente, as Tregs também podem ser geradas na decídua a partir das células T CD4⁺ virgens quando estimuladas por DCs tolerogênicas locais, identificadas pela expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e produção de TGF- β (ALUVIHARE; KALLIKOURDIS; BETZ,

2004; DIETL *et al.*, 2006). Os mecanismos gerais utilizados pelas Tregs para inibir as células T CD4⁺ e T CD8⁺ efetoras podem ser diretos, através da produção de IL-10 e TGF- β , e/ou indireto, por inibir as APCs imunogênicas (HEIKKINEN *et al.*, 2004). Nesse último caso, o CTLA-4 expresso pelas Tregs, pode se ligar às moléculas da família B7 (B7-1/CD80 e B7-2/CD86), desativando as APCs (CEDERBOM; HALL; IVARS, 2000). Outro mecanismo que também está envolvido na inibição das células T efetoras é a expressão de FasL pelas células da placenta e da decídua que pode levar à apoptose dos linfócitos T ativados que expressam Fas (ABRAHAMS *et al.*, 2004a).

Sendo assim, numerosas células imunes estão presentes no endométrio, e todas elas contribuem, à sua maneira, no estabelecimento da gravidez. No entanto, para evitar a rejeição do embrião, o controle de suas atividades é mediado por diferentes eventos humorais e hormonais (CUTOLO *et al.*, 2004; GROSSMAN, 1984).

1.3.3 Imunomodulação pelos hormônios gestacionais e seus receptores

Os hormônios gestacionais exercem diferentes efeitos sobre o sistema imune que, dependendo das suas concentrações, podem exercer ações pró-inflamatórias ou imunorreguladoras (PATAS *et al.*, 2013) (Figura 5). Este evento ocorre quando as células imunes são recrutadas para órgãos e tecidos reprodutores femininos sendo, assim, expostas à ação hormonal (CUTOLO *et al.*, 2004; GROSSMAN, 1984) através da interação dos hormônios com seus receptores específicos (DUAX *et al.*, 1985). Durante a gravidez, a gonadotrofina coriônica humana (hCG - do inglês, *human chorionic gonadotropin*) é inicialmente produzida pelo blastocisto, 6 a 8 dias após a fertilização (LOPATA; HAY, 1989) e depois, pelo sinciciotrofoblasto (HOSHINA *et al.*, 1985). Os níveis de hCG aumentam no primeiro trimestre de gravidez e diminuem para 10% dos valores de pico durante o segundo e terceiro trimestres (HEALY, 1987). É amplamente conhecido que a hCG tem propriedades imunomoduladoras, reduzindo, por exemplo, a proliferação e produção de citocinas inflamatórias pelas células T (KAYE; JONES, 1971; ADCOCK *et al.*, 1973; HAN, 1974) e linfócitos B (HAMMARSTRÖN *et al.*, 1979) em resposta a diferentes

estímulos. Uma das funções do hCG é elevar a produção de progesterona (CHEN *et al.*, 2011), além de atuar localmente modulando as funções das células imunes e aumentando a angiogênese (PRABHUDAS *et al.*, 2015). Estudos têm sugerido que os efeitos supressores do hCG sobre os linfócitos efetores devem ser preferencialmente indiretos, através do favorecimento da expansão das células Treg (BANSAL *et al.*, 2012).

A regulação de vários processos reprodutivos - como a ovulação, implantação e manutenção da gestação - é mediada pela progesterona (POLIKARPOVA *et al.*, 2019). Este hormônio, que auxilia na redução da contração uterina (RAFIEE *et al.*, 2019), é naturalmente produzido no ovário e na placenta; e a sua concentração, tanto no sangue periférico quanto na placenta, eleva-se linearmente com o tempo de gestação chegando a atingir valores 90 ng/mL (SIITERI;STITES 1983). Em humanos, o corpo lúteo produz progesterona no início da gestação e, após 8 semanas, a placenta passa a ser a maior fonte desse hormônio (HALL;KLEIN, 2017). Os efeitos da progesterona sobre o sistema imune são classicamente imunossupressores (SZEKERES-BARTHO, 2009), o que inclui a diminuição da migração de células NK (SENTMAN *et al.*, 2004), linfócitos e macrófagos (HEL *et al.*, 2010), além de atenuar a capacidade proliferativa dos linfócitos no trato genital feminino (WHITELAW;CROY, 1996; INOUE, 1996). Ademais, esse hormônio inibe as atividades líticas e a produção de IFN- γ pelas células NK (ARRUVITO *et al.*, 2008) e pelas células T CD8⁺ citolíticas. Consequentemente, ao inibir a produção de IFN- γ , a progesterona reduz respostas típicas do fenótipo Th1, o que também compromete a função microbicida exercida pelos macrófagos (CLEMENS *et al.*, 1979; MANNEL *et al.*, 1990; PICCINNI *et al.*, 1995; HUGHES *et al.*, 2013). De forma adicional, o estímulo de progesterona suprime o fenótipo Th17 e estimula as células Th2 produtoras de IL-4 e IL-5 (HALL;KLEIN, 2017). Em contrapartida, elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias regulam negativamente a secreção de progesterona pelo trofoblasto da placenta e do corpo lúteo (FEINBERG, 1994; PEDERSEN *et al.*, 1994; BEST, 1995), favorecendo a expansão de células T embriotóxicas - o que compromete, assim, o desenvolvimento do conceito.

Para exercerem as suas funções, a progesterona e seus metabolitos agem principalmente através uma série de receptores nucleares específicos (PR), assim como receptores para os glicocorticoides (GR). E mais recentemente, isoformas de membrana (mPR) também têm sido descritas (HIERWEGER *et al.*, 2019;

POLIKARPOVA *et al.*, 2019), sendo mPR α , β e γ , e seus componentes PGRMC1 e PGRMC2 (RAFIEE *et al.*, 2019). A porcentagem de linfócitos na circulação expressando PR aumenta durante a gestação normal, mas é significativamente menor em mulheres que apresentam abortos espontâneos recorrentes (SZEKERES-BARTHO *et al.*, 1989;1990). Na presença de progesterona, linfócitos T PR⁺ de gestantes produzem a proteína PIBF (do inglês, *progesterone induced blocking factor*), responsável por mediar alguns dos efeitos imunológicos desse hormônio relacionados com aceitação ao conceito (CHECK *et al.*, 2005; SZEKERES-BARTHO, 2018). De forma interessante, estudos mostram que um dos estímulos mais potentes para elevar a expressão de PR nos linfócitos T maternos é a exposição aloantígenos fetais de origem paterna (PALDI *et al.*, 1994), mostrando uma relação entre a expressão do PR e o início/manutenção da gestação. Ademais, em uma gestação normal, a porcentagem de células Treg mPR α ⁺ também é favorecida (AREIA *et al.*,2016).

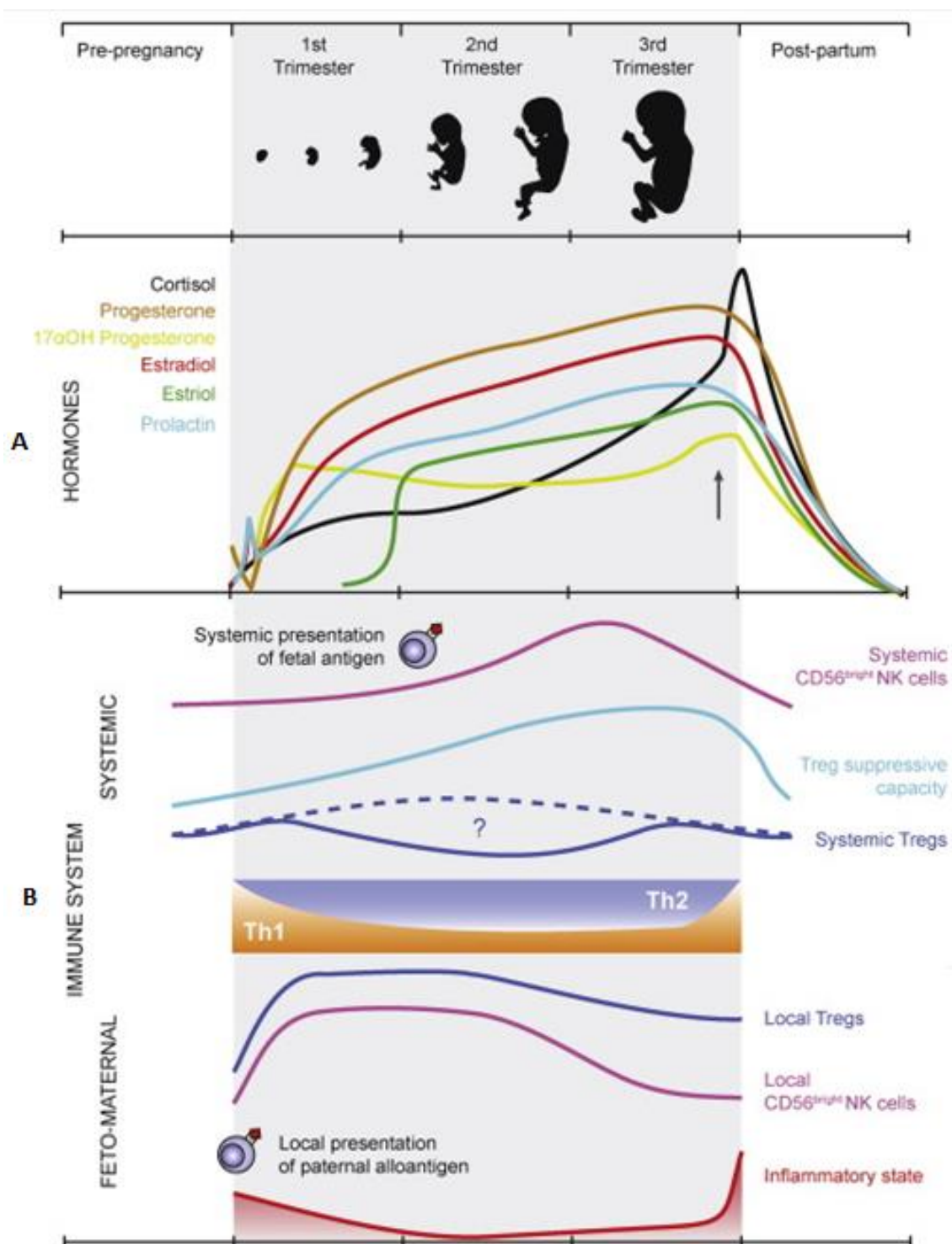
Finalmente, as concentrações séricas do estrogênio mais potente, o 17 β -estradiol (E2), aumentam, em média, de 1 a 6 ng/mL durante a gravidez (HIRANO *et al.*, 2007). Dependendo da sua concentração, o E2 pode exercer um efeito pró-inflamatório ou antiinflamatório (STRAUB, 2007; VAN VOLLENHOVEN;MCGUIRE, 1994) pela ligação com seus receptores intracelulares ER α ou ER β , ao induzir mecanismos de transdução de sinais em certos subtipos celulares (CUNNINGHAM; GILKESON, 2011). Apesar de ER α ser abundantemente encontrado no endométrio, essa isoforma também é detectada em várias células do sistema imune, tais como linfócitos T e B circulantes (SMITHSON *et al.*, 1995; STIMSON, 1988; HAKURI *et al.*, 1983; SHIM *et al.*, 2006). E a expressão deste receptor pelos linfócitos em questão é aumentada após administração de estrogênio (INUI *et al.*, 2007).

Em níveis basais (100 a 200 pg/mL), o E2 induz a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β), aumenta a migração de leucócitos para o local da inflamação (STRAUB, 2007), além de sua expansão clonal. Em nítido contraste, em níveis elevados - como na gravidez (3 a 7 ng/mL) - o E2 inibe a resposta imunitária celular e diminui a expressão de vários marcadores de ativação (HEL *et al.*, 2010). Neste caso, o E2 inibe a produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β pelas células T, macrófagos e DCs (HEL *et al.*, 2010), e induz a produção de IL-10 e TGF- β , resultando em um efeito imunossupressor (LUO *et al.*, 2011; ZANG *et al.*, 2002). Um estudo conduzido por Tai *et al.* observou que ER α é expresso em células T

CD4⁺CD25⁻ e que o E2 aumenta a expressão dos genes de FoxP3 e IL-10 *in vitro*, bem como induz a expressão de CD25 por estas células. De forma interessante, esse fenômeno de conversão de subtipo celular é revertido ao inibir a expressão de ER α (CUNNINGHAM; GILKESON, 2011; TAI *et al.*, 2008). DCs maduras e imaturas expressam ambas isorformas ER α e ER β independente do seu estágio de desenvolvimento (KOMI; LASSILA, 2000), e a diferenciação das DC é inibida na ausência de doses fisiológicas desse hormônio (PAHARKOVA-VATCHKOVA; MALDONADO; KOVATS, 2004). Por outro lado, elevados níveis de E2 favorece a expansão das DCs que expressam a enzima IDO (LIU *et al.*, 2002; UEMURA *et al.*, 2008; XIAO *et al.*, 2004). De fato, a enzima IDO, por induzir uma depleção do aminoácido triptofano, é conhecida por inibir a produção de IL-12 e, conseqüentemente, a diferenciação das células T CD4⁺ (STECKEL *et al.*, 2003). Sendo assim, as DCs IDO⁺ têm um papel importante na inibição da função das células T potencialmente embriotóxicas (ITO *et al.*, 2002). Adicionalmente, DCs tratadas com E2 têm a habilidade de induzir células Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (POLANCZK *et al.*, 2005). Além desses efeitos diretos, elevados níveis de E2 pode atenuar a migração de diferentes leucócitos por reduzir a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular da decídua, tais como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1 - do inglês, *Intercellular Adhesion Molecule 1* ou CD54), E-selectinas, e molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1 - do inglês, *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* ou CD106) (HEL *et al.*, 2010). Por outro lado, em células B de memória, elevadas doses de E2, eleva a produção de anticorpos (KANDA; TAMAKI, 1999) e, após alguns anos, estudo por ERLANDSSON *et al.* demonstrou que esse fenômeno é mediado pelo ER α (ERLANDSSON *et al.*, 2003).

Apesar dos efeitos predominantemente imunossupressores exercidos pelos hormônios da gestação, classicamente a produção de anticorpos pelas células B de memória é amplificado nas gestantes e esse fenômeno pode estar relacionado aos efeitos dos hormônios gestacionais em favorecer a expansão das células T_{FH} em detrimento de uma redução na fração de células T efetoras relacionados aos fenótipos Th1, Th2 e Th17. Em contrapartida, equilíbrio imune relacionado à gestação pode ser rompido por diferentes intercorrências, tal como a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, o HIV.

Figura 5 - Resumo da imunomodulação materna em decorrência dos hormônios gestacionais



Legenda: Mudanças nas concentrações de hormônios levam a mudanças imunológicas durante a gestação. Durante os três trimestres da gestação, há uma alteração no equilíbrio das respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. No terceiro trimestre, respostas anti-inflamatórias são elevadas e respostas inflamatórias, reduzidas. **A)** Propriedades imunomodulatórias dos hormônios gestacionais estrogênio e progesterona que têm suas concentrações mais elevadas durante o terceiro trimestre da gestação. Dias antes que antecedem o parto, os níveis de marcadores reguladores começam a cair junto com os

níveis de progesterona e estrogênio. Nesse momento, o resgate dos eventos inflamatórios maternos devem ajudar no preparo do útero para o parto. **B)** Alguns eventos imunológicos na interface materno-fetal e sistemicamente.

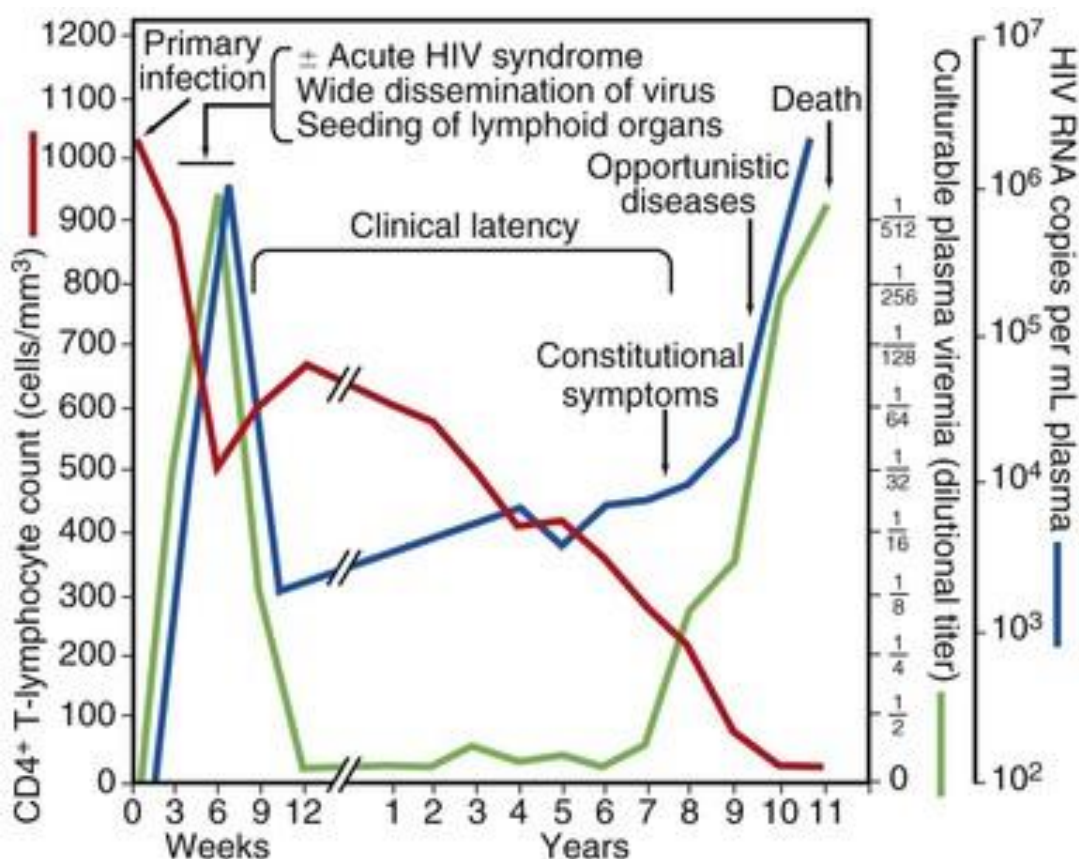
Fonte: PATAS *et al.*, 2013.

1.3.4 A infecção pelo HIV-1 durante a gestação e risco de transmissão vertical

O HIV-1 é o agente causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS - do inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) e afeta principalmente os linfócitos T CD4⁺, causando dano progressivo ao sistema imunológico. A infecção pelo vírus, em geral, ocorre após o contato direto com fluidos orgânicos, como sangue e sêmen, de uma pessoa infectada pelo vírus (WEISS, 1993). Uma intensa replicação viral nos linfonodos dos indivíduos infectados é observada entre 2 a 6 semanas após a primeira exposição do vírus, levando, conseqüentemente, a uma elevada viremia associada a uma queda quantitativa das células T CD4⁺ (Figura 6). Essa fase é caracterizada pela soroconversão e por sintomas inespecíficos como febre, linfadenopatia e dor de garganta (FAUCI *et al.*, 1996; STREECK; VAN BOCKEL; KELLEHER, 2008). Com o objetivo de eliminar as partículas virais presentes no sangue, a resposta imune específica mediada pelas células T é acionada. Em contrapartida, a ativação crônica do sistema imune nos pacientes sem terapia antirretroviral (TARV), torna-se essencial para infecção do vírus nas células T CD4⁺ (LIEBERMAN *et al.*, 2001). A IL-1 β , IL-6 e o TNF- α , por ativarem o fator de transcrição NF-kB, favorecem a replicação viral dentro destas células (MANGINO *et al.*, 2011). Devido a maior suscetibilidade à ativação durante a resposta imune anti-HIV, as células Th1 e Th17 são alvos preferenciais tanto da infecção direta pelo vírus como também da exaustão clonal, identificadas como células disfuncionais que expressam PD-1, Fas/CD95, CTLA-4 e domínio de mucina e imunoglobulina em células T (Tim-3 – do inglês, *T cell immunoglobulin mucin-3*) (DAY *et al.*, 2006; DOUEK *et al.*, 2002; FAVRE *et al.*, 2009; RODRIGUEZ *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2007). Portanto, a perda preferencial das células Th1 e Th17 torna o paciente cada vez mais susceptível às infecções e neoplasias oportunistas (FAVRE *et al.*, 2009) (Figura 6). Finalmente, ao longo da progressão da doença, com a queda numérica e

funcional das células T CD4⁺, os linfócitos T CD8⁺ HIV-específicos, ou não, se acumulam periféricamente (Figura 6).

Figura 6 – História Natural da infecção pelo HIV na ausência de terapia



Legenda: Durante o curso da infecção pelo HIV, ocorre a replicação viral e o quadro de imunodeficiência sofre progressão, embora haja um período de ausência de sintomas, chamado de período de latência clínica. A ativação do sistema imune e a secreção de citocinas possuem um papel-chave na patogênese da doença e é variável entre os indivíduos infectados, algumas vezes aumentando dramaticamente a progressão da doença.

Fonte: FAUCI *et al.*, 1996.

Esses linfócitos T CD8⁺ expressam marcadores relacionados à senescência, tais como CD57 e Tim-3, associada à expressão reduzida de CD38, CD27 e perforina (CODES *et al.*, 2007; ELLER *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2007). Conseqüentemente, as células T CD8⁺ apresentam uma capacidade limitada em reconhecer e atacar células infectadas pelo HIV-1 e por outros vírus (APPAY *et al.*, 2000; SHANKAR *et al.*, 2000). O estado inflamatório persistente indica falhas dos mecanismos imunológicos de regulação, particularmente das células T reguladoras que expressam (Tregs) ou não (Tr-1) a proteína FoxP3 (CHEVALIER *et al.*, 2015).

Na infecção pelo HIV-1, as células T reguladoras têm sido descritas tanto como protetoras quanto facilitadoras de progressão para a AIDS por inibir as respostas anti-HIV mediadas pelas células T CD4⁺ e T CD8⁺ (ANDERSSON *et al.*, 2005; EGGENA *et al.*, 2005).

No contexto da resposta imune anti-HIV, os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs – do inglês, *Cytotoxic T Lymphocytes*) exercem um importante papel na identificação dos peptídeos do HIV apresentados pelas células APCs via moléculas de MHC de classe I. Quando ativados, os CTLs matam células infectadas pelo HIV pela via exocítica através da liberação de grânulos de perforinas, granzimas, e/ou pela via de engajamento de receptores de superfície da célula-alvo contendo domínio de morte (SCHOENBERGER *et al.*, 1998). Nesse último caso, as células infectadas pelo HIV-1 morrem devido à ativação das caspases pela via extrínseca de apoptose. As células T CD8⁺ ativadas podem também bloquear a infecção de células saudáveis por produzir e secretar β -quimiocinas (COCCHI *et al.*, 1995; WALKER *et al.*, 1986). No entanto, uma ativação eficiente dos linfócitos T CD8⁺ e a manutenção de uma resposta de memória dependem do auxílio de células Th1 funcionais (STREECK; VAN BOCKEL; KELLEHER, 2008). Ou seja, a capacidade das células T reguladoras em inibir a resposta imune celular do tipo Th1 e CTL contra antígenos virais tem sido associada à falha no controle da replicação viral na fase aguda da infecção (ANDERSSON *et al.*, 2005). Por outro lado, dano às células Tregs em nível de mucosa intestinal parece amplificar os eventos relacionados à exaustão imune (EGGENA *et al.*, 2005; FAVRE *et al.*, 2009). Deficiências funcionais dessas células podem estar associadas a dois eventos não excludentes, infecção latente pelo HIV (SEDDIKI *et al.*, 2009) e produção excessiva de citocinas inflamatórias (FAVRE *et al.*, 2009).

Na gravidez, infecção viral materna pode ter consequências adversas à gestação por diferentes vias. A primeira delas pode envolver severo prejuízo ao desenvolvimento fetal devido a infecção da placenta e disseminação para o sangue do cordão umbilical. A outra via pode ser o rompimento do delicado equilíbrio envolvido na tolerância fetal devido à produção de citocinas inflamatórias maternas em resposta aos patógenos (YOCKEY; IWASAKI, 2018). Dessa forma, frente a uma infecção, a manutenção e desenvolvimento fetal vão depender da capacidade do sistema imune materno em montar uma resposta inflamatória adequada contra o agente infeccioso sem que os mecanismos envolvidos com a tolerância aos

antígenos polimórficos de origem paterna sejam perdidos. No caso específico da infecção pelo HIV-1, a resposta imune protetora contra o vírus em pacientes infectados contrasta drasticamente com os eventos imunes responsáveis pela tolerância ao feto. No entanto, e de forma interessante, o risco de progressão clínica da doença na mãe não é aumentado pela gestação, e a taxa de transmissão vertical é entre 12 a 40% (SIASSAKOS *et al.*, 2008).

Essa variação na taxa de transmissão vertical do HIV deve-se a diversos fatores clínicos maternos e virológicos, como por exemplo: (a) elevada carga viral plasmática (CVP) materna (SHEARER *et al.*, 1997), (b) fase da doença (BLANCHE *et al.*, 1989; EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY, 1992; JOHNSTONE *et al.*, 1991; LINDGREN *et al.*, 1991; PEUCHMAUR *et al.*, 1991), (c) estado imune da gestante (CLERICI *et al.*, 1993; LEE *et al.*, 1997; WOLINSKY *et al.*, 1992), (d) subtipo de HIV-1 infectante (RAGUPATHY *et al.*, 2013), (e) coinfeção com o vírus da hepatite C ou outras doenças sexualmente transmissíveis, e (f) complicações obstétricas associadas geralmente com uma resposta pró-inflamatória, tais como, rotura prematura de membranas fetais, parto pré-termo espontâneo e a presença de corioamnionite (GARCIA *et al.*, 1999; HERSHOW *et al.*, 1997; LANDESMAN *et al.*, 1996). Apesar disso, a maioria das mulheres, mesmo na ausência de qualquer intervenção, não transmite o vírus do HIV-1 para o seu concepto durante a gestação, e vários mecanismos têm sido propostos para explicar a proteção do feto contra o vírus durante a gravidez (MAARTENS;CELUM;LEWIN, 2014). Estudos realizados *in vitro* mostraram que as células da decídua, principalmente macrófagos e células NK, produzem naturalmente fatores solúveis que inibem e controlam a infecção das células mononucleares da decídua pelo HIV-1 (MARLIN *et al.*, 2011; QUILLAY *et al.*, 2016). Os macrófagos da placenta, as células Hofbauer, apresentam menor habilidade em replicar o HIV-1, *in vitro*, quando comparado com macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico devido a sua capacidade de produzir naturalmente altas concentrações de IL-10 e TGF- β (JOHNSON; CHAKRABORTY, 2012). Corroborando com esses dados, estudo realizado por KUMAR e colaboradores (2012) mostrou que a placenta de mulheres que transmitiram o HIV-1 *in útero* apresentava elevada produção de citocinas e quimiocinas associadas à replicação viral e ao recrutamento de células permissivas a replicação viral em comparação com a placenta de mulheres que transmitiram o vírus intraparto ou não transmitiram (KUMAR *et al.*, 2012).

Dentro do compartimento das células T, estudo conduzido pelo nosso grupo mostrou que a gestação, em mulheres infectadas pelo HIV-1 que controlam a CVP, aumenta a frequência periférica de células T CD4⁺ reguladoras produtoras de IL-10 específicas para o HIV-1 (HYGINO *et al.*, 2012). Além disso, uma correlação direta foi encontrada entre o aumento na produção de IL-10 e a baixa replicação viral, sugerindo que os níveis elevados de IL-10 podem ajudar a reduzir a transmissão vertical por reduzir a produção de citocinas inflamatórias que sabidamente ativam o NF- κ B (HYGINO *et al.*, 2012). Esses achados podem ajudar a explicar porque a gestação, apesar de atenuar a resposta imune celular, não é considerada um fator de risco para a progressão da doença em mulheres infectadas pelo HIV-1 (HYGINO *et al.*, 2012).

Quanto a imunidade humoral, apesar da transferência placentária de anticorpos maternos para o feto, o papel da IgG anti-HIV em reduzir o risco de transmissão vertical do HIV-1 não está claro (JOHNSON; CHAKRABORTY, 2016). OMENDA e colaboradores (2013) mostrou que há uma transferência eficiente de anticorpos neutralizantes específicos para o HIV-1 em crianças expostas ao vírus durante a gestação, mas nenhuma associação foi encontrada entre a presença desses anticorpos e uma redução na transmissão vertical (OMENDA *et al.*, 2013). Outros estudos, que também incluíram apenas crianças infectadas durante o parto ou na amamentação, não encontraram associação entre os títulos ou a atividade de neutralização de anticorpos autólogo e heterólogo contra o HIV-1 e o risco de transmissão (CHAILLON *et al.*, 2012; LYNCH *et al.*, 2011; MILLIGAN *et al.*, 2016). Por outro lado, os títulos de anticorpos neutralizantes anti-HIV foram maiores no sangue periférico de neonatos não infectados (BARIN *et al.*, 2006). Outro estudo também observou que gestantes que transmitiram o vírus durante a gestação apresentavam títulos menores de anticorpos neutralizantes para o vírus autólogo do que as gestantes que não transmitiram (DICKOVER *et al.*, 2006). Dessa forma, não a dosagem total de IgG, mas sim, a titulação desses anticorpos com propriedades de neutralizar o HIV-1, é que deve contribuir - em conjunto com o controle da replicação viral e da inflamação - na proteção da transmissão vertical. Nesse sentido, com a adequação de manobras clínicas às gestantes infectadas pelo HIV-1, que incluem o parto cesáreo, a não amamentação e, principalmente, o uso da TARV, a taxa de transmissão vertical cai para menos de 1% (HAZRA; SIBERRY; MOFENSON, 2010; MOFENSON, 2010; PRENDERGAST *et al.*, 2007).

1.3.4.2 Terapia antirretroviral

A descoberta de drogas baseadas no entendimento do ciclo viral, na década de 80, transformou a infecção pelo HIV, antes considerada uma infecção de progressão rápida e letal, em uma condição crônica que pode ser controlada durante anos. Atualmente, no Brasil, existem 22 medicamentos disponíveis que são divididos em quatro grandes classes de antirretrovirais: os inibidores da transcriptase reversa, os inibidores de protease (IP), os inibidores da integrase e os inibidores de entrada. Os inibidores da transcriptase, por sua vez, podem ser subdivididos em duas classes, os análogos sintéticos de nucleosídeos (ITRNs) e os não análogos (ITRNNs) (DE CLERCQ, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013) (Tabela 1).

A Organização Mundial da Saúde, assim como o Ministério da Saúde, recomenda o início imediato da TARV para todas as pessoas infectadas pelo HIV-1, independente da contagem de células T CD4+. Até 2018, era recomendado que a primeira linha de tratamento fosse composta por três antirretrovirais, sendo dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e nucleotídeos (ITRN) associado a um inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeos (ITRNN). Dessa forma, o esquema preferencial para gestantes deveria ser composto por tenofovir (TDF), lamivudina (3TC) e efavirez (EFV). A partir de 2018, o esquema inicial preferencial passou a ser formado pela combinação de 2 ITRN associados a um inibidor de integrase, sendo preferencial a escolha de TDF/3TC com raltegravir (RAL). Entretanto, o esquema anterior deve ser mantido em pessoas que já estavam em tratamento e com carga viral indetectável. A substituição do tratamento somente é indicada em casos em que haja a necessidade de diminuir efeitos adversos e interações medicamentosas, ou em casos de comorbidades incompatíveis com o esquema atual (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Tabela 1 - Grupos de antirretrovirais utilizados na terapia anti-HIV disponibilizados pelo Ministério da Saúde do Brasil*

Inibidor da Transcriptase Reversa nucleosídeos ou nucleotídeos (ITRN)	Inibidor da Transcriptase Reversa não nucleosídeos (ITRNN)	Inibidor de Protease (IP)	Inibidor de Integrase *	Inibidor de Fusão*	Inibidor de Co-receptor*
Zidovudina (AZT)	Nevirapina (NVP)	Ritonavir (RTV)	Raltegravir (RAL)	Enfuvirtida(T-20)	Maraviroque (MVC)
Abacavir (ABC)	Efavirenz (EFV)	Lopinavir (LPV)	Dolutegravir (DTG)		
Estavudina (d4t)	Etravirina (ETR)	Atazanavir (ATV)			
Lamivudina (3TC)		Darunavir (DRV)			
Tenofovir (TDF)		Tipranavir (TPV)			
Entricitabina (FTC)		Fosamprenavir (FPV)			

Fonte: * www.aids.gov.br. Acessado em 13 de fevereiro de 2020.

O objetivo principal da TARV é retardar a progressão da imunodeficiência e restaurar, na medida do possível, a imunidade aumentando o tempo e a qualidade de vida dos indivíduos infectados. Um tratamento eficiente está associado a uma rápida redução da CVP e, conseqüentemente, a um aumento gradativo no número de células T CD4+. O aumento na contagem de células T CD4+ ocorre em duas fases. A primeira fase reflete na redistribuição rápida de células T CD4+ com fenótipo ativado/memória que estavam retidas nos órgãos linfoides secundários e na medula-óssea e associada a uma redução na morte por apoptose (ENSOLI et al., 2000). Já a segunda fase é caracterizada pela expansão de células naíves geradas no timo (LAWN; WILKINSON, 2006; YE; KIRSCHNER; KOURTIS, 2004). Para muitos autores, a recuperação das células T CD4+ na segunda fase reflete melhor o grau de aquisição de imunocompetência do portador de HIV. A timopoiese, após o início da TARV, é acompanhada de uma recuperação de linfócitos T CD4+ expressando um repertório diverso de receptores de antígeno, os TCRs, pertencentes a diferentes famílias V β associada à expressão de CD45RA e CD62L (FRANCO et al., 2002; KOLTE et al., 2002).

No Brasil, para reduzir o risco de transmissão vertical do HIV, o “Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para prevenção da transmissão vertical de HIV, sífilis

e hepatites virais” de 2015 do Ministério da Saúde recomenda a TARV em todas as gestantes infectadas pelo HIV-1, independentemente de critérios clínicos e imunológicos, e sem interrupção do tratamento após o parto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Quanto a via de parto, a cesárea eletiva na 38ª semana de gestação é indicada para gestantes que não realizaram profilaxia antirretroviral combinada ou que tenham sua CVP, com 34 semanas ou mais de gestação, desconhecida ou superior a 1.000 cópias de RNA/ml. Para gestantes em uso da TARV e com supressão da carga viral sustentada, caso não apresentem indicação de cesárea por outro motivo, a via de parto vaginal é indicada. Toda gestante soropositiva para o HIV deve receber a infusão intravenosa de zidovudina (AZT) no início do trabalho de parto até o clampeamento do cordão umbilical. A manutenção do AZT durante o parto não é necessária para as gestantes com carga viral indetectável após a 34ª semana de gestação. O recém-nascido deve receber uma solução oral de AZT, preferencialmente ainda na sala de parto, logo após os cuidados imediatos, ou nas primeiras 2 horas após o nascimento, devendo ser mantido o tratamento durante as primeiras 4 semanas de vida. No caso de gestantes com carga viral superior a 1.000 cópias/ml, deve-se acrescentar a nevirapina ao esquema de profilaxia do recém-nascido. Por fim, toda mãe soropositiva para o HIV é orientada a não amamentar, sendo terminantemente contraindicados o aleitamento cruzado (amamentação da criança por outra nutriz), a alimentação mista (leite humano e fórmula infantil) e o uso de leite materno com pasteurização domiciliar.

Adicionalmente, uma melhor recuperação quantitativa e qualitativa das células T CD4+ periféricas pela TARV é diretamente proporcional à redução nos índices de ativação imune e, portanto, a um aumento na sobrevivência das células T CD4+ e T CD8+ mais funcionais (LENG et al., 2002). Conseqüentemente, o sucesso terapêutico depende da recuperação das barreiras de mucosa, o que reflete numa queda na frequência de linfócitos T periféricos senescentes (TILLING et al., 2002) associada a uma recuperação na resposta imune celular (SPITSIN et al., 2012) e humoral, esta última dependente das células TFH.

1.3.5 Células T_{FH} na infecção pelo HIV-1

A infecção crônica pelo HIV está associada a um estado de hipergamaglobulinemia. Porém, essa elevada produção de anticorpos não está associada à proteção e sim, a uma ativação policlonal e desregulada das células B levando à produção de anticorpos de baixa afinidade e não dirigidos contra o HIV (PERREAU *et al.*, 2013). Como a formação do centro germinativo e a diferenciação dos linfócitos B em células de memória e plasmócitos secretores de anticorpos depende do auxílio das células T_{FH}, danos funcionais nessa população de células T pode explicar a inadequada produção de anticorpos protetores contra o HIV-1 e outros patógenos.

Estudo realizado por LINDQVIST e colaboradores (2012) mostrou que indivíduos infectados pelo HIV apresentam uma elevada frequência de linfócitos TFH no linfonodo, principalmente TFH HIV-específicas, quando comparados com indivíduos saudáveis, e que esse aumento está associado a uma redução das células B de memória, à hipergamaglobulinemia e a um aumento das células B do centro germinativo (LINDQVIST, 2012). Outro estudo, realizado por PERREAU e colaboradores (2013), também demonstrou que essas células TFH são os principais alvos utilizados pelo HIV-1 para manter o seu nicho de replicação, conduzindo, portanto, a deficiências funcionais graves dessa subpopulação. Isso impacta na capacidade dessas células T em ajudar, de forma adequada, na produção de anticorpos pelas células B foliculares (PERREAU *et al.*, 2013). Nesse sentido, estudo realizado por CUBAS e colaboradores (2013) mostrou um aumento na frequência de células B que expressavam o PD-L1 nos linfonodos de indivíduos infectados pelo HIV quando comparado com indivíduos saudáveis. Ainda nesse estudo, o aumento da expressão de PD-L1 inibiu, *in vitro*, a função dos linfócitos TFH através da ligação com PD-1 (CUBAS *et al.*, 2013). Estudo conduzido em macacos Rhesus infectados com o vírus da imunodeficiência símia (SIV – do inglês, Simian Immunodeficiency Virus) demonstrou uma relação entre a expansão das células TFH capazes de produzir IL-21 após 14 dias de infecção e a produção de anticorpos protetores (HONG *et al.*, 2014).

Em humanos, a detecção de anticorpos contra o HIV-1 ocorre após a primeira semana de infecção, sendo esses anticorpos, no entanto, não neutralizantes e

dirigidos contra a gp41 do envelope viral. Aproximadamente após um mês de infecção, é possível detectar anticorpos contra a gp120 que também não são neutralizantes ou apenas específicos para o vírus autólogo, permitindo mutações de escape (DE BREE; LYNCH, 2016). Esses resultados sugerem que a qualidade dos anticorpos, e não seus títulos, é que devem ser indicativos de clearance viral. Nesse sentido, em cerca de 20% dos indivíduos infectados pelo HIV-1, após 2-4 anos da infecção, há a produção de anticorpos amplamente neutralizantes (bNabs – do inglês, broadly neutralizing antibodies) que são capazes de neutralizar uma grande variedade de isolados virais (NOTO; PANTALEO, 2017). Esses bNabs apresentam um número significativo de mutações, indicando intenso processo de hipermutação somática nos CGs, sendo necessário o auxílio das células TFH (SADANAND; SUSCOVICH; ALTER, 2015).

Em humanos, diversos estudos têm demonstrado uma associação entre a frequência de células TFH, e os níveis de bNabs específicos para o HIV-1 e progressão para Aids. Estudo realizado por LOCCI e colaboradores (2013) identificou uma população de linfócitos TFH de memória circulantes que apresentam características semelhantes às células TFH localizadas nos CGs dos linfonodos. A frequência dessa população no início da infecção pelo HIV-1, caracterizada fenotipicamente como CD4+CXCR5+CXCR3-PD-1+, tem sido correlacionada positivamente com a produção de anticorpos neutralizantes contra o vírus (LOCCI et al., 2013). COHEN e colaboradores (2014) também observaram que indivíduos que foram capazes de produzir bNabs apresentavam uma maior frequência de células T CD4+CXCR5+PD-1+ periféricas e um menor risco de progressão para Aids (COHEN et al., 2014). No entanto, na grande maioria dos pacientes infectados pelo HIV-1 sem terapia antirretroviral, o quadro de hipergamaglobulinemia reflete distúrbios no compartimento das células TFH (ABUDULAI et al., 2017; KROON et al., 1994; PALLIKKUTH et al., 2012). Esses indivíduos, por exemplo, respondem fracamente à imunização contra o influenza (PALLIKKUTH et al., 2012). Nos pacientes que responderam de forma adequada à vacina contra o influenza, a produção de IgG foi correlacionada com a expressão de ICOS e com a produção de IL-21 pelas células TFH (PALLIKKUTH et al., 2012). Outro estudo, conduzido por ABUDULAI e colaboradores (2017), demonstrou que a baixa produção de anticorpos contra polissacarídeos de pneumococo foi associada à não expansão das células TFH circulantes após a vacinação em pacientes infectados pelo HIV-1 sob TARV

(ABUDULAI et al., 2017). Como o comprometimento das células TFH é um evento precoce, a introdução da TARV na fase inicial da infecção pelo HIV-1 tem se mostrado mais eficiente em preservar a função das células TFH periféricas e das células B de memória (MUIR et al., 2016). Além disso, BOSWELL e colaboradores (2014) também observaram um aumento na frequência de células TFH periféricas em indivíduos em uso da TARV em comparação com indivíduos infectados pelo HIV-1 sem tratamento (BOSWELL et al., 2014). De forma interessante, a hipótese de que a capacidade da TARV em recuperar as células TFH circulantes pode ser favorecida na gestação precisa ser avaliada, uma vez que é uma condição onde a produção de anticorpos pelas células B de memória é sabidamente potencializada (KANDA; TAMAKI, 1999).

Por outro lado, diferente do que acontece na infecção pelo HIV-1, incremento na produção de anticorpos específicos maternos pode complicar a gestação no contexto de doenças autoimunes mediadas por células B autoreativas, como, por exemplo, nas desordens do espectro da neuromielite óptica (SHIMIZU et al., 2016; SHOSHA et al., 2017).

1.4 Desordens do Espectro da Neuromielite Óptica

A neuromielite óptica (NMO) é uma doença autoimune desmielinizante inflamatória idiopática (DDII) do sistema nervoso central (SNC) (PAPAI-ALVARENGA et al., 2015a) caracterizada por episódios simultâneos ou sequenciais de neurite óptica (NO) e/ou mielite transversa aguda (MTA) (WINGERCHUK et al., 2015). Esses ataques autoimunes podem levar à perda de visão, fraqueza e perda da sensibilidade dos membros e disfunção da motilidade intestinal e da bexiga (ROSALES; KISTER, 2016). Devido a novos conhecimentos acerca dos achados de imagem e de dados sorológicos, permitiu-se que o critério de diagnóstico mais recente incluísse a NMO e outras formas mais limitadas da doença numa única categoria, conhecida como doenças do espectro da neuromielite óptica (NMOSD - do inglês, neuromyelitis optica spectrum disorder) (WINGERCHUK et al., 2015). Apesar de alguns pacientes apresentarem a forma monofásica da doença, caracterizada por ausência de recidivas adicionais, a grande maioria dos pacientes

(> 80 %) é acometida pela forma remitente-recorrente (RR), que cursa com crises agudas de MTA, NO ou ambas, seguida de remissão (PEREIRA et al., 2015).

A NMOSD é uma doença rara. Estima-se que a prevalência seja de 0,5-4/100.000 indivíduos (ABOUL-ENEIN et al., 2013; ASGARI et al., 2011; CABRERA-GÓMEZ et al., 2009) com a média de idade do início da doença variando entre 32,6 e 45,7 anos, porém, novos casos em crianças e idosos também já foram reportados (ABOUL-ENEIN et al., 2013; ASGARI et al., 2011; BICHUETTI et al., 2013; CABRE, 2009; COLLONGUES et al., 2010; HÖFTBERGER et al., 2015; JARIUS et al., 2012; KIM et al., 2012a; MEALY et al., 2012; PANDIT et al., 2013). Apesar de existirem casos de NMOSD em todo o mundo, as diferenças na prevalência da doença entre regiões distintas devem estar relacionada, principalmente, a fatores étnicos. Nesse sentido, diversos estudos têm demonstrado que a NMOSD é mais frequente em não-caucasianos e em regiões onde a prevalência de EM é baixa (COSSBURN et al., 2012; LANA-PEIXOTO, 2008a; MEALY et al., 2012; PAPAIS-ALVARENGA et al., 2015a; RIVERA et al., 2008). Segundo diversos estudos, a NMOSD afeta principalmente o sexo feminino, com uma razão média de 5 mulheres para cada homem e, particularmente nos pacientes com a forma RR, dentre os quais até 90% são mulheres (COLLONGUES et al., 2010; NAGAISHI et al., 2011; QUEK et al., 2012; WINGERCHUK et al., 2006). No Brasil, 11,8% dos casos de DDIs (doenças desmielinizantes inflamatórias idiopáticas) são NMOSD, e acomete mais frequentemente mulheres, afro-brasileiras, com curso RR e levando a incapacidades moderadas a graves (PAPAIS-ALVARENGA et al., 2015a). Com relação à hereditariedade, poucos casos familiares foram relatados (por volta de 3% dos casos) (MATIELLO et al., 2010; PAPAIS-ALVARENGA et al., 2015b), indicando que a manifestação da doença é multifatorial.

1.4.1 Critérios de diagnóstico

Sabe-se que a NMOSD é uma doença grave e que as incapacidades neurológicas se originam dos surtos agudos, com recuperação limitada dos mesmos. Dessa forma, torna-se clara a necessidade do rápido diagnóstico para início do tratamento o mais breve possível. Para acompanhamento do grau de incapacidade neurológica, os pacientes com NMOSD são estadiados usando a

escala de EDSS (do inglês, *Expanded Disability Status Scale*), a mesma utilizada na EM (KURTZKE, 1983). Através da avaliação de distúrbios nos diversos sistemas funcionais (Quadro 1), os pacientes são estadiados de 0 a 10, sendo 0 relativo a um exame neurológico normal e, valores maiores do que 6 estaria relacionado a um elevado grau de incapacidade neurológica (Quadro 2).

Quadro 1 - Os sistemas funcionais avaliados no âmbito da escala EDSS

Sistemas funcionais	Exemplos de processos relacionados
Funções Piramidais	Movimento voluntário
Funções Cerebelares	Coordenação de movimento Equilíbrio
Funções de Tronco cerebral	Movimento dos olhos Sensação Movimentos da face Engolir
Funções Sensitivas	
Funções Vesicais e Intestinais	
Funções Visuais	
Funções Cerebrais (ou Mentais)	Memória Concentração Humor
Outros	Fadiga

Fonte: traduzido e adaptado de KURTZKE, 1983.

Quadro 2 - A Escala EDSS

EDSS	Déficit neurológico
0	Exame neurológico normal
1	Ausência de incapacidade funcional e exame com achados anormais mínimos
2	Incapacidade funcional mínima em apenas um sistema funcional
3	Capaz de andar sem ajuda, mas com incapacidade moderada em um dos sistemas funcionais
4	Capaz de andar sem ajuda pelo menos 500 metros, mas tem incapacidade grave em um dos sistemas funcionais

- 5 Capaz de andar sem ajuda pelo menos 200 metros, mas a incapacidade é muito grave para estar apto para o trabalho a tempo inteiro
 - 6 Precisa de uma bengala, muleta ou outra ajuda para andar 100 metros, com ou sem pausas
 - 7 Não consegue andar mais de 5 metros, mesmo com ajuda, pode mover a cadeira de rodas e transferir-se sem ajuda
 - 8 Restringido à cadeira, cama ou cadeira de rodas, braços funcionais, mas necessita de assistência para a transferência
 - 9 Acamado e totalmente dependente, braços não funcionais, mas pode comer e falar
 - 10 Morte devido a NMO
-

Fonte: traduzido e adaptado de KURTKE, 1983.

Várias outras doenças autoimunes têm sido reportadas em pacientes com NMOSD. Segundo estudos, 30% dos pacientes com a doença apresentam comorbidades autoimunes, o que sugere a existência de uma predisposição genética para aberrações autoimunes (IYER et al., 2014). Hipotireoidismo autoimune, Lupus Eritematoso Sistêmico (SLE – do inglês, Systemic Lupus Erythematosus), Síndrome de Sjogren são as doenças autoimunes que mais frequentemente acometem pacientes com NMOSD (ROSALES; KISTER, 2016). De forma interessante, todas essas doenças autoimunes, semelhante à NMOSD, têm um componente humoral autoimune fortemente envolvido (PITTOCK et al., 2008). No caso da NMOSD, vários estudos têm demonstrado uma participação de anticorpos anti-aquaporina 4 (AQP4) na imunopatogenia das lesões neuronais (LENNON et al., 2004). A descoberta do anticorpo anti-AQP4, presente na maioria dos pacientes com NMO, foi um grande marco no estudo da doença, pois permitiu a inclusão de uma evidência sorológica no suporte diagnóstico da NMOSD e na sua consolidação como sendo uma doença distinta da EM (LENNON et al., 2004). Por essa razão, a sorologia para anticorpos anti-AQP4 foi incluído no critério diagnóstico da doença a partir de 2006 (WINGERCHUK et al., 2006, 2015).

Desde a sua implementação, a busca pelo anticorpo anti-AQP4 foi realizada através das técnicas de ELISA (do inglês, enzyme-linked immunosorbent assay) e

imunofluorescência indireta (KALLURI et al., 2010; LENNON et al., 2004; MADER et al., 2010; MATSUOKA et al., 2007; WATERS et al., 2012, 2014). Entretanto, atualmente, o ensaio baseado em células (CBA - do inglês, cell-based assay) tem sido considerado padrão-ouro na pesquisa de anticorpos anti-AQP4 por apresentar melhor sensibilidade que as outras técnicas (JARIUS; WILDEMANN, 2013; SATO et al., 2013; WATERS et al., 2012). Após a implementação da técnica CBA, os médicos observaram que muitos pacientes eram soropositivos para IgG contra AQP4 e apresentavam quadro clínico semelhante, porém limitado, quando comparado à NMO (BENNETT, 2016; SATO et al., 2013). Assim, na discussão para a criação do mais recente critério, em 2015, concluiu-se que essas formas limitadas, junto com a NMO clássica, representariam as NMOSD (WINGERCHUK et al., 2015) (Quadro 3).

Quadro 3 - Atual critério de diagnóstico da NMOSD

Critério diagnóstico do NMOSD para pacientes adultos (traduzido e adaptado de WINGERCHUK *et al.*, 2015)

✓ **Critério diagnóstico para NMOSD com AQP4-IgG**

1. Pelo menos 1 característica clínica maior*
 2. Teste POSITIVO para AQP4-IgG utilizando o melhor método de detecção (cell-based assay é fortemente recomendado)
 3. Exclusão de diagnósticos alternativos
-

✓ **Critério diagnóstico para NMOSD sem AQP4-IgG ou NMOSD com status AQP4-IgG desconhecido**

1. Pelo menos 2 características clínicas maiores e ocorrendo como resultado de um ou mais recidivas clínicas e de acordo com todos os seguintes requerimentos:
 - a. Pelo menos 1 característica clínica maior DEVE ser neurite óptica, mielite aguda com LETM, ou síndrome da área postrema
 - b. Disseminação no espaço (2 ou mais características clínicas maiores diferentes)
 - c. Preenchimento dos critérios adicionais da RM (ressonância magnética), se aplicável
 2. Testes negativos para AQP4-IgG usando a melhor técnica disponível ou teste não disponível
 3. Exclusão de diagnósticos alternativos
-

*** Características Clínicas Maiores**

1. Neurite Óptica (Figura 7)
 2. Mielite Aguda (Figura 8)
 3. Síndrome da área postrema: episódio de soluços sem explicação anterior ou náuseas e vômitos
 4. Síndrome aguda do tronco cerebral (Figura 9)
-

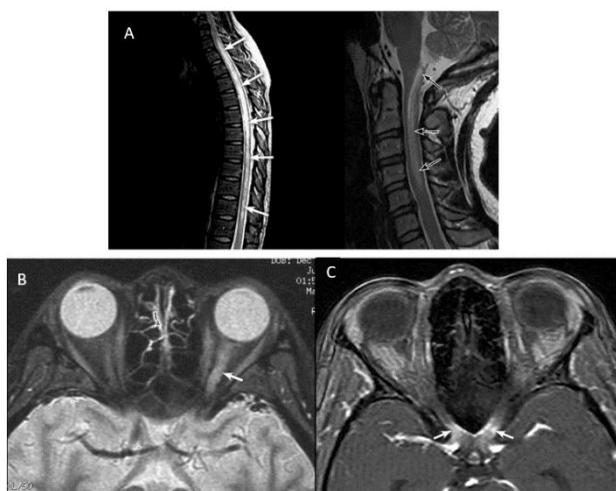
-
5. Narcolepsia sintomática ou síndrome clínica diencefálica aguda com lesões diencefálicas típicas de NMOSD na RM (Figura 10)
 6. Síndrome cerebral sintomática com lesões cerebrais típicas de NMOSD (Figura 8)
-

Requisitos adicionais de MRI para NMOSD sem AQP4-IgG e NMOSD com status AQP4-IgG desconhecido

1. Neurite Óptica Aguda: Requer RM cerebral mostrando (a) achados normais e apenas lesões não-específicas de massa branca OU (b) RM do nervo óptico com lesão hiperintensa T2 ou lesão pesada em T1 marcada com gadolínio, que se estenda por mais de metade do comprimento do nervo óptico ou que envolva o quiasma óptico (Figura 9)
2. Mielite Aguda: Requer associação com lesão intramedular que se estenda por 3 segmentos contíguos (LETM) ou 3 segmentos contíguos de atrofia focal da medula espinhal em pacientes com história compatível com mielite aguda (Figura 7)
3. Síndrome de área postrema: Requer associação com lesões na área postrema e região dorsal do bulbo (Figura 8)
4. Síndrome de tronco cerebral aguda: Requer lesões periependimais no tronco cerebral (Figura 9)

Abreviações: AQP4 = aquaporina-4; IgG = Imunoglobulina G, LETM = lesões longitudinalmente extensas de mielite transversa; NMOSD = doenças do espectro da Neuromielite Óptica; RM = Ressonância magnética

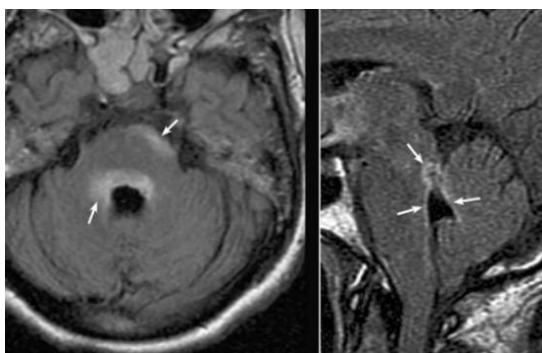
Figura 7 – Mielite Transversa Aguda (MTA) e Neurite Óptica (NO) em pacientes com NMOSD



Legenda: Em **A**, à esquerda, RM de medula espinhal apresentando lesão de mielite transversa longitudinalmente extensa (LETM), acometendo mais que 3 segmentos vertebrais. Nessa figura, a lesão típica de LETM acomete a maior parte da medula espinhal torácica (setas). À direita, LETM cervical característica de NMOSD. Em **B**, NO demonstrada pelo sinal aumentado na maior parte do nervo óptico, especialmente na porção posterior (seta). Em **C**, NO com sinal aumentado no quiasma óptico. Imagens de dois pacientes diferentes apresentando NO aguda no contexto da NMOSD

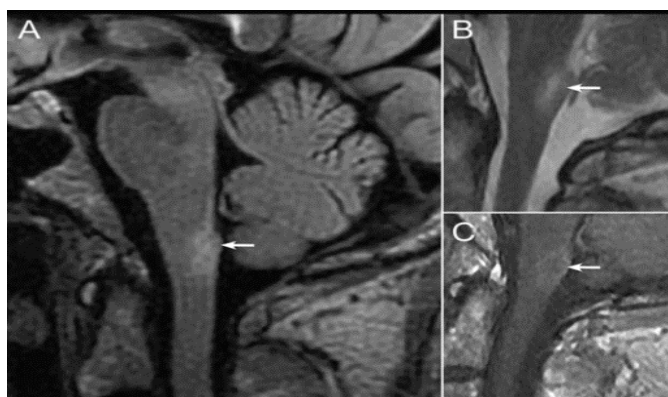
Fonte: WINGERCHUK *et al.*, 2015.

Figura 8 – Lesão na região dorsal do bulbo (A, seta) e lesões agudas associadas à síndrome clínica de área postrema (B e C)



Fonte: WINGERCHUK *et al.*, 2015.

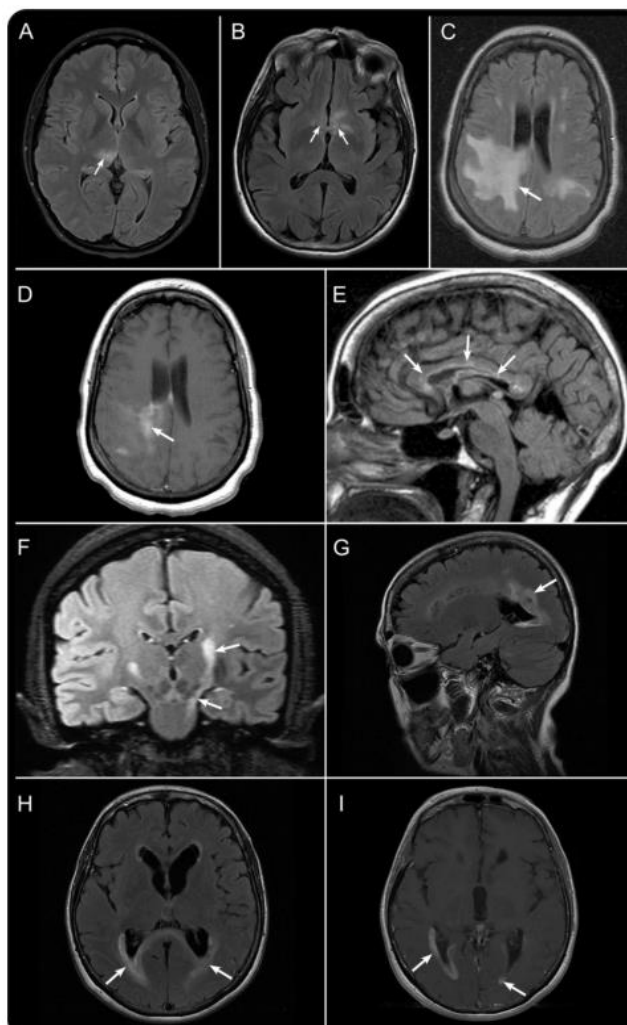
Figura 9 – Lesões típicas de síndrome do tronco cerebral



Legenda: Lesões periependimais que envolvem a ponte (esquerda, setas). Sinal aumentado no entorno do quarto ventrículo (direita, setas)

Fonte: WINGERCHUK *et al.*, 2015.

Figura 10 – Lesões cerebrais e de diencéfalo típicas de NMOSD



Legenda: Diversos padrões de lesão cerebral são associadas à NMOSD. Lesões envolvendo o tálamo direito (A, seta) e o hipotálamo (B, setas). Extensa lesão subcortical na massa branca (C, seta) e com administração de gadolínio (D, seta). Lesões crônicas longitudinalmente extensas e lesões lineares no corpo caloso (E, setas). Envolvimento longitudinal do trato costicoespinal, estendendo-se ao pedúnculo cerebral e ponte (F, setas). Lesões cerebrais periependimais agudas (H e I, setas)

Fonte: WINGERCHUK *et al.*, 2015.

1.4.2 Imunopatogênese da NMOSD

1.4.2.1 As células Th17 e as células T_{FH} na Imunopatogênese da NMOSD

Por ser uma doença autoimune, a imunopatogênese da NMOSD apresenta uma alta complexidade por compreender diversos fatores ambientais em indivíduos geneticamente predispostos, tais como doenças infecciosas e disbiose intestinal (CAMPBELL *et al.*, 2014). Até então, nenhuma causa definitiva para o desenvolvimento da NMOSD foi encontrada. No entanto, as células T parecem ter um papel significativo em lesões do SNC (PEREIRA *et al.*, 2015), como as células Th17 e as células T_{FH} (PAPADOPOULOS *et al.*, 2012).

Diversos trabalhos têm demonstrado o papel das células Th17 na NMOSD. Sabe-se que na ausência do TGF- β , associada à liberação persistente de IL-23, IL-6 e IL-1 β , as DCs induzem um subtipo de células Th17 envolvidas na patogênese de muitas doenças inflamatórias crônicas, como as doenças autoimunes (ZHANG, 2014b; LANGRISH *et al.*, 2005). Nos pacientes com NMOSD, níveis elevados de IL-17 e IL-8 foram observados tanto no soro, quanto no líquido (BARROS *et al.*, 2015; ISHIZU *et al.*, 2005; JACOB *et al.*, 2007; TANAKA *et al.*, 2008; VARRIN-DOYER *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2012), especialmente durante surtos (JONES *et al.*, 2015). Segundo estudo de ISHIZU e colaboradores (2005), altos níveis de IL-17, por induzir a produção *in situ* de IL-8, estariam envolvidos no recrutamento de neutrófilos para o SNC, células que estão relacionadas com a gravidade das lesões vistas na ressonância magnética (RM) e são detectadas em quase 60% dos espécimes de medula espinhal coletados para autópsia de pacientes com a doença (KIRA, 2011). O recrutamento de neutrófilos pode contribuir para as lesões através da produção e liberação de substâncias tóxicas, tais como as metaloproteinases, elastases e radicais livres derivados do oxigênio, tal como contribuindo na destruição da neuroglia local e aumento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica (KIRA, 2011).

Para causar a NMOSD, as células Th17 precisam inicialmente atravessar a BHE. Diversos mecanismos parecem estar envolvidos, como a expressão do receptor de quimiocina CCR6, o que as permite atravessar a BHE através da ligação

à quimiocina CCL20, expressa constitutivamente pelas células do plexo coroide, permitindo o acesso desses linfócitos ao espaço subaracnoide, onde são reativadas (REBOLDI et al., 2009; WOLBURG; PAULUS, 2010; YAMAZAKI et al., 2008). Ainda, a produção de IL-17 e IL-22 reduzem a expressão de moléculas de adesão intervacular importantes para a integridade da BHE (HUPPERT et al., 2010; KEBIR et al., 2007) e a produção de ligantes de quimiocina CXCL1 e CXCL2, participam não apenas na ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), como também na destruição dos astrócitos opsonizados com IgG anti-AQP4 (CARLSON et al., 2008).

Uma vez que células Th17 específicas para AQP4 já foram identificadas em elevados níveis em pacientes com NMOSD (VARRIN-DOYER et al., 2012), a IL-6, citocina importante para a diferenciação do fenótipo Th17, mostra-se elevada em pacientes com NMOSD e tem sido sugerida como um possível biomarcador na doença (CHANG et al., 2015). Nesse sentido, diversos trabalhos se tornaram alicerces para tal associação. Elevados níveis de IL-6 e GFAP (do inglês, Glial fibrillary acidic protein), no líquido de pacientes com NMOSD, foram associados com a ocorrência de novas crises clínicas (UZAWA et al., 2013). Além disso, altos níveis de IL-6 no soro e líquido foram detectados, especialmente em pacientes soropositivos para anti-AQP4 (İLÇÖZ et al., 2010). Quanto ao envolvimento concomitante com a produção de IL-21, um trabalho publicado pelo nosso grupo demonstrou uma expansão de células T CD4+ produtoras de IL-6 e IL-21 no sangue periférico dos pacientes com NMOSD, mesmo em fase de remissão clínica; e a produção dessas citocinas foi diretamente correlacionada ao nível de incapacidade neurológica dos pacientes (LINHARES et al., 2013). A IL-21 possui a capacidade de induzir as DCs a secretarem IL-23, que, conforme citado anteriormente, tal mecanismo envolve a expansão de clones de células Th17 patogênicas (KORN et al., 2009; SONG; GAO; QIAN, 2014). Ademais, sabendo que há um papel bem elucidado da citocina IL-21 na diferenciação de células B em plasmócitos secretores de anticorpos (LIU; KING, 2013), o envolvimento de subtipos de células TFH na resposta imune periférica da NMOSD tem sido cada vez mais consistente.

O equilíbrio entre a geração e a função das células TFH é essencial para a produção de anticorpos protetores de alta afinidade e, uma hiperativação destas células ou uma hiperexpressão das moléculas associadas a esse subtipo celular, podem resultar em doenças autoimunes, como a artrite reumatoide (MA et al., 2012) e a nefropatia mediada por IgA (ZHANG et al., 2014a). Quanto a patogênese de

doenças neuroautoimunes, diversos estudos têm mostrado que um possível desequilíbrio destes fatores pode estar envolvido, por exemplo, na EM (CHRISTENSEN et al., 2013), na NMOSD (FAN et al., 2016) e na Miastenia Gravis (ZHANG et al., 2014b).

No que diz respeito a NMOSD, poucos estudos foram conduzidos quanto ao compartimento periférico das células TFH. Através da utilização dos marcadores CXCR5, PD-1 e ICOS, alguns autores demonstraram uma maior porcentagem das células TFH nos pacientes quando comparados a indivíduos controles, sendo a grande maioria durante recaídas clínicas (LI et al., 2015; FAN et al., 2016; ZHAO et al., 2017). Apesar do papel das células TFH na resposta imune humoral, nenhuma correlação significativa foi observada entre a frequência dessas células com os títulos de anti-AQP4 (LI et al., 2015). Acreditamos que essa correlação aconteça ao associar os títulos de anticorpos com células TFH relacionadas ao fenótipo Th17, subtipo sabidamente envolvido na patogênese da NMOSD. Apesar de promissores, nenhum dos estudos conduzidos até o momento avaliou os subtipos de células TFH no contexto da produção de citocinas – fator essencial na determinação da qualidade funcional dessas células - e a sua correlação com a produção de anticorpos anti-AQP4 e anti-MOG.

1.4.2.2 Imunopatogênese da NMOSD quanto a produção de anticorpos anti-AQP4 e anti-MOG

A AQP4, conhecida por facilitar o fluxo de água no cérebro e na medula espinhal, é a proteína de canal de água mais abundante no SNC e é expressa, em elevados níveis, nos pés dos astrócitos (NIELSEN *et al.*, 1997; RASH *et al.*, 1998). Além do seu papel no diagnóstico, a detecção do anticorpo anti-AQP4 na maioria dos pacientes fortaleceu a hipótese de que NMOSD trata-se de uma doença autoimune de fundo predominante humoral. Esse anticorpo é, majoritariamente, da classe IgG1, um anticorpo fixador de complemento, entretanto, também foram detectados níveis de IgG2 em alguns pacientes (ISOBE *et al.*, 2015). A produção do anticorpo anti-AQP4 ocorre principalmente no sangue periférico e precisa atravessar a BHE para se ligar ao antígeno alvo no SNC (AKAZA *et al.*, 2014). Estudos

sugerem que o anti-AQP4 parece atravessar a BHE pelas regiões previamente danificadas, ou por regiões aonde a BHE é mais escassa (BRADL; LASSMANN, 2008; LENNON *et al.*, 2005). A ligação da IgG anti-AQP4 à molécula de AQP4, inicialmente, leva a três consequências: ativação do complemento, diminuição da expressão de AQP4 e, conseqüentemente, do transportador do glutamato EAAT2 (do inglês, *excitatory aminoacid transporter-2*) (HINSON *et al.*, 2008; ZENG *et al.*, 2007) (Figura 11).

Na dinâmica da resposta local, a ativação da via clássica do complemento na superfície do astrócito, e a conseqüente liberação de anafilotoxinas, leva ao recrutamento de granulócitos e macrófagos que, através de suas funções efetoras, causam dano não apenas aos astrócitos, como também aos oligodendrócitos, culminando na desmielinização e morte neuronal (JARIUS *et al.*, 2008; JARIUS; WILDEMANN, 2010; PAPADOPOULOS; VERKMAN, 2012; WEINSHENKER; WINGERCHUK, 2014). Nesse sentido, sabendo que a AQP4 é expressa em conjunto com o principal transportador de glutamato no SNC, o EAAT2 (HINSON *et al.*, 2008), diversos estudos têm sugerido que a reduzida expressão de EAAT2 leva ao acúmulo de glutamato no meio extracelular, que é particularmente tóxico para os oligodendrócitos e neurônios. Assim, a desmielinização na NMOSD pode resultar do efeito deletério conjunto mediado pelo sistema imune e pelo distúrbio na homeostase do glutamato (MARIGNIER *et al.*, 2010; MCDONALD *et al.*, 1998; PITT; WERNER; RAINE, 2000; SALTER; FERN, 2005). Em conjunto, esses dados demonstram que, nos pacientes soropositivos para anti-AQP4, a NMOSD é, primariamente, uma astrocitopatia que leva a uma desmielinização secundária ao ataque imune às moléculas de AQP4 (FUJIHARA *et al.*, 2012).

A razão pela qual ocorre uma destruição preferencial dos astrócitos nos nervos ópticos e na medula espinhal na patogênese NMOSD não é conhecida, uma vez que a AQP4 é expressa em outros tecidos e órgãos periféricos, como o rim (VAN HOEK *et al.*, 2000) Uma maior expressão de AQP4 nas regiões mais comumente afetadas na NMOSD, ou seja, no nervo óptico, na medula espinhal e na área postrema, deve ajudar a explicar a razão da restrição topográfica dessas lesões (LENNON *et al.*, 2004; ROSSI *et al.*, 2012). Adicionalmente, outra possível explicação baseia-se na expressão diferencial de isoformas de AQP4 no SNC, tais como AQP4-M1 e AQP4-M23 (NEELY *et al.*, 1999; PAPADOPOULOS, 2004; SAADOUN; PAPADOPOULOS, 2015; VERKMAN; ANDERSON; PAPADOPOULOS,

2014). De fato, estudo desenvolvido por IORIO e colaboradores (2013) demonstrou que a IgG anti-AQP4 é policlonal, sendo capaz de reagir a diversos epítomos em ambas as isoformas AQP4-M1 e AQP4-M23. No entanto, o efeito da ligação da AQP4-IgG é diferente em cada isoforma: enquanto a ligação da IgG à isoforma M1 leva a internalização do imunocomplexo, o reconhecimento da M23 pelo anticorpo gera um complexo na superfície dos astrócitos, fazendo com que esses aglomerados moleculares sejam alvos da morte mediada pela ativação do complemento ou por mecanismos de citotoxicidade celular mediada por fagócitos. Tais diferenças sugerem que regiões mais ricas na isoforma M23 possam ser mais vulneráveis ao dano, com maior presença de lesões necróticas no parênquima cerebral dos pacientes (HINSON *et al.*, 2007). Ainda, outro estudo publicado por SAADOUN e PAPADOPOULOS (2015) sugeriu que, quando comparada à periferia, a expressão reduzida de proteínas reguladoras da ativação do complemento no SNC seria a causa primária da maior sensibilidade local ao ataque mediado pelos anticorpos anti-AQP4 nos pacientes com NMOSD.

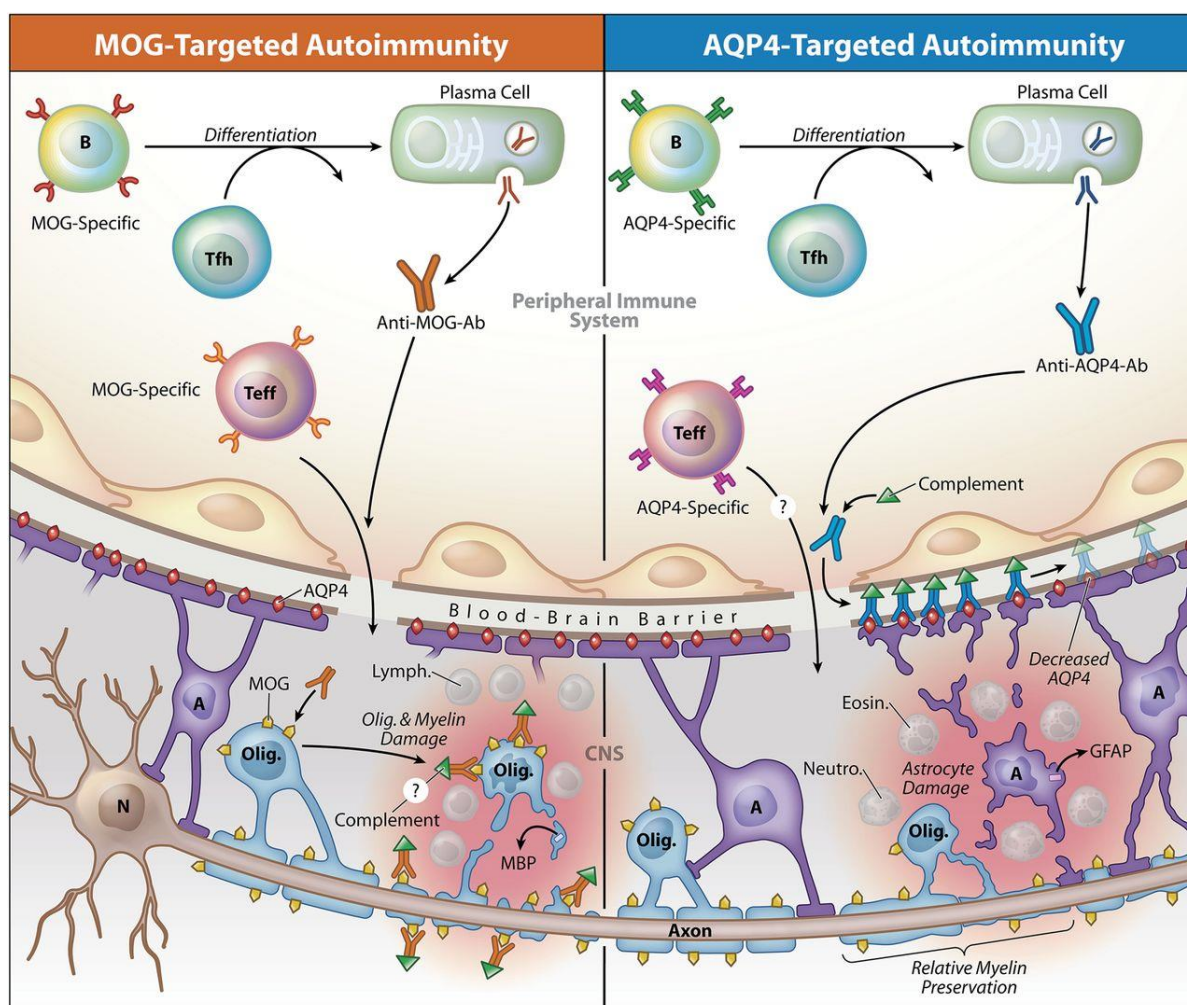
Apesar do conhecimento de que a maioria dos pacientes com NMOSD são soropositivos para anticorpos anti-AQP4, outros estudos têm demonstrado uma fração significativa de pacientes NMOSD soronegativos para esse anticorpo. Estudos mais recentes apontam para o possível papel de anticorpos contra a glicoproteína de oligodendrócitos da mielina (MOG - do inglês, *myelin oligodendrocytes glycoprotein*), que estão presentes em aproximadamente 20% dos pacientes que são soronegativos para anti-AQP4 (KITLEY *et al.*, 2012; PRÖBSTEL *et al.*, 2015; SATO *et al.*, 2014). Estudos em camundongos sugerem que anticorpos anti-MOG possam causar lesão no SNC e que, o antígeno-alvo desse anticorpo, a MOG, está presente na superfície externa da bainha de mielina (SAADOUN *et al.*, 2014). A presença de um antígeno-alvo na própria bainha de mielina pode indicar que, nesse caso, a imunopatogênese se daria através de desmielinização primária, ao contrário do que ocorre com pacientes soropositivos para anti-AQP4 (Figura 11).

Apesar de pouca informação quanto ao papel patogênico desse anticorpo na NMOSD *in vivo*, recentemente, um estudo desenvolvido por FANG e colaboradores (2019) demonstrou que a presença de anticorpos anti-MOG poderia contribuir para uma oligodendrociopatia, mas somente na presença de complemento. Em contrapartida, outros estudos mostraram que, em camundongos, anticorpos anti-MOG causaram danos reversíveis na bainha de mielina e em axônios e que, o

mecanismo de lesão por anti-MOG não envolveria a ativação do complemento e nem infiltração leucocitária, o que seria determinante para o melhor prognóstico, quando comparado a pacientes anti-AQP4⁺ (MADER *et al.*, 2011; SAADOUN *et al.*, 2014). Em humanos, indivíduos com NMOSD e positivos para anti-MOG tendem a apresentar uma menor frequência de exacerbações clínicas e maior equilíbrio na razão entre mulheres e homens afetados quando comparados aos pacientes positivos para anti-AQP4, o que sugere que sejam doenças distintas (HÖFTBERGER *et al.*, 2015; JARIUS *et al.*, 2016). No geral, pacientes têm melhor recuperação dos surtos quando comparados aos pacientes soropositivos para anti-AQP4, ou mesmo quando soronegativos para ambos os anticorpos (SATO *et al.*, 2014). Neste último caso, ainda não se sabe quais seriam os mecanismos imunopatogênicos envolvidos no desenvolvimento e exacerbações da NMOSD. A AQP1 (aquaporina-1) tem sido sugerida como possível alvo, porém, há muita controvérsia sobre o seu papel na doença até então (JASIAK-ZATONSKA *et al.*, 2016; SANCHÉZ-GOMAR *et al.*, 2016; GARCIA-MIRANDA *et al.*, 2019).

Finalmente, a existência de pacientes com NMOSD soropositivos para ambos os anticorpos (anti-AQP4 e anti-MOG) também vem sendo observada. Apesar de se ter pouca informação a respeito, estes pacientes parecem manifestar piores sintomas visuais e recuperação deficiente após episódios ópticos agudos e, ainda, parecem apresentar um maior EDSS quando comparados a pacientes com soropositividade apenas para anti-MOG ou anti-AQP4 (YAN *et al.* 2016). Sendo assim, a compreensão, em conjunto, das características patológicas e imunopatológicas da doença torna-se essencial para o manejo terapêutico da NMOSD.

Figura 11 - Possíveis diferenças entre os mecanismos imunopatológicos da NMO em pacientes soropositivos para anti-AQP4 ou para anti-MOG



Legenda: Anticorpos anti-MOG e anti-AQP4 (Ab) têm seus antígenos alvo expressos em diferentes populações celulares, os oligodendrócitos (Olig.) ou astrócitos (A), respectivamente. Estudos sugerem que os dois anticorpos são produzidos na periferia. Anticorpos anti-AQP4 são IgG1, subclasse produzida por células B dependente da interação com células T helper foliculares (T_{FH}) (CROTTY, 2011). O isotipo do anticorpo anti-MOG ainda não foi definido, apesar de aparecer como IgG na figura. Os anticorpos anti-MOG ou anti-AQP4 não são considerados patogênicos na ausência de resposta inflamatória mediada por células T. Possivelmente, células T efectoras específicas para MOG (SHETTY *et al.*, 2014; VARRIN-DOYER *et al.*, 2014) ou para AQP4 iniciam a inflamação no SNC, induzindo o recrutamento de neutrófilos (Neutro.) e eosinófilos (Eosin.) (LUCCHINETTI *et al.*, 2000). Entretanto, a presença de linfócitos (Lymph.) não foi confirmada no caso de inflamação associada ao anticorpo anti-MOG, porém são detectados nas lesões características de EM (LASSMANN; BRÜCK; LUCCHINETTI, 2007) e de EAE (encefalomielite autoimune experimental), modelo animal de EM, induzidas por MOG (MOLNARFI *et al.*, 2013; SLAVIN *et al.*, 2001). Em ambas as condições, a inflamação dependente de células T pode levar ao aumento da permeabilidade ou perda da integridade da BHE, permitindo o acesso dos anticorpos ao SNC (BENNETT *et al.*, 2009; BRADL *et al.*, 2009; LITZENBURGER *et al.*, 1998). Anticorpos anti-MOG se ligam às moléculas de MOG, expressas nos oligodendrócitos e na mielina, que envolve os axônios dos neurônios (N). Assim, provavelmente, anticorpos anti-MOG induzem a desmielinização (GENAIN *et al.*, 1999; LITZENBURGER *et al.*, 1998). Dano aos oligodendrócitos ou à mielina pode expor outros antígenos, como o da proteína básica da mielina (MBP) (IKEDA *et al.*, 2015).

Anticorpos anti-AQP4 se ligam às moléculas de AQP4, abundantes nos pés dos astrócitos. O anti-AQP4 é uma IgG1 e fixa complemento, amplificando o dano no astrócito. GFAP (do inglês, *glial fibrillary acidic protein*) é liberado devido ao dano nos astrócitos (IKEDA *et al.*, 2015; TAKANO *et al.*, 2010). A resposta contra o AQP4 é caracterizada pela relativa preservação da mielina.

Fonte: Traduzido e adaptado de ZAMVIL; SLAVIN, 2015.

1.4.3 Tratamento da NMOSD

Formas progressivas da doença são bastante raras, porém, incapacidades surgem devido aos repetidos surtos que causam danos profundos no parênquima do SNC. Nesse sentido, é imprescindível que o tratamento de pacientes com NMOSD se inicie de maneira rápida, a fim de diminuir a inflamação e as chances de uma nova exacerbação, minimizando o risco do desenvolvimento de incapacidades neurológicas irreversíveis (SATO *et al.*, 2012).

A pulsoterapia com corticoides (geralmente 1g/dia por 3-5 dias por via intravenosa), ou plasmaferese, para casos refratários à corticoideterapia, são as opções padrão para o tratamento das exacerbações de NMOSD (TREBST *et al.*, 2014). Os corticoides apresentam amplas ações antiinflamatórias e imunossupressoras, com redução dos linfócitos e monócitos circulantes, alteração da transcrição de citocinas inflamatórias e diminuição da expressão de moléculas de adesão e metaloproteinases (BARNES, 2006). Além disso, IL-6, IL-17A e IL-23 (WANG *et al.*, 2011b), citocinas relacionadas à indução e manutenção do fenótipo Th17, parecem ter sua produção diminuída com emprego de corticoides (MULS *et al.*, 2012). Já a plasmaferese age através da remoção passiva dos anticorpos circulantes, além de diminuir os níveis periféricos de citocinas inflamatórias (REEVES; WINTERS, 2014). Entretanto, parece que o benefício decorrente dessa última opção de tratamento independe da soropositividade para o anticorpo anti-AQP4 (BONNAN *et al.*, 2009). Além de seu papel no tratamento de surtos, tratamento com corticoides ou a plasmaferese podem ser empregados no esquema de profilaxia de novos surtos. Dentre as opções de tratamento para prevenção de novos surtos estão a Azatioprina, Micofenolato de mofetila, Metotrexato, Mitoxantrona, Ciclofosfamida, Tocilizumabe e Eculizumab. O Rituximabe - um anticorpo monoclonal anti-CD20 usado na depleção das células B - tem sido cada vez mais empregado nos casos refratários à Azatioprina ou até como droga de

primeira linha (TREBST et al., 2014). Em contrapartida, apesar de existirem casos em que a terapia com alvo nas células B não é eficaz, independente da produção de anticorpos anti-AQP4 (LINDSEY et al., 2012), outro estudo demonstrou que o tratamento com Rituximabe foi eficaz em diminuir a porcentagem de células TFH17 e em aumentar o fenótipo regulador TFR na circulação (NICOLAS et al., 2019). Em modelos experimentais, a injeção de anticorpos anti-AQP4 obtidos de pacientes não foi capaz de induzir NMOSD em camundongos na ausência de células T CD4+ específicas para a proteína AQP4 (BENNETT et al., 2009; BRADL et al., 2009). Estes acontecimentos podem estar relacionados, provavelmente, ao papel das células T CD4+ patogênicas na doença, como por exemplo, as células TFH, capazes de auxiliar os linfócitos B - que são continuamente produzidos pela medula-óssea dos pacientes afetados - na produção de anticorpos.

Nesse sentido, levando em consideração que, a NMOSD é uma condição autoimune predominantemente humoral com maior prevalência em mulheres e fatores hormonais referentes ao gênero feminino podem influenciar na patogênese dessa doença (SHOSHA et al., 2017) e que, ainda, a gestação é caracterizada por um aumento da produção de anticorpos em decorrência hormonal (KANDA;TAMAKI, 1999), estudos aprofundados no que diz respeito à funcionalidade das células TFH em ambas as condições – tendo como grande pilar o papel hormonal - são de extrema importância para futuras estratégias terapêuticas e de vacinas em diferentes contextos, por exemplo, contra o HIV-1.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a biologia das células T_{FH} circulantes em gestantes, infectadas ou não pelo HIV-1, e em mulheres com diagnóstico definitivo de NMOSD. E, ainda, avaliar os mecanismos de atuação dos hormônios gestacionais, estrogênio e progesterona, no status funcional desses linfócitos.

2.2 Específicos

Artigo 1: Pregnancy favors the expansion of circulating functional follicular helper T cells (Artigo publicado)

Clarice Monteiro*, Taissa M. Kasahara*, José Roberto Castro, Priscila Mendonça, Joana Hygino, Newton Centurião, Tatiane Cassano, Lana M. Ferreira Lopes, Simone Leite, Vander Guimarães Silva, Sudhir Gupta and Cleonice A. M. Bento. *Journal of Reproductive Immunology* (2017). Apr 27;121:1-10.

doi: 10.1016/j.jri.2017.04.007.

* The first two authors contributed equally to this work

- a) Determinar a frequência das células T_{FH} no sangue periférico de mulheres saudáveis, grávidas ou não;
- b) Avaliar o impacto da gestação no perfil de citocinas produzido pelas células T_{FH} ;
- c) Correlacionar a frequência das células T_{FH} com a produção de hormônios gestacionais;

- d) Correlacionar a frequência das células T_{FH} com a produção de anticorpos IgG contra o citomegalovírus e antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg).

Artigo 2: Pregnancy favors circulating IL-21-secreting T_{FH}-like cell recovery in ARV-treated HIV-1-infected women (Artigo publicado)

Taissa M. Kasahara*, Clarice Monteiro*, Joana Hygino, Marcos O. S. D. Cafasso, Hugo A. A. Oyamada, Regis M. Andrade, Simone Leite, Vander G. Silva, Sudhir Gupta, and Cleonice A. M. Bento. Am J Reprod Immunol. 2019 Oct 31:e13204.

doi: 10.1111/aji.13204

* The first two authors contributed equally to this work

- a) Determinar a frequência das células T_{FH} no sangue periférico de gestantes infectadas, ou não, pelo HIV-1, antes e após início da TARV;
- b) Avaliar a produção de IgG pelas células B, *in vitro*, em coculturas com células T CD4⁺ de mulheres infectadas pelo HIV-1, grávidas ou não;
- c) Avaliar a produção de IL-21 em coculturas de células B com células T CD4⁺ de mulheres infectadas pelo HIV-1, grávidas ou não;
- d) Correlacionar a frequência das células T_{FH} com a produção de hormônios gestacionais;
- e) Correlacionar a frequência das células T_{FH} com a produção de anticorpos IgG contra HIV-1, HBs e toxóide tetânico (TT).

Artigo 3: The expansion of circulating IL-6 and IL-17-secreting follicular helper T cells is associated with neurological disabilities in neuromyelitis optica spectrum disorders (Artigo publicado)

Clarice Monteiro*, Gabriel Fernandes*, Taissa M. Kasahara, Priscila O. Barros, Aleida S. O. Dias, Ana Carolina M. A. Araújo, Alice M. M. Ornelas, Renato S. Aguiar, Regina Alvarenga and Cleonice A. M. Bento. Journal of Neuroimmunology (2019). May 15;330:12-18.

doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.01.015.

* The first two authors contributed equally to this work

- a) Avaliar a frequência de células T_{FH} no sangue periférico de pacientes com neuromielite óptica, produtores ou não de anticorpos anti-AQP4;
- b) Avaliar o impacto da doença no perfil de citocinas produzido pelas células T_{FH} ;
- c) Correlacionar a frequência de células T_{FH} com o EDSS e com o índice de recaídas clínicas de pacientes com neuromielite óptica produtores, ou não, de anticorpos anti-AQP4;
- d) Avaliar a concentração plasmática de diferentes citocinas em pacientes com neuromielite óptica produtores ou não de anticorpos anti-AQP4;
- e) Correlacionar a concentração plasmática de diferentes citocinas com o EDSS e com o índice de recaídas clínicas de pacientes com neuromielite óptica produtores ou não de anticorpos anti-AQP4.

Artigo 4: Pregnancy levels of estrogen and progesterone contribute to humoral immunity by activating B / T_{FH} cell axis (Artigo submetido)

Clarice Monteiro^{a,b,*}, Taissa Kasahara^{a,b,*}, Priscila M. Sacramento^a, Aleida Dias^{a,b}, Sudhir Gupta^c, Anshu Agrawal^c, Cleonice A. M. Bento^{a,c}

* The first two authors contributed equally to this work.

- a) Avaliar o efeito direto dos hormônios gestacionais estrogênio e progesterona na frequência de diferentes subtipos de células T_{FH} e T_{FR} *in vitro*
- b) Avaliar o efeito direto de estrogênio e de progesterona na frequência de células T não foliculares *in vitro*
- c) Avaliar o efeito direto de estrogênio e de progesterona na frequência diferentes subtipos de células B, plasmócitos e plasmablastos *in vitro*
- d) Avaliar o efeito direto de estrogênio e progesterona na diferenciação de células T $CD4^+$ naíve em células T_{FH}
- e) Avaliar a produção de anticorpos IgG e de IL-21 resultante de cocultura de células T_{FH} com células B na presença de estrogênio e/ou progesterona

- f) Comparar a frequência de células T_{FH} entre homens e mulheres saudáveis
- g) Avaliar a expressão dos receptores de estrogênio e de progesterona em células T CD4⁺CXCR5⁻ e CXCR5⁺ em homem e em mulher saudável.

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 Artigo 1 - Pregnancy favors the expansion of circulating functional follicular helper T cells (Artgo Publicado)

Journal of Reproductive Immunology 121 (2017) 1–10



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Reproductive Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jri



Pregnancy favors the expansion of circulating functional follicular helper T Cells



Clarice Monteiro^{a,b,1}, Taissa M. Kasahara^{a,b,1}, José Roberto Castro^a, Priscila M. Sacramento^a, Joana Hygino^a, Newton Centurião^a, Tatiane Cassano^a, Lana M. Ferreira Lopes^a, Simone Leite^c, Vander Guimarães Silva^c, Sudhir Gupta^d, Cleonice A.M. Bento^{a,*}

^a Department of Microbiology and Parasitology/Federal University of the State of Rio de Janeiro, Brazil

^b Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, UERJ, Rio de Janeiro, Brazil

^c Fernandes Figueira Institute/IOC, Rio de Janeiro, Brazil

^d University of California, Irvine, CA, USA

ARTICLE INFO

Keywords:
Pregnancy
T_{H1} cells
Estrogen
Antibodies

ABSTRACT

Pregnancy favors antibody production, and some evidence has suggested a direct effect of estrogen on B cells. The impact of pregnancy on circulating follicular helper T (T_{H1}) cells, typically identified by the expression of CD45RO and CXCR5, has not been previously investigated. Here, the percentage of T_{H1} cells, co-expressing or not PD-1, ICOS, or CXCR3 markers was significantly higher in pregnant women (PW) as compared with non-pregnant ones (nPW). Furthermore, the percentage of CXCR3⁺ T_{H1} cells able to produce IL-6, IL-21, and IL-10 was significantly higher in PW than nPW. Interestingly, anti-CMV and anti-HBs antibody titers were significantly higher in the plasma of PW and were directly correlated with IL-21-producing CXCR3⁺ T_{H1} cells. Finally, peripheral estrogen levels, but not progesterone, were positively related to either PD-1⁺ CXCR3⁺ T_{H1} cells or plasma anti-CMV and anti-HBs IgG antibodies. In summary, our data suggests a positive effect of pregnancy on the proportion of CD4⁺ T cell subset specialized in helping B cells. This phenomenon, which could be related to the high estrogen levels produced during pregnancy, may help to explain why pregnancy favor humoral immunity.

1. Introduction

Human follicular helper T (T_{H1}) cells represent a distinct subset of CD4⁺ T cells found in secondary lymphoid organs and characterized by a high expression of the transcription factor B cell lymphoma-6 (Bcl-6), programmed cell death receptor-1 (PD-1), inducible T-cell co-stimulator (ICOS) and chemokine receptor CXCR5 associated with high IL-21 cytokine secretion (Crotty, 2011). The high expression of CXCR5, associated with low levels of CCR7, allows these lymphocytes to migrate toward lymph node follicles in a CXCL13-dependent manner (Johnston et al., 2009). Functionally, T_{H1} cells up-regulate humoral immunity by assisting germinal center generation, through the delivery of cognitive and soluble signals required for the proliferation, survival, affinity maturation, and differentiation of B lymphocytes into antibody-

producing plasma cells and long-lived memory B cells (Nurieva et al., 2009; Shulman et al., 2013; Ma and Deenick, 2014). Additionally, T_{H1} cells are important for the process of heavy chain class switch of antibodies (Ma and Deenick, 2014). At the T_{H1} cell-level, the positive signals are especially provided through the expression of ICOS and CD40 ligand (CD40L/CD154), as well as IL-21 and IL-4 production (Yusuf et al., 2010; Pallikkuth et al., 2012; Ma and Deenick, 2014). IL-21, by inducing Bcl-6 expression in B lymphocytes, allows both maturation and differentiation of these cells (Johnston et al., 2009; Yusuf et al., 2010), whereas IL-4 promotes B cell survival by inhibiting cell apoptosis (Johnston et al., 2009; Kitano et al., 2011).

Recent studies have demonstrated the presence of functionally similar T_{H1} cells in the pool of circulating memory T cells (Chevalier et al., 2011; Morita et al., 2011). Phenotypically, these circulating T_{H1}

Abbreviations: Bcl-6, transcription factor B cell lymphoma-6; CMV, cytomegalovirus; E2-17β, estradiol; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; GC, germinal center; HbsAg, hepatitis B superficial antigen; HBV, hepatitis B virus; HIV, Human immunodeficiency virus; ICOS, inducible T-cell co-stimulator; IFN, interferon; IgG, immunoglobulin G; IL, interleukin; mAbs, monoclonal antibodies; nPW, non-pregnant women; PD-1, programmed cell death receptor-1; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; PW, pregnant women; T_{H1}, T follicular helper; Th, T helper; TMB, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine; TNF, tumor necrosis factor

* Corresponding author at: Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Frei Caneca 94, 20.261-040, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail address: cbento@iglobo.com (C.A.M. Bento).

¹ The first two authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2017.04.007>

Received 26 March 2017; Accepted 25 April 2017

0165-0378/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

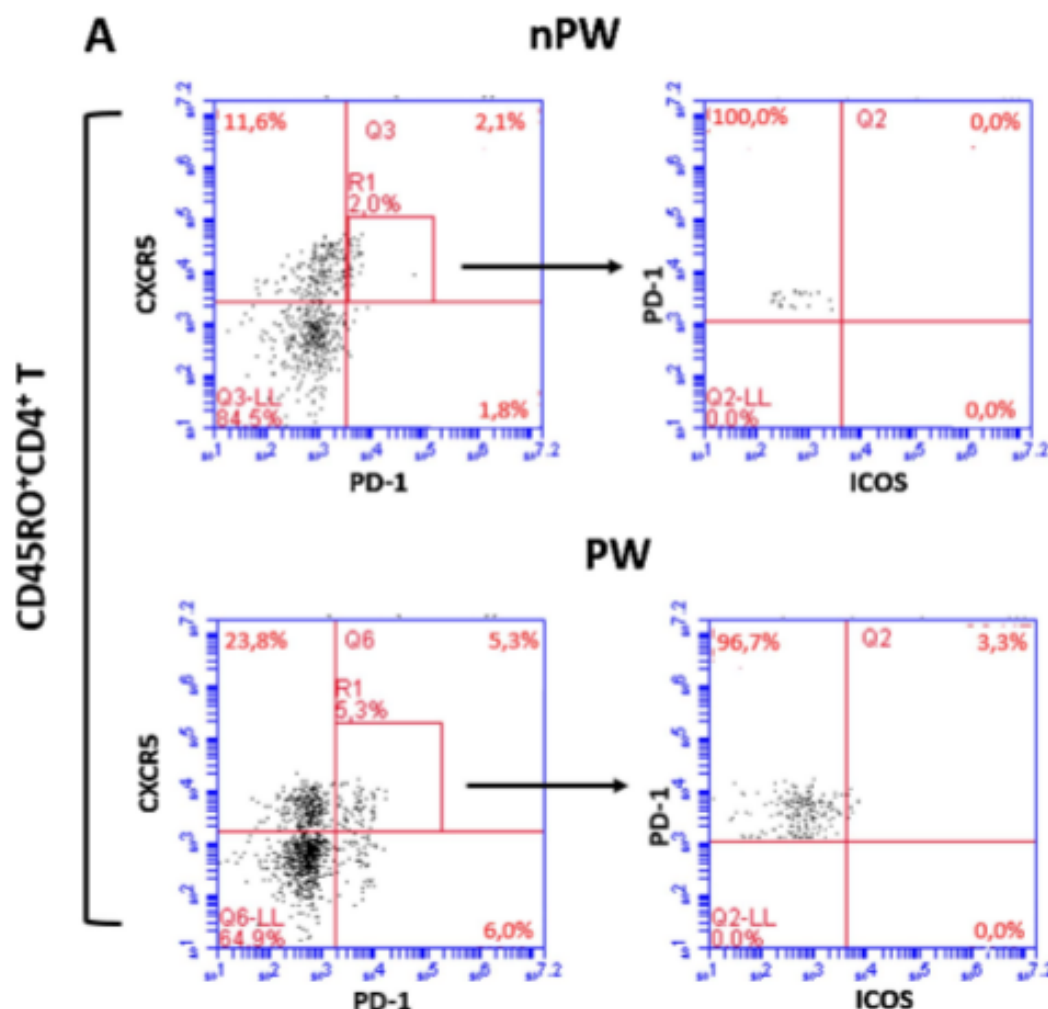


Fig. 1. The impact of pregnancy on the percentage of circulating T_{reg} cells. Peripheral blood was obtained from healthy women, pregnant (PW, $n = 10$) or not (nPW, $n = 10$), and submitted to staining with fluorescent monoclonal antibodies against CD3, CD4, CXCR5, CD45RO, ICOS and PD-1 markers. The percentage of T_{reg} cells was evaluated through flow cytometry. In (A), representative dot plots. In (B), the percentage of T_{reg} cells (CD45RO⁺ CXCR5⁺ CD4⁺ T cells) expressing ICOS (C) and PD-1 (D) are shown as mean \pm SD and the p values (Mann-Whitney U test) are indicated in the figure. The percentage of CD4⁺ T cells expressing CXCR5 and CXCR3 (E) with PD-1 (F) in PW ($n = 20$) and nPW ($n = 20$) are also analyzed and shown as mean \pm SD and the p values are indicated in the figure (Mann-Whitney U test).

cells have been primarily identified as CXCR5⁺ CD45RO⁺ (Chevalier et al., 2011; Morita et al., 2011). Although these CXCR5⁺ CD4⁺ T cells did not express Bcl-6, they are able to help B cells, at least in part, by secreting large amounts of IL-21 and IL-10 (Morita et al., 2011; Bentebibel et al., 2013). Furthermore, the co-expression of ICOS and PD-1 (Loeffel et al., 2013; Tsai and Yu, 2014) appears to identify a more efficient circulating T_{reg} cell subset to induce the production of neutralizing antibodies in response to immunization or infections, such as those caused by the Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Influenza virus (Bentebibel et al., 2013; Bentebibel et al., 2016). On the other hand, these cells have also been associated with humoral autoimmune diseases (Nakayamada and Tanaka, 2016). No study aiming to evaluate the prevalence of T_{reg} cells in pregnant women, which takes into consideration the stimulation of antibody production by pregnancy, has been carried out so far.

In order to avoid fetus rejection, potentially embryotoxic maternal cellular immune responses mediated by effector Th1/Tc-1 and Th17/Tc-17 cells need to be attenuated (Heikkinen et al. 2004; Saito et al.,

2010; Kwak-Kim et al., 2014). This phenomenon has been accompanied by an increase in the prevalence of maternal regulatory T cell subsets (Xiong et al., 2013). These maternal immune changes appear to be modulated by hormones, such as estrogen and progesterone. The 17 β -estradiol (E2) and progesterone, at higher levels, inhibit cellular immune responses classically mediated by Th1 and Th17 cells (Hel et al., 2010; Luo et al., 2011; Hughes et al., 2013). In contrast, E2 increases antibody production by memory B lymphocytes (Kanda and Tamaki, 1999; Fu et al., 2011), thus increasing fetal protection against different pathogens from maternal IgG placental transfer (Tangye et al., 2013). Despite the direct effect of estrogen on B cells, the data presented here, although preliminary, suggests that pregnancy can also favor humoral immunity by favoring the expansion of T_{reg} cells, a previously uninvestigated phenomenon.

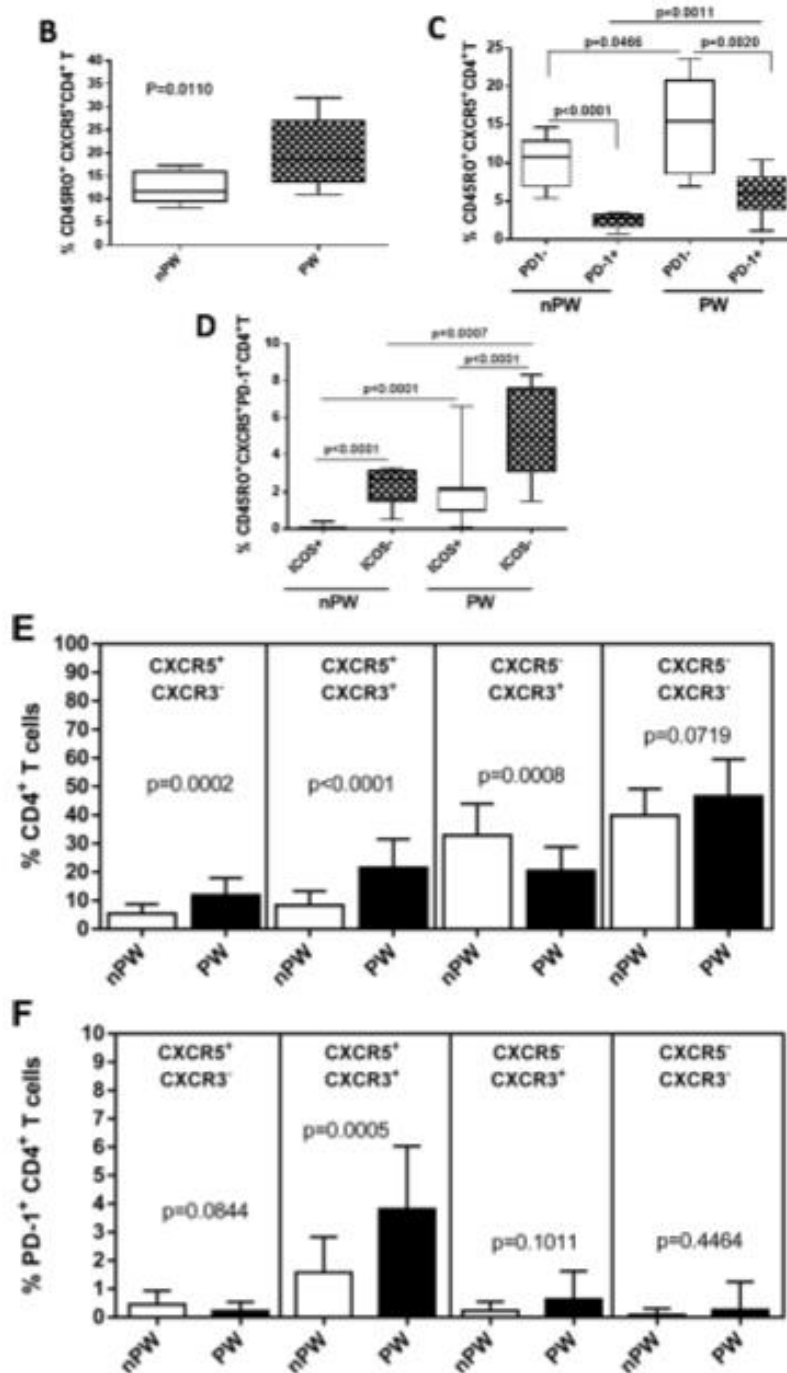


Fig. 1. (continued)

2. Materials and methods

2.1. Subjects

For this study, blood samples were collected from 35 pregnant women (PW), in the third trimester of pregnancy, and age-matched

with 35 non-pregnant women (nPW). All subjects were aged between 15 and 35 years of age. Women with autoimmune diseases or cancer, immunocompromised, smokers, illicit substance users, and those with clinical or serological signs of acute or chronic diseases such as influenza, HCV, HBV and HIV-1/2 were excluded. The subjects were recruited from Fernandes Figueira Institute (IFF/Fiocruz-RJ) and

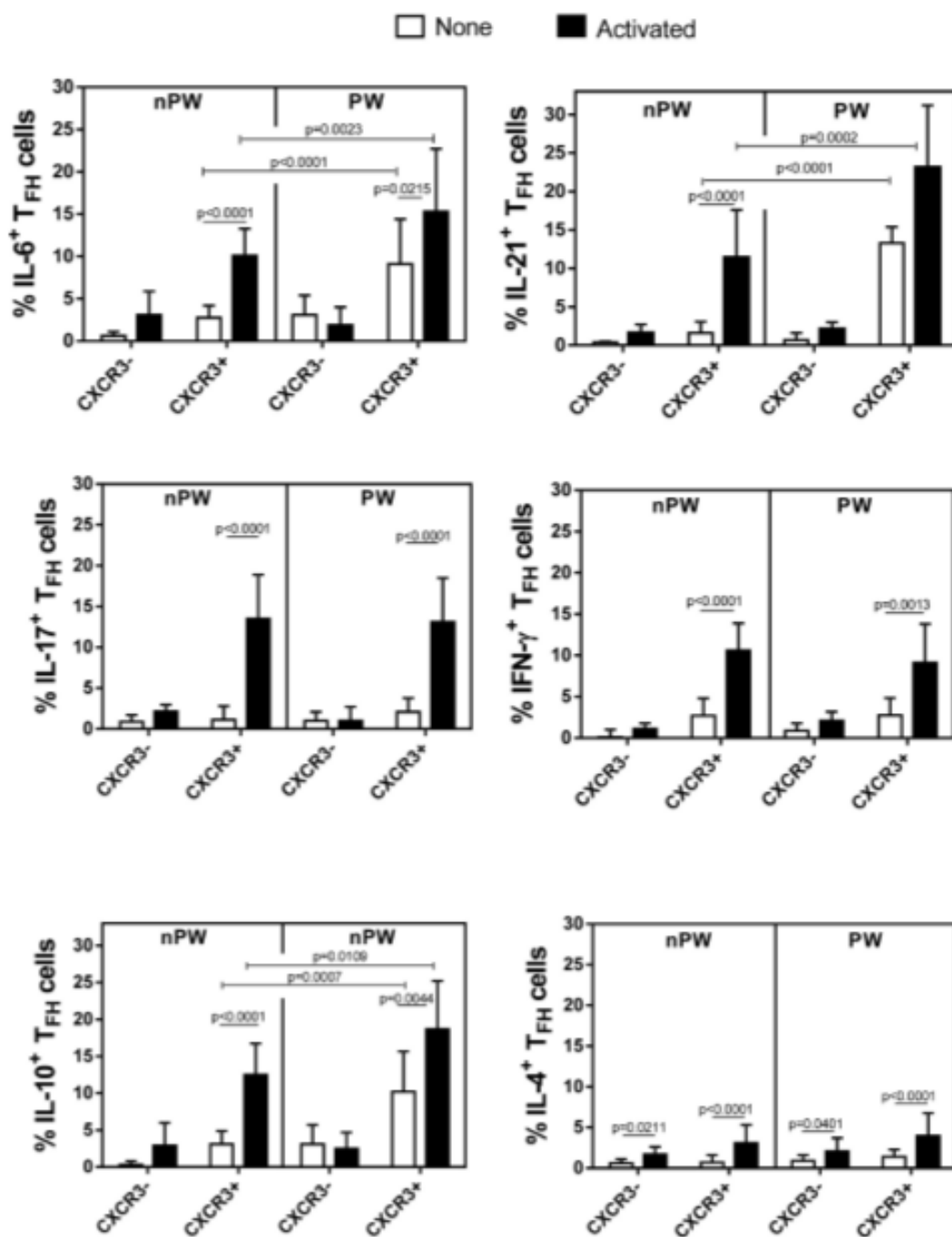


Fig. 2. The impact of pregnancy on the percentage of cytokine-producing T_H1 cells expressing or not CXCR3 marker. Peripheral blood was obtained from healthy women, both pregnant (PW, $n = 20$) or not (nPW, $n = 20$), and was stimulated with PMA and ionomycin. After 4 h, the cells were submitted to staining with fluorescent monoclonal antibodies against CD4, CXCR5, CXCR3 markers and different intracellular cytokines (IL-6, IL-21, IL-17, IFN- γ , IL-10 and IL-4). The percentage of cytokine-expressing T_H1 cells was evaluated through flow cytometry. The data is shown as mean \pm SD and the p values (Student's t test) are indicated in the figure.

Table 1
Relationship between the cytokine production and the percentage of CXCR3⁺ or CXCR3⁺ PD-1⁺ T_{H1} cells.

	% CXCR3 ⁺ T _{H1}		% CXCR3 ⁺ PD-1 ⁺ T _{H1}	
	Correlation (r)	p values	Correlation (r)	p values
% CD4 ⁺ T				
IL-6	0.7346	< 0.0001	0.2690	0.1663
IL-21	0.5608	0.0019	0.2834	0.1439
IL-10	0.5631	0.0018	0.3178	0.0994

In the table, the percentage of CXCR3⁺ T_{H1} cells, according the expression of PD-1, was associated with the percentage of cytokine-producing CD4⁺ T cells from all women, pregnant or not. Pearson's correlation was applied and the p values are indicated in the table.

Gaffrée and Guinle University Hospital (HUGG). This study was approved by the ethics committee of the HUGG (UNIRIO) and written consent was obtained from all subjects.

2.2. Flow cytometry analysis

Whole peripheral blood from PW and nPW were briefly stimulated in 24-well flat bottom microtiter plates with phorbolmyristate acetate (20 ng/mL; Sigma-Aldrich) plus ionomycin (600 ng/mL; Sigma-Aldrich) at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator for 4 h. For cytokine measurement optimization, Brefeldin A (10 µg/mL; Sigma-Aldrich) was also added to the culture. To determine the circulating percentage of T_{H1} cells, mouse anti-human monoclonal antibodies (mAbs) to CD3-PE, CD4-FITC/PECy7, CD45RO-PE-Cy7, CXCR3-PE/PECy7, CXCR5-PECy7/PE/APC, ICOS-PerCP, PD1-APC, IL-21-PE/APC, IFN-γ-PE/APC, IL-10-FITC/APC, IL-17-PECy7, IL-4-APC, IL-6-PE and all isotype control antibodies were purchased from BioLegend (San Diego, CA, USA) and used to characterize the different T-cell phenotypes. Briefly, blood samples were incubated with various combinations of the aforementioned mAbs for 30 min at room temperature in the dark, according to the instructions of the manufacturer. The cells were lysed, washed and, then, permeabilized by incubating cells with Cytofix/Cytoperm solution (BD Pharmingen, San Diego, CA). The mAbs for intracellular staining (IL-21-PE/APC, IFN-γ-PE/APC, IL-10-FITC/APC, IL-17-PECy7, IL-4-APC, IL-6-PE) were added in different combinations. The cells were acquired on Accuri C6 (Accuri™, Ann Arbor, MI, USA) or FACS LRS II Fortessa (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and analyzed by using Cflow (Accuri™, Ann Arbor, MI, USA) or FlowJo software. Isotype control antibodies and single-stained samples were used to periodically check the settings and gates on the flow cytometer. After acquisition of 100,000 events, lymphocytes were gated based on forward and side scatter properties after the exclusion of dead cells, by using propidium iodide, and doublets. Further, the gated cells were negatives for CD14 marker.

2.3. ELISA

The peripheral levels of pregnancy hormones (progesterone and estrogen), as well as total IgG antibodies were determined by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Estrogen and progesterone plasma levels, as well as anti-cytomegalovirus (CMV) IgG titers, were measured using Abcañis ELISA kit (Cambridge, USA), while the anti-hepatitis B (HBsAg) titers were determined through BIOLISA kit (Bioclin, Belo Horizonte, BRA), according to manufacturers' instructions. Reagents supplied by the manufacturer were used to construct the standard curve from 0.021–15 ng/mL to IgG, 0–1000 pg/mL to estrogen, 0–500 mIU/mL to HBs IgG, 0–18 U/mL to CMV IgG, and 0–40 ng/mL to progesterone.

2.4. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Differences between two different groups were analyzed either by parametric (t-test) or nonparametric tests (Mann-Whitney U test) where appropriate. We used Spearman and Pearson's correlation coefficient test to determine the relation of different immune events trialed, as appropriate. Significance for all experiments was defined as p < 0.05.

3. Results

3.1. Impact of pregnancy on the percentage of circulating T_{H1} cells

Taking into consideration the most typical markers for T_{H1} cells (Fig. 1A), the percentage of CD45RO⁺ CXCR5⁺ CD4⁺ T cells was significantly higher in pregnant (PW) as compared with non-pregnant women (nPW) (Fig. 1B). Moreover, although the percentage of these T_{H1} cells co-expressing PD-1 (Fig. 1C) and ICOS (Fig. 1D) was low, it was significantly higher among PW. Some other surface markers, like CXCR3, have been suggested to further the characterization of T_{H1} functions (Bentebibel et al., 2013; Gensous et al., 2016). In the present study, pregnancy significantly increased the percentage of T_{H1} cells with or without co-expression of CXCR3 (Fig. 1S and E). Otherwise, a lower percentage of CXCR5⁺ CXCR3⁺ CD4⁺ T cells were detected in PW, and no difference was observed concerning the frequency of CXCR5⁺ CXCR3⁺ CD4⁺ T cells in the two experimental groups (Fig. 1E). Then we determined the PD-1 expression according to the expression of CXCR3 on T_{H1} cells. The PD-1 was mainly expressed on CXCR3⁺ T_{H1} cell subset in both groups, but the percentage of this subset was significantly higher in PW than nPW (Fig. 1S and F). No statistical difference was observed in the percentages of the other subsets.

3.2. Impact of pregnancy on cytokine profile produced by circulating T_{H1} cells

With regard to cytokine profile, the production of IL-21, IL-6, IL-10, IL-17, and IFN-γ, but not IL-4, was predominantly confined to circulating CXCR3⁺ T_{H1} cells in both experimental groups (Fig. 2). Interestingly, following the representative flow cytometric histograms (Fig. 2S), the percentage of those cells positives for IL-6, IL-21, and IL-10 was significantly higher in PW, even in unstimulated cultures (Fig. 2). No statistical difference was observed in the percentage of IL-4, IL-17, or IFN-γ-producing T_{H1} cells between PW and nPW (Fig. 2). Moreover, the frequency T_{H1} cell producers of IL-6, IL-10 and IL-21 was directly correlated with the proportion of CXCR3⁺ T_{H1} cells, but not PD-1⁺ CXCR3⁺ T_{H1} cell subset (Table 1).

3.3. The proportion of circulating CXCR3⁺ T_{H1} cells and the production of IgG antibodies

The previous results showed that pregnancy increased the percentage of cytokines (IL-21, IL-6 and IL-10)-secreting CXCR3⁺ T_{H1} cells. Therefore, we sought to analyze if these cells, expressing or not PD-1, was associated with the in vivo IgG levels directed against HBsAg from HBV and anti-CMV. Notably, over 75% of women (PW and nPW) were seropositive for anti-CMV IgG, and 85% for anti-HBs IgG. As shown in Fig. 3A, anti-CMV and anti-HBs antibody titers were significantly higher in the plasma of PW than nPW. A positive correlation was observed between the percentage of both, CXCR3⁺ or CXCR3⁺ PD-1⁺, T_{H1} cell subsets and the anti-CMV level (Fig. 3B). However, with regard to anti-HBs antibodies, we found a direct relationship between IgG titers and the percentage of CXCR3⁺ PD-1⁺ T_{H1} cell subset (Fig. 3C). We also verified the correlation between the percentage of cytokine producing CXCR3⁺ T_{H1} cells and the production of those antibodies. As

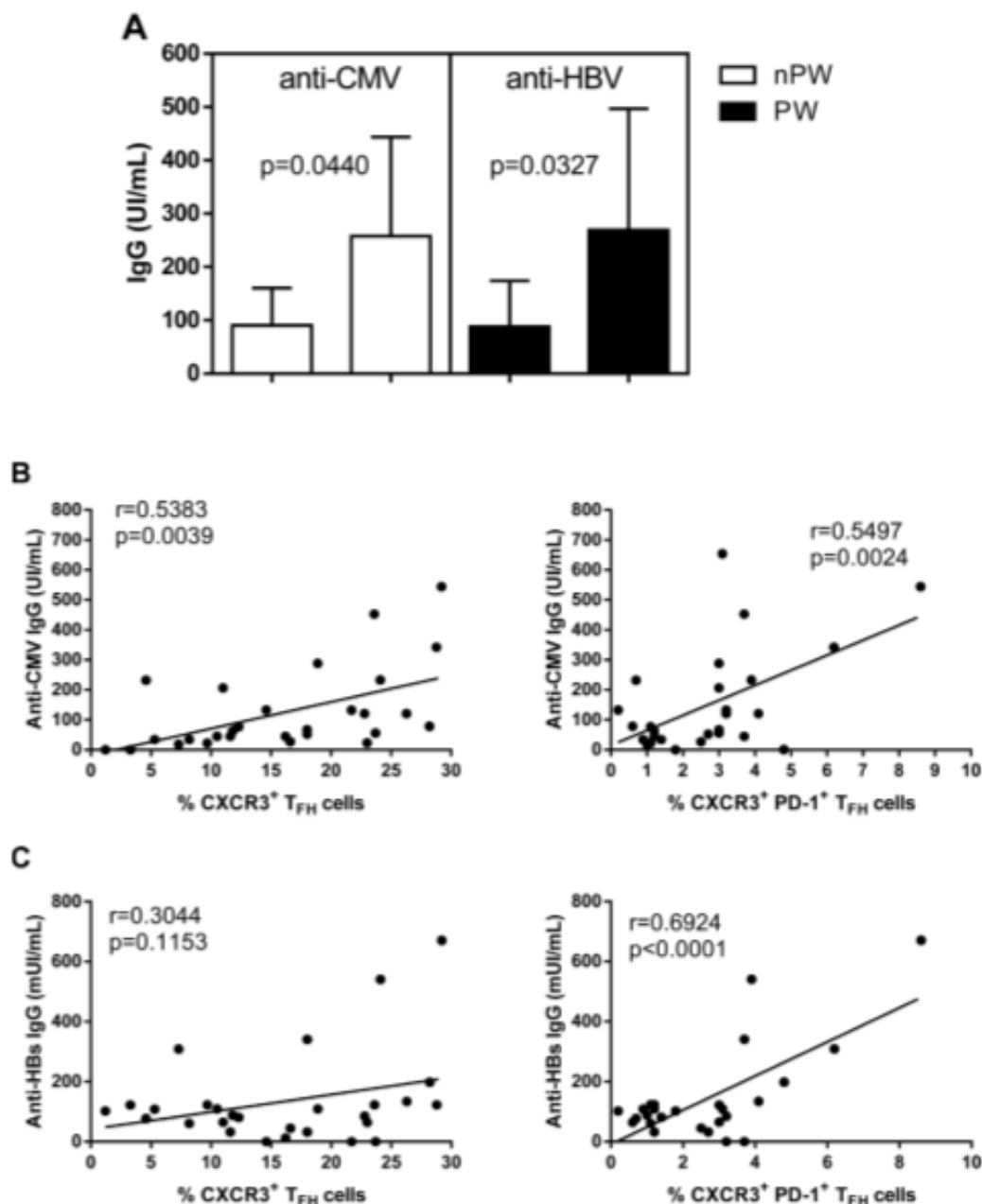


Fig. 3. The relationship between the percentage of CXCR3⁺ T_{FH} cells, according the expression of PD-1, and plasmatic levels of anti-CMV and anti-HBs IgG. In (A), the mean plasmatic levels of anti-CMV and anti-HBs IgG antibodies in nPW (n = 14) and PW (n = 14) is shown. The relationship between the percentage of T_{FH} cells, according the expression of PD-1 marker, with anti-CMV (B) and anti-HBs (C) antibodies are also shown. Significance was determined by Mann-Whitney U test (A). Pearson's correlation (B and C) was applied and the p values are indicated in the figure.

shown in Fig. 4A, the proportion of IL-6 and IL-21-producing CXCR3⁺ T_{FH} cells was positively related to the anti-CMV IgG levels from nPW and PW women. In contrast, only the percentage of IL-21-producing CXCR3⁺ T_{FH} cells was associated with the anti-HBs levels (Fig. 4B).

3.4. Pregnancy hormone levels and their relationship with the percentage of CXCR3⁺ T_{FH} cells and antibody production

Finally, we evaluated if the pregnancy hormone levels were related with the percentage of circulating T_{FH} cells and the antibody production. Notably, as expected, the plasma levels of progesterone and estrogen were higher in PW when compared with nPW. Interestingly,

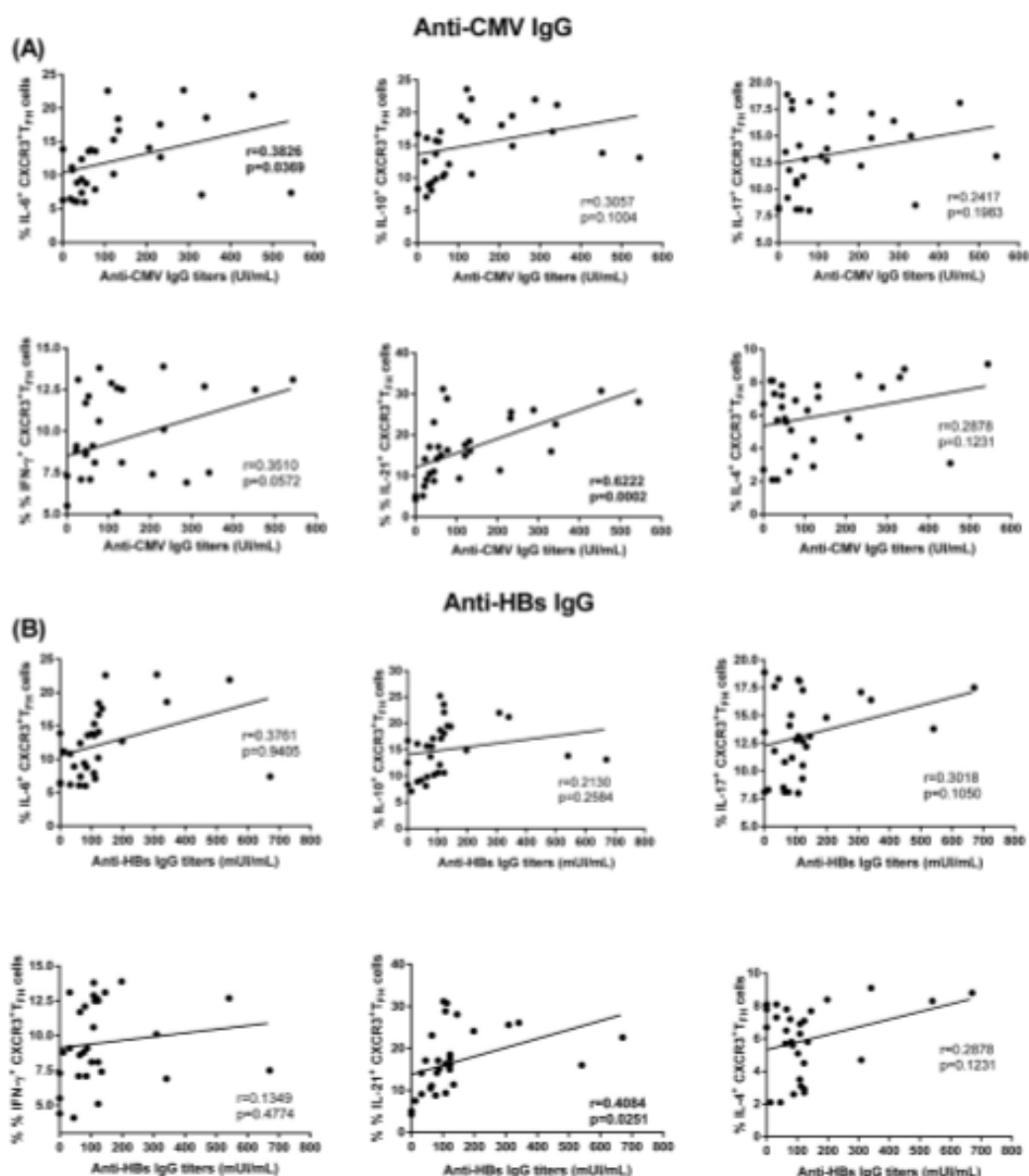


Fig. 4. The relationship between the percentage of cytokine-producing CXCR3⁺ T_{H1} cells and antibody production. The figure shows the relationship between the percentage of circulating cytokine-producing CXCR3⁺ T_{H1} cells with the peripheral levels of anti-CMV (A) and anti-HBs (B), determined by ELISA in pregnant (n = 15) and non-pregnant women (n = 15). Pearson's correlation was applied and the p values are indicated in the figure.

peripheral estrogen levels were positively related to whole CXCR3⁺ T_{H1} cells and those PD-1⁺ subsets (Fig. 5A). Furthermore, the plasma estrogen levels were also associated with anti-CMV and anti-HBs IgG titers (Fig. 5B). No statistical relationship was observed with regard to progesterone levels, and neither T_{H1} cell percentages nor antibody production (Fig. 5A and B, respectively).

4. Discussion

Although the differentiation of CD4⁺ T cells during Ag-specific activation depends mainly on the cytokines (Shulman et al., 2013), hormones can also drive CD4⁺ T cell lineage commitment (Song and

Shi, 2014; Qi et al., 2014). Elevated levels of estrogen and progesterone modulate CD4⁺ T cell behavior by attenuating effector Th1 and Th17 phenotypes, enhancing humoral immunity (Kanda and Tamaki, 1999; Grimaldi et al., 2002; Fu et al., 2011). In the present study, the findings suggest that pregnancy can favor humoral immune response by elevating circulating T_{H1} cells, a CD4⁺ T cell subset specialized in helping B cells to produce antibodies (Schmitt et al., 2014). To our knowledge, this is the first report showing a relationship between pregnancy and T_{H1} cells.

Into the follicles of lymph nodes, human T_{H1} cells are identified by high expression of classical CXCR5 molecules, associated with the expression of Bel 6, PD-1, ICOS and production of IL-21 (Crotty, 2011).

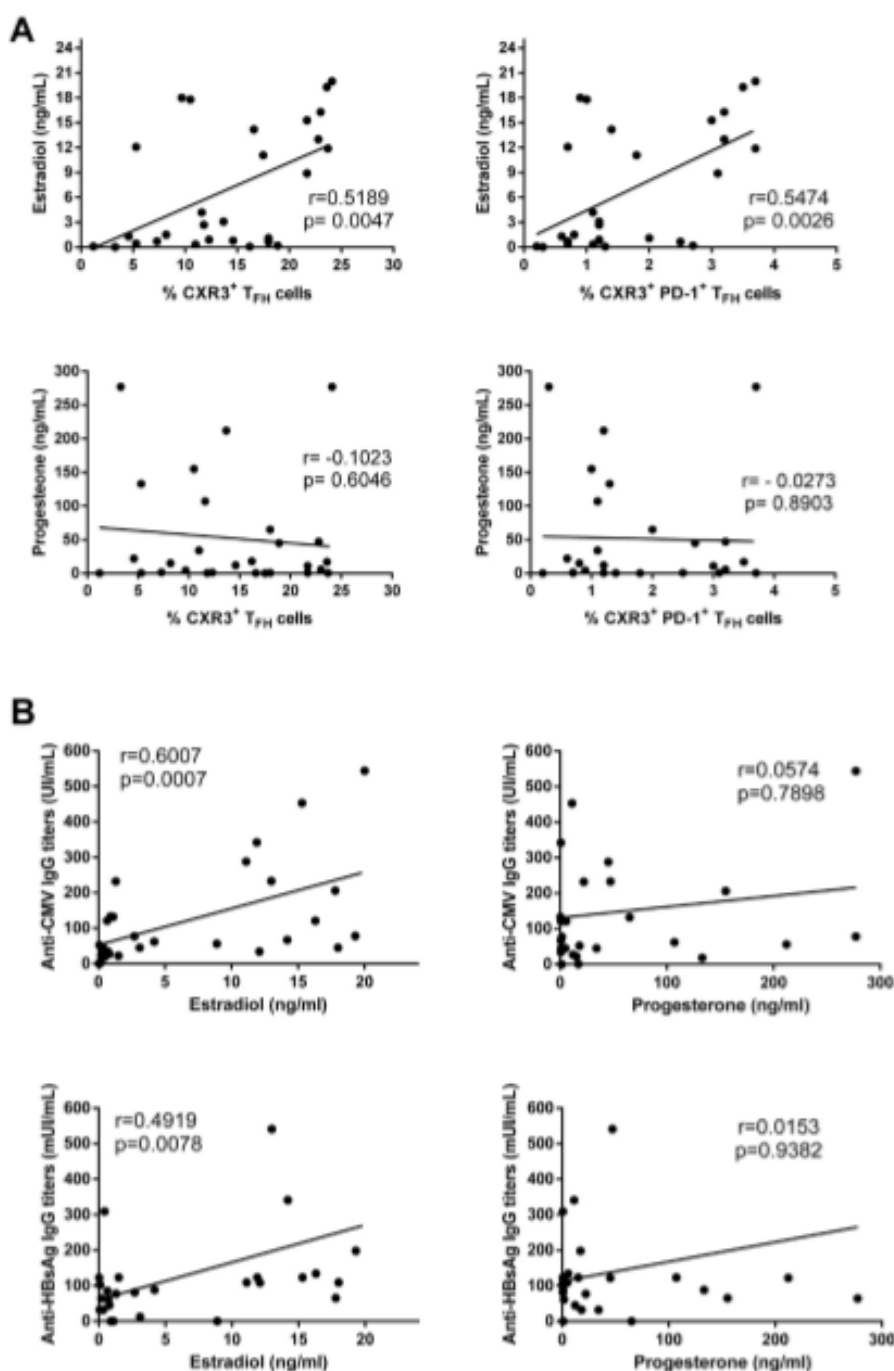


Fig. 5. The relationship between pregnancy hormone levels with the percentage of CXCR3⁺ T_{FH} cells and PD-1 positive subset, was evaluated in relation to estrogen and progesterone levels in plasma of pregnant and non-pregnant women, determined by ELISA. In (B), the anti-CMV and anti-HBs IgG levels were evaluated in terms of estrogen and progesterone plasmatic levels. Pearson's correlation was applied and the p values are indicated in the figure.

Recently, a circulating CD4⁺ T cell subset functionally similar to T_{FH} cells, but negative for Bcl-6 protein, has been identified (Wang et al., 2016). In our study, a higher frequency of T_{FH}-like cells (CD45RO⁺ CXCR5⁺), with or without expression of PD-1 and ICOS was observed

in the peripheral blood of PW as compared to nPW. Although the role of PD-1 expression on T cells in humoral immunity is unclear (Jin et al., 2011; Cubas et al., 2013), PD-1⁺ T_{FH} cells are considered as better B cell helpers, as compared with PD-1 negative subset (Locci et al., 2013;

Nakayamada and Tanaka, 2016). In line with this observation, the plasma levels of anti-HBs and anti-CMV IgG in women was directly associated with the proportion of PD-1⁺ T_{H1} cells, although these represent a minor T_{H1} cell subset.

Another functional marker for T_{H1} cells is ICOS, but some studies have found a very low frequency of circulating ICOS⁺ T_{H1} cells (Sallusto et al., 1998; Ma et al., 2009; Locci et al., 2013; Nakayamada and Tanaka, 2006). In our study, the percentage of peripheral PD-1⁺ ICOS⁺ T_{H1} cells is significantly higher in PW than nPW. Our findings, however, suggest that pregnancy favors an expansion of circulating functional T_{H1} cells.

Despite the importance of cognitive interactions between T_{H1} cells and B cells, efficient antibody production is also dependent on cytokine production, particularly IL-21 (Morita et al., 2011; Bentebibel et al., 2013). In this study, in unstimulated cells the frequency of CXCR3⁺ T_{H1} cells was able to produce not only IL-21, but also IL-6 and IL-10, being significantly higher in PW. Whether it is due to *in vivo* activation remains unclear. During pregnancy, several vaccines, including influenza, tetanus, and hepatitis B are indicated for seronegative mothers. The hepatitis B immunization is safe and protects the mother and child from viral infections through neutralizing anti-HBs IgG (Levy and Koren, 1991). Here, the anti-HBs IgG levels were not only significantly higher in PW, as they titers were directly correlated with the proportion of IL-21-secreting CXCR3⁺ T_{H1} cells. Additionally, we also observed the same relationship between anti-CMV IgG levels and IL-6- or IL-21-producing T_{H1} cells, regardless of the expression of PD-1. These findings are in agreement with other studies that show the importance of T_{H1} cell-derived IL-21 and IL-6 cytokines in promoting antibody-producing plasma cells (Bentebibel et al., 2013; Schmitt and Ueno, 2013). For example, Bentebibel et al. (2013) demonstrated that CXCR3⁺ T_{H1} cell subset was able to induce *in vivo* and *in vitro* elevated production of anti-influenza IgG. Furthermore, when stimulated with the influenza antigen hemagglutinin, this T_{H1} subset produced IL-10, IL-21 and IFN- γ (Bentebibel et al., 2013). However, these authors did not provide any information regarding the correlation between cytokine production and plasma levels of anti-influenza IgG.

Although the percentage of circulating T_{H1} cells that are able to produce IFN- γ , IL-17, or IL-4 was not elevated in PW, some studies have reported the ability of these cells to help B cells (Schmitt and Bentebibel, 2014; Geginat et al., 2014; Geginat et al., 2014). These cells peripheral T_{H1} cells may also be identified by the differential expression of CXCR3 and CCR6. While IFN- γ -secreting T_{H1}-like cells are CXCR3⁺CCR6⁻, the CXCR3⁻CCR6⁺ cell subset produces IL-17, and those CXCR3⁻CCR6⁻ are IL-4 producers (Bentebibel et al., 2013; Geginat et al., 2014). In this study, among these cytokines, the CXCR3⁺ T_{H1} cell subset produced mainly IFN- γ and IL-17. In the peripheral blood, this may present a hybrid IFN- γ -producing Th17 phenotype, as described by some authors (Su et al., 2015; Sage and Sharpe, 2016). Concerning IL-4-secreting CXCR3⁺ T_{H1}, its frequency was low. To better identify each circulating T_{H1} cell subset, we will include the CCR6 marker for future analysis in pregnant women.

The frequency of non-follicular CXCR3⁺ CXCR5⁻ CD4⁺ T cells and, IFN- γ production was lower in PW compared to nPW (data not shown). These cells represent classical Th1 cells, and their lower frequency in PW might be associated with the down-regulation of cellular immune response. This event has been linked to pregnancy-related hormones, such as progesterone and estrogen that favor IL-10-producing regulatory CD4⁺ T cells (Kanda and Tamaki, et al., 1999; Lao et al., 2011; Kwak-Kim et al., 2014). Interestingly, the percentage of circulating IL-10⁺ CXCR3⁺ T_{H1} cells was also elevated in PW in the present study. It is known that estrogen elevates IL-10 production of human regulatory T cells (Tregs) (Hughes et al., 2013), and CXCR5⁺ Treg cells, named T_{H1} cells, are found in follicles and appear to control GC response (Ortona et al., 2014; Zhu et al., 2016). We plan to analyze the expression of classical molecular Tregs markers, such as Foxp3 and CD25, among those IL-10⁺ T_{H1} cells identified here.

In terms of pregnancy-related hormones, the levels of estrogen, but not progesterone, positively correlated with both whole CXCR3⁺ T_{H1} cells, and IgG titers for HBsAg and CMV. These findings are in agreements with studies that have shown the ability of estrogen to favor humoral immunity (Grimaldi et al., 2002; Bentebibel et al., 2016). Although B cells have been described as the classical immune target cells of estrogen (Grimaldi et al., 2002; Bentebibel et al., 2016), our data suggests that estrogen may influence antibody production via an increased differentiation and/or expansion of circulating T_{H1} cells. Most significantly, the *in vitro* effects of estrogen on survival and function of human T_{H1} cells will be investigated by our group.

Although the precise mechanisms need to be fully elucidated, estrogen has been proposed as playing an important role in autoimmunity (Mackera-Oberti et al., 2017). An increase in circulating PD-1⁺ ICOS⁺ T_{H1} cells has emerged as a common feature in a broad range of autoimmune diseases mediated by antibodies, such as lupus and neuromyelitis optica (Bossaller et al., 2006; Procaccini et al., 2015; Zhang et al., 2015; Fan et al., 2016). There is a possibility that deregulation in either effector T_{H1} or T_{H2} cells in an estrogen-dependent manner, is associated with the pathogenesis of these autoimmune diseases. In summary, our data suggest an effect of pregnancy in up-regulating the expansion of CD4⁺ T cell subsets specialized in helping B cells to produce neutralizing antibodies. This phenomenon could be related, at least partially, to pregnancy-related estrogen levels. Although this study must be conducted in a larger number of subjects, our findings could help to explain why pregnancy favors humoral immunity.

Contribution

C.A.M.B. and S.G. designed and carried out the research and wrote the paper; C.M., T.M.K., J.R.C., P.M., J.H., L.M.F.L. performed the experiments and analyzed the data; N.C. and T.C. collected the samples and contributed to analysis of the data; S.L. and V.G. carried out the clinical analysis of patients.

Conflict of interest statement

All authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa Carlos Chagas Filho (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2017.04.007>.

References

- Bentebibel, S.E., Lopez, S., Obermayer, G., Schmitt, N., Mueller, C., Harrod, C., et al., 2013. Induction of ICOS⁺CXCR3⁺CXCR5⁺ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci. Transl. Med.* 5 (176), 176ra32.
- Bentebibel, S.E., Khurana, S., Schmitt, N., Kurup, P., Mueller, C., Obermayer, G., et al., 2016. ICOS⁺ PD-1⁺ CXCR3⁺ T follicular helper cells contribute to the generation of high-avidity antibodies following influenza vaccination. *Sci. Rep.* 6, 26494.
- Bossaller, L., Burger, J., Draeger, R., Grimbacher, B., Knuth, R., Plebani, A., et al., 2006. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5⁺ CD4⁺ germinal center Th cells. *J. Immunol.* 177 (7), 4927–4932.
- Chevalier, N., Jarrossay, D., Ho, E., Avery, D.T., Ma, G.S., Yu, D., et al., 2011. CXCR5 expressing human central memory CD4⁺ cells and their relevance for humoral immune responses. *J. Immunol.* 186 (16), 5556–5568.
- Croft, S., 2011. Follicular helper CD4⁺ cells (TFH). *Ann. Rev. Immunol.* 29, 621–663.
- Cubas, R.A., Mudd, J.C., Sawoy, A.L., Perrault, M., van Grevenynghe, J., Metcalf, T., et al., 2013. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV

- infection. *Nat. Med.* 19 (4), 494–499.
- Fan, X., Jiang, Y., Han, J., Liu, J., Wei, Y., Jiang, X., et al., 2016. Circulating memory T follicular helper cells in patients with neuromyelitis optica/neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mediators Inflamm.* 2016, 3678152.
- Fu, Y., Li, L., Liu, X., Ma, C., Zhang, J., Jiao, Y., et al., 2011. Estrogen promotes B cell activation in vitro through down-regulating CD80 molecule expression. *Gynecol. Endocrinol.* 27 (8), 593–596.
- Gegnat, J., Paroni, M., Maglie, S., Allen, J.S., Kastirz, I., Grusarin, P., et al., 2014. Plasticity of human CD4⁺ T cell subsets. *Front. Immunol.* 5, 630.
- Gerosus, N., Schmitt, N., Richez, C., Ueno, H., Bianco, P., 2016. T follicular helper cells, interleukin-21 and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*(August (7)) pii: kcw297.
- Grimaldi, C.M., Cleary, J., Daggas, A.S., Mousai, D., Diamond, B., 2002. Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J. Clin. Invest.* 109 (12), 1625–1633.
- Helkinnen, J., Mötönen, M., Alanen, A., Lamsola, O., 2004. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin. Exp. Immunol.* 136 (2), 373–378.
- Hel, Z., Stringer, E., Mastock, J., 2010. Sex steroid hormones, hormonal contraception, and the immunobiology of human immunodeficiency virus-1 infection. *Endocr. Rev.* 31 (1), 79–97.
- Hughes, G.C., Clark, E.A., Wang, A.H., 2013. The intracellular progesterone receptor regulates CD4⁺ T cells and T cell-dependent antibody responses. *J. Leukoc. Biol.* 93 (3), 369–375.
- Jin, H.T., Ahmed, R., Okazaki, T., 2011. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 350, 17–37.
- Johnston, R.J., Peholek, A.C., D'Otto, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., et al., 2009. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 325 (5943), 1006–1010.
- Kanda, N., Tamaki, K., 1999. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103, 282–288.
- Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikiida, M., Mori, Y., Kurosaki, T., et al., 2011. Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity* 34 (6), 961–972.
- Kwak-Kim, J., Ban, S., Lee, S.K., Kim, J.W., Gilman-Sachs, A., 2014. Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune efference, and stress. *Am. J. Reprod. Immunol.* 72 (2), 129–140.
- Levy, M., Koren, G., 1991. Hepatitis B vaccine in pregnancy: maternal and fetal safety. *Am. J. Perinatol.* 8 (3), 227–232.
- Locci, M., Havenar-Daughton, C., Landais, E., Wu, J., Kroenke, M.A., Arlehamn, C.L., et al., 2013. Human circulating PD1⁺ CXCR3⁺ CXCR5⁺ memory TFH cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity* 39, 758–769.
- Luo, C.Y., Wang, L., Sun, C., Li, D.J., 2011. Estrogen enhances the functions of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. *Cell Mol. Immunol.* 8 (1), 50–58.
- Ma, C.S., Desnick, R.K., 2014. Human T follicular helper (T_{fh}) cells and disease. *Immunol. Cell Biol.* 92 (1), 64–71.
- Ma, C.S., Suryani, S., Avery, D.T., Chan, A., Nanan, B., Santner-Nanan, B., et al., 2009. Early commitment of naive human CD4⁺ T cells to the T follicular helper (T_{fh}) cell lineage is induced by IL-12. *Immunol. Cell Biol.* 87, 590–600.
- Mackern-Oberst, J.P., Jara, E.L., Biedel, C.A., Kalergis, A.M., 2017. Hormonal modulation of dendritic cells differentiation, maturation and function: implications for the initiation and progress of systemic autoimmunity. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 65 (2), 123–136.
- Morita, R., Schmitt, N., Bestebibel, S.E., Ranganathan, R., Boundery, L., Zurawski, G., et al., 2011. Human blood CXCR5⁺ CD4⁺ T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34 (1), 106–121.
- Nakayama, S., Tanaka, Y., 2016. T follicular helper (T_{fh}) cells in autoimmune diseases. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 39 (1), 1–7.
- Nariva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.G., Tanaka, S., Mankevitich, T.D., et al., 2009. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325 (5943), 1001–1005.
- Ortosa, E., Pierdominici, M., Bernstein, L., 2014. Autoantibodies to estrogen receptors and their involvement in autoimmune diseases and cancer. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 144 (Pt B), 260–267.
- Pallikkath, S., Parmigiani, A., Pshwa, S., 2012. The role of interleukin-21 in HIV infection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23 (4–5), 173–180.
- Procaccini, C., Pucino, V., Mantzoros, C.S., Matarese, G., 2015. Leptin in autoimmune diseases. *Metabolism* 64 (1), 92–104.
- Qi, H., Chen, X., Chu, C., Liu, D., Ma, W., Wang, Y., et al., 2014. T_{fh} cell differentiation and their function in promoting B-cell responses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 841, 153–180.
- Sage, P.T., Sharpe, A.H., 2016. T follicular regulatory cells. *Immunol. Rev.* 271 (1), 246–259.
- Saito, S., Nakanishi, A., Shima, T., Ito, M., 2010. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 63 (6), 601–610.
- Schmitt, N., Ueno, H., 2013. Blood T_{fh} cells come with cohesin. *Immunity* 39 (4), 629–630.
- Schmitt, N., Bestebibel, S.E., Ueno, H., 2014. Phenotype and functions of memory T_{fh} cells in human blood. *Trends Immunol.* 35 (9), 436–442.
- Shulman, Z., Gilha, A.D., Targ, S., Janovic, M., Pasqual, G., Nusenzweig, M.C., et al., 2013. T follicular helper cell dynamics in germinal centers. *Science* 341 (6146), 673–677.
- Song, D., Shi, Y., 2014. Immune system modifications and fetal-maternal immune tolerance. *Chin. Med. J.* 127 (17), 3171–3180.
- Su, Z., Lu, H., Jiang, H., Zhu, H., Li, Z., Zhang, F., et al., 2015. IFN- γ producing Th17 cells bias by HMGB1-T-bet/RUNX3 axis might contribute to progression of coronary artery atherosclerosis. *Atherosclerosis* 243 (2), 421–428.
- Tangye, S.G., Ma, C.S., Brink, R., Desnick, R.K., 2013. The good, the bad and the ugly – T_{fh} cells in human health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 13 (6), 412–426.
- Tsai, L.M., Yu, D., 2014. Follicular helper T-cell memory: establishing new frontiers during antibody response. *Immunol. Cell Biol.* 92 (1), 57–63.
- Wang, S., Zhu, X., Xu, Y., Zhang, D., Li, Y., Tao, Y., et al., 2016. Programmed cell death-1 (PD-1) and T-cell immunoglobulin mucin-3 (Tim-3) regulate CD4⁺ T cells to induce Type 2 helper T cell (Th2) bias at the maternal-fetal interface. *Hum. Reprod.* 31 (4), 700–711.
- Xiong, Y., Yuan, Z., He, L., 2013. Effects of estrogen on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell in peripheral blood during pregnancy. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 6, 748–752.
- Yusuf, I., Kageyama, R., Monticelli, L., Johnston, R.J., D'Otto, D., Hansen, K., et al., 2010. Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *J. Immunol.* 185 (1), 190–202.
- Zhang, X., Linwall, E., Gauthier, C., Lyman, J., Spencer, N., Alarakhia, A., et al., 2015. Circulating CXCR5⁺CD4⁺ helper T cells in systemic lupus erythematosus patients share phenotypic properties with germinal center follicular helper T cells and promote antibody production. *Lupus* 24 (9), 909–917.
- Zhu, Y., Zou, L., Liu, Y.C., 2016. T follicular helper cells, T follicular regulatory cells and autoimmunity. *Int. Immunol.* 28 (4), 173–179.

3.2 Artigo 2 – Pregnancy favors circulating IL-21-secreting TFH –like cell recovery in ARV-treated HIV-1-infected women (Artigo publicado)

Received: 25 July 2019 | Revised: 15 October 2019 | Accepted: 22 October 2019

DOI: 10.1111/aji.13204

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

Pregnancy favors circulating IL-21-secreting T_{FH}-like cell recovery in ARV-treated HIV-1-infected women

Taissa M. Kasahara^{1,2} | Clarice Monteiro^{1,2} | Joana Hygino¹ | Marcos O. S. D. Cafasso¹ | Hugo A. A. Oyamada¹ | Regis M. Andrade³ | Orlando Ferreira⁴ | Simone Leite⁵ | Vander G. Silva⁵ | Sudhir Gupta⁶ | Cleonice A. M. Bento^{1,2} 

¹Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

²Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

³Department of General Medicine Department, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁵Ferando Figueiras Institute/IOC, Rio de Janeiro, Brazil

⁶University of California, Irvine, CA, USA

Correspondence

Cleonice A. M. Bento, Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Frei Caneca 94, 20.261-040 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
Email: cbento@globo.com

Funding information

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa Carlos Chagas Filho (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Abstract

Problem: Pregnancy appears to favor maternal antibody production. In contrast, by damaging follicular helper T cells (T_{FH}), HIV-1 infection compromises protective humoral immune response. Therefore, we aimed to investigate the frequency of different T_{FH}-like cells in HIV-infected pregnant women (PW) before and after antiretroviral (ARV) therapy.

Method of study: Peripheral blood mononuclear cells, CD4⁺ T and B cells, were obtained from asymptomatic HIV-1-infected non-PW and PW just before and after ARV therapy. In some experiments, healthy HIV-1-negative PW were also tested. The frequency of different T_{FH}-like cell subsets was determined by flow cytometry. The plasma titers of IgG anti-tetanus toxoid (TT), anti-HBsAg, and anti-gp41 were determined by ELISA. The in vitro production of total IgG, IL-21, and hormones (estrogen and progesterone) was quantified also by ELISA.

Results: Our results demonstrate that antiretroviral (ARV) therapy was more efficient in elevating the percentage of circulating IL-21-secreting T_{FH} cells in HIV-1-infected pregnant women (PW) than in non-pregnant patients (nPW). Moreover, in co-culture systems, CD4⁺ T cells from ART-treated PW were more efficient in assisting B cells to produce IgG production. The in vivo anti-HBsAg IgG titers after ARV therapy were also significantly higher in PW, and their levels were directly associated with both IL-21⁺T_{FH} frequency and plasma concentration of estrogen.

Conclusion: In summary, our results suggest that pregnancy favors the recovery of T_{FH}-like cells after ARV therapy in HIV-1-infected women, which could help these mothers to protect their newborns from infectious diseases by transferring IgG across the placenta.

KEYWORDS

antiretroviral therapy, estrogen, HIV-1, IgG, TFH cells

1 | INTRODUCTION

Follicular helper T cells (T_{FH}) are an important subset of CD4⁺ T cells originally found in the germinal center of secondary lymphoid organs

specialized for to assist B cells.¹⁻³ In the germinal center (GC), these cells are characterized by a high expression of the transcription factor B-cell lymphoma-6 (Bcl-6), chemokine receptor CXCR5, programmed cell death receptor-1 (PD-1), inducible T-cell co-stimulator

Kasahara and Monteiro contributed equally to this work.

(ICOS), CD40 ligand (CD40L/CD154), and the production of IL-21.⁴ The interaction between these surface molecules expressed on T_{FH} cells with their ligands on B cells, together with IL-21 release, provides signals for GC formation by inducing B-cell proliferation, survival, and the differentiation of B lymphocytes into heavy chain-switched and affinity-matured antibody-producing plasma cells.⁷⁻⁹ Additionally, long-lived memory B cells are also generated from GC reactions.⁷⁻⁹

After supporting GC development, T_{FH} cells can leave secondary follicles and join the pool of circulating memory T cells.^{10,12} These circulating T_{FH} (cT_{FH}) cells, which are Bcl-6-negative, express CD45RO and CXCR5,¹¹ and they can assist B cells, at least partially, by secreting large amounts of IL-21 and IL-10.^{10,12} Although most cT_{FH} cells do not express ICOS or PD-1, a very small number of ICOS⁺PD-1⁺ T_{FH} cells (<1%) can be found,¹³ and this population is quite efficient in inducing antibody production by memory B cells *in vitro*.¹⁴⁻¹⁶

Taking into consideration the protective role played by neutralizing antibodies in response to infection or immunization, studies of cT_{FH} -cell behavior are essential, mainly in the context of HIV-1 infection in which these cells present the main site for viral reservoir and replication.^{17,18} In untreated HIV-1-infected patients, an increase in T_{FH} cells in the lymph nodes has been associated with both viraemia and hypergammaglobulinaemia.^{18,19} This virus-induced dysfunctional T_{FH} -cell expansion not only favors viral persistence and replication but also compromises the ability of patients to produce specific neutralizing antibodies in response to co-infections and vaccines.²⁰⁻²² By contrast, in a small fraction of patients who spontaneously controlled HIV-1 replication, the maintenance of a high frequency of functional cT_{FH} cells able to induce broadly neutralizing antibodies (bNAbs) against different HIV-1 strains is critical to avoid disease progression.²³ This phenomenon has been linked to a large number of mutations in variable IgG regions due to the process of somatic hypermutation. In agreement with this finding, passive infusions of these IgG antibodies reduced plasma viral loads in both human and animal models.^{22,24} Furthermore, as expected, the maintenance of functional cT_{FH} cells is also associated with a better response to various vaccines in HIV-1-infected patients.^{21,25} Since damage in the T_{FH} -cell compartment is an event observed during the acute phase of HIV-1 infection, early antiretroviral (ARV) therapy enables the preservation of T_{FH} function.^{16,26} As pregnancy favors maternal humoral immunity,²⁷ the ARV effects on maternal T_{FH} may help to reduce the risk of mother-to-child viral transmission.

It is known that successful pregnancy is accompanied by immune modulation that attenuates the production of embryotoxic cytokines by paternal antigen-specific Th1 and Th17 cells.²⁸ On the other hand, it appears that hormonal changes during pregnancy favor antibody production by activated/memory B cells.^{29,30} This maternal immunomodulation not only avoids maternal fetus rejection but also enhances antibody production by pregnant women following vaccination, which promotes passive immunity via IgG transfer through the placenta and breastfeeding.³¹ In this context, a recent study published by our group demonstrated that pregnancy favors an expansion of functional cT_{FH} cells.³² This phenomenon was directly associated with estrogen levels

and anti-HBs IgG titers.³² Nevertheless, the impact of HIV-1 infection on the homeostasis of cT_{FH} cells in pregnant women (PW) has not been evaluated. Therefore, the objective of the present study was to investigate the frequency of different T_{FH} -like cells in HIV-infected PW prior to and following ARV therapy.

2 | METHODS

2.1 | Patients and control subjects

For this study, blood samples were obtained from 60 asymptomatic HIV-1-infected (HIV-1.pos) non-pregnant (nPW, n = 30) and pregnant (PW, n = 30) women just before (during first trimester of pregnancy) and approximately 5.4 months after (third trimester of pregnancy) antiretroviral (ARV) therapy. As control, blood samples from 30 healthy HIV-1-negative pregnant women (HIV-1.neg PW) in the last trimester of pregnancy were also obtained. The women were recruited from Fernandes Figueiras Institute (IFF/FIOCRUZ-RJ), Gaffrée and Guinle Hospital (HUGG/UNIRIO), and Pedro Ernesto Hospital (UERJ).

Clinical data from HIV-1-infected women were obtained from medical records, including the antiretroviral scheme, CD4⁺ and CD8⁺ T-cell counts and plasma viral load (PVL). Women who were taking immunosuppressive drugs or who had autoimmune diseases, cancer, diabetes, allergic manifestation, and clinical or serological signs of acute or chronic diseases, such as influenza, HCV, and HBV, were excluded. We evaluated the impact of ARV therapy on anti-hepatitis B IgG titers. All HIV-1-infected patients (PW = 10 and nPW = 10) who were not previously immunized against HBV infection (anti-HBsAg IgG <10 UI/mL, and negative for IgG directed against HBcAg and HBe antigens), received a three-dose hepatitis B vaccine schedule. The evaluation of anti-HBsAg IgG was performed just before and approximately 6 months after the first dose. Moreover, patients with over 10 years since their last tetanus vaccination also received the booster dose of tetanus toxoid (TT) just before receiving ARV therapy. Anti-TT IgG titers were evaluated prior to and 6 months after the HIV-1 treatment.

This study was approved by the Ethics Committee for Research on Human Subjects of the HUGG (UNIRIO), and written informed consent was obtained from all pregnant women.

2.2 | Flow cytometry analysis

Mouse anti-human monoclonal antibodies (mAbs) to CD3-PE, CD4-FITC/PECy7, CXCR5-PECy7/PE, PD1-APC, IL-21-PE/APC, IFN- γ -PE/APC, IL-10-FITC/APC, IL-6-PE, and all isotype control antibodies were purchased from BD Biosciences. Whole peripheral blood of women from all different groups was stimulated in 24-well flat-bottom plates with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 20 ng/mL; Sigma-Aldrich) plus ionomycin (IO, 600 ng/mL; Sigma-Aldrich) at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator

for 4 hours. For cytokine measurement optimization, brefeldin A (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma-Aldrich) was also added. Briefly, whole blood cells were incubated with various combinations of mAbs for surface markers, for 30 minutes at room temperature in the dark, according to manufacturer's instructions. The cells were washed with PBS + 2%FBS, and then, the whole blood cells were lysed with Fix/Lyse solution (eBioscience) for 10 minutes at room temperature before cell permeabilization, that was performed by incubating cells with Cytofix/Cytoperm solution (BD Pharmingen) at 4°C for 20 minutes. After washing, the mAbs for intracellular staining (IL-21-PE/APC, IFN- γ -PE/APC, IL-10-FITC/APC, IL-6-PE) were added in different combinations and incubated for 30 minutes at 4°C. The cells were acquired on Accuri C6 (Accuri™) or Attune NxT flow cytometers (Thermo Fisher Corporation) and analyzed using Cflow (Accuri™). Isotype control antibodies and single-stained samples were used to periodically check the settings and gates on the flow cytometer. After the acquisition of 100 000–200 000 events, lymphocytes were gated based on forward and side scatter properties after the exclusion of dead cells, by using propidium iodide, and doublets. Additionally, gated cells were negative for CD14 marker.

2.3 | IgG quantification in CD4 T/B-cell co-cultures

To purify CD4⁺ T and B cells, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from Ficoll-Hypaque gradients and then submitted to negative selection using magnetic columns according to manufacturer's instructions (EasySep™, Stemcell Technologies). Briefly, 50 μL of the isolation cocktail was added to a PBMC suspension (1×10^7 cells/1 mL) in a 14-mL tube. After rapidly mixing, the suspension was incubated for 10 minutes at room temperature. Then, already homogenized RapidSphere suspensions were added to the cell suspension at 100 μL for CD4⁺ T cells and 150 μL for CD19⁺ cells (B cells). After rapidly mixing, the cell suspension was incubated at room temperature for 5 minutes. Finally, 4 mL of HBSS solution was added to the cell suspension and, after pipetting, the tube was then placed on the magnet for 5 minutes and supernatants were recovered. The purity of CD4⁺ T cells and B cells was >98%, as measured by flow cytometry (data not shown). To evaluate the in vitro production of IgG, CD4⁺ T-cell ($1 \times 10^4/500 \mu\text{L}$) and B-cell ($1 \times 10^4/500 \mu\text{L}$) co-cultures were stimulated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Staphylococcal enterotoxin B (SEB) from *Staphylococcus aureus* (Sigma-Aldrich Co). The cells were maintained at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. After 6 days, the supernatants were collected and the concentration of IgG determined by human IgG ELISA kit (ab195215). Briefly, 100 μL of supernatants were added to each well containing anti-IgG primary antibody. Then, the cells were incubated for 1 hour, washed and treated with 100 μL of the biotinylated secondary IgG antibody for anti-IgG. Finally, 100 μL of the streptavidin-horseradish peroxidase conjugate enzyme was added to the wells and then the TMB substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine). Plates were read at 450 nm in ELISA reader (DyNex Technologies).

The results were interpolated from standard curve construct by using IgG ranging from 0.23 to 15 ng/mL.

2.4 | Quantification of secreted IL-21

The quantification of IL-21 in supernatants of SEB-activated CD4⁺ T/B-cell co-cultures was performed using OptEIA ELISA kits (BD Pharmingen), according to manufacturer's instructions. Briefly, each assay was performed using pairs of mAbs directed to human IL-21. The reaction was revealed with streptavidin-horseradish peroxidase, using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as substrate. Recombinant human cytokines, at concentrations ranging from 3.5 to 500 pg/mL, were used to construct standard curves.

2.5 | Quantification of anti-HBsAg, anti-TT, and anti-gp41 immunoglobulins

The anti-hepatitis B (HBsAg) and tetanus toxoid (TT) titers were determined through ELISA kits (BioClin for anti-HBV IgG and Creative Diagnostics for anti-TT IgG), according to manufacturers' instructions. Reagents supplied by the manufacturer were used to construct the standard curve from 0–500 mIU/mL to anti-HBsAg IgG and 0–5 IU/mL to anti-TT IgG. The anti-HIV-1 titers were determined by ELISA. Briefly, serum samples were added to the wells previously coated with gp41 and incubated for 1 hour at 37°C. After washing, bound antibodies were detected by goat anti-human IgG's peroxidase conjugate (120 minutes at 37°C), followed by substrate (TMB) incubation for 25 minutes at room temperature. The OD was obtained by reading the samples at 450 nm.

2.6 | Hormone determination

Peripheral progesterone and estrogen levels were measured using Abcam's ELISA kit, according to manufacturers' instructions. Reagents supplied by the manufacturer were used to construct the standard curve from 0 to 1000 pg/mL for estrogen and 0 to 40 ng/mL for progesterone.

2.7 | Statistical analysis

The statistical analysis was performed using Prism 5.0 software (GraphPad Software). Comparisons between immune assays in the cell cultures from the two different groups (patients and control) were performed with two-way ANOVA. Within each experimental group, the variables were analyzed using Wilcoxon test and Student's t test. Correlations between variables were ascertained using Pearson's correlation. Significance in all experiments was $P < .05$.

3 | RESULTS

3.1 | The impact of pregnancy on T_{FH}-like cell subset recovery in ARV-treated HIV-1-infected women

To evaluate the impact of pregnancy on cT_{FH}-like subset recovery in HIV-1-infected women, peripheral blood samples were drawn from 60 asymptomatic pregnant (PW) and non-pregnant (nPW) patients just before (first trimester in PW) and after (at the end of third trimester of pregnancy) ARV treatment (Table 1). As expected, ARV treatment significantly reduced plasma viral load (PVL) and elevated CD4⁺ T-cell counts in both HIV-1-positive groups. Notably, the PVL at the end was significantly lower in PW group (Table 1). Concerning ARV therapy, the great majority of patients were receiving either zidovudine (AZT)/lamivudine (3TC)/lopinavir (LPV)/ritonavir (RTV) or tenofovir (TDF)/lamivudine (3TC)/efavirenz schemes. No neonate was born infected by HIV-1.

Taking into consideration the CXCR5 expression (Figure 1A), we observed that ARV significantly diminished the percentage of total cT_{FH}-like cells, as well as PD-1⁺ subset, only in HIV-1-infected PW

TABLE 1 Characteristics of the HIV-1-infected pregnant and non-pregnant women^a

	HIV-1pos.nPW	HIV-1pos.PW
No. of subjects	30	30
Mean age [y (SD)]	27.6 (4.1)	27.1 (6.1)
Median T CD4 ⁺ cell count [cells/ μ L (SD)] ^b		
At baseline	401 (167)	556 (271)
End point	515 (311) [*]	651 (310) [*]
Median T CD8 ⁺ cell count [cells/ μ L (SD)] ^b		
At baseline	708 (291.1)	778 (310.3)
End point	617 (554)	591 (447)
Median viral load [copies RNA/mL (SD)] ^c		
At baseline	24 500 (26 433)	16 805 (47 071)
End point	4200 (5409) [*]	105 (3701) [*]
Time of ARV therapy [d (SD)] ^d	189.1 (9.1)	151.4 (27.1)
Schedule ARV ^e		
AZT/3TC/RTV/LPV	16	16
TDF/3TC/EFZ	8	7
ATV/RTV/TDF/3TC	2	3
AZT/3TC/ATV/RTV	4	4

^aThe median count of CD4⁺ and CD8⁺ T cells before (at baseline) and after (end point) antiretroviral (ARV) therapy.

^bMedian plasma viral load before (at baseline) and after (end point) antiretroviral (ARV) therapy [limit of detection: 40 copies/mL].

^cTime before (at baseline) and after (end point) antiretroviral (ARV) therapy.

^dTime of ARV therapy.

^eARV schedule: AZT (zidovudine), 3TC (lamivudine), RTV (ritonavir), LPV (lopinavir), TDF (tenofovir), EFZ (efavirenz), and ATV (atazanavir).

^{*}P < .05.

(Figure 1B). Regarding the cytokine profile, no significant difference was observed between the two HIV-1-infected groups before ARV therapy (Figure 1C). HIV-1 treatment reduced the proportion of IL-6-secreting T_{FH} cells, but elevated the frequency of IFN- γ ⁺ T_{FH}-cell subset in those patients (Figure 1C). More interestingly, in terms of IL-21, the T_{FH}-cell signature cytokine,³ ARV therapy was more efficient in recovering the IL-21⁺ CXCR5⁺CD4⁺T-cell subset in PW (Figure 1C). Finally, the percentage of IL-10⁺ cell subsets was also higher in PW after ARV therapy (Figure 1C). T_{FH} cells assist B cells to produce antibodies with heavy chain-switched and affinity-matured antibodies.^{7,9} In the present study, the levels of both IgG production (Figure 2A) and IL-21 release (Figure 2B) were significantly higher in SEB-activated CD4⁺ T/B-cell co-cultures from ARV-treated HIV-1-infected PW than in non-PW. Neither non-stimulated CD4⁺ T cells nor B cells, alone or in combination, produced IL-21 (data not shown).

3.2 | The production of anti-HIV and anti-vaccine antibodies in HIV-1-infected PW and nPW under ARV therapy

It is known that functional T_{FH} cells, due to providing B cell help, are important for the production of antibodies protective against pathogens and vaccine antigens.¹⁵ Here, although anti-gp41 antibody levels were the same in the plasma of HIV-1-infected PW and nPW before and after ARV therapy (Figure 3A), the in vivo anti-HBsAg IgG titers following HBV immunization was significantly higher in ARV-treated PW (Figure 3B). Similar results were observed after the booster dose of tetanus vaccine (Figure 3B). Anti-HBsAg IgG titers were directly correlated with both IL-21⁺T_{FH}-like cell frequency and plasma estrogen levels. Similar correlations were observed with regard to the anti-tetanus toxoid (TT) IgG titers and IL-21⁺T_{FH} cells (data not shown). No relationship was observed between anti-gp41 antibodies and different T_{FH}-like cells and hormone levels (estrogen and progesterone).

3.3 | HIV-1 therapy during pregnancy did not normalize the proportion of different T_{FH}-like cell subsets

Our findings suggest that ARV showed greater ability to recover IL-21-secreting T_{FH}-like cells in HIV-1-infected PW. However, taking into account the representative dot-plots shown in Figure 4A, HIV-1 treatment was not able to normalize the mean percentage of different cT_{FH}-like cell subsets observed in healthy HIV-1-negative PW (Figure 4). The percentage of total T_{FH}-like cells, and the PD-1⁺ subset, as well as those positive for IFN- γ , IL-10, and IL-21, were significantly lower in samples from HIV-1-infected patients (Figure 4B,C). By contrast, no difference was observed for IL-6⁺ T_{FH}-like cell subsets between the two experimental groups (Figure 4C). In terms of circulating antibodies, anti-HBsAg IgG

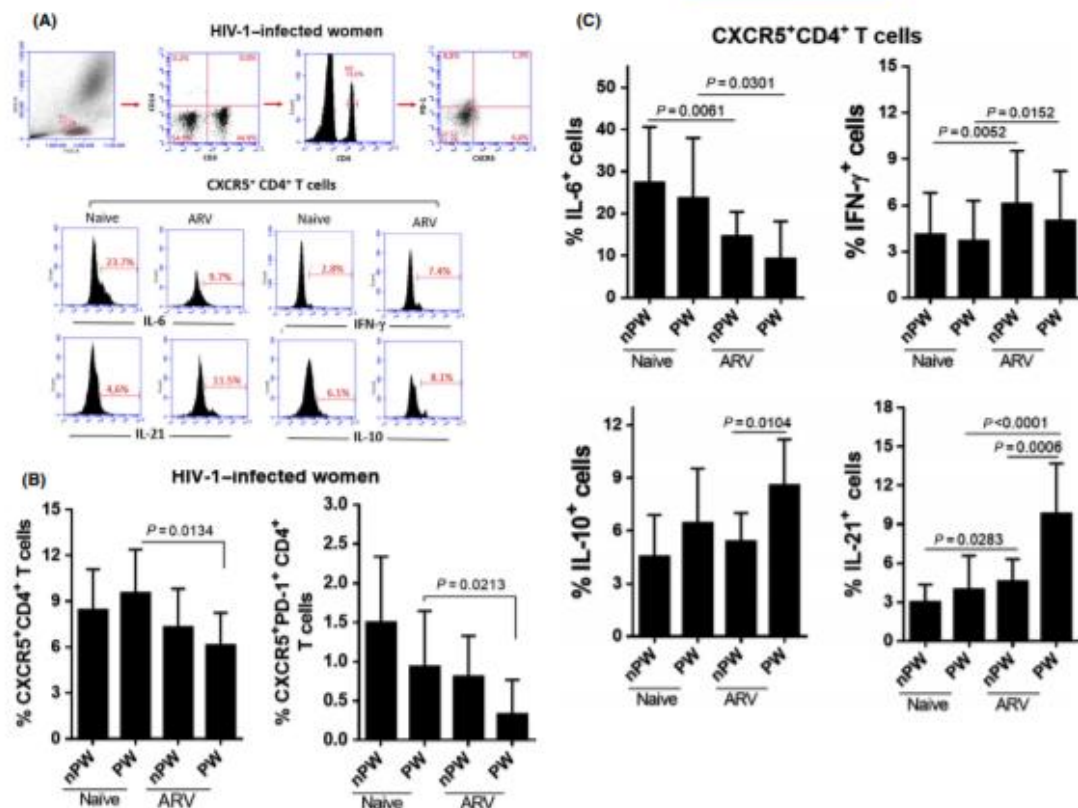


FIGURE 1 The impact of antiretroviral (ARV) therapy on the percentage of cytokine-producing CXCR5⁺ CD4⁺ T cells in HIV-1-infected pregnant (PW) and non-pregnant (nPW) women. In (A) representative Dot-Plots and histograms of CXCR5⁺ CD4⁺ T-cell subsets in PW infected by HIV-1 before (Naive) and after ARV therapy. In (B), the mean percentage of circulating T_{H1}-like cells, and PD-1⁺ T_{H1}-like cell subsets in PW and nPW. In (C), the mean percentage of different T_{H1}-like cells able to produce IL-6, IFN- γ , IL-10, and IL-21 from virus-infected PW and nPW was determined by cytometry after stimulation with PMA plus ionomycin for 4 h. The mean values were compared, and the significant P values shown in the figure

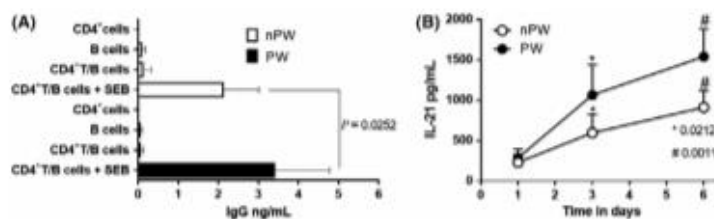


FIGURE 2 The impact of pregnancy on functional recovery of IL-21-producing CD4⁺ T in ARV-treated patients. In (A), CD4⁺ T cells, and B-cell co-cultures from ARV-treated HIV-infected PW (n = 15) and nPW (n = 15) were stimulated with SEB (1 μ g/mL) for 6 days and both IgG production (A) and IL-21 release (B) were dosed in the supernatants by ELISA. The mean values were compared and the P values presented in the figures

titers were also significantly higher in healthy HIV-1-negative PW (Figure 5A). Finally, concerning hormones (Figure 5B,C), HIV-1-infected PW have significantly lower estrogen levels than healthy PW (Figure 5C).

4 | DISCUSSION

Some studies have reported a tendency of pregnancy to enhance acquired humoral immunity by favoring the expansion of memory B

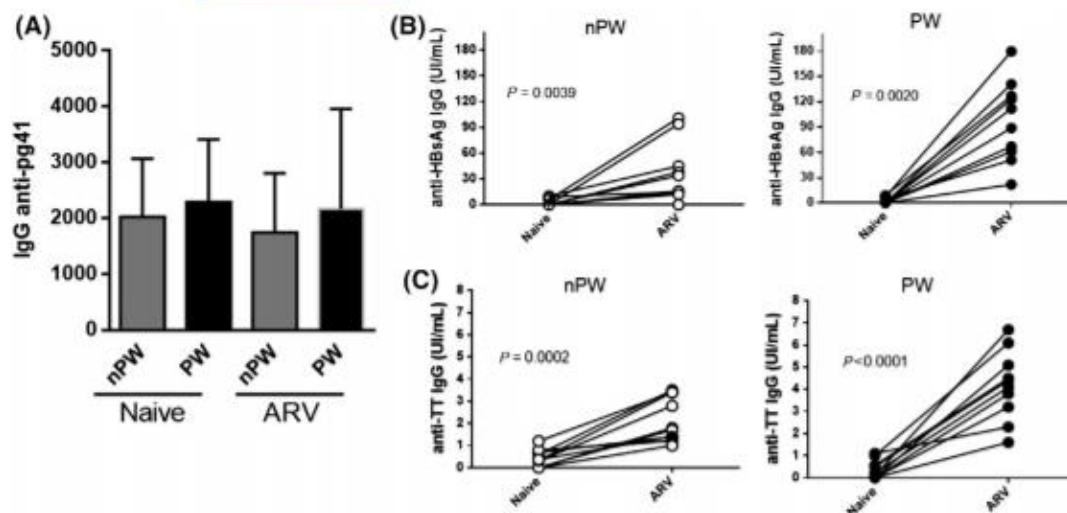


FIGURE 3 The in vivo anti-HIV-1 and anti-vaccine antibodies in HIV-1-infected women before and after ARV. The levels of antibodies against anti-gp41 (A), as well as anti-HBsAg (B) and anti-TT (C) IgG after immunization/booster, were quantified in the plasma of nPW and PW before and after HIV-1 treatment by ELISA. The mean values in nPW and PW were compared and the *P* values presented in the figures

and T_{FH} cells.^{30,32} In contrast, by infecting T_{FH} cells, HIV-1 primarily damages the production of neutralizing antibodies.²⁰ In the present study, we observed that pregnancy favors better recovery of circulating IL-21-producing T_{FH} -like cells after ARV therapy in HIV-1-infected women.

Despite a decline in total $CD4^+$ T cells, an expansion of dysfunctional T_{FH} cells is observed in the lymph nodes of HIV-infected individuals,^{19,20} and this phenomenon is associated with high rates of viral replication in these cells.¹⁸ Consequently, all events associated with germinal center reactions are compromised, which reduces the generation of memory B cells and the production of neutralizing antibodies against different pathogens.^{20,25,26,33,34}

Antiretroviral treatment classically reduces PVL and elevates $CD4^+$ T cells in HIV-infected patients. However, the functional reconstitution of $CD4^+$ T cells may be partial and not seen in <1-2 years of successful ARV therapy.^{35,36} Boswell et al¹⁶ observed an increase in the frequency of circulating T_{FH} cells 1 year after starting ARV therapy. Study published by our group performed in healthy HIV-1-negative women demonstrated that pregnancy, during the third trimester, favors expansion of different cT_{FH} -cell subsets.³² In the present study, before introduction of ARV therapy, no difference was observed regarding the percentage of cT_{FH} cells among non-pregnant or pregnant patients in the first trimester of pregnancy. Nevertheless, both of patient groups responded differently to the ARV therapy. We did not observe any change in the percentage of $CXCR5^+CD4^+$ T or $CXCR5^+PD-1^+CD4^+$ T cells in non-pregnant patients after approximately 6 months of ARV therapy. This could be explained by the short HIV-1 treatment time. In pregnant patients, on the other hand, the frequency of those cells diminished following ARV therapy. There is no clear explanation for this difference;

however, it could be explained, at least partially, by the immunological changes that occur during pregnancy, such as in the cytokine profile.

In this context, high levels of IL-6 observed during HIV-1 infection appear to promote the expansion of dysfunctional T_{FH} cells.³⁷ In the present study, ARV therapy reduced the frequency of circulating IL-6-secreting T_{FH} -like cells in both groups of HIV-1-infected women, but increased the proportions of IL-10⁺ T_{FH} -like cells only in pregnant patients. There is a possibility that the reduction in IL-6 production associated with an elevated IL-10 release in pregnant patients may contribute to attenuating the expansion of dysfunctional T_{FH} -like cells. This phenomenon can be linked to the ability of IL-10 to reduce both IL-6 production³⁸ and HIV-1 replication.³⁹ Although we did not investigate this relationship, better virological response to ARV therapy was observed among our PW.

More interestingly, pregnancy affects the efficiency of ARV therapy in elevating different circulating cytokine-secreting T_{FH} -cell subsets. Although HIV-1 treatment had increased the frequency of $IFN-\gamma^+$ T_{FH} -like cells in both HIV-1-infected groups of patients, ARV was more efficient in elevating the proportion of IL-21-secreting T_{FH} -like cells in PW. $IFN-\gamma$ is important to induce HIV-1-specific IgG antibodies.⁴⁰ Some T_{FH} cells, named $T_{FH}1$ cells, co-express CXCR3 and produce IL-21 and $IFN-\gamma$.¹¹ The frequency of this T_{FH} -cell subset during acute HIV-1 infection correlates negatively with set point viral load and positively with anti-p24 IgG titers.⁴¹ Interestingly, a higher frequency of $CXCR3^+CXCR5^+CD4^+$ T cells able to produce IL-21 and $IFN-\gamma$ has been observed in healthy HIV-1-negative PW during the third trimester of gestation, as compared with nPW ones.³² Here, there is a possibility that ARV raised the frequency

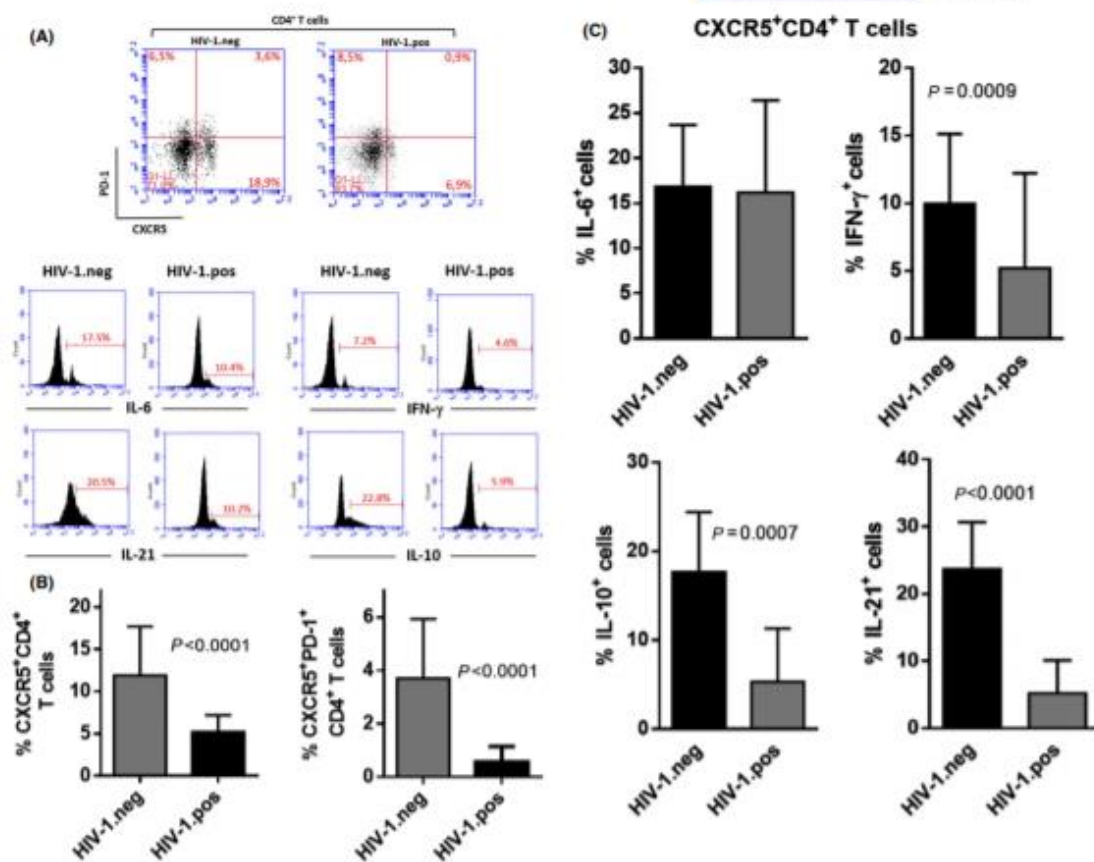


FIGURE 4 The ARV therapy during pregnancy fails to normalize circulating T_{FH} -like cell subsets in HIV-1-infected pregnant women. In (A), representative dot-plots and histograms of different T_{FH} -like cell subsets in healthy HIV-1-negative PW (PW.HIV-1.neg) and ARV-treated PW patients (PW.HIV-1.pos) during the last trimester of pregnancy. In (B), mean values of T_{FH} -like cells, and those positive for PD-1, and in (C), the proportion of different cytokine-producing T_{FH} -like cells. The mean values were compared, and the P values are shown in the figure

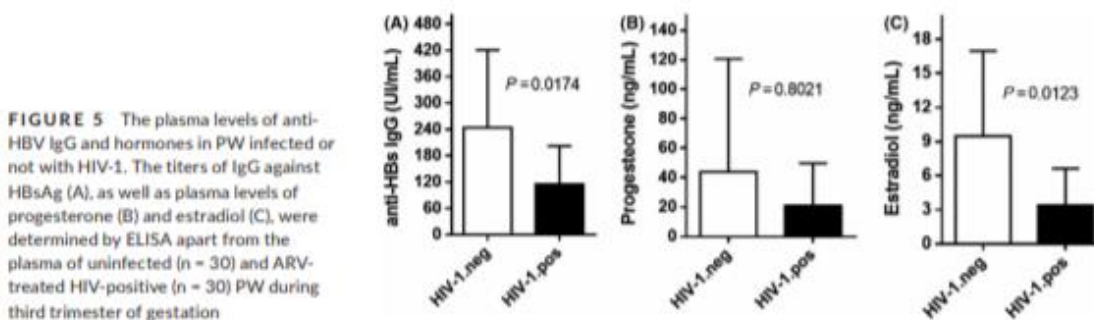


FIGURE 5 The plasma levels of anti-HBV IgG and hormones in PW infected or not with HIV-1. The titers of IgG against HBsAg (A), as well as plasma levels of progesterone (B) and estradiol (C), were determined by ELISA apart from the plasma of uninfected ($n = 30$) and ARV-treated HIV-positive ($n = 30$) PW during third trimester of gestation

of $T_{FH}1$ cells in HIV-1-positive PW. Unfortunately, due to our technical limitations, we were unable to investigate what proportion of IFN- γ -producing T_{FH} cells detected in HIV-1-infected PW is positive for IL-21 and CXCR3.

A higher tendency of pregnancy in favoring an increase in circulating IL-21-secreting T_{FH} -like cells could help immunized healthy

mothers to protect their newborns from infectious diseases by transferring IgG across the placenta and breastfeeding. In our present study, both IL-21 release and IgG production were significantly higher in CD4⁺ T- and B-cell co-cultures from ARV-treated PW in response to Staphylococcal enterotoxin B (SEB) from *S. aureus* than in HIV-1-positive nPW.

In the context of HIV, neutralization of antibodies for different HIV-1 strains has been observed among patients who spontaneously control the virus.²³ This event may contribute to a reduction in mother-to-child viral transmission, despite the classical attenuation of cellular immune response during the pregnancy.²⁷ Here, ARV therapy did not alter anti-gp41 IgG titers in our experimental groups. Although anti-gp41 IgG is produced early during HIV-1 infection, its presence was not correlated with virus clearance, probably due to both insufficient quantity and/or low affinity.⁴² On the other hand, anti-p24 IgG titers were significantly higher in HIV controllers than in progressors.⁴³ Unfortunately, we do not have kits available to carry out the dosage of antibodies against antigens other than the gp41 protein. Otherwise, the in vivo anti-HBsAg and anti-tetanus toxoid IgG titers following immunization/booster were higher in ARV-treated PW. In addition, anti-HBsAg IgG titers were directly correlated with both IL-21⁺T_{FH}-like cell frequency and plasma estrogen levels. The better recovery in humoral events should be inherent to pregnancy status. Indeed, in our previous study, peripheral estrogen levels were positively related to both PD-1⁺ CXCR3⁺ T_{FH} cells and plasma anti-HBs IgG antibodies in healthy PW during the third trimester.³² Is it possible that pregnancy-related levels of estrogen enhance functional status of T_{FH}³² and B cells,²⁹ even in the context of HIV-1 infection. Although we did not analyze the percentage of CXCR3 T_{FH}-cell subset in the samples from HIV-1-infected women, pregnant patients responded better to ARV therapy by recovering functional T_{FH} cells. Nevertheless, both anti-HBsAg IgG titers and the percentage of T_{FH}-like lymphocytes, able to produce IL-21, IL-10, and IFN- γ , were significantly higher in healthy PW than in HIV-1-positive PW. These findings show the negative impact of HIV-1 infection on T_{FH} cells and reveal the inability of ARV therapy to restore these cells over the short term. It is possible that immune recovery of these cells probably continues after delivery. Unfortunately, we could not adequately assess the long-term effect of ARV therapy on the frequency of different T_{FH}-like cells, since all PW were discharged from hospital after delivery.

Estrogen levels could contribute to the difference between the two groups. A study published by Fu et al²⁹ demonstrated that high concentrations of estradiol would decrease the need for costimulation by the T_{FH} in B cells for the synthesis of antibodies. In comparison with the healthy group, HIV-1-infected pregnant women have significantly lower estrogen levels. To date, the cause(s) for this lower estradiol plasma concentration associated with HIV-1 infection is unclear. It is possible that HIV-1 replication in the deciduous cells of the placental environment reduces the production of estradiol.⁴⁴ Another mechanism may involve ARV therapy. Some studies report effects on the reduction in serum estradiol through the administration of protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors during the treatment of HIV-1-infected women with oral contraceptives.⁴⁵⁻⁴⁷

In conclusion, our results suggest that pregnancy, probably by elevating circulating levels of estrogen, favors a better functional circulating T_{FH}-cell recovery in HIV-1-infected women after ARV introduction. This phenomenon could help virus-infected mothers

to protect their newborns from infectious diseases by transferring IgG cross the placenta. Furthermore, in the context of HIV infection, more studies will be necessary to evaluate whether this pregnancy-related event persists longer, making the women more prone to produce broadly neutralizing antibodies against the virus, which could be critical to slow down disease progression and vertical virus transmission.

CONFLICT OF INTEREST

All authors declare that there are no conflicts of interest.

ORCID

Cleonice A. M. Bento  <https://orcid.org/0000-0002-8613-6608>

REFERENCES

- Schaerli P, Willmann K, Lang AB, et al. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med*. 2000;192:1553-1562.
- Victora GD, Schwickert TA, Fooksman DR, et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell*. 2010;143:592-605.
- Chtanova T, Tangye SG, Newton R, et al. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol*. 2004;173:68-78.
- Breitfeld D, Ohi L, Kremmer E, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med*. 2000;192:1545-1552.
- Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, et al. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med*. 2001;193:1373-1381.
- Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (T_{FH}). *Annu Rev Immunol*. 2011;29:621-663.
- Deenick EK, Ma CS. The regulation and role of T follicular helper cells in immunity. *Immunology*. 2011;134:361-367.
- Linterman MA, Beaton L, Yu D, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med*. 2010;207:353-363.
- Zotos D, Coquet K, Zhang Y, et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med*. 2010;207:365-378.
- Shulman Z, Gitlin AD, Targ S, et al. T follicular helper cell dynamics in germinal centers. *Science*. 2013;341:673-677.
- Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, et al. Human blood CXCR5(+) CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*. 2011;34:108-121.
- Chevalier N, Jarrossay D, Ho E, et al. CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. *J Immunol*. 2011;186:5556-5568.
- Schmitt N, Bentebibel SE, Ueno H. Phenotype and functions of memory T_{FH} cells in human blood. *Trends Immunol*. 2014;35:436-442.
- Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, et al. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory T_{FH} cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity*. 2013;39:758-769.
- He J, Tsai M, Leong YA, et al. Circulating precursor CCR7^{hi}PD-1^{hi}CXCR5^{hi}CD4⁺ T cells indicate T_{FH} cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity*. 2013;39:770-781.

16. Boswell KL, Paris R, Boritz E, et al. Loss of circulating CD4 T cells with B cell helper function during chronic HIV infection. *PLoS Pathog Pathogens*. 2014;10:e1003853.
17. Uneo H. Human circulating T follicular helper cell subsets in health and disease. *J Clin Immunol*. 2016;36:34-39.
18. Perreau M, Savoye AL, De Crignis E, et al. Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med*. 2013;210:143-156.
19. Lindqvist M, van Lunzen J, Soghoian DZ, et al. Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J Clin Invest*. 2012;122:3271-3280.
20. Cubas RA, Mudd JC, Savoye AL, et al. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med*. 2013;19:494-499.
21. Abudulai LN, Fernandez SL, Corscadden K, et al. Production of IgG antibodies to pneumococcal polysaccharides is associated with expansion of ICOS⁺ circulating memory T follicular-helper cells which is impaired by HIV infection. *PLoS ONE*. 2017;12:e0176641.
22. De Bree GJ, Lynch RM. B cells in HIV pathogenesis. *Curr Opin Infect Dis*. 2016;29:23-30.
23. Martin-Gayo E, Cronin EJ, Hickman T, et al. Circulating CXCR5⁺CXCR3⁺PD-1^{hi} Tfh-like cells in HIV-1 controllers with neutralizing antibody breadth. *JCI Insight*. 2017;2:e89574.
24. Caskey Klein MF, Lorenzi JC, et al. Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. *Nature*. 2015;522:487-491.
25. Pallikkuth S, Parmigiani A, Silva SY, et al. Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine. *Blood*. 2012;120:985-993.
26. Muir R, Metcalf T, Tardif V, et al. Altered memory circulating T follicular helper-B cell interaction in early acute HIV infection. *PLoS Pathog Pathogens*. 2016;12:e1005777.
27. Robinson DP, Klein SL. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Horm Behav*. 2012;62:263-271.
28. Heikkinen J, Möttönen M, Alanen A, et al. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol*. 2004;136:372-378.
29. Fu Y, Li L, Liu X, et al. Estrogen promotes B cell activation in vitro through down-regulating CD80 molecule expression. *Gynecol Endocrinol*. 2011;27:593-596.
30. Kay A, Bayless NL, Fukuyama J, et al. Pregnancy does not attenuate the antibody or plasmablast response to inactivated Influenza vaccine. *J Infect Dis*. 2015;212:861-870.
31. Faucette AN, Pawlitz MD, Pei B, et al. Immunization of pregnant women: future of early infant protection. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11:2549-2555.
32. Monteiro C, Kasahara TM, Castro JR, et al. Pregnancy favors the expansion of circulating functional follicular helper T cells. *J Reprod Immunol*. 2017;121:1-10.
33. Streeck H, van Bockel D, Kelleher A, et al. T-cell responses in primary HIV-1 infection. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2008;2:52-59.
34. Colineau L, Rouers A, Yamamoto T, et al. HIV-infected spleens present altered follicular helper T cell (Tfh) subsets and skewed B cell maturation. *PLoS ONE*. 2015;10:e0140978.
35. Chéret A, Bacchus-Souffan C, Avettand-Fenoël V, et al. Combined ART started during acute HIV infection protects central memory CD4⁺ T cells and can induce remission. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70:2108-2120.
36. Laanani M, Ghosn J, Essat A, et al. Impact of the timing of initiation of antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection on the decay of cell-associated HIV-DNA. *Clin Infect Dis*. 2015;160:1715-1721.
37. Petrovas C, Yamamoto T, Gerner MY, et al. CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. *J Clin Invest*. 2012;122:3281-3294.
38. Bento CA, Hygino J, Andrade RM, et al. IL-10-secreting T cells from HIV-infected pregnant women downregulate HIV-1 replication: effect enhanced by antiretroviral treatment. *AIDS*. 2009;23:9-18.
39. Velu V, Mylvaganam GH, Gangadhara S, et al. Induction of Th1 biased Tfh (Tfh1 cells) in lymphoid tissues during chronic SIV infection defines functionally distinct germinal center Tfh cells. *J Immunol*. 2016;197:1832-1842.
40. Baiyegunhi O, Ndlovu B, Ogunshola F, et al. Frequencies of circulating Th1-biased T follicular helper cells in acute HIV-1 infection correlate with the development of HIV-specific antibody responses and lower set point viral load. *J Virol*. 2018;92:e00659.
41. Borrow P, Moody MA. Immunologic characteristics of HIV-infected individuals who make broadly neutralizing antibodies. *Immunol Rev*. 2017;2017(275):62-78.
42. Zwart G, van der Hoek L, Valk M, et al. Antibody responses to HIV-1 envelope and gag epitopes in HIV-1 seroconverts with rapid versus slow disease progression. *Virology*. 1994;201:285-293.
43. Kumar SB, Rice CE Jr, Milner DA, et al. Elevated cytokine and chemokine levels in the placenta are associated with in-utero HIV-1 mother-to-child transmission. *AIDS*. 2012;26:685-694.
44. Landolt NK, Phanuphak N, Ubolyam S, et al. Efavirez, in contrast to nevirapine, is associated with unfavorable progesterone and antiretroviral levels when coadministered with combined oral contraceptives. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013;62:534-539.
45. Papp E, Mohammadi H, Loutfy RM, et al. HIV protease inhibitor use during pregnancy is associated with decreased progesterone levels, suggesting a potential mechanism contributing to fetal growth restriction. *J Infect Dis*. 2015;211:10-18.
46. Siou K, Walmsley SL, Murphy KE, et al. Progesterone supplementation for HIV-positive pregnant women on protease inhibitor-based antiretroviral regimens (the ProSPAR study): a study protocol for a pilot randomized controlled trial. *Pilot Feasibility Stud*. 2016;2:49.
47. Schwartz O, Maréchal V, Le Gall S, et al. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med*. 1996;2:338-342.

How to cite this article: Kasahara TM, Monteiro C, Hygino J, et al. Pregnancy favors circulating IL-21-secreting T_{FH1}-like cell recovery in ARV-treated HIV-1-infected women. *Am J Reprod Immunol*. 2019;00:e13204. <https://doi.org/10.1111/ajr.13204>

3.3 Artigo 3 – The expansion of circulating IL-6 and IL-17-secreting follicular helper T cells is associated with neurological disabilities in neuromyelitis optica spectrum disorders. (Artigo publicado)

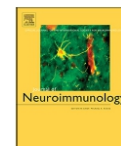
Journal of Neuroimmunology 330 (2019) 12–18



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroimmunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneuroim



The expansion of circulating IL-6 and IL-17-secreting follicular helper T cells is associated with neurological disabilities in neuromyelitis optica spectrum disorders



Clarice Monteiro^{a,b,1}, Gabriel Fernandes^{a,1}, Taissa M. Kasahara^{a,b}, Priscila O. Barros^a, Aleida S.O. Dias^{a,b}, Ana Carolina R.A. Araújo^c, Alice M.M. Ornelas^d, Renato S. Aguiar^d, Regina Alvarenga^c, Cleonice A.M. Bento^{a,b,c,*}

^a Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^b Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

^c Department of Neurology, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Brazil

^d Department of Genetics, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Neuromyelitis optica spectrum disorders
Aquaporin-4
Follicular helper T cell
Cytokines

ABSTRACT

Due to their function in assisting B cells, T_{FH} cells may be involved in the production of pathogenic IgG in neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD). In the present study, the proportion of IL-6⁺ and IL-17⁺ T_{FH} cell subsets was higher in NMOSD patients than healthy individuals. The frequency of both T_{FH} cell subsets were directly associated with disease activity. By contrast, NMOSD patients with a higher proportion of IL-10⁺ T_{FH} cell subsets showed a lower neurological disabilities score. In summary, all findings suggest that expansion of peripheral IL-6⁺ and IL-17⁺ T_{FH} cells may be involved in the severity of NMOSD.

1. Introduction

Neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD) is an autoimmune inflammatory disease of the central nervous system (CNS), which is mostly characterized by severe simultaneous or sequential episodes of optic neuritis and/or transverse myelitis (Wingerchuk et al., 2015a, 2015b), but also affects other areas in the CNS (e.g., brainstem and hypothalamus) (Kinoshita et al., 2009). In terms of immunopathogenesis, growing evidence has suggested the involvement of autoantibodies, mostly the presence of anti-aquaporin 4 (AQP4) antibody (Ab), in spinal cord lesions (Kinoshita et al., 2009; Wingerchuk et al., 2015a, 2015b). AQP4 is a water channel protein expressed in astrocyte foot processes in association with excitatory aminoacid transporter-2 (EAAT2) (Hinson et al., 2008). The anti-AQP4 Ab is present in approximately 90% of patients with classical NMO and > 50% of patients with NMOSD (Wingerchuk et al., 2015a, 2015b). In addition, an average of 20% of NMOSD patients negative for anti-AQP4 Ab have IgG against myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) (Wingerchuk et al., 2015a, 2015b). Some evidence has indicated that seropositivity for anti-AQP4 Ab, but not for anti-MOG Ab, correlates

with disease severity (Jarius et al., 2014; Sato et al., 2014). This deleterious relationship between presence of anti-AQP4 Ab and neurological disabilities should be associated with astrocyte damage, induced by complement deposition (Hinson et al., 2008) and neutrophil-mediated antibody-dependent cytotoxicity (Jasiak-Zatonska et al., 2016), as well as glutamate-mediated neurotoxicity due to lower EAAT2 availability (Hinson et al., 2008). Although the involvement of autoantibodies in NMOSD is recognized, CD4⁺ T cells might also be implicated in the disease, particularly follicular CD4⁺ T cells, named T_{FH} cells (Qi, 2016).

Human T_{FH} cells represent a distinct subset of CD4⁺ T cells found in secondary lymphoid organs and constitutively express the chemokine receptor CXCR5, which allows them to migrate into the lymphoid follicles (Qi, 2016). These cells are also characterized by a high expression of the transcription factor B cell lymphoma-6 (Bcl-6), programmed cell death receptor-1 (PD-1), inducible T-cell co-stimulator (ICOS), CD40 ligand (CD40L/CD154) and the production of IL-21 (Qi, 2016). T_{FH} cells provide signals for GC formation by inducing B cell proliferation, survival and the differentiation of B lymphocytes into heavy chain switched and affinity matured antibody-producing plasma cells.

* Corresponding author at: Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Frei Caneca 94, 20.261-040 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail address: cbento@unirio.br (C.A.M. Bento).

¹ The first two authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.01.015>

Received 2 December 2018; Received in revised form 9 January 2019; Accepted 25 January 2019
0165-5728/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Moreover, long-lived memory B cells are also generated from GC reactions (Qi, 2016).

After supporting CG development, T_{FH} cells can leave secondary follicles and join the pool of circulating memory T cells (Qi, 2016; Tangye et al., 2013). In the periphery, these cells are Bcl-6 negative and only a very low fraction (< 1%) co-express PD-1 and ICOS. When activated, these cells produce high levels of IL-21, the signature cytokine. In the context of autoimmunity, an increase in IL-21-secreting CXCR5⁺ CD4⁺ T cells has been observed in patients suffering from rheumatoid arthritis (AR) and systemic lupus erythematosus (SLE) (Rasmussen, 2008). Besides producing IL-21, a study by Morita et al. (2011) demonstrated the existence of different circulating T_{FH} cell subsets able to produce other pro-inflammatory cytokines, such as IFN- γ (T_{FH1}) and IL-17 (T_{FH17}).

Using PD-1, ICOS and CXCR5 markers to define T_{FH} cells, some authors have demonstrated a higher frequency of these cells in NMO, mainly among relapsing patients (Li et al., 2015; Fan et al., 2016; Zhao et al., 2017). Nevertheless, the contribution of different cytokine-secreting T_{FH} cell subsets in NMO had not been determined to date, and, in the present study, we observed that an expansion of IL-17⁺ and IL-6⁺ T_{FH} cell subsets in NMO with seropositivity for anti-AQP4 was associated with disease activity.

2. Materials and methods

2.1. Patients

For our study, 26 patients (3 males and 23 females) with a diagnosis for remittent recurrent NMO, according to Wingerchuk et al. (2015a, 2015b), were recruited between 2016 and 2017 from Lagoa and Clementino Fraga Filho Hospitals (Rio de Janeiro, Brazil) during clinical remission (Table 1). The disability status was evaluated by two neurologists (R.A. and S.A.L.) at the time of the study, according to the expanded disability status scale (EDSS) (Kurtzke, 1983). All patients were receiving immunosuppressive drugs (Table 1). After recruitment and blood sampling, the occurrence of clinical relapses were determined during a 1-year follow-up. Relapse was defined as a sudden appearance of new neurological symptoms and signs, or worsening of existing symptoms, lasting for at least 24 h. As a control, 25 healthy subjects, matched by age, sex, and racial background were recruited to participate in this study. Of note, no subject had a clinical diagnosis of any infection at the time of blood extraction.

After a complete description of the study to the participants, written informed consent was obtained from each individual. The study was

Table 1
Subjects characteristics.

	Control ¹ (n = 25)	NMO ² (n = 26)
Mean age in years (sd)	39.4 (15.9)	41.1 (18.1)
Male (%)	12	12
Disease duration (in years)	NA ⁴	6.7 (3–15)
Positive anti-AQP4 Ab (%) ⁵	NA ⁴	62
Positive anti-MOG Ab (%) ⁵	NA ⁴	0
EDSS ³ [mean (range)]	NA ⁴	4.2 (1–7)
Clinical relapses (%) ⁶	NA	46
NMO therapy (%) ⁷	NA	100

¹ Healthy individuals.

² Relapsing-remittent NMO patients in clinical remission.

³ Expanded Disability Status Scale.

⁴ Not analyzed.

⁵ Positivity for serum anti-aquaporin-4 (AQP4) Ab or anti-MOG Ab was determined by CBA assay.

⁶ The occurrence of relapses one year after blood sampling.

⁷ Immunosuppressor therapy at the moment of study: cyclophosphamide (n = 3), azathioprine (n = 13), mycophenolate mofetil (n = 10).

approved by the Ethics Committee for Research on Human Subjects of the Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO).

2.2. Flow cytometry analysis

Whole peripheral blood from healthy subjects and NMO patients were briefly stimulated in 24-well flat bottom microtiter plates with phorbol myristate acetate (20 ng/mL; Sigma-Aldrich) plus Ionomycin (600 ng/mL; Sigma-Aldrich) at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator for 4 h. For cytokine measurement optimization, Brefeldin A (1.0 μ g/mL; Sigma-Aldrich) was also added to the culture. To determine the circulating percentage of cytokine-secreting T_{FH} cell subsets, mouse anti-human monoclonal antibodies (mAbs) against CD4-FITC, CXCR5-PECy7/PE, IL-21-PE/APC, IFN- γ -APC, IL-10-APC, IL-17-PECy7, IL-6-PE and all isotype control antibodies were purchased from BioLegend (San Diego, CA, USA). Briefly, blood samples were incubated with the aforementioned mAbs against superficial molecules for 30 min at room temperature in the dark, according to manufacturer's instructions. The red blood cells were lysed, washed and, then, the cells were permeabilized by incubating cells with Cytofix/Cytoperm solution (BD Pharmingen, San Diego, CA). After washing, the mAbs for intracellular staining (IL-21-PE/APC, IFN- γ -APC, IL-10-APC, IL-17-PECy7, IL-4-APC, IL-6-PE) were added in different combinations. The different T_{FH} cell subtypes were determined using Accuri C6 flow cytometer (Accuri[™], Ann Arbor, MI, USA) and analyzed using Cflow (Accuri[™], Ann Arbor, MI, USA). Isotype control antibodies and single-stained samples were used to periodically check the settings and gates on the flow cytometer. After acquisition of 200,000 events, lymphocytes were gated based on forward and side scatter properties after the exclusion of dead cells and doublets. Circulating T_{FH} cells were defined as CD3⁺ CXCR5⁺ IL-21⁺.

2.3. ELISA technique

The circulating levels of different cytokines were quantified by ELISA technique using OptEIA ELISA kits (BD, Pharmingen, San Diego, CA), according to manufacturer's instructions. Each ELISA was performed using pairs of antibodies against IL-6, IL-17, IL-21 and IL-10. The reaction was revealed with streptavidin-horseradish peroxidase, using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as a substrate. Recombinant human cytokines, at concentrations ranging from 3.5–500 pg/mL, were used to construct standard curves.

2.4. Cell-based assays

The presence of plasma anti-AQP4 and anti-MOG antibodies from NMO patients was evaluated by cell-based assay (CBA). Briefly, plasmas (diluted at 1/100 for AQP4-Ab and 1/640 for MOG-Ab) were incubated at 4 °C for 20 min, with HEK293T cells previously transfected with the respective plasmids (MOG or AQP4-M23) (Marignier et al., 2013; Cobo-Calvo et al., 2016). The cells were fixed with paraformaldehyde (PFA) for 15 min and stained with a secondary goat antibody against human IgG, conjugated with allophycocyanin (APC) (Jackson Immuno Research Inc.). Results were analyzed using an Accuri C6 cytometer (Accuri[™], Ann Arbor, MI, USA) and FlowJo v10 software (FlowJo, LLC).

2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 5.0 software (GraphPad Software). Comparisons between immune assays in the cell cultures from the control group and NMO patients were made using two-way ANOVA. Within the patient group, Student's *t*-test was applied. Correlations between variables were sought using Pearson's correlation. Significance in all experiments was defined as *p* < .05.

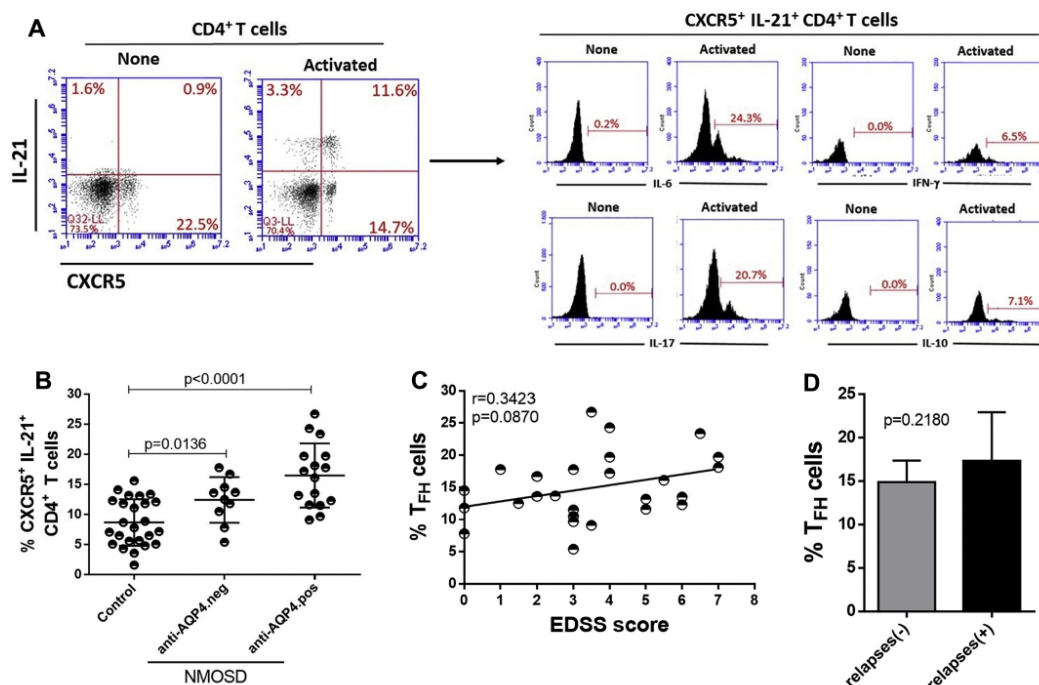


Fig. 1. The percentage of T_{FH} cell subsets in NMOSD patients. In (A), the strategy for gating the T_{FH} (CXCR5⁺ IL-21⁺ CD4⁺) cells, and their cytokines-secreting subsets. (B) Identification of peripheral T_{FH} cells from the control group ($n = 25$) and NMOSD patients, seronegatives (anti-AQP4^{neg}, $n = 9$) or seropositives (anti-AQP4^{pos}, $n = 16$) for anti-AQP4 Ab, was performed after brief stimulation (4 h) with PMA (600 ng/mL) plus Ionomycin (20 ng/mL). In the figure shows the mean (SD) and (***) and (**) indicate $p < .001$ and $p < .0001$ respectively, determined by the two-way ANOVA. In (C) and (D), the frequency of T_{FH} cells from NMOSD patients is demonstrated in function of EDSS score (Pearson's correlation) and relapses (Student's test) occurrence during follow up (1 year), respectively. In (C) and (D), the mean values were compared and the p values are indicated in the figures.

3. Results

3.1. Clinical parameters of individuals

Demographic and clinical features of the NMOSD patients and the age-matched control group are shown in Table 1. As expected, the majority of patients were women. The disability score ranged 1 to 7, and the patients were receiving immunosuppressive therapy. In terms of autoantibody status, 16 from 26 (62%) of NMOSD patients presented antibodies (Ab) against AQP4 while no individual was positive for anti-MOG Ab. Notably, all immune assays were performed during the clinical remission phase (at baseline), and occurrence of clinical relapses was observed in 12 patients during a 1-year follow-up. Regardless of treatment scheme, the majority of patients (10/12) who relapsed had an EDSS score ≥ 5 .

3.2. The frequency of different T_{FH} cell subtypes was associated with clinical activity of NMOSD

Taking into consideration the CXCR5 and IL-21 markers (Fig. 1A), the proportion of circulating T_{FH} was significantly higher in NMOSD patients in comparison with the control group, notably among those patients positive for anti-AQP4 Ab (Fig. 1B). No difference was observed in the patient subgroups ($p = .4340$). Additionally, the frequency of these cells did not correlate with either neurological disabilities or occurrence of further relapses after blood sampling (Fig. 1C

and D). On the other hand, the proportion of IL-6⁺ and IL-17⁺ T_{FH} cell subsets was higher in NMOSD patients than control group, mainly among those seropositive for anti-AQP4 Ab (Fig. 2A). Moreover, the frequency of those T_{FH} cell subsets were directly associated with EDSS score (Fig. 2B). Further, the occurrence of new relapses during follow up (1 year) was observed among patients with a higher frequency of IL-6⁺ T_{FH} cells (Fig. 2C). No difference was observed with regard to IFN- γ -secreting T_{FH} cells (Fig. 2A). Additionally, these IFN- γ ⁺ T_{FH} cell subset was not associated with clinical parameters (Fig. 2B and C). By contrast, a lower proportion of IL-10-producing T_{FH} cells was identified in NMOSD with anti-AQP4 antibodies (Fig. 2A), and their percentage was positively associated with neurological disabilities (Fig. 2B).

3.3. In vivo IL-6 and IL-17 levels are correlated with T_{FH} cells and disease severity

Plasma levels of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-21 were significantly higher in NMOSD patients, regardless of anti-AQP4 antibody status, as compared with the control group (Fig. 3A). Moreover, *in vivo* IL-21, IL-6 and IL-17 levels were directly correlated with the frequency of T_{FH} cells (IL-21⁺), as well as those cells positives for IL-6 and IL-17 cytokines, respectively (Fig. 3B). No significant correlation was observed between IL-10 and IL-10⁺ T_{FH} cells. Finally, concerning plasma cytokines, while IL-6 levels were positively associated with EDSS (Fig. 3C), IL-6 and IL-17, but not IL-21 or IL-10, were significantly higher among NMOSD patients who relapse during the follow up (Fig. 3D).

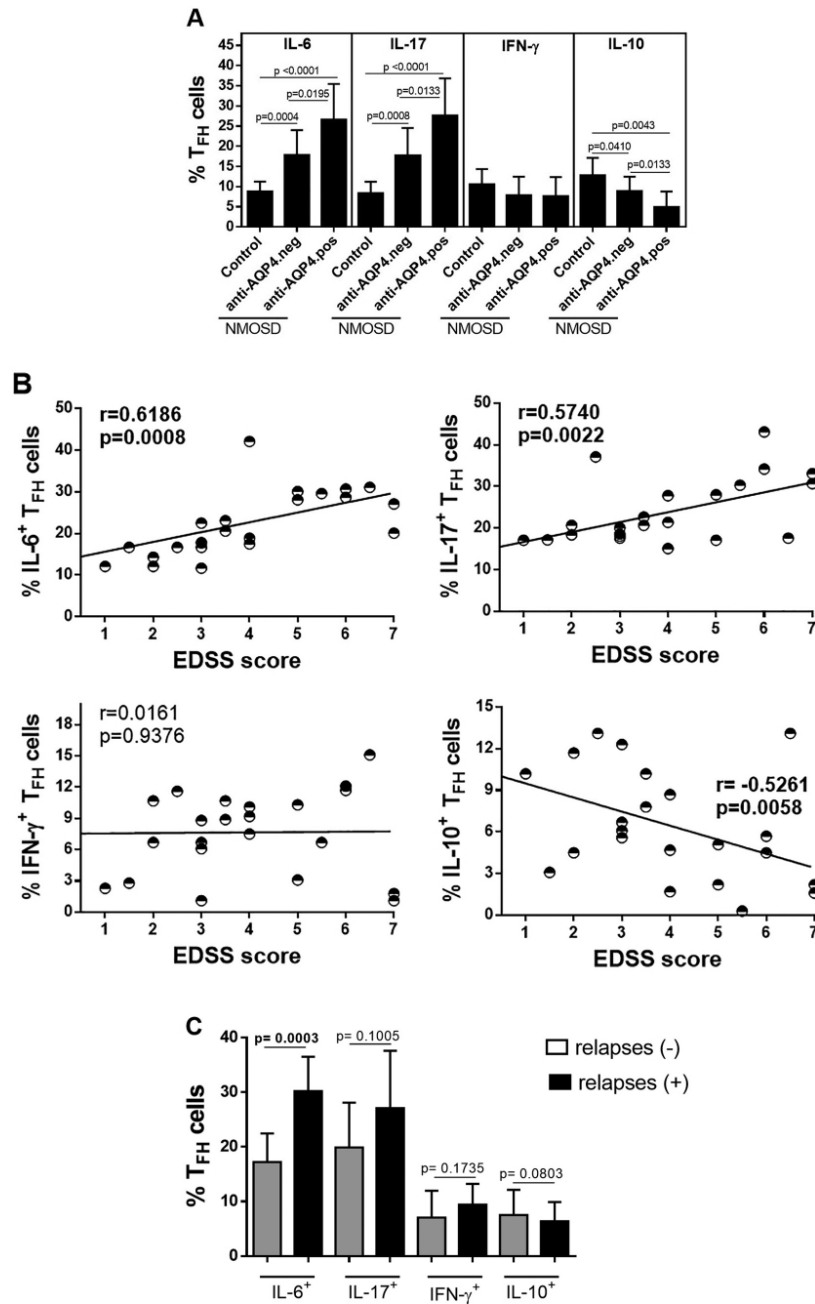


Fig. 2. The proportion of different T_H cell subsets and its relationship with clinical parameters in NMOSD patients. In (A), the percentage of PMA/IO-stimulated T_H cells producers of IL-6, IL-17, IFN- γ and IL-10 was analyzed in healthy subjects ($n = 26$) and anti-AQP4neg ($n = 10$) and anti-AQP4pos ($n = 16$) NMOSD patients. In NMOSD (B), the percentage of different cytokine-secreting T_H cells was correlated with neurological disabilities, determined by EDSS score. The Pearson's correlation was applied and the p values are indicated at the figure. In (C), the mean percentages of these T_H cell subsets were stratified in function of relapse occurrence during the first year after blood sampling. The mean values were compared by using Student's t -test and the p values are indicated in the figures.

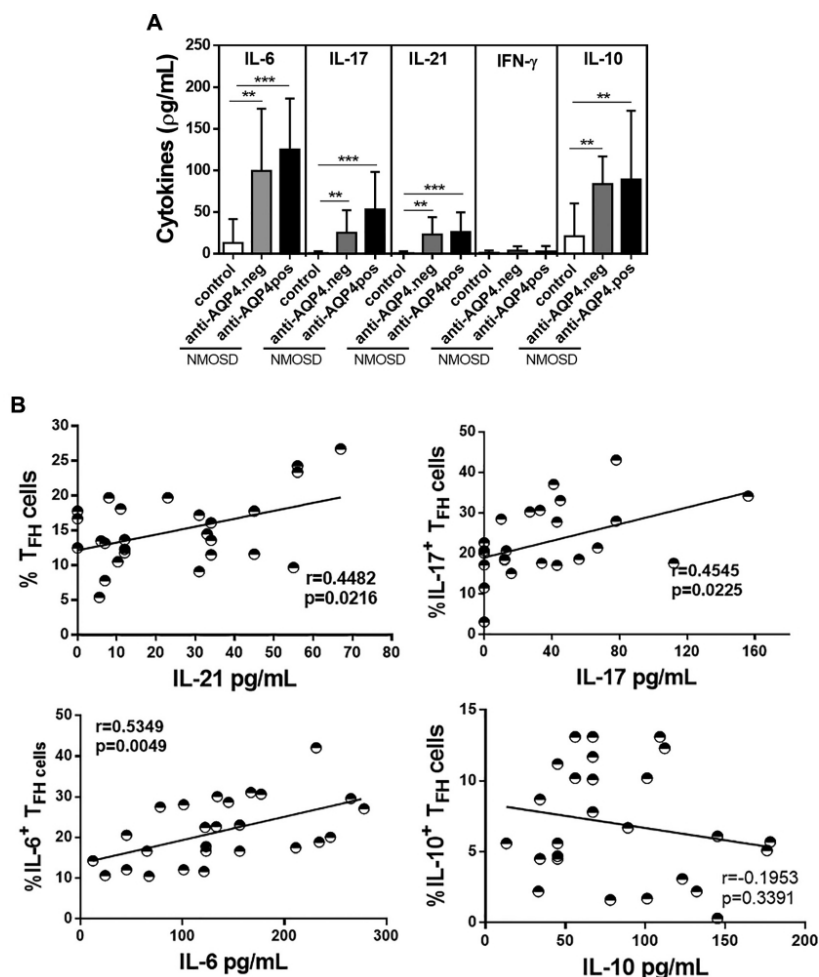


Fig. 3. *In vivo* cytokines and their relationship with circulating T_H17 cell subsets and clinical parameters in NMOSD patients. In (A), plasma levels of IL-6, IL-17, IL-21, IFN- γ and IL-10 from NMOSD patients (n = 26) were quantified by ELISA in control group and NMOSD samples. The mean values of cytokines between different groups were compared by using the two-way ANOVA, and (**) and (***) indicates $p < .001$ and $p < .0001$, respectively. In (B) and (C), the *in vivo* cytokines were correlated with different T_H17 cell subsets or EDSS score, respectively. In (B and C), the Pearson's correlation was applied and the p values are indicated at the figure. In (D), cytokines values were stratified by occurrence of clinical relapses during follow up (1 year) ly. The (D) shows the mean (SD) and the p values were obtained by the Student's t -test.

4. Discussion

It is believed that NMOSD immunopathogenesis involves the production of pathogenic, IgG notably directed to AQP4. Nevertheless, the synthesis of affinity matured IgG-producing plasma cells depends on T_H17 cells, a distinct IL-21-producing CXCR5⁺ CD4⁺ T cell subset (Qi, 2016).

Here, a higher percentage of T_H17 cells, identified as being CXCR5⁺IL-21⁺, was observed in NMOSD following brief *in vitro* activation, mainly among patients seropositive for anti-AQP4 Ab. Nevertheless, their frequency was not associated with clinical parameters. T_H17 cells produce IL-21 in association with other cytokines

(Rasmussen, 2008; Morita et al., 2011; Tangye et al., 2013; Qi, 2016), and, in the present study, an overrepresentation of IL-6⁺ and IL-17⁺ T_H17 cells was associated with advanced neurological disabilities and occurrence of further relapses. To our knowledge, this is the first report that suggested an involvement of different cytokine-producing T_H17 cells in NMOSD.

Some studies have demonstrated an expansion of PD-1⁺CXCR5⁺CD4⁺T cells in relapsing NMOSD patients (Li et al., 2015; Zhao et al., 2017). However, none of these studies has demonstrated any relationship between these cells and neurological disabilities. Although Zhao et al. (2017) did not perform intracellular IL-21 staining in these cells, they observed a positive correlation between these cells and

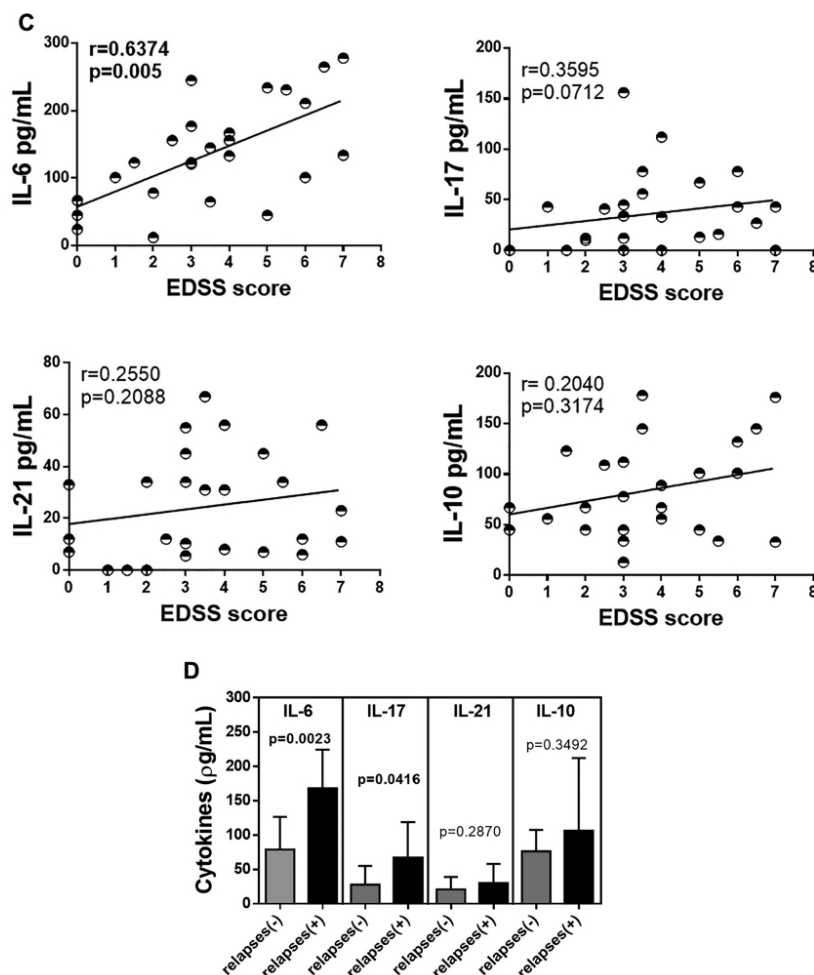


Fig. 3. (continued)

plasma levels of IL-21. In LES, a classical humoral autoimmune disease, CXCR5⁺PD-1⁺IL-21⁺CD4⁺ T cells were directly associated with disease activity (Sawaf et al., 2016). Since PD-1 expression on T_H cells enhances the ability of these lymphocytes to help B cells (Tangye et al., 2013; Onabajo et al., 2013; Qi, 2016), there is a possibility that PD-1⁺T_H cells in the aforementioned NMOSD studies (Li et al., 2015; Zhao et al., 2017) are positive not only for IL-21, but for other cytokines as well. Another interesting finding by Zhao et al. (2017) study was the ability of rituximab (RTX), a monoclonal against CD20 that depletes B cells, in attenuating disease activity in NMSO patients. This beneficial effect was related to a significant reduction of the frequency of circulating T_H cells and IL-21 and IL-6 plasma levels. These findings are in line with some clinical studies suggesting RTX as more efficient therapeutic option in the NMOSD treatment (Kessler et al., 2016). Nonetheless, take into account the ability of the bone marrow to restore peripheral B cells, the development of a novel therapeutic drug for depletion of circulating T_H cells may provide long-term protection for

clinical attacks in NMOSD patients.

Concerning *in vivo* cytokines, the plasma levels of IL-6, IL-21 and IL-17 were higher in NMOSD patients than in the control group. These findings are in agreement with other studies demonstrating elevated circulating levels of IL-6 and IL-21 in NMOSD patients (Fan et al., 2016; Zhao et al., 2017). In addition, in our cohort, IL-6 and IL-17 concentrations were positively associated with clinical parameters. The higher peripheral levels of IL-10 that could be produced by different immune cells, in our patients showed an attempt to control the production of pro-inflammatory cytokines.

Some evidence has linked IL-6 and IL-17 to NMOSD pathogenesis (Chihara et al., 2011; Wang et al., 2011; Barros et al., 2016). Indeed, a recent study published by our group (Barros et al., 2016) demonstrated an elevated percentage of circulating dual IL-6 and IL-17-secreting CD4⁺ T cells positive for toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in NMOSD patients with advanced neurological disabilities. There is a possibility that a fraction of these lymphocytes may become T_H cells and thereby,

support germinal center reactions. In the SLE animal model, the production of autoantibodies was dependent on ICOS⁺IL-17⁺IL-21⁺T_{FH} cells (Wu et al., 2008). Consistent with this finding, the percentage of IL-6- and IL-17-secreting T_{FH} cell subsets was higher in our NMO patients with anti-AQP4 Ab. Since IL-6 enhances the survival of plasmablasts, thereby promoting anti-AQP4 Ab production (Chihara et al., 2011), the expansion of IL-6-producing T_{FH} cells could help to at least partially explain why seropositivity to anti-AQP4 Ab is related to more attacks and diminished recovery in NMO patients (Sato et al., 2014). Unfortunately, although it presents elevated sensitivity, anti-AQP4 IgG dosage by CBA is not a classical quantitative. This means therefore, that we are unable to perform any comparison between anti-AQP4 titers and circulating T_{FH} cells.

With regard to IFN- γ -secreting T_{FH} cells, little is known about this follicular subset in autoimmune diseases (Che et al., 2016). In the present study, no difference was observed with regard to peripheral IFN- γ -secreting T_{FH} cells in NMO patients when compared to healthy controls. These findings can be explained with previous studies that showed a lower capacity of these cells to support Ab production when compared with T_{FH}17 cells (Morita et al., 2011). Finally, a lower percentage of circulating IL-10-secreting T_{FH} cells was identified in our patients, notably among those with advanced neurological disabilities. These findings are in agreement with some observations indicating a critical role in controlling GC responses for regulatory IL-10⁺ FoxP3⁺ CD4⁺ T cells, named T_{FR} cells, which are found in follicles (Sage and Sharpe, 2016). Although our sample size was small, this data suggests that a lower percentage of IL-10⁺ T_{FH} cells in NMO with anti-AQP4 Ab may fail to attenuate pathogenic T_{FH} cell subsets in NMO.

5. Conclusions

Although the sample size of the present study could be increased, our data suggests that an increase in circulating IL-6⁺ and IL17⁺ T_{FH} cells in NMO patients seropositive for anti-AQP4 Ab, associated with lower frequency of IL-10⁺ T_{FH} subset, may contribute to the severity of the disease. Although preliminary, our data can help to design new immunotherapeutic tools to treat NMO.

Conflict of interest statement

All authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa Carlos Chagas Filho (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Barros, P.O., Cassano, T., Hygino, J., Ferreira, T.B., Centurião, N., Kasahara, T.M., Andrade, R.M., Linhares, U.C., Andrade, A.F., Vasconcelos, C.C., Alvarenga, R., Marignier, R., Bento, C.A., 2016. Prediction of disease severity in neuromyelitis optica by the levels of interleukin (IL)-6 produced during remission phase. *Clin. Exp. Immunol.* 183, 480–489. <https://doi.org/10.1111/cei.12733>.
- Che, Y., Qiu, J., Jin, T., Yin, F., Li, M., Jiang, Y., 2016. Circulating memory T follicular helper subsets, T_{fh2} and T_{fh17}, participate in the pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *Sci. Rep.* 6, 20963. <https://doi.org/10.1038/srep20963>.
- Chihara, N., Aranami, T., Sato, W., Miyazaki, Y., Miyake, S., Okamoto, T., Ogawa, M., Toda, T., Yamamura, T., 2011. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (9), 3701–3706. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017385108>.
- Cobo-Calvo, Á., Sepúlveda, M., Bernard-Valnet, R., Ruiz, A., Brassat, D., Martínez-Yéamos, S., Saiz, A., Marignier, R., 2016. Antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in aquaporin 4 antibody seronegative longitudinally extensive transverse myelitis: clinical and prognostic implications. *Mult. Scler.* 22 (3), 312–319. <https://doi.org/10.1177/1352458515591071>.
- Fan, X., Jiang, Y., Han, J., Liu, J., Wei, Y., Jiang, X., Jin, T., 2016. Circulating memory T follicular helper cells in patients with neuromyelitis optica/Neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mediat. Inflamm.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3678152>.
- Hinson, S.R., Roemer, S.F., Lucchinetti, C.F., Fryer, J.P., Kryzer, T.J., Chamberlain, J.L., Howe, C.L., Pittock, S.J., Lennon, V.A., 2008. Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transporter by downregulating EAAT2. *J. Immunol.* 181, 5730–5737.
- Jarius, S., Wildemann, B., Paul, F., 2014. Neuromyelitis optica: clinical features, immunopathogenesis and treatment. *Clin. Exp. Immunol.* 176 (2), 149–164. <https://doi.org/10.1111/cei.12271>.
- Jasiak-Zatonska, M., Kalinowska-Lyszczarz, A., Michalak, S., Kozubski, W., 2016. The immunology of neuromyelitis optica—current knowledge, clinical implications, controversies and future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (3), 273. <https://doi.org/10.3390/ijms17030273>.
- Kessler, R.A., Mealy, M.A., Levy, M., 2016 Jan. Treatment of neuromyelitis optica spectrum disorder: acute, preventive, and symptomatic. *Curr. Treat. Options Neurol.* 18 (1), 2. <https://doi.org/10.1007/s11940-015-0387-9>.
- Kinoshita, M., Nakatsuji, Y., Moriya, M., Okuno, T., Kumanogoh, A., Nakano, M., Takahashi, T., Fujihara, K., Tanaka, K., Sakoda, S., 2009. Astrocytic necrosis is induced by anti-aquaporin-4 antibody-positive serum. *Neuroreport* 20 (5), 508.
- Kurtzke, J.F., 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33 (11), 1444–1452.
- Li, Y.J., Zhang, F., Qi, Y., Chang, G.Q., Fu, Y., Su, L., Shen, Y., Sun, N., Borzanci, A., Yang, C., Shi, F.D., Yan, Y., 2015. Association of circulating follicular helper T cells with disease course of NMO spectrum disorders. *J. Neuroimmunol.* 278, 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.11.011>.
- Marignier, R., Bernard-Valnet, R., Giraudon, P., Collongues, N., Papeix, C., Zéphir, H., Cavillon, G., Rogemond, V., Casey, R., Frangoulis, B., De Seze, J., Vukusic, S., Honnorat, J., Confavreux, C., NOMADMUS Study Group, et al., 2013. Aquaporin-4 antibody-negative neuromyelitis optica: distinct assay sensitivity-dependent entity. *Neurology* 80, 2194–2200. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318296917>.
- Morita, R., Schmitt, N., Benteibibel, S.E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S., Sabzghabaei, N., Lavecchio, E.M., Punaro, M., Pascual, V., Banchereau, J., Ueno, H., 2011. Human blood CXCR5 (+) CD4 (+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34 (1), 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.012>.
- Onabajo, O.O., George, J., Lewis, M.G., Mattapallil, J.J., 2013. Rhesus Macaque lymph node PD1^{hi}CD4⁺ T cells express high levels of CXCR5 and IL-21 and display a CCR7^{hi}ICOS⁺Bcl6⁺ T-follicular helper (TFH) cell phenotype. *PLoS One* 8, e59758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059758>.
- Qi, H., 2016 Oct. T follicular helper cells in space-time. *Nat. Rev. Immunol.* 16 (10), 612–625. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.94>.
- Rasmussen, T.K., 2008 Nov 1. Follicular T helper cells and IL-21 in rheumatic diseases. *J. Immunol.* 181 (9), 6038–6050.
- Sage, P.T., Sharpe, A.H., 2016. T follicular regulatory cells. *Immunol. Rev.* 271 (1), 246–259. <https://doi.org/10.1111/imr.12411>.
- Sato, D.K., Callegaro, D., Lana-Peixoto, M.A., Waters, P.J., de Haidar Jorge, F.M., Takahashi, T., Nakashima, I., Apostolos-Pereira, S.L., Talim, N., Simm, R.F., Lino, A.M., Mitsu, T., Leite, M.I., Aoki, M., Fujihara, K., 2014 Feb 11. Distinction between MOG antibody-positive and AQP4 antibody-positive NMO spectrum disorders. *Neurology* 82 (6), 474–481. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000101>.
- Sawaf, M., Dumortier, H., Monneaux, F., 2016. Follicular helper T cells in systemic erythematosis: why should they be considered as interesting therapeutic target? *J. Immunol. Res.* 2016, 5767106. <https://doi.org/10.1155/2016/5767106>.
- Tangye, S.G., Ma, C.S., Brink, R., Deenick, E.K., 2013. The good, the bad and the ugly – TFH cells in human health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 13 (6), 412–426. <https://doi.org/10.1038/nri3447>.
- Wang, H.H., Dai, Y.Q., Qiu, W., Lu, Z.Q., Peng, F.H., Wang, Y.G., Bao, J., Li, Y., Hu, X.Q., 2011. Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *J. Clin. Neurosci.* 18, 1313–1317. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2011.01.031>.
- Wingerchuk, D.M., Banwell, B., Bennett, J.L., Cabre, P., Carroll, W., Chitnis, T., de Seze, J., Fujihara, K., Greenberg, B., Jacob, A., Jarius, S., Lana-Peixoto, M., Levy, M., Simon, J.H., Tenenbaum, S., Traboulsee, A.L., Waters, P., Wellik, K.E., Weinstenker, B.G., 2015a. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 85, 177–189. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001729>.
- Wingerchuk, D.M., Banwell, B., Bennett, J.L., Cabre, P., Carroll, W., Chitnis, T., de Seze, J., Fujihara, K., Greenberg, B., Jacob, A., Jarius, S., Lana-Peixoto, M., Levy, M., Simon, J.H., Tenenbaum, S., Traboulsee, A.L., Waters, P., Wellik, K.E., Weinstenker, B.G., International Panel for NMO Diagnosis, International Panel for NMO Diagnosis, 2015b. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 85, 177–189. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001729>. (Epub 2015 Jun 19).
- Wu, H.Y., Quintana, F.J., Weiner, H.L., 2008. Nasal anti-CD3 antibody ameliorates lupus by inducing an IL-10-secreting CD4⁺ CD25⁺ LAP⁺ regulatory T cell and is associated with down-regulation of IL-17 + CD4⁺ ICOS⁺ + CXCR5⁺ follicular helper T cells. *J. Immunol.* 181 (9), 6038–6050.
- Zhao, C., Li, H.Z., Zhao, D.D., Ma, C., Wu, F., Bai, Y.N., Zhang, M., Li, Z.Y., Guo, J., 2017 Mar 15. Increased circulating T follicular helper cells are inhibited by rituximab in neuromyelitis optica spectrum disorder. *Front. Neurol.* 8, 104. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00104>.

3.4 Artigo 4 – Pregnancy levels of estrogen and progesterone contribute to humoral immunity by activating B /TFH cell axis (Artigo submetido)

Assunto: Eur. J. Immunology - Manuscript number eji.202048658 submitted

Data: 31/03/2020 18:30

De: European Journal of Immunology - 2 <onbehalfof@manuscriptcentral.com>

Para: cbento@globo.com

Responder para: ejied@wiley-vch.de

31-Mar-2020

Dear Dr. Bento,

Your manuscript entitled "Pregnancy levels of estrogen and progesterone contribute to humoral immunity by activating TFH/B cell axis." has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the European Journal of Immunology.

Your manuscript number is eji.202048658. Please mention this number in all future correspondence regarding this submission.

You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging into <https://mc.manuscriptcentral.com/eurjimmu>. If you have difficulty using this site, please click the 'Get Help Now' link at the top right corner of the site or contact the Editorial Office.

COVID-19 ALERT: Due to the constantly changing coronavirus situation worldwide, there will be changing demands on our editors, referees and editorial office. This may result in some delays in the processing and evaluation of your manuscript. Thank you for your patience and please stay safe.

We would like to bring your attention to the new recent developments at the European Journal of Immunology:

1. EJI is presenting a comprehensive flow cytometry resource, the Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. The Flow Cytometry Guidelines not only highlight the latest trends and best practices in basic and advanced flow cytometry but also re-enforce optimal sample preparation, as well as data analysis, enabling the correct use of state of the art flow cytometry for all involved in immunological research.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.201646632/pdf>

2. As announced in the Editorial entitled "Fair play at EJI" by Prof. Andreas Radbruch (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.201370012/pdf>), we will publish the correspondence of the peer review process of research articles, including the referee reports and the author responses for all stages of the submission, if the article is accepted for publication. There will be a link from the published article to Publons, where all the peer review correspondence will be shown. You can read more about the Publons service at <https://authorservices.wiley.com/Reviewers/journal-reviewers/recognition-for->

[reviewers/publons.html](#)

If you do not wish the peer review information to be published with your manuscript, please let the editorial office (ejied@wiley.com) know. Please note that opting out has no bearing on the peer review process or the handling of your manuscript; this has been introduced as a benefit for authors to ensure that reviewers write responsible reports that stand up to public scrutiny and to demystify the peer review process for readers.

3. The European Journal of Immunology now works together with Wiley's Open Access Journal, Immunity, Inflammation and Disease (www.immunityinflammationdisease.com), to enable rapid publication of good quality research that is not found to reach the threshold for publication in the European Journal of Immunology. Authors of papers rejected by the European Journal of Immunology but felt to be a candidate for publication in Immunity, Inflammation and Disease will be offered the option of having their paper, along with any related peer reviews (if the manuscript has been peer-reviewed), automatically transferred for consideration by the Editor of Immunity, Inflammation and Disease. Authors will not need to reformat or rewrite their manuscript at this stage, and publication decisions will be made a short time after the transfer takes place.

4. New Publication Charges:

As of 1st of February 2019, all color figures will be published at no extra charge.

For Authors who do not wish to publish their articles Online Open publication charges are as follows (plus tax where applicable):

- Euro 500 for Technical Comments/Letters
- Euro 1000 for Short Communications longer than 5 pages
- Euro 1600 for Research Articles longer than 7 pages

For Authors who wish to publish their articles Online Open the publication charges are included in the Online Open fee of Euro 3000.

If you want any further information on these recent initiatives or would like to comment on them, please contact the editorial office (ejied@wiley.com).

We thank you for submitting your manuscript to the European Journal of Immunology.

Yours sincerely,

The Editorial Team
European Journal of Immunology

e-mail: ejied@wiley.com

www.eji-journal.eu

Get the latest articles delivered directly to your desktop ! Register now for the free Wiley Alerting Service at <http://onlinelibrary.wiley.com/myprofile/alertManager>

European Journal of Immunology

Pregnancy levels of estrogen and progesterone contribute to humoral immunity by activating TFH/B cell axis.

Journal:	<i>European Journal of Immunology - 2</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Monteiro, Clarice; Microbiology and Parasitology Kasahara, Taissa Sacramento, Priscila; Microbiology and Parasitology Dias, Aleida Leite, Simone; Fernando Figueiras Institute Silva, Vander; Oswaldo Cruz Foundation Gupta, Sudhir; University of California Irvine Agrawal, Anshu; University of California Irvine Bento, Cleonice; Microbiology and Parasitology; Federal University of Rio de Janeiro
Keywords:	Antibodies, B cells, CD4 T cells, Regulatory T cells

SCHOLARONE™
Manuscripts

**Pregnancy levels of estrogen and progesterone contribute to humoral immunity
by activating T_{FH}/B cell axis**

Running title

Estrogen and progesterone modulate T_{FH}/B cell axis

Clarice Monteiro^{a,b,*}, Taissa Kasahara^{a,b,*}, Priscila M. Sacramento^a, Aleida Dias^{a,b},
Simone Leite^c, Vander G. Silva^c, Sudhir Gupta^d, Anshu Agrawal^d, Cleonice A. M.
Bento^{a,c}

From the ^aDepartment of Microbiology and Parasitology/ Federal University of the State
of Rio de Janeiro; ^bPost-graduate Program in Microbiology/University of the State of
Rio de Janeiro, ^cFernando Figueiras Institute /IOC, Rio de Janeiro, Brazil; ^dDepartment
of Medicine, University of California, Irvine, CA, USA.

* The first two authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Dr. Cleonice A. M. Bento, Department of Microbiology and
Parasitology, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Frei Caneca 94; 20.261-
040, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel.: + 55-21-2531-7906; Fax: + 55-21-2531-7906; e-
mail address: cbento@globocom

Keywords: T_{FH} cells, B cells, estrogen, progesterone, anti-HBsAg IgG

ABBREVIATIONS

Bcl-6 - Transcription factor B cell lymphoma-6

CMV - Cytomegalovirus

cT_{FH} – circulating T follicular helper

cT_{FR} – circulating follicular regulatory T cells

E2 – 17 β -estradiol

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

ER – estrogen receptor

GC - Germinal center

HbsAg - Hepatitis B superficial antigen

HBV - Hepatitis B virus

HIV - Human immunodeficiency virus

ICOS - Inducible T-cell co-stimulator

IgG - Immunoglobulin G

IL - Interleukin

mAbs - Monoclonal antibodies

nPW - Non-pregnant women

P4- progesterone

PD-1 - Programmed cell death receptor-1

PMA - Phorbol 12-myristate 13-acetate

PW - Pregnant women

Th - T helper

Abstract

Circulating T_{FH} (cT_{FH}) cells express CXCR5, PD-1 and, when activated, ICOS and release IL-21. According to the production of IFN- γ , IL-4 and IL-17 and expression of FoxP3, these cells are also classified as cT_{FH1}, cT_{FH2}, cT_{FH17} and cT_{FR} cells, respectively. This CD4⁺T-cell subset is pivotal to efficient humoral immunity, and pregnancy appears to favor IgG production. Here, not only pregnancy amplified the *in vivo* production of anti-HBsAg IgG in HBV immunized women, but the frequency of cT_{FH} cells was directly correlated with estradiol levels. *In vitro*, pregnancy-related dose of 17- β -estradiol (E2) directly increased the percentage of different cT_{FH} subsets. While E2 and progesterone (P4) increased the proportion of differentiated T_{FH} cells derived from naïve CD4⁺T-cells, only E2 amplified the release of IL-21 in those cell cultures. In addition, E2 and P4 increased the proportion of memory B cells and plasma cells, respectively. In SEB-activated B/T_{FH} cell co-cultures, E2, in the presence of P4, increased the production of total IgG. Finally, among the hormones, P4 was stronger in up regulating the percentage of IL-10⁺T_{FR} cells. Collectively, our findings suggested that E2 and P4 cooperate in the humoral immune response by favoring the expansion of different cT_{FH} and B cell subsets.

Introduction

Human follicular helper T (T_{FH}) cells represent a distinct subset of $CD4^+$ T-cells found in secondary lymphoid organs. They are identified by a high expression of the transcription factor B cell lymphoma-6 (Bcl-6), programmed cell death receptor-1 (PD-1), inducible T-cell co-stimulator (ICOS) and chemokine receptor CXCR5, and associated with the production of their signature cytokine, the IL-21.¹⁻⁴ The interaction of T_{FH} with B cells is facilitated by the production of CXCR5 ligand, the CXCL13 chemokine, by follicular cells associated with reduced expression of CCR7.⁵ In addition to ICOS/ICOSL, at the T_{FH}/B cell level, positive signals are also triggered through CD154/CD40 and IL-21/IL-21R interactions.⁶⁻⁸ Furthermore, T_{FH} cell-derived IL-4 promotes B cell survival through inhibition of cell apoptosis⁹⁻¹¹, and IL-10 and IL-6 that promote plasma cell differentiation¹²⁻¹⁴ contribute to germinal center (GC) reaction. Functionally, mature T_{FH} cells up-regulate humoral immunity by supporting proliferation, survival, affinity maturation, and differentiation of B lymphocytes into antibody-producing plasma cells and long-lived memory B cells.¹⁻⁴ Additionally, GC- T_{FH} cells are important for the process of heavy chain class switching of antibodies.¹⁻⁴ Another GC- T_{FH} cell subset, called natural follicular regulatory T (T_{FR}) cells ($CXCR5^+Bcl-6^+FoxP3^+CD4^+$), has been implicated in tolerance and regulate the production of autoantibodies and autoantibodies-mediated autoimmune disease.^{15,16}

Circulating T_{FH} (cT_{FH}) and T_{FR} (cT_{FR}) cells have been identified among the pool of memory Bcl-6⁻ $CD4^+$ T-cells.^{17,18} According to the expression of CXCR3 and CCR6 markers, cT_{FH} cells are classified as cT_{FH1} ($CXCR5^+CXCR3^+CCR6^-$), cT_{FH2} ($CXCR5^+CXCR3^-CCR6^-$) and cT_{FH17} ($CXCR5^+CXCR3^-CCR6^+$), all of them able to efficiently induce antibody response by memory B cells.¹⁹ In addition to IL-21, these

different cT_{FH} subsets can also produce, albeit in lower amounts, IL-4 (cT_{FH2}), IFN- γ (cT_{FH1}) and IL-17 (cT_{FH17}).^{20,21} The expression of PD-1 and ICOS (less than 1% of cT_{FH} cells) identifies a more efficient cT_{FH} cell subset.^{17,18} cT_{FR} cells are identified by intracellular expression of FoxP3.²²⁻²³ Several investigators have reported a positive association between the percentage of different subtypes of cT_{FH} cells and the production of neutralizing IgG against human immunodeficiency virus (HIV) and influenza.^{18,24-26} Recently we have shown that pregnancy favors the expansion of cT_{FH} cells, that was directly associated with increased plasma anti-HBsAg IgG titers following HBV immunization in healthy²⁷ and HIV-1-infected pregnant women.²⁸ Furthermore, there was a positive correlation with the plasma levels of estrogen (E2) but not with progesterone levels (P4).^{27,28}

E2 and P4 are produced throughout pregnancy by the placenta with levels increasing steadily until just prior to delivery. High levels of both hormones are pivotal to fetal tolerance through inhibition of potentially embryotoxic maternal CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, as well as Th1 and Th17 cells.^{29,30} This phenomenon depends on the functional expression of intracellular receptors for E2 isoforms (ER α and ER β) and P4 [PR and glucocorticoid (GR)] on immune cells able to regulate the transcription of different genes.³¹⁻³⁵ In addition to inhibiting the expression of pro-inflammatory cytokines³³⁻³⁵ E2 and P4 increased the number and functional status of FoxP3⁺ and FoxP3⁻ regulatory T cells,³⁴⁻³⁷ thus helping to prevent fetus rejection. On the other hand, pregnancy appears to favor humoral response.^{38,39} Studies have suggested that this event is due to the capacity of E2, via ER α , to promote B cell differentiation and immunoglobulin (Ig) production.⁴⁰⁻⁴³ In the context of normal pregnancy, this biological phenomenon should help to increase fetal protection against different pathogens from maternal IgG placental transfer.⁴⁴ We have previously reported ^{27,28} a positive correlation between

plasma E2 levels with cT_{FH} cell subsets in pregnant women. In the present study, we not only demonstrated that pregnancy amplifies the production of anti-HBV IgG following HBsAg immunization, but we also demonstrated, for the first time, the ability of 17 β -estradiol (E2) in directly favoring the expansion of T_{FH} cell subsets and IgG production. Furthermore, this hormone amplified *in vitro* T_{FH} differentiation and IL-21 production from circulating naïve CD4⁺ T-cells. Finally, both E2 and P4 up-regulated the proportions of T_{FR} cells, which could help to prevent autoreactive B cell activation.

Results

Pregnancy-related levels of estradiol correlated with circulating T_{FH} in women immunized against HBV

Our previous study demonstrated that pregnancy favors the expansion of circulating T_{FH} (cT_{FH}) cells.²⁷ Here, taking into account the gate strategy showed in the figure 1A, no difference was observed regarding the percentage of peripheral $CXCR5^+CD4^+$ T cells, expressing or not PD-1 (Fig. 1B) and IL-21 (Fig. 1C), between non-pregnant women (nPW) and pregnant women (PW) in the first five weeks of pregnancy, just before receiving HBV vaccination (t0). Nevertheless, 6 months after immunization (t1), the frequency of those cells, mainly the IL-21⁺PD-1⁺ subset, was significantly higher in the peripheral blood of PW (Fig. 1B and 1C). As expected, among women, mean plasma levels of estradiol [nPW (78.50 ± 28 pg/mL) and PW in the third trimester (5,761 ± 1,133 pg/mL)] and progesterone [nPW (4.1 ± 1.8 ng/mL) and PW in the third trimester (57.5 ± 14.9 ng/mL)] were higher in the pregnant group. Moreover, the *in vivo* estradiol levels were positively correlated with the frequency of IL-21⁺PD-1⁺ $CXCR5^+CD4^+$ T cells only in PW in the third trimester (Fig. 1E). No relationship was observed between progesterone concentrations and this cell subset in the peripheral blood of nPW (Fig. 1D) and PW (Fig. 1E). Although only nPW did not reach 10 UI/mL of anti-HBsAg IgG, pregnancy clearly amplified the *in vivo* production of these neutralizing antibodies following immunization (Fig. 1F).

17- β -estradiol and progesterone modulate differently non- cT_{FH} and cT_{FH} cell subsets

The co-expression of CXCR5 and PD-1 is used to identify cT_{FH} cells.¹⁻⁴ Following the gate strategies shown in Figure 2A, we observed that 17- β -estradiol (E2), but not progesterone (P4), increased the percentage of T_{FH} cells among $CD4^+$ T-cells in PBMC

cultures activated via TCR/CD28 (Fig 2B). In addition, E2 increased the frequency of ICOS⁺ cells (Fig, 2C). A similar but less impressive effect was observed in cultures treated with 1ng/mL of E2 (data not shown).

With regard to the cytokine profile, E2 but not P4, increased the proportion of cT_{FH} cells positive for IL-21 and to a lesser extent IL-17, with no change in frequency of IL-4⁺ or IFN- γ ⁺ cell subsets (Fig 2D). Concerning the role of both hormones on cytokine-producing non-cT_{FH} cells, pregnancy-related doses of P4 but not E2, significantly reduced the percentage of CXCR5⁺CD4⁺ T-cells capable of producing IL-4 and IL-17 (Fig. 2E). The frequency of IL-21⁺ non-cT_{FH} cells was low and was not affected by either hormone. Both E2 and P4 reduced the proportion of the IFN- γ ⁺ subset (Fig. 2E). On the other hand, P4 elevated the frequency of IL-10-producing non-T_{FH} cells mainly in the presence of E2 (Fig.2E).

Neither E2 nor P4 altered the proportion of T_{FR} cells (CXCR5⁺FoxP3⁺CD4⁺ T-cells) (Fig. 3A and 3B). However, E2 and mainly P4, significantly up regulated the percentage of IL-10⁺ T_{FR} cells (Fig. 3A and 3C). E2 also significantly increased the frequency of IL-10- secreting FoxP3⁺CXCR5⁺T_{FH} cells (Fig 3A and 3D); this effect was potentiated by the addition of P4. No changes were observed in cell cultures maintained in the presence E2 and/or P4 alone (data not shown).

17- β -estradiol and progesterone elevated the in vitro frequency of differentiated T_{FH} cells

In order to determine the ability of both hormones in modulating the *in vitro* differentiation of T_{FH} cells, naïve CD4⁺ T-cells were activated for 5 days in the presence of conditioning cultures containing a combination of recombinant human cytokines IL-12, IL-23 and TGF- β ⁴⁵ with or without E2 and/or P4⁴⁶. As shown in Figure 4A and C,

the addition of E2 and P4 elevated the proportion of cT_{FH} cells. By contrast, only E2 amplified the release of IL-21 (Fig. 4D). Neither hormone had any significant effect on the percentages of differentiated T_{FH}1 (CXCR3⁺CCR6⁻), T_{FH}2 (CXCR3⁻CCR6⁻) and T_{FH}17 (CXCR3⁻CCR6⁺) (4B).

The effects of hormones on B cell subsets and in vitro IL-21 and IgG production

It is known that E2 and P4 can modulate B cell activation^{47,48} and plasma cell generation.⁴⁹ In the present study, following the strategy shown in Figure 5A, the addition of E2 plus P4 led to a reduction in the percentage of naïve B cells (CD19⁺IgD⁺CD27⁻) in PBMC cultures activated with SEB (Fig. 5B). The memory B cell subset (CD19⁺IgD⁻CD27⁺) was up-regulated by E2, but not P4 (Fig 5C). P4 significantly reduced the proportion of plasmablasts (Fig. 5D), and by contrast, increased the frequency of plasma cells in SEB-activated PBMC cultures (Fig. 5E).

As T_{FH} cells help B cells to generate antibody-producing plasma cells¹⁻⁴, our objective was to evaluate the ability of those hormones in modulating the *in vitro* production of IgG in T_{FH}/B cell co-cultures activated with SEB. E2, in the presence of P4, increased the production of total IgG (Figure 6A). Furthermore, E2 also increased the production of IL-21 (Fig 6B).

The analysis of cT_{FH} cell frequency in women and men

We also analyzed the frequency of cT_{FH} cells at baseline between men and women. No significant difference was observed in CXCR5⁺PD-1⁺CD4⁺ T-cells between men and women (Fig. 7A and 7B). Our preliminary data show that the expression of E2 (ER α) receptor in CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺ subset, by Real time PCR, in a female sample was higher as compared to its expression in CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁻ subset (Fig. 7C).

Moreover, the extent of ER α expression was also higher in a female sample when compared with a male sample. The PGR expression was almost absent in CXCR5⁺ CD4⁺T cells from a male (Fig. 7C).

Discussion

Both 17 β -estradiol (E2) and progesterone (P4) alter the function of many body systems including the immune system. While P4 exerts essentially immunosuppressive actions, immune effects of E2 are concentration- and context-dependent.⁵⁰⁻⁵³ In physiological concentrations, E2, via ER α , amplified many immune events, such as TCR-stimulated T-cell activation and expression of MHCII,^{54,55} expression of CD40 and CD86⁵⁶ on human myeloid DCs, as well as DC-derived IL-6, IL-23 and IL-12 production in response to TLR ligands.⁵⁷ Nonetheless, like P4, pregnancy-related doses of E2 downregulate some effector T cell-dependent inflammatory processes.^{58,59} Pregnancy favors humoral responses⁴⁰⁻⁴³, and, the findings obtained in the present study suggest that this phenomenon is mainly related to the property of E2 to modulate the proportion of different circulating T_{FH} (cT_{FH}) cell subsets.

Taking into account the co-expression of CXCR5, PD-1 markers, we observed a direct correlation between the plasma estradiol levels, but not progesterone, and the frequency of IL-21-producing cT_{FH} cells in PW in the third trimester. Further, after completing the hepatitis B immunization schedule, the plasma titers of anti-HBsAg IgG were also higher in PW as compared with nPW. Although we have not analyzed the frequency of cells in the second semester of pregnancy, these findings, along with other studies^{27,28,40-43}, suggest that pregnancy-related levels of estradiol should improve the cT_{FH} cell function. Indeed, here, E2, but not P4, directly increased the frequency of both cT_{FH} (PD1⁺CXCR5⁺) and ICOS⁺T_{FH} cell subsets in PBMC cultures containing polyclonally-activated T cells. The expression of ICOS on activated T cells, and signaling via ICOS-ICOSL interactions are critical for T_{FH} cell differentiation and GC formation.⁶⁰ The study by Rider *et al*⁶¹ revealed the ability of E2 to increase CD40L (CD154) expression on CD4⁺ T cells. It is possible that, in addition to up-regulating

ICOS, E2 also increases CD40 ligand (CD154) expression on T_{FH}. In addition to ICOS and CD154, some cytokines, particularly IL-21 released by T_{FH} cells, have also been implicated in B cell activation and antibody class switching.^{62,63} Along with IL-21, small amounts of IL-4, IL-17 and IFN- γ can also be produced by cT_{FH2}, cT_{FH17} and cT_{FH1} cell subsets, respectively.⁶⁴ In agreement with published literature^{5,65} regarding cytokine profiles, most T_{FH} cells from healthy women were positive for IL-21, and E2 but not P4, increased the proportion of IL-21 and IL-17 producing cells without any changes in the percentage of cT_{FH1} or cT_{FH2} cells. In comparison with cT_{FH1} cells, cT_{FH2} and cT_{FH17} phenotypes are known to provide efficient help to naïve B cells.¹⁹ It is known that IL-4⁺IL-21⁺CXCR5⁺CD4⁺ T-cells positively correlated with total IgE in the blood of allergic patients,^{66,67} and the absence of E2 effect on this phenotype in the present study is related to exclusion criteria applied to our cohort, whereby none of the women recruited for the study suffered from any allergic disease. However, the inability of E2 to modulate the *in vitro* cT_{FH1} cell subset may also be associated with lower IFN- γ production during pregnancy. Indeed, high E2 and P4 levels reduced the frequency of CXCR5⁻ Th1-like cells. Moreover, P4 but not E2 decreased the proportion of non-T_{FH} cells positive for IL-21, IL-4 and IL-17. These results suggested that E2 and P4 have different immunomodulatory effects in non-T_{FH} and T_{FH} cells. Lower IFN- γ production by Th1-like cells should be pivotal to preventing fetus rejection by embryotoxic maternal effector CD4⁺ T and CD8⁺ T cells,^{29,30} but this phenomenon should contribute to known maternal susceptibility to infection by intracellular pathogens⁶⁸⁻⁷¹ Finally, the ability of pregnancy-related doses of E2 and P4 in controlling IFN- γ production can also explain why pregnancy is typically a stabilizing period in the clinical course of multiple sclerosis^{72,73}, a demyelinating autoimmune disease of the central nervous system.

During the third trimester of pregnancy, the MS relapse rate can be 70% lower when compared with the period prior to pregnancy.⁷⁴

In addition to reducing pro-inflammatory cytokines, the highest frequency of IL-10⁺non-T_{FH} cells was seen in cell cultures stimulated in the presence of E2 and P4. Although we did not analyze FoxP3 expression, these observations are in agreement with other studies that demonstrate the ability of pregnancy-related doses of E2 and P4 to favor the expansion of IL-10⁺CD25⁺FoxP3⁺ CD4⁺ Tregs.³⁴⁻³⁷ E2 and P4 modulated the proportion of different subtypes of IL-10-secreting T_{FH} cells. While E2 and P4 increased the proportion of the IL-10⁺T_{FR} phenotype, identified by additional expression of FoxP3, only E2 increased the percentage of IL-10⁺FoxP3⁺T_{FH} cells. It is known that T_{FR} cells are particularly important in the suppression of autoreactive B cell responses.⁷⁵ However, FoxP3⁺IL-10⁺ T_{FH} cell subset can promote GC response.^{19,76,77} Therefore, during normal pregnancy it is possible that cT_{FR} expansion controls production of autoantibodies rather than reducing maternal Ig production against different pathogens. In fact, a direct correlation between plasma estrogen levels with both frequencies of IL-21-secreting T_{FH} cells and *in vivo* anti-HBsAg IgG production following HBV immunization was observed in both healthy and HIV-1-infected pregnant women.^{27,28} In the present study, E2, mainly in the presence of P4, directly increased IgG production by B cells co-cultured with purified cT_{FH} cells. Further, in the supernatants of these cultures, higher IL-21 levels were quantified after the addition of E2. Interestingly, in SEB-activated PBMC cultures, while E2 elevated the percentage of memory B cells, P4 reduced the proportion of plasmablasts but enhanced the percentage of plasma cells. In line with our study, another study published by Parr and Parr⁵⁰ in ovariectomized mice demonstrated the ability of P4 to elevate the number of plasma cells in the uterus at the outset of pregnancy. Here, the capacity of P4 to

elevate *in vitro* plasma cells, coupled with its inability to increase IgG production in the absence of E2, suggests that both hormones are necessary for optimal humoral immune response.

The effects of hormones depend not only on their concentrations, but also on the cell maturation stage. In the present study, although P4 did not change the percentage of CXCR5⁺PD-1⁺ CD4⁺ T-cells in activated PBMC cultures, it did amplify just like E2, the differentiation of circulating naïve CD4⁺ T-cells into T_{FH} cells; no changes were observed in the proportion of T_{FH1}, T_{FH2} and T_{FH17} subsets. E2 also increased the levels of IL-21. These results suggested that during pregnancy these hormones can boost maternal neutralizing antibody production following maternal primary immunization. The differential effects of P4 on naïve CD4⁺ T cells could be related to the differential expression of the receptor for this hormone. Regardless of the existence of membrane isoforms, the biological effects of E2 and P4 effects are mainly mediated by intracellular ER (α and β) isoforms and PGR, respectively.^{78,79} In humans, ER α signaling increases the production of B cell activating factor (BAFF), a vital cytokine for survival and maturation of B cells,⁴⁸ as well as increasing immunoglobulin production.^{80,38} Interestingly, estrogen response elements (ERE) region for ER α was identified within the heavy chain switch (S) regions, indicating that this hormone can directly regulate class switch recombinations.⁴² In the present study, quantification of ER α and PGR via Real time PCR in one woman from our cohort demonstrated a higher expression of ER α on CD45RA⁻CXCR5⁺CD4⁺ T-cells when compared with CD45RA⁻CXCR5⁻ ones. Further, the expression of ER α on T_{FH}-like cells was lower in a sample collected from a male subject as compared to the woman, although T_{FH} cell frequency presented no difference at baseline. The expression of these receptors in women and

men needs to analyze in a larger number of subjects before a definitive statement can be made for gender differences.

During normal pregnancy, a delicate balance between T_{FH} and T_{FR} phenotypes is probably important to avoid immune disorders mediated by excessive antibody production. Indeed, mice deficient in T_{FR} cells developed late-onset spontaneous autoimmune diseases mediated by antibodies.⁸¹ Sex differences in T_{FH} cells help B cells contribute to sexual dimorphism in severity of experimental model for rheumatoid arthritis.⁸² Moreover, uncontrolled IgG production in animals lacking functional ER α on CD4⁺ T-cells⁸³ should also be related to a loss of functional T_{FH} cells. Furthermore, an imbalance of T_{FR} and T_{FH} cells could result in abnormal germinal center response and contribute to progression of pathogenesis of autoimmune diseases, as observed in lupus.⁸⁴ In the murine model of lupus and patients, E2 treatment led to increased serum anti-dsDNA IgG, and peripheral lymphoid expansion of high-affinity antibody-positive B cells.^{85,86} In humans, production of high levels of pro-inflammatory cytokines and placental transfer of these anti-dsDNA IgG can complicate pregnancy with an increased risk of miscarriage, premature delivery, and preeclampsia, as well as heart problems in the newborn.⁸⁷

In summary, our findings suggested that a combined and balanced effect of high E2 and P4 levels on the non- T_{FH} and T_{FH}/T_{FR} axis is important not only to prevent fetal rejection but, also, to increase fetal protection against different pathogens from immunized maternal IgG placental transfer by booster functional cT_{FH} cell subsets.

Materials and methods

Subjects

For our study peripheral blood was collected from 30 healthy female volunteers (20 to 35 years old) after completing a self-administered questionnaire regarding their menstrual status, reproductive history and use of oral contraceptives. Women with regular menstrual cycles (28 ± 2 days) who had not taken hormone-containing medication in the last 3 months were recruited for the study. In order to attenuate interaction of endogenous E2 and P4 with the *in vitro* immune assays, blood samples were taken at the beginning of the follicular phase of the menstrual cycle (days 6-7). As we aimed to evaluate the impact of pregnancy on the immunization against hepatitis B virus (HBV), pregnant (n=10) or not pregnant (n=10 from 30 healthy female volunteers) women, who were not previously immunized to this virus (anti-HBsAg IgG less than 10 UI/ml), received a three-dose hepatitis B vaccine schedule. The evaluation of anti-HBsAg IgG and T_{FH} cells was performed just before (t0) and 15 days (t1) after the application of the last dose of the vaccination schedule (approximately 6 after the first dose). For some assays, blood samples from 20 age-matched healthy men were also collected. In the present study, subjects with autoimmune and allergic diseases or cancer, immunocompromised individuals, smokers, illicit substance users, and those with a clinical or serological indication of acute or chronic disease, such as influenza, HCV, HBV and HIV-1/2 were excluded. The subjects were recruited from the Federal University of the State of Rio de Janeiro, Fernando Figueiras Institute /IOC, and the Institute for Immunology/University of California (UC/Irvine), with written consent being obtained from all subjects.

Peripheral blood mononuclear cell cultures

Peripheral blood was collected in heparin-containing tubes (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NY) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by centrifugation on the Ficoll–Hypaque density gradient. Fresh viable PBMC (1×10^6 /mL) were cultured in 24-well flat-bottomed microplates with 2 mL of AIM-V serum free medium without phenol red (ThermoFisher Scientific Inc.) and stimulated with anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads™ (10 μ L/mL) for 3 days or with 1 μ g/mL of Staphylococcal enterotoxin B (SEB) from *Staphylococcus aureus* (Sigma-Aldrich Co) for 6 days. The effects of hormones on cT_{FH} cells were evaluated after addition of pregnancy-related doses⁸⁷ of 17 β -estradiol (E2, 5 ng/ml) and/or Progesterone (P4, 50 ng/mL) (Sigma-Aldrich Inc.) at the beginning of cell cultures. In order to optimize the detection of intracellular cytokines, PBMC cultures were stimulated with phorbolmyristate acetate (PMA, 20 ng/mL; Sigma-Aldrich) plus Ionomycin (600 ng/mL; SigmaAldrich) for 4 hours in the presence of brefeldin A (10 μ g/mL) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). The cell cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator.

Flow Cytometry

To determine the percentage of different cT_{FH} and B-cell subtypes, we used mouse anti-human monoclonal antibodies (mAbs) directed against surface (CD3-APC/FITC, CD4-FITC/PECy7, CD19-FITC/APC, CXCR5-PECy7/PerCPCy5.5/Alexa Fluor 488, CCR6-PE, CXCR3-PECy7/BV421, PD1-APC/PECF594, CD45RA/PECy7, ICOS-BB515/PE/BV786, CD3-APC/PE, CD38-PE, CD138-PECy7, IgD-PECy7 and CD27-FITC/PE) and intracellular (IL-21-PE/APC, IFN- γ -APC, IL-10-APC, IL-17-PECy7, IL-4-APC, IL-6-PE, FoxP3-PE) markers. Antibodies and isotype controls were purchased from BioLegend (San Diego, CA, USA). Briefly, the cells were incubated

with various combinations of mAbs for 30 minutes at room temperature in the dark, according to manufacturer's instructions. The cells, washed with phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin, were permeabilized by incubating them with Cytotfix/Cytoperm solution (BD Pharmigen, San Diego, CA) at 4°C for 20 minutes. The mAbs for intracellular staining were incubated for 30 minutes at 4 °C. The cells were acquired on Attune NxT Flow Cytometer (ThermoFisher Scientific Inc.), Accuri C6 (Accuri™ Ann Arbor, MI, USA) or FACS LRS II Fortessa (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and analyzed by using ©FlowJo or Cflow Software. Isotype control antibodies and single-stained samples were used to periodically check the settings and gates on the flow cytometer. After acquisition of 100,000 to 200,000 events, lymphocytes were gated based on forward and side scatter properties after the exclusion of dead cells and doublets.

In vitro differentiation of T_{FH} cells

Naïve CD4⁺ T-cells were obtained from PBMCs by negative selection using magnetic columns according to manufacturer's instructions (EasySep™, StemCell Technology, Canada). The purity of CD4⁺ T-cell was > 98%, as measured by flow cytometry (data not shown). To induce T_{FH} cell differentiation, 0.8 x 10⁶ of naïve CD4⁺ T-cells were resuspended in 2 mL of AIM-V serum free medium without phenol red (ThermoFisher Scientific Inc.) and stimulated in 24-well flat bottom tissue culture plates with anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads™ (10 µL/mL) plus the recombinant human IL-12 (0.5ng/mL), IL-23 (25 ng/mL) and TGF-β (5 ng/mL).⁸⁸ In some wells, E2 (5 ng/ml) and/or P4 (50 ng/mL) (Sigma-Aldrich Inc.) were added at the beginning of cell cultures. The cell cultures were maintained for 5 days at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator.

T_{FH}/B cell co-culture assays

For cT_{FH} and B cell cocultures, T_{FH} cells were sorted as CD4⁺CXCR5⁺CD45RA⁻ after staining PBMC with CD4/PerCP, CXCR5/Alexa Fluor 488 and CD45RA/APC. The sorting was conducted using BD FACS ARIA II (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). To acquire B cells, PBMCs were submitted to negative selection using magnetic bead based kits according to manufacturer's instructions (EasySep™, StemCell Technology, Canada). The cells were resuspended in AIM-V serum free medium without phenol red (ThermoFisher Scientific Inc.). Using a round bottom 96-well plate, cT_{FH} (1 x 10⁴/100 µL) and B (2x 10⁴/100 µL) cells were stimulated with 1µg/mL of Staphylococcal enterotoxin B (SEB) from *Staphylococcus aureus* (Sigma-Aldrich Co) with or without hormones [E2 (5 ng/mL) and P4 (50 ng/ml)] (Sigma-Aldrich Inc.) The cells were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator for 6 days. Just prior to analyzing the cells by flow cytometry, the supernatants were collected for quantification of IL-21 and total IgG via ELISA.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay

The quantification of IL-21 and total IgG antibodies in supernatants of SEB-activated T_{FH}/B cell co-cultures were performed using ELISA kits (Invitrogen, ThermoFischer), according to manufacturer's instructions. Recombinant human IgG, at concentrations ranging from 1.6 to 100 ng/mL, were used to construct the standard curve. Results concerning IL-21 were interpolated from a standard curve plotted using recombinant human IL-21 ranging from 78 to 5,000 pg/mL. Peripheral progesterone and estradiol levels were also measured using Abcam's ELISA kit (Cambridge, USA), according to manufacturers' instructions. Reagents supplied by the manufacturer were

used to construct the standard curve from 0–1,000 pg/mL for estrogen and 0–40 ng/mL for progesterone. The anti-hepatitis B (HBsAg) titers were determined through ELISA kits [Bioclin (Belo Horizonte, BRA), according to manufacturers' instructions. Reagents supplied by the manufacturer were used to construct the standard curve from 0–500 mUI/mL to anti-HBsAg IgG.

Real Time PCR

For the quantification of estradiol and progesterone human receptor expression in T_{FH} and non- T_{FH} cells, 1×10^6 T_{FH} (CD45RA⁺CXCR5⁺CD4⁺) and non- T_{FH} (CD45RA⁺CXCR5⁻CD4⁺) cells were sorted from PBMCs according to the previous protocol using BD FACS ARIA II (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). The total RNA was extracted using a Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp.), according to manufacturer's instructions. cDNA was prepared using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was performed with SYBR Green PCR Master Mix on a CFX96 Real-Time PCR system (Bio-Rad), as per manufacturer's instructions, using gene-specific primers for human Estrogen Receptor 1 (ESR-1/ER α), Progesterone Receptor (PGR) , and GAPDH (as internal control) (see Table 1, for a list of all primers). Relative gene expression was quantified by normalizing Ct values with the corresponding GAPDH value. The specific primers used in this study for ESR-1, PGR and GAPDH were: ESR-1 sense 5'- GAA AGG TGG GAT ACG AAA AGA CC-3', antisense 5'- GCT GTT CTT CTT AGA GCG TTT GA-3'; PGR sense 5'-ACCCGCCTTATCTCAACTACC-3', antisense 5'-AGG ACA CCA TAA TGA CAG CCT-3'; GAPDH sense 5'- CTA CAG CAA CAG GGT GGT GG-3', anti-sense 5'- TAT GGG GGT CTG GGA TGG-3'. Data were reported as the relative expression normalized to the housekeeping gene GAPDH.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA). To compare >2 groups (control, E2, P4, E2 + P4), we used two-way ANOVA. The nonparametric Mann-Whitney U test and the Student's t-test were applied to determine whether the two groups were statistically different for nonparametric and parametric variables, respectively. We used Spearman and Pearson's correlation coefficient test to determine the relation of different hormones and cT_{FH} cells, as appropriate. Significance in all experiments was defined as $p < 0.05$.

Acknowledgments: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa Carlos Chagas Filho (FAPERJ, grant number: E-26/202.940/2017) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number: 301.780/2017-0).

Authorship contribution: C.A.M.B, S.G, A.A. and C.M. designed and performed research, and wrote the paper; T.M.K, P.M.S and A.D. contributed to experimental assays and analysis of the data.

Disclosure of conflict of Interest

All authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. **Schaerli, P.; Willimann, K.; Lang, A.B.; Lipp, M.; Loetscher, P.; Moser, B.** CXCR5 chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med.* 2000;**192**:1553-1562.
2. **Victora, G.D.; Schwickert, T.A.; Fooksman, D.R.; Kamphorst, A.O.; Meyer-Hermann, M.; Dustin, M.L.; Nussenzweig, M.C.** Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell.* 2010;**143**:592-605.
3. **Chtanova, T.; Tangye, S.G.; Newton, R.; Frank, N.; Hodge, M.R.; Rolph, M.S.; Mackay, C.R.** Follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol.* 2004;**173**:68-78.
4. **Crotty, S.** Follicular helper CD4 T cells (T_{FH}). *Annu Rev Immunol.* 2011;**29**:621-663.
5. **Crotty, S.** T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity.* 2019 May 21;**50**(5):1132-1148.
6. **Choi, Y.S.; Kageyama, R.; Eto, D.; Escobar, T.C.; Johnston, R.J.; Monticelli, L.; Lao, C.; Crotty, S.** ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity.* 2011;**34**, 932–946.
7. **Schwickert, T.A.; Victora, G.D.; Fooksman, D.R.; Kamphorst, A.O.; Mugnier, M.R.; Gitlin, A.D.; Dustin, M.L.; Nussenzweig, M.C.** A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *J. Exp. Med.* 2011; **208**:1243–1252.

8. **Yeh, C-H.; Nojima, T.; Kuraoka, M.; Kelsoe, G.** Germinal center entry not selection of B cells is controlled by peptide-MHCII complex density. *Nat. Commun.* 2018; **9**:928.
9. **Wurster, A.L.; Rodgers, V.L.; White, M.F.; Rothstein, T.L.; Grusby, M.J.** Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL. *J Biol Chem.* 2002 Jul 26; **277**(30):27169-75.
10. **Kitano, M.; Moriyama, S.; Ando, Y.; Hikida, M.; Mori, Y.; Kurosaki, T.; Okada, T.** Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity.* 2011; **34** (6):961–972.
11. **Johnston, R.J.; Poholek, A.C.; DiToro, D.; Yusuf, I.; Eto, D.; Barnett, B.; Dent, A.L.; Craft, J.; et al.** Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science.* 2009; **325** (5943):1006–1010.
12. **Eto, D.; Lao, C.; DiToro, D.; Barnett, B.; Escobar, T.C.; Kageyama, R.; Yusuf, I.; Crotty, S.** IL-21 and IL6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (T_{FH}) differentiation. *PLoS One.* 2011 Mar 14; **6**(3):e17739.
13. **Zander, R.A.; Xin, G.; Schauder, D.; Cui, W.** T follicular helper cell-derived IL-10 sustains humoral immunity during chronic viral infection. *J Immunol.* May 1 2017; **198** (1 Supplement) 122.2.
14. **Agematsu, K.; Nagumo, H.; Oguchi, Y.; Nakazawa, T.; Komiyama, A.** Generation of plasma cells from peripheral blood memory B cells: synergistic e

- ffect of interleukin-10 and CD27/CD70 interaction. *Blood*. 1998 Jan 1;**91**(1):173-80.
15. **Fonseca, V.R.; Ribeiro, F.; Graca, L.** T follicular regulatory (Tfr) cells: Dissecting the complexity of Tfr-cell compartments. *Immunol Rev*. 2019 Mar;**288**(1):112-127.
16. **Zhu, Y.; Zou, L.; Liu, Y.C.** T follicular helper cells, T follicular regulatory cells and autoimmunity. *Int Immunol*. 2016 Apr;**28**(4):173-9.
17. **Ueno, H.** Human Circulating T Follicular Helper Cell Subsets in Health and Disease. *J Clin Immunol*. 2016 May;**36 Suppl 1**:34-9.
18. **Locci, M.; Havenar-Daughton, C.; Landais, E.; Wu, J.; Kroenke, M.A.; Arlehamn, C.L.; Su, L.F.; Cubas, R., et al.** Human circulating PD-1⁺CXCR3-CXCR5⁺ memory T_{FH} cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity*. 2013. **39**:758–769.
19. **Morita, R.; Schmitt, N.; Bentebibel, S.E.; Ranganathan, R.; Bourdery, L.; Zurawski, G.; Foucat, E.; Dullaers, M.; et al.** Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*. 2011; **34**:108– 121.
20. **Sallusto, F.; Lenig, D.; Mackay, C.R.; Lanzavecchia, A.** Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1998; **187**:875–883.
21. **Acosta-Rodriguez, E.V.; Rivino, L.; Geginat, J.; Jarrossay, D.; Gattorno, M.; Lanzavecchia, A.; Sallusto, F.; Napolitani, G.** Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17- producing T helper memory cells. *Nature immunology*. 2007; **8**:639–646.

22. **Liu, C.; Wang, D.; Song, Y.; Lu, S.; Zhao, J.; Wang, H.** Increased circulating CD4⁺CXCR5⁺FoxP3⁺ follicular regulatory T cells correlated with severity of systemic lupus erythematosus patients. *Int Immunopharmacol.* 2018 Mar;**56**:261-268.
23. **Liu, C.; Wang, D.; Lu, S.; Xu, Q.; Zhao, L.; Zhao, J.; Song, Y.; Wang, H.** Increased Circulating Follicular Treg Cells Are Associated With Lower Levels of Autoantibodies in Patients With Rheumatoid Arthritis in Stable Remission. *Arthritis Rheumatol.* 2018 May;**70**(5):711-721.
24. **Lartey, S.; Zhou, F.; Brokstad, K.A.; Mohn, K.G.; Slettevoll, S.A.; Pathirana, R.D.; Cox, R.J.** Live-Attenuated Influenza Vaccine Induces Tonsillar Follicular T Helper Cell Responses That Correlate With Antibody Induction. *J Infect Dis.* 2020 Jan 1;**221**(1):21-32.
25. **Bentebibel, S.E.; Khurana, S.; Schmitt, N.; Kurup, P.; Mueller, C.; Obermoser, G.; Palucka, A.K.; Albrecht, A.A. et al.** ICOS⁽⁺⁾ PD-1⁽⁺⁾ CXCR3⁽⁺⁾ T follicular helper cells contribute to the generation of high-avidity antibodies following influenza vaccination. *Sci. Rep.* 2016;**6**:26494.
26. **Martin-Gayo, E.; Cronin, J.; Hickman, T.; Ouyang, Z.; Lindqvist, M.; Kolb, K.E.; Schulze Zur Wiesch, J.; Cubas, R.; et al.** Circulating CXCR5⁺CXCR3⁺PD-1^{lo} T_{FH}-like cells in HIV-1 controllers with neutralizing antibody breadth. *JCI Insight.* 2017;**2**:e89574.
27. **Monteiro, C.; Kasahara, T.M.; Castro, J.R.; et al.** Pregnancy favors the expansion of circulating functional follicular helper T Cells. *J Reprod Immunol.* 2017 Jun;**121**:1-10.

28. **Kasahara, T.M.; Monteiro, C.; Hygino, J.; et al.** Pregnancy favors circulating IL-21-secreting T_{FH}-like cell recovery in ARV-treated HIV-1-infected women. *Am J Reprod Immunol.* 2020 Feb;**83**(2):e13204.
29. **Chaouat, G.; Monnot, P.; Hoffmann, M.; Voisin, G.A.** Regulatory T cells in pregnancy. VI. Evidence for T-cell-mediated suppression of CTL generation toward paternal alloantigens. *Cell Immunol.* 1982 Apr;**68**(2):322-31.
30. **Deshmukh, H.; Way, S.S.** Immunological Basis for Recurrent Fetal Loss and Pregnancy Complications. *Annu Rev Pathol.* 2019 Jan 24;**14**:185-210. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012743.
31. **Tiwari-Woodruff, S.; Morales, L.B.; Lee, R.; Voskuhl, R.R.** Differential neuroprotective and antiinflammatory effects of estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta ligand treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Sep 11;**104**(37):14813-8. Epub 2007 Sep 4.
32. **Okabe, H.; Makino, S.; Kato, K.; Matsuoka, K.; Seki, H.; Takeda, S.** The effect of progesterone on genes involved in preterm labor. *J Repro Immunol.* 2014;**104-105**:80-91.
33. **Arenas-Hernandez, M.; Romero, R.; Xu, Y.; et al.** Effector and Activated T Cells Induce Preterm Labor and Birth That Is Prevented by Treatment with Progesterone. *The Journal of Immunology,* 2019, **202**: 000–000.
34. **Szekeres-Bartho, J.** The Role of Progesterone in Feto-Maternal Immunological Cross Talk. *Med Princ Pract.* 2018;**27**(4):301-307.
35. **Shah, N.M.; Imami, N.; Johnson, M.R.** Progesterone Modulation of Pregnancy-Related Immune Responses. *Front Immunol.* 2018 Jun 20;**9**:1293.

36. **Polanczyk, M.J.; Hopke, C.; Huan, J.; Vandembark, A.A.; Offner, H.** Enhanced FoxP3 expression and Treg cell function in pregnant and estrogen-treated mice. *J Neuroimmunol.* 2005 Dec 30; **170**(1-2):85-92. Epub 2005 Oct 25.
37. **Polanczyk, M.J.; Carson, B.D.; Subramanian, S.; Afentoulis, M.; Vandembark, A.A.; Ziegler, S.F.; Offner, H. J.** Estrogen drives expansion of the CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell compartment. *Immunol.* 2004 Aug 15; **173**(4):2227-30.
38. **Kanda, N.; Tamaki, K.** Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999; **103**:282–288.
39. **Fu, Y.; Li, L.; Liu, X.; et al.** Estrogen promotes B cell activation in vitro through down-regulating CD80 molecule expression. *Gynecol. Endocrinol.* 2011; **27** (8), 593–596.
40. **Bynoe, M.S.; Grimaldi, C.M.; Diamond, B.** Estrogen up-regulates Bcl-2 and blocks tolerance induction of naive B cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; **97**:2703–8.
41. **Hill, L.; Jegannathan, V.; Chinnasamy, P.; Grimaldi, C.; Diamond, B.** Differential roles of estrogen receptors α and β in control of B-cell maturation and selection. *Mol Med.* 2011; **17**:211–20. 43.
42. **Jones, B.G.; Penkert, R.R.; Xu, B.; Fan, Y.; Neale, G.; Gearhart, P.J.; et al.** Binding of estrogen receptors to switch sites and regulatory elements in the immunoglobulin heavy chain locus of activated B cells suggests a direct influence of estrogen on antibody expression. *Mol Immunol.* 2016; **77**:97– 102.
43. **Grimaldi, C.M.; Jegannathan, V.; Diamond, B.** Hormonal regulation of B cell development: 17 β -estradiol impairs negative selection of high-affinity

- DNAreactive B cells at more than one developmental checkpoint. *J Immunol.* 2006;**176**:2703–10.
44. **Palmeira, P.; Quinello, C.; Silveira-Lessa, A.L.; Zago, C.A.; Carneiro-Sampaio, M.** IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol.* 2012;**2012**:985646.
45. **Abbassi-Ghanavati, M.; Greer, L.G.; Cunningham, F.G.** Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. *Obstet Gynecol.* 2009 Dec;**114**(6):1326-31.
46. **Schmitt, N.; Liu, Y.; Bentebibel, S.E., et al.** The cytokine TGF- β co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human T_{FH} cells. *Nat Immunol.* 2014 Sep;**15**(9):856-65.
47. **Grimaldi, C.M.; Cleary, J.; Dagtas, A.S.; Moussai, D.; Diamond, B.** Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J Clin Invest.* 2002;**109**:1625– 33.
48. **Panchanathan, R.; Choubey, D.** Murine BAFF expression is upregulated by estrogen and interferons: implications for sex bias in the development of autoimmunity. *Mol Immunol.* 2013;**53** (1-2):15–23.
49. **Parr, M.B.; Parr, E.L.** Effects of oestradiol-17 beta and progesterone on the number of plasma cells in uteri of ovariectomized mice. *J Reprod Fertil.* 1986 May;**77**(1):91-7.
50. **Mohammad, I.; Starskaia, I.; Nagy, T.; et al.** Estrogen receptor α contributes to T cell mediated autoimmune inflammation by promoting T cell activation and proliferation. *Sci Signal.* 2018 Apr 17;**11**(526). pii: eaap9415.

51. **Dupuis, M.L.; Conti, F.; Maselli, A.; et al.**
The Natural Agonist of Estrogen Receptor β Silibinin Plays an Immunosuppressive Role Representing a Potential Therapeutic Tool in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.* 2018 Aug 17;**9**:1903.
52. **Arenas-Hernandez, M.; Romero, R.; Xu, Y.; et al.**
Effector and Activated T Cells Induce Preterm Labor and Birth That is Prevented by Treatment with Progesterone. *J Immunol.* 2019 May 1;**202**(9):2585-2608.
53. **Recalde, G.; Moreno-Sosa, T.; Yúdica, F.; et al.**
Contribution of sex steroids and prolactin to the modulation of T and B cells during autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2018 May;**17**(5):504-512.
54. **Nalbandian, G.; Kovats, S.** Understanding sex biases in immunity: effects of estrogen on the differentiation and function of antigen-presenting cells. *Immunol Res.* 2005;**31**(2):91–106.
55. **Paharkova-Vatchkova, V.; Maldonado, R.; Kovats, S.** Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c⁺CD11b (intermediate) dendritic cells from bone marrow precursors. *J Immunol* 2004.**172**(3):1426–1436.
56. **Victorine Douin-Echinard, V.; Laffont, S.; Seillet, C.; Delpy, L.; Krust, A., Chambon, P.; Gourdy, P. Arnal, J-F, et al.** Estrogen Receptor α , but Not, Is Required for Optimal Dendritic Cell Differentiation and of CD40-Induced Cytokine Production. *The Journal of Immunology*, 2008;**180**: 3661– 3669.

57. **Laffont, S.; Seillet, C.; Guéry, J.C.** Estrogen Receptor-Dependent Regulation of Dendritic Cell Development and Function. *Front Immunol.* 2017 Feb 10;**8**:108.
58. **Moulton, V.R.** Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease. *Front. Immunol.* 2018;**9**:2279
59. **Robinson, D.P.; Kleina, S.L.** Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Horm Behav.* 2012 August ; **62**(3): 263–271.
60. **Hutloff, A.; Dittrich, A.M.; Beier, K.C.; Eljaschewitsch, B.; Kraft, R.; Anagnostopoulos, I.; Kroczeck, R.A.** ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature.* 1999 Jan 21;**397**(6716):263-6.
61. **Rider, V.; Jones, S.; Evans, M.; Bassiri, H.; Afsar, Z.; Abdou, N.I.** Estrogen increases CD40 ligand expression in T cells from women with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2001 Dec;**28**(12):2644-9.
62. **Pène, J.; Gauchat, J.F.; Lécart, S.; et al.** IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. *J Immunol.* 2004 May 1;**172**(9):5154-7.
63. **Cho, H.; Jaime, H.; de Oliveira, R.P.; et al.** Defective IgA response to atypical intestinal commensals in IL-21 receptor deficiency reshapes immune cell homeostasis and mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 2019 Jan;**12**(1):85-96.
64. **Schmitt N, Bentebibel SE, Ueno H.** Phenotype and functions of memory T_{FH} cells in human blood. *Trends Immunol.* 2014 Sep;**35**(9):436-42.

65. **Spolski, R.; Leonard, W.J.** IL-21 and T follicular helper cells. *Int Immunol.* 2010 Jan; **22**(1):7-12.
66. **Kobayashi, T.; Iijima, K.; Dent, A.L.; Kita, H.** Follicular helper T cells mediate IgE antibody response to airborne allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017; **139**, 300–313.e7.
67. **Yao, Y.; Wang, Z.-C.; Wang, N.; et al.** Allergen immunotherapy improves defective follicular regulatory T cells in patients with allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2019 Jul; **144**(1):118-128.
68. **Yao, Y.; Li, H.; Ding, J.; Xia, Y.; Wang, L.** Progesterone impairs antigen-non specific immune protection by CD8 T memory cells via interferon- γ gene hypermethylation. *PLoS Pathog.* 2017 Nov 20; **13**(11):e1006736.
69. **Baud, D.; Greub, G.** Intracellular bacteria and adverse pregnancy outcomes. *Clin Microbiol Infect.* 2011; **17**:1312±1322.
70. **Silasi, M.; Cardenas, I.; Racicot, K.; Kwon, J-Y.; Aldo, P; Mor, G.** Viral Infections During Pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2015 March ; **73**(3): 199–213.
71. **Racicot, K.; Mor, G. J.** Risks associated with viral infections during pregnancy. *Clin Invest.* 2017; **127**(5):1591-1599.
72. **Gold, S.M.; Vosku, R.R.** Estrogen Treatment in Multiple Sclerosis. *J Neurol Sci.* 2009 November 15; **286**(1-2): 99–103
73. **Seifert, H.A.; Benedek, G.; Nguyen, H.; Kent, G.; Vandebark, A.A., Offner, H.** Estrogen protects both sexes against EAE by promoting common regulatory cell subtypes independent of endogenous estrogen. *Metab Brain Dis.* 2017 Oct; **32**(5):1747-1754.

74. **Airas, L.; Kaaja, R.** Pregnancy and multiple sclerosis. *Obstetric Medicine* 2012; **5**: 94–97.
75. **Fonseca, V.R.; Graca, L.** Contribution of FoxP3⁺ Tfr cells to overall human blood CXCR5⁺ T cells. *Clin Exp Immunol.* 2019 Mar; **195**(3):302-304.
76. **Chevalier, N.; Jarrossay, D.; Ho, E.; et al.** CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. *J Immunol.* 2011; **186**(10):5556–5568.
77. **Bentebibel, S.E.; Lopez, S.; Obermoser, G.; et al.** Induction of ICOS⁺CXCR3⁺CXCR5⁺ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci Transl Med.* 2013; **5**(176):176ra32.
78. **Yaşar, P.; Ayaz, G.; User, S.D.; Güpür, G.; Muyan, M.** Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol.* 2016 Dec 5; **16**(1):4-20.
79. **Kyurkchiev, D.; Ivanova-Todorova, E.; Kyurkchiev, S.D.** New target cells of the immunomodulatory effects of progesterone. *Reprod Biomed Online.* 2010 Sep; **21**(3):304-11.
80. **Engdahl, C.; Bondt, A.; Harre, U.; et al.** Estrogen induces St6gal1 expression and increases IgG sialylation in mice and patients with rheumatoid arthritis: a potential explanation for the increased risk of rheumatoid arthritis in postmenopausal women. *Arthritis Res Ther.* 2018 May 2; **20**(1):84.
81. **Fu, W.; Liu, X.; Lin, X.; et al.** Deficiency in T follicular regulatory cells promotes autoimmunity. *J Exp Med.* 2018 Mar 5; **215**(3):815-825.
82. **Dimitrijević, M.; Arsenović-Ranin, N.; Kosec, D.; Bufan, B.; Nacka-Aleksić, M.; Pilipović, I.; Leposavić, G.**

- Sex differences in T_{FH} cell help to B cells contribute to sexual dimorphism in severity of rat collagen-induced arthritis. *Sci Rep.* 2020 Jan 27;**10**(1):1214.
83. **Kim, D.H.; Park, H.J.; Park, H.S.; Lee, J.U.; Ko, C.; Gye, M.C.; Choi, J.M.** Estrogen receptor α in T cells suppresses follicular helper T cell responses and prevents autoimmunity. *Exp Mol Med.* 2019 Apr 15;**51**(4):1-9.
84. **Xu, B.; Wang, S.; Zhou, M.; et al.** The ratio of circulating follicular T helper cell to follicular T regulatory cell is correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2017 Oct;**183**:46-53.
85. **Kanda, N.; Tsuchida, T.; Tamaki, K.** Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999 Feb;**42**(2):328-37.
86. **Grimaldi, C.M.; Jeganathan, V.; Diamond, B.** Hormonal regulation of B cell development: 17 β -estradiol impairs negative selection of high-affinity DNA-reactive B cells at more than one developmental checkpoint. *J Immunol.* 2006;176:2703–10.
87. **Aly, E.; Aly, H.; Riyad, R.M.; Mokbel, A.N.** Pregnancy outcome in patients with systemic lupus erythematosus: A single center study in the High Risk Pregnancy unit. *Middle East Fertility Society Journal* 2015. **21**(3):168-17.

Figures legend

Figure 1. The impact of pregnancy on the frequency of cT_{FH} cells and the anti-HBsAg IgG in women immunized against HBV. PBMC cultures (1×10^6 /mL) obtained from nPW (n=10) and PW (n=10) just before (t0) and after (t1) anti-HBV vaccine were maintained for 4 h in the presence of PM (20 ng/mL) plus Ionomycin (600 ng/mL). In (A) representative flow cytometry dot-plots and histograms of cytokine-producing CXCR5⁺ CD4⁺ T cells positives for PD-1 and IL-21. In (B) and (C), the mean (\pm SD) percentage of CXCR5⁺CD4⁺T cells, expressing or not PD-1, and IL-21⁺PD-1⁺CXCR5⁺CD4⁺T cells, respectively. The data are shown as mean \pm SD from five independent experiments with 4 samples for experiment. Significance was calculated by comparing nPW (n=10) versus PW (n=10), and the *p* values, obtained by using unpaired Student's t-test, are presented in the figures. In (D) and (E), the correlation of Pearson was applied to evaluate the relationship between the proportion of IL-21⁺PD-1⁺CXCR5⁺CD4⁺T cells and the plasma levels of estradiol and progesterone, respectively. In (F), the plasma titers of anti-HBsAg IgG in nPW and PW just before and after immunization against HBV. The mean \pm SD of 10 nPW and 10 PW plasma samples were compared by using unpaired Student's test and the significant *p* values shown in the Figure.

Figure 2. The effect of E2 and P4 on non-T_{FH} and T_{FH} cells. PBMC cells (1×10^6 /mL) from healthy women (n=20) were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 beads (10 μ L/mL) in the presence or absence of 17 β -estradiol (E2, 5ng/mL) and/or progesterone (P4, 50 ng/mL) every 3 days. In (A) representative flow cytometry dot-plots and histograms of

cytokine-producing CXCR5⁻CD4⁺ T (non-T_{FH}) and different cT_{FH} (total CXCR5⁺PD-1⁺ and ICOS⁺CXCR5⁺PD-1⁺ subset) cells. In **(B)** and **(C)**, the mean percentage of the total cT_{FH} and ICOS⁺ cT_{FH} cell subset, respectively. In **(D)**, the mean percentage of different cT_{FH} cells, and **(E)** non-T_{FH} cells able, to produce IL-21, IL-4, IL-17 and IFN- γ after the addition of PMA and Ionomycin 4 h before finishing culture time. Data are shown as mean \pm SD of five independent experiments with 4 samples per experiments. Significance was calculated by comparing different cell cultures conditions (medium, E2, P4, and E2 plus P4; two-away ANOVA).

Figure 3. The effect of E2 and P4 on T_{FR} cell frequency. PBMC cells (1×10^6 /mL) from healthy women (n=20) were stimulated with α CD3/ α CD28 beads (10 μ L/mL) in the presence or absence of 17 β -estradiol (E2, 5ng/mL) and/or progesterone (P4, 50 ng/mL) for 3 days. **(A)** Representative dot-plots of cT_{FR} and IL-10⁺FoxP3⁻CXCR5⁺ T cell subsets. The mean percentage of FOXP3⁺CXCR5⁺ CD4⁺ T cells **(B)**, FOXP3⁺CXCR5⁺IL-10⁺CD4⁺ T **(C)**, and FOXP3⁻CXCR5⁺IL-10⁺CD4⁺ T **(D)** were determined after incubation of PBMC cultures with PMA and Ionomycin for 4 hours before finishing culture time. Data are shown as mean \pm SD of five independent experiments with 4 samples per experiments. Significance was calculated by comparing different cell cultures conditions (medium, E2, P4, and E2 plus P4; two-away ANOVA).

Figure 4: The impact of E2 and P4 on *in vitro* cT_{FH} cell differentiation. Naïve CD4⁺ T cells (0.8×10^6 /2 mL) from healthy women (n=10) were stimulated with α -CD3/CD28 beads (10 μ L/mL) in the presence of hrIL-12 (0.5 ng/mL), hrIL-23 (25 ng/mL) and hrTGF- β (5 ng/mL). In some wells, 17 β -estradiol (E2, 5ng/mL) and/or progesterone (P4, 50 ng/mL) were added at the start of the cell culture period. After 5 days, the

differentiated frequency of T_{FH} (iT_{FH}) cells was determined by cytometry. In **(A)** and **(B)** representative dot-plots of T_{FH} cells ($PD-1^+CXCR5^+CD4^+$ T cells) and T_{FH1} ($CXCR3^+CCR6^-$), T_{FH2} ($CXCR3^-CCR6^-$) and T_{FH17} ($CXCR3^-CCR6^+$) cells, respectively. The mean percentage of cT_{FH} cells ($CXCR5^+PD-1^+CD4^+$ T cells) **(C)** and IL-21 secretion **(D)** were analyzed by flow cytometry and ELISA, respectively. Data are shown as mean \pm SD of five independent experiments with 4 samples per experiments. Significance was calculated by comparing different cell cultures conditions (medium, E2, P4, and E2 plus P4; two-away ANOVA).

Figure 5: The effect of E2 and P4 on the frequency of B cell subsets. PBMC cultures (1×10^6 /mL) from healthy women ($n=20$) were stimulated with SEB ($1\mu\text{g/mL}$) for 6 days and, following the strategies in **(A)**, we determined the frequency of **(B)** naïve ($CD3^- CD19^+ CD27^- IgD^+$), **(C)** memory ($CD3^- CD19^+ CD27^+ IgD^-$), **(D)** plasmablasts ($CD3^- CD19^+ CD38^+ CD138^-$), and **(E)** plasma cells ($CD3^- CD19^+ CD38^+ CD138^+$) by cytometry. Data are shown as mean \pm SD of five independent experiments with 4 samples from women per experiments. Significance was calculated by comparing different cell cultures conditions (medium, E2, P4, and E2 plus P4; two-away ANOVA).

Figure 6: The effect of E2 and P4 on IgG and IL-21 production by SEB-activated T_{FH}/B cell co-cultures. Purified T_{FH} cells ($CD4^+CD45RA^-CXCR5^+$) and B cells from healthy women ($n=10$) were co-cultured in the presence of medium (negative control) or stimulated with SEB ($1\mu\text{g/mL}$) for 6 days. Both IgG production **(A)** and IL-21 release **(B)** were dosed in the supernatants through ELISA. Data are shown as mean \pm SD of four independent experiments with 2-3 samples per experiments. Significance was

calculated by comparing different cell cultures conditions (medium, E2, P4, and E2 plus P4; two-away ANOVA).

Figure 7. cT_{FH} cell frequency in women and men. The percentage of PD-1⁺CXCR5⁺CD4⁺T cells (**A** and **B**) was determined in peripheral blood of healthy women (n=20) and men (n=20) through cytometry. Data are shown as mean ± SD of from 5 independent experiments with 4 women and 4 men samples for experiment. Significance was calculated by using paired Student's test and the *p* values are shown in the Figure. In (**C**), the expression of ER α and PGR on CXCR5⁺CD4⁺ and CXCR5⁻CD4⁺ T cells from a women and a man determined via Real-time PCR from one independent experiment with 1 woman and 1 man samples (unpaired Student's t-teste).

Figures

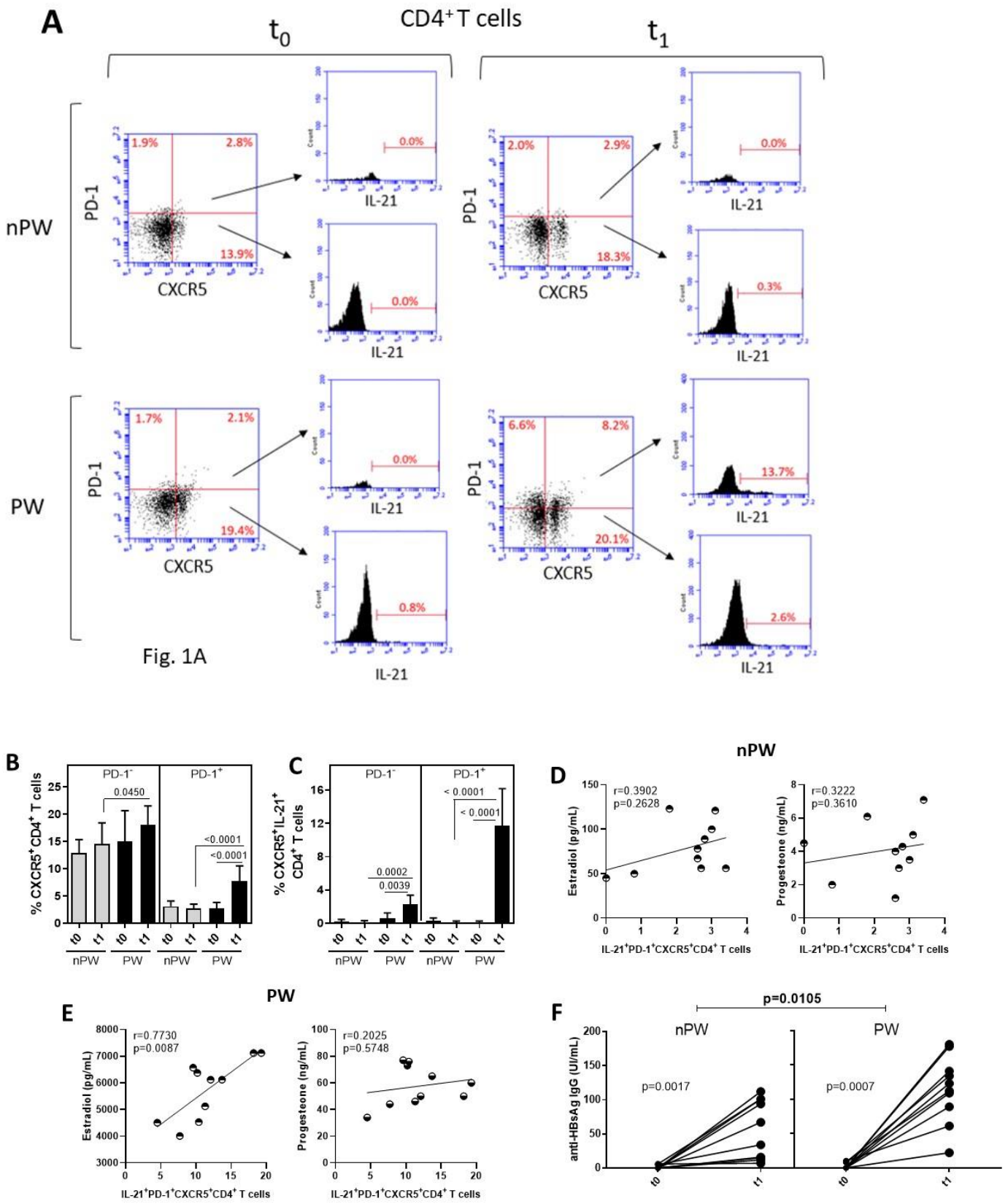


Fig. 1B to 1F

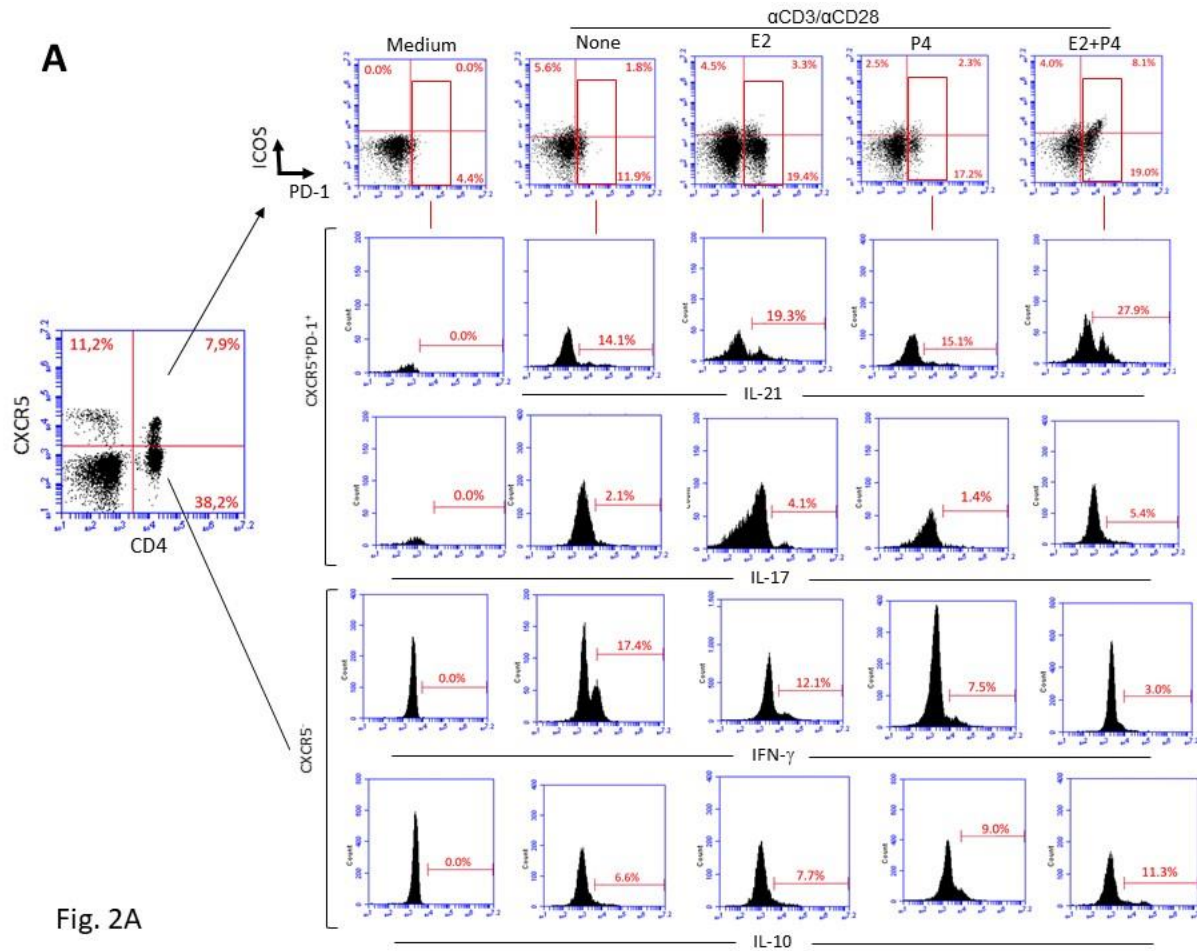


Fig. 2A

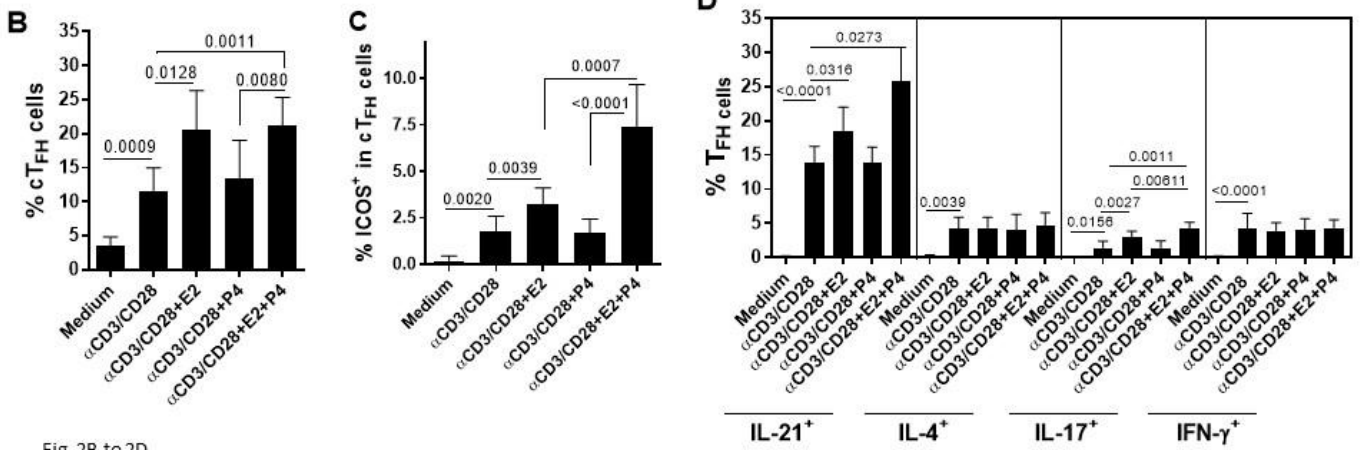


Fig. 2B to 2D

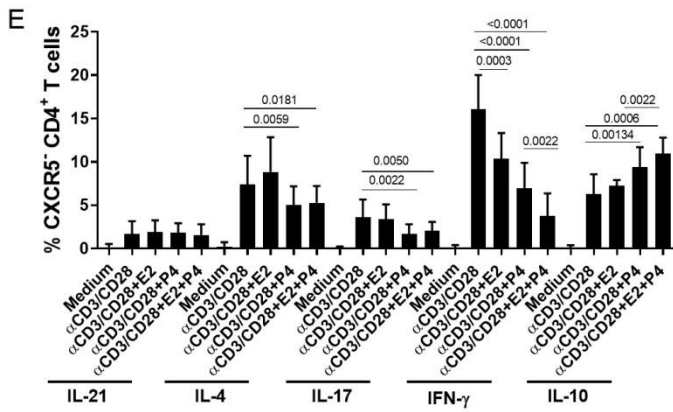


Fig. 2E

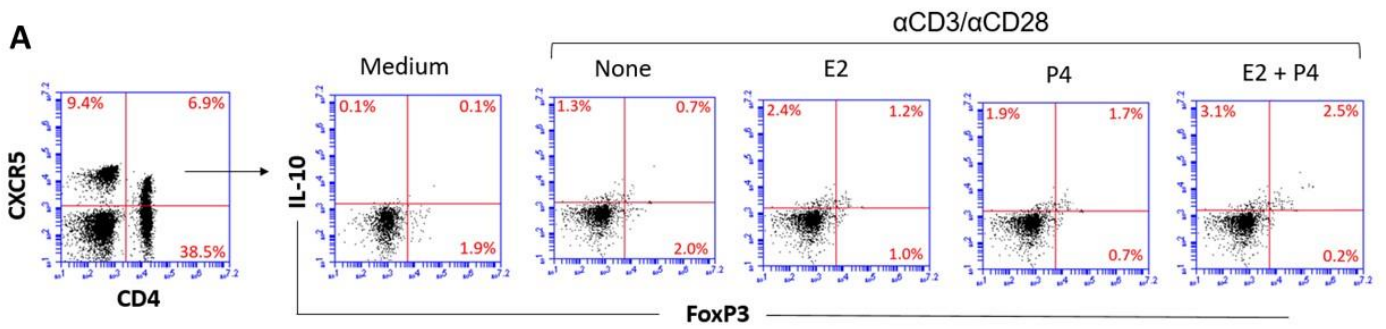


Fig. 3A

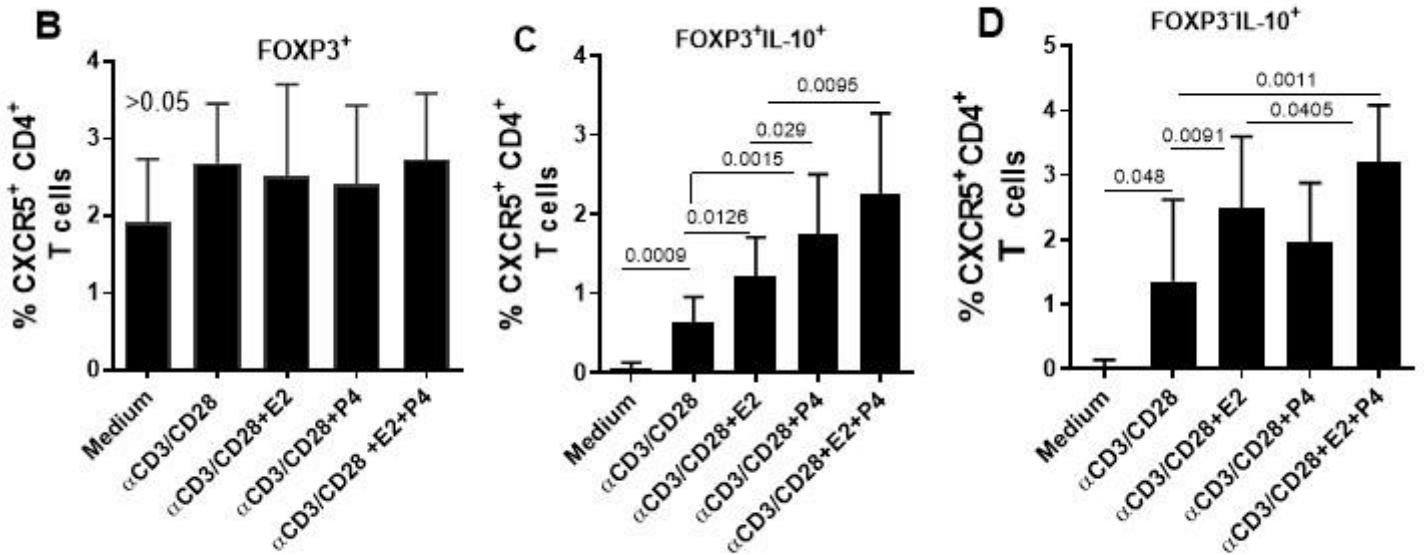


Fig. 3B to D

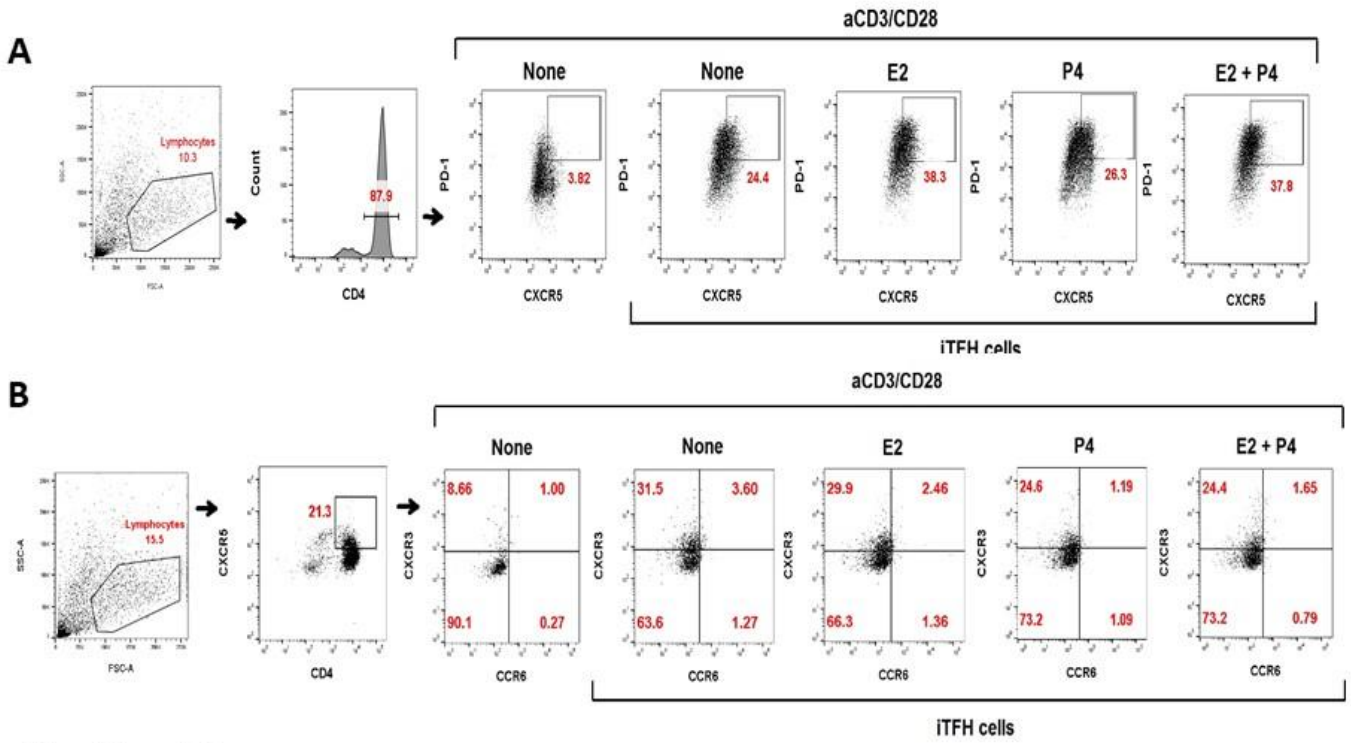


Fig. 4A and B

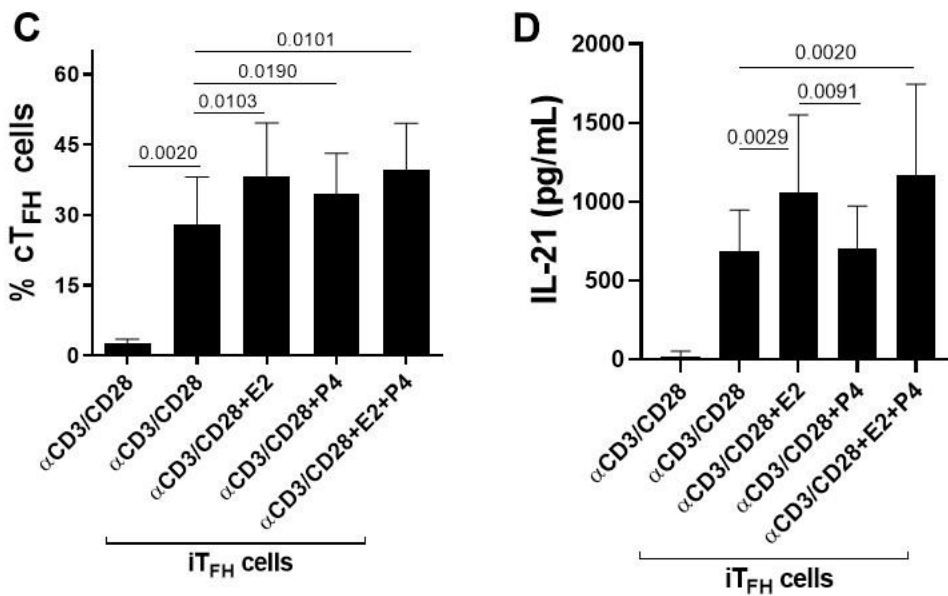


Fig. 4C and 4D

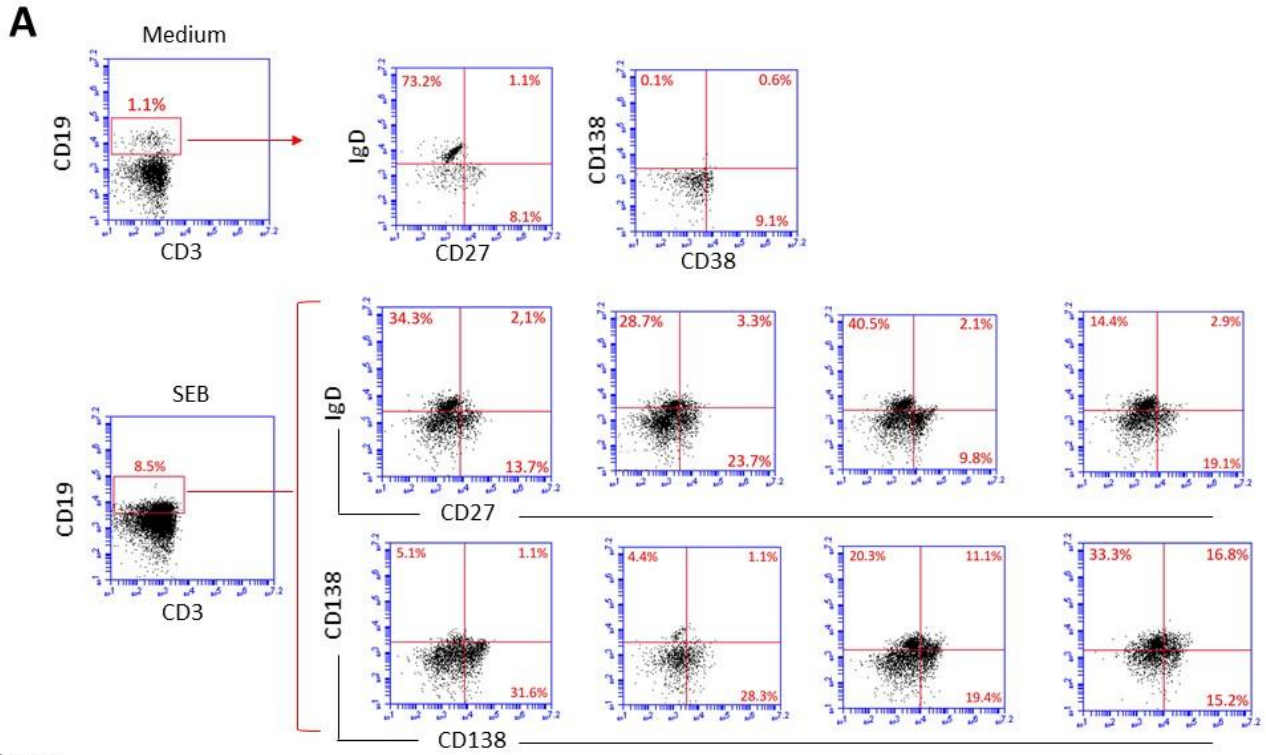


Fig. 5A

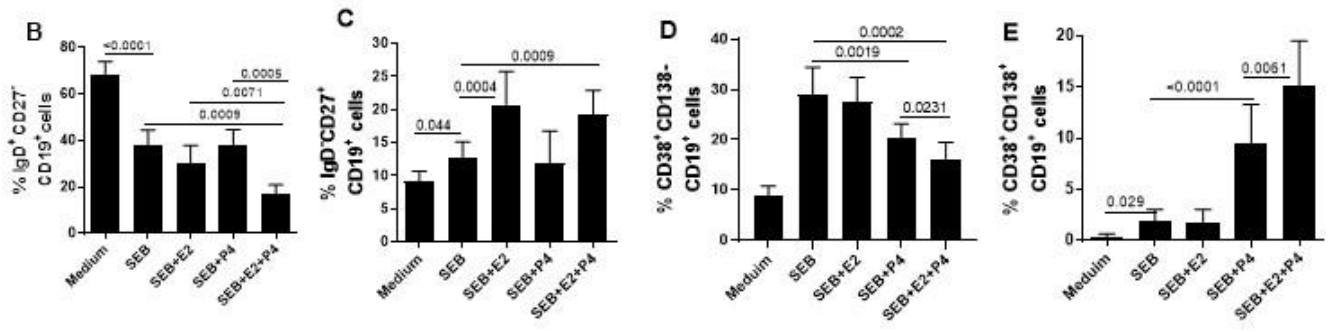


Fig. 5B to 4E

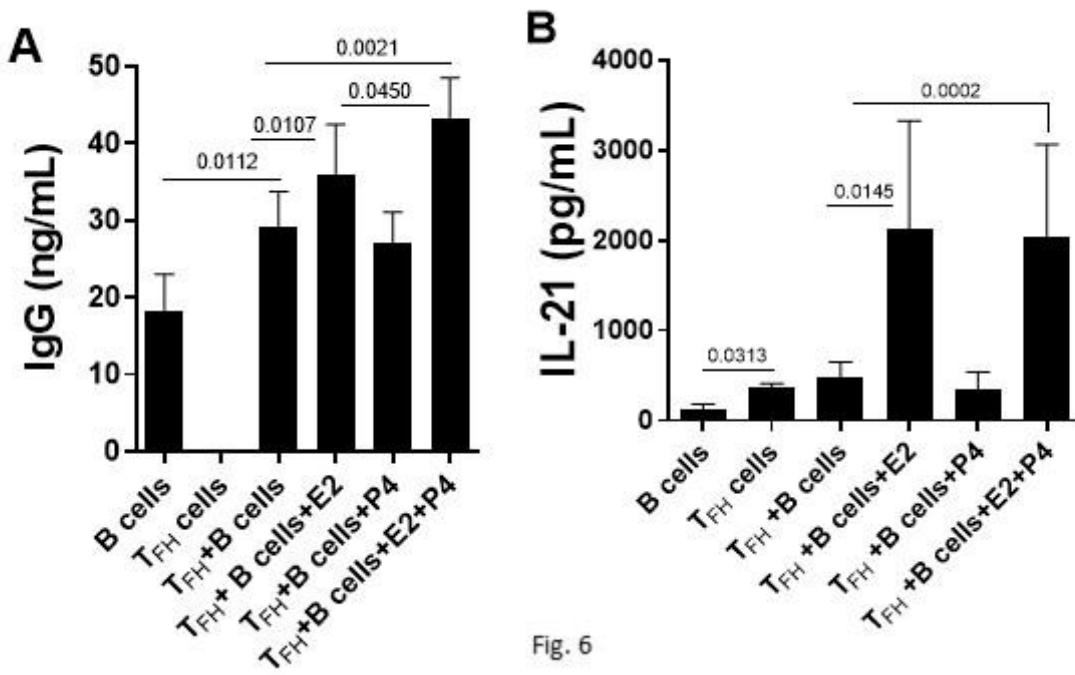


Fig. 6

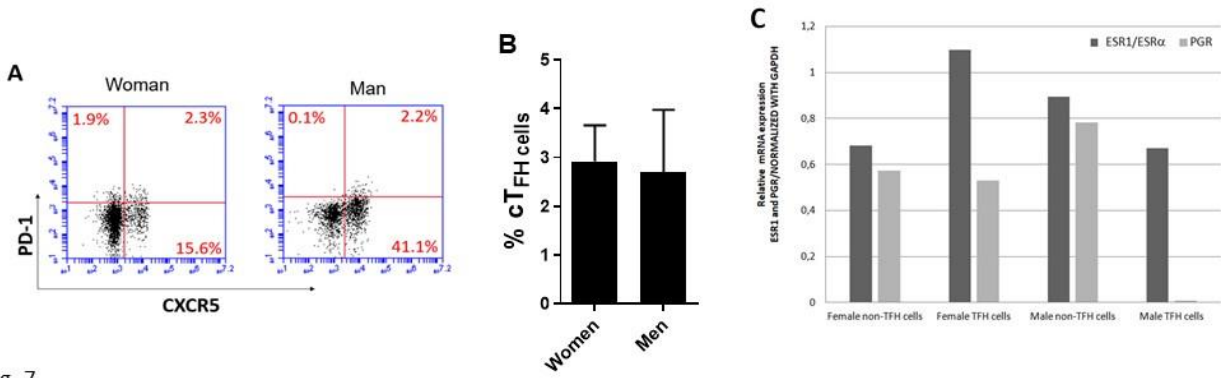


Fig. 7

4. DISCUSSÃO

O sistema imunológico atua, em conjunto, a fim de impedir que organismos potencialmente patogênicos causem doença no hospedeiro (ABBAS, 2012). Entretanto, diversos eventos ambientais podem contribuir para uma alteração ou desequilíbrio dessa homeostase imune, como é o caso da gestação (KANDA; TAMAKI, 1999). Sabendo que o sucesso da gravidez está atrelado a uma modulação negativa da resposta imune celular materna contra diferentes patógenos com incremento na produção de anticorpos IgG por células B de memória (KANDA; TAMAKI, 1999; MUZZIO *et al.*, 2013); nossa primeira teoria foi de que, além das células B, a frequência e a função de outras células envolvidas na produção de anticorpos poderiam ser moduladas na gestação, tal como as células T_{FH}. As células T_{FH} podem ser identificadas principalmente pela expressão de CXCR5, PD-1 e pela produção de IL-21 (ONABAJA *et al.*, 2013); e estão envolvidas na resposta humoral de alta eficiência por regularem positivamente vários eventos das células B nos centros germinativos (KIM *et al.*, 2001; YUSUF *et al.*, 2010). Nesse sentido, em nosso primeiro trabalho publicado (MONTEIRO *et al.*, 2017, Artigo 1), observamos pela primeira vez um aumento na porcentagem de células T CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺ e também dessas células capazes de expressar os marcadores PD-1 e ICOS, no sangue periférico de gestantes saudáveis no terceiro trimestre de gestação, quando comparado a mulheres não grávidas. Enquanto PD-1 é importante na regulação negativa da atividade das células T_{FH} no centro germinativo, a expressão de ICOS é essencial para a geração e a função dessas células (CUBAS, 2013). De fato, alguns estudos têm demonstrado uma maior frequência de células T PD-1⁺ associada à aceitação do feto e ao sucesso na gestação (WANG *et al.*, 2016) pela promoção da tolerância imune (FU *et al.*, 2011; GRIMALDI *et al.*, 2002). Na circulação, apesar de estudos mostrarem que menos de 1% das células cT_{FH} de memória circulantes de indivíduos saudáveis expressam ICOS (KIM *et al.*, 2001; LOCCI *et al.*, 2013; BENTEBIBEL *et al.*, 2013; MA *et al.*, 2009; SALLUSTO *et al.*, 1998), as células cT_{FH} ICOS⁺PD-1⁺ seguido de células ICOS⁻PD-1⁺ são subtipos celulares considerados os mais eficientes em auxiliar as células B (MA *et al.*, 2015; MORITA *et al.*, 2011; SIMPSON *et al.*, 2010).

De forma complementar, diferentes subtipos de células cT_{FH} podem ser identificados através da combinação da expressão dos marcadores CXCR3 e CCR6 (SCHMITT;BENTEBIBEL;UENO,2014), todos capazes de produzir IL-21, em três subtipos: $CXCR3^+CCR6^-$, $CXCR3^-CCR6^+$ e $CXCR3^-CCR6^-$, denominados cT_{FH1} , cT_{FH17} e cT_{FH2} , respectivamente. No artigo 01, observamos uma maior porcentagem de células cT_{FH} $CXCR3^+$ e também cT_{FH} $CXCR3^+PD-1^+$ em gestantes, em comparação com mulheres não grávidas. Por limitações técnicas do momento, não utilizamos o marcador CCR6 em nossas primeiras análises. Entretanto, dentro desse subtipo celular $CXCR3^+$, BENTEBIBEL e colaboradores (2013) demonstraram uma correlação positiva entre a frequência de células cT_{FH} $CXCR3^+$ $ICOS^+$ e a produção de anticorpos específicos contra Influenza após vacinação. Além disso, essas células cT_{FH} foram capazes de produzir IL-2, IL-10, IL-21 e IFN- γ quando estimuladas *in vitro* com o antígeno do vírus influenza (BENTEBIBEL *et al.*, 2013). Ademais, sabe-se que o subtipo $CXCR5^+CXCR3^+CCR6^-$, apesar de não ser muito eficiente em auxiliar os linfócitos B naíve *in vitro*, são capazes de induzir a diferenciação das células B de memória em plasmócitos através da secreção de IL-21 e IL-10 (BENTEBIBEL *et al.*, 2013). Estudos mais recentes também têm demonstrado uma correlação positiva entre as células cT_{FH} $PD-1^+$ e os níveis de anticorpos após vacinação (HEIT *et al.*, 2017). No contexto da gestação, a resposta protetora mediada por vacinas é imprescindível para o desenvolvimento de imunidade da mãe e do feto (BARUG *et al.*, 2019; KAY *et al.*, 2015; ZHONG *et al.*, 2019). Nesse sentido, nós demonstramos no artigo 1 que os níveis séricos de IgG anti-CMV e anti-HBsAg não apenas foram superiores nas gestantes, quando comparado às mulheres não grávidas, como foram correlacionados positivamente com a porcentagem de células T_{FH} $CXCR3^+PD-1^+$ e também com essas células produtoras de IL-21 (MONTEIRO *et al.*, 2017).

Classicamente, as células T_{FH} modulam várias funções das células B nos folículos secundários através da liberação de citocinas, principalmente a IL-21 (YUSUF *et al.*, 2010). A IL-21 é um importante regulador da resposta imune humoral, por modular a proliferação das células B e a troca de cadeia pesada do anticorpo (RANKIN *et al.*, 2011). Nesse sentido, caracterizamos o perfil de citocinas produzido pelas células cT_{FH} $CXCR3^+$ através de uma rápida ativação com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) e ionomicina, considerados potentes estimuladores da síntese de diferentes citocinas. Em nosso estudo, a gestação claramente

favoreceu a expansão de células cT_{FH} $CXCR3^+$ produtoras de citocinas mais envolvidas em respostas humorais (IL-21 e IL-6) e reguladoras (IL-10), exatamente os fenótipos que biologicamente devem ser mais favorecidos na gestação. Esses resultados sugerem que, biologicamente, as alterações do sistema imune promovidas pela gestação têm como objetivo maior criar um ambiente de tolerância imune ao feto ao mesmo tempo em que favorece a transferência de proteção passiva contra diferentes agentes infecciosos através da passagem placentária de anticorpos maternos.

Apesar de a manutenção dos eventos imunes que garantem a gestação ser um evento delicado que pode ser rompido por diferentes intercorrências, na infecção pelo HIV-1, a resposta imune protetora contra o vírus contrasta drasticamente com os eventos imunes responsáveis pela tolerância ao feto. Sendo assim, o risco de progressão clínica da doença não é aumentado pela gestação (GRAY; MCINTYRE, 2007). De toda maneira, a TARV é indicada a todas as gestantes infectadas pelo HIV-1 e tem como objetivo suprimir a replicação viral, prevenindo a transmissão vertical; reduzir o risco de progressão da doença, melhorar a qualidade de vida, além de preservar e restaurar o sistema imunológico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Ademais, estudos mostraram que indivíduos infectados pelo HIV-1 apresentam um estado de hipergamaglobulinemia com a produção de anticorpos inespecíficos ao vírus (PERREAU *et al.*, 2013), fator que pode ser decorrente de uma alteração funcional das células T_{FH} mediada pela doença. Dessa forma, de forma inédita, o objetivo do nosso segundo artigo foi avaliar o impacto da infecção pelo HIV-1 e da TARV sobre as células cT_{FH} em gestantes. Nossos resultados mostraram que a infecção pelo HIV-1 diminuiu a porcentagem de células cT_{FH} e cT_{FH} $PD1^+$ em gestantes quando comparada às mães saudáveis; e a terapia com TARV por 6 meses levou a uma queda na frequência dessas células somente nas gestantes. Por outro lado, BOSWELL e colaboradores (2014) mostraram um aumento na frequência de células T_{FH} e T_{FH} $PD-1^+$ no sangue periférico de indivíduos infectados pelo HIV-1 após 1 ano de tratamento. A divergência entre os nossos resultados, que não mostraram dado algum significativo quanto ao impacto do tratamento em mulheres não grávidas, com os achados obtidos por BOSWELL *et al.* pode ser explicada, em parte, pelo período em que nossas análises foram realizadas após o início da TARV. Uma TARV eficiente é capaz de reduzir a carga viral plasmática e aumentar o número de células T $CD4^+$ após 6 meses de uso. Todavia,

apesar do aumento na contagem de células T CD4⁺ periféricas ser o marcador clássico de reconstituição imune após a TARV, a recuperação funcional das células T, assim como das células B, é um processo mais lento e quase sempre parcial (HE *et al.*, 2012), podendo levar até 2 anos para ser observada (NDUMBI *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013). Em se tratando das gestantes infectadas, a diminuição das células cT_{FH} pode ser explicada devido a alterações imunológicas da gestação envolvendo a rede de citocinas.

Nesse sentido, observamos que a TARV reduziu a porcentagem de células cT_{FH} IL-6⁺, em mulheres, grávidas ou não, infectadas pelo HIV-1. No entanto, houve um aumento na porcentagem de células cT_{FH} IL-10⁺ somente nas gestantes após a TARV. Dentro dos órgãos linfoides secundários, as células T_{FH} ou T_{FR} produzem IL-10. O subtipo celular T_{FR}, que expressa FoxP3, tem sido descrito como responsável por regular as reações do centro germinativo (LINTERMAN *et al.*, 2011). Infelizmente, no presente estudo, não foi possível determinar o subtipo de cT_{FH} IL-10⁺ quanto à expressão de FoxP3, mas o aumento da proporção desse subtipo celular poderia exercer efeitos protetores no contexto da infecção pelo HIV-1 em gestantes. Estudos anteriores publicados pelo nosso grupo demonstraram que elevados níveis de IL-10 produzidos pelas células T CD4⁺ durante a gestação, apesar de classicamente atenuarem a resposta imune celular mediada por TH1/Tc-1, inibem diretamente a replicação viral, o que deve contribuir para reduzir o risco de transmissão vertical do vírus (HYGINO *et al.*, 2012). Ademais, incremento na produção de IL-10 pode auxiliar na redução na produção de IL-6, citocina capaz de aumentar a replicação viral e favorecer a expansão de células T_{FH} disfuncionais (PETROVAS *et al.*, 2012). Portanto, a habilidade da TARV em aumentar a razão entre T_{FH} IL-10⁺/T_{FH} IL-6⁺ em gestantes pode ajudar no controle da replicação viral nos linfonodos, reduzindo o risco de transmissão vertical, como também facilitando a recuperação funcional da resposta imune humoral. De fato, também observamos que a TARV foi capaz de aumentar a porcentagem de células cT_{FH} IL-21⁺ nas pacientes, principalmente entre as gestantes, o que parece ser um fenômeno natural relacionado à imunomodulação materna, como visto no artigo 1. Em indivíduos infectados pelo HIV-1, a produção de IL-21 pelas células T_{FH} foi correlacionada positivamente com a produção de anticorpos após a vacinação contra o influenza (PALLIKUTH *et al.*, 2012). Ademais, ainda na infecção pelo HIV-1, o aumento na frequência de células T_{FH} IFN- γ ⁺ tem sido correlacionado negativamente com a carga

viral e positivamente com títulos de anticorpos específicos para o HIV-1 (BAIYEGUNHI *et al.*, 2018; VELU *et al.*, 2016). Em nosso estudo, além da IL-21, aumento na porcentagem de células cT_{FH} $IFN-\gamma^+$ foi observado particularmente nas amostras de sangue obtidas de gestantes sob tratamento com TARV quando comparado às pacientes não grávidas. Coletivamente, os dados publicados no artigo 2 sugerem que a gestação amplificaria a capacidade da TARV em recompor a funcionalidade das células cT_{FH} em mulheres infectadas pelo HIV-1.

Para avaliar a recuperação funcional dessas células mais diretamente, realizamos ensaios de cocultura de células T $CD4^+$ com células B de pacientes, grávidas ou não, em sucesso terapêutico. Nós observamos que a gestação, de fato, potencializou a capacidade da TARV em reconstituir a capacidade das células T $CD4^+$ em ajudar as células B a produzirem IgG, sendo esse fenômeno associado à maior produção de IL-21. Além disso, os níveis séricos de IgG anti-HBsAg e anti-TT foram maiores nas gestantes infectadas pelo HIV-1 em comparação com as pacientes não grávidas. Sabendo que a presença de anticorpos neutralizantes contra o HIV-1 tem sido observada em indivíduos capazes de controlar a carga viral (BAIYEGUNHI *et al.*, 2018; MARTIN-GAYO *et al.*, 2017), a presença desses anticorpos em gestantes poderia contribuir na redução da transmissão vertical do vírus. Em nosso estudo, não observamos diferenças nos níveis séricos de IgG anti-gp41 entre nenhum dos subgrupos estudados. A produção de IgG anti-gp41 ocorre já no início da infecção pelo HIV-1, porém sua presença não está relacionada a eliminação do vírus, em parte, devido a sua baixa afinidade (VAIDYA *et al.*, 2018). Por outro lado, altos títulos de IgG anti-p24 tem sido encontrado em pacientes que apresentam progressão lenta da doença (ZWART *et al.*, 1994). Infelizmente, por questões técnicas não foi possível realizar a dosagem de outros anticorpos, como IgG anti-p24.

Nossos resultados, de fato, indicam que a gestação favorece a expansão de células cT_{FH} mais funcionais em pacientes infectadas pelo HIV-1 após 6 meses do início da TARV. No entanto, esse curto período de tratamento da infecção pelo HIV-1 não foi capaz de normalizar a proporção dessas células quando comparada às gestantes saudáveis. Também demonstramos que as gestantes infectadas pelo HIV-1 apresentaram menor porcentagem de células cT_{FH} totais produtoras de IL-21, IL-10 e $IFN-\gamma$; e que, ademais, os títulos de IgG anti-HBsAg foram significativamente inferiores nas gestantes infectadas. De forma interessante, as gestantes infectadas

apresentaram níveis séricos de estrogênio inferiores em comparação com as gestantes saudáveis e estudos têm observado o envolvimento da TARV nas alterações séricas de estrogênio e progesterona em mulheres (XIANG *et al.*, 2014). Dessa forma, a redução nos níveis séricos de estrogênio também poderia estar contribuindo para a não recuperação das células cT_{FH} em gestantes infectadas. Infelizmente, não foi possível continuar as análises sobre o papel da TARV em manter essas células em períodos após o parto porque o segmento ambulatorial delas é descontinuado após alta hospitalar. Resumidamente, sugerimos que a gestação, provavelmente através do estrogênio, favorece a expansão das células T_{FH} periféricas funcionais, responsáveis por auxiliar as células B na produção de anticorpos e que intercorrências durante a gestação, como a infecção pelo HIV-1, prejudicam a expansão dessas células mesmo com introdução da terapia antirretroviral no início da gestação.

De fato, a imunomodulação que ocorre durante a gestação é particularmente mediada pelos hormônios gestacionais, entre eles o estrogênio e a progesterona. Esses hormônios, através de interações com várias células imunes e não imunes, são capazes de atenuar a resposta imune celular mediada pelas células T embriotóxicas dirigidas contra antígenos paternos, particularmente os fenótipos TH1, TH17 e Tc-1 (KANADA; TAMAKI, 1999; WANG *et al.*, 2010). O estabelecimento de rede de citocinas inflamatórias relacionadas a esses fenótipos pode auxiliar na produção de IgG, dirigidos contra antígenos paternos expressos pelas células da placenta, por favorecer a expansão de linfócitos T_{FH} . Uma elevada frequência de células T_{FH} tem sido associada a intercorrências na gestação, tais como pré-eclâmpsia (HEYDARLOU *et al.*, 2019) e abortos espontâneos (LUAN *et al.*, 2017). Esses distúrbios na produção de anticorpos patogênicos podem estar associados a uma desregulação na produção dos hormônios gestacionais (VERMA *et al.*, 2019). De fato, o controle funcional desses linfócitos T efetores é particularmente executado pelas células T reguladoras que têm suas funções potencializadas pelos hormônios gestacionais. Em dois dos nossos estudos (Artigo 01 e 02), a concentração plasmática de estrogênio - mas não de progesterona - foi positivamente correlacionada com a porcentagem de células cT_{FH} IL-21⁺ e com os títulos de IgG anti-HBsAg em mulheres saudáveis e em mulheres infectadas pelo HIV-1 (MONTEIRO *et al.*, 2017; KASAHARA *et al.*, 2019). Estudos têm demonstrado que o estrogênio atua diretamente nas células B, promovendo a produção de anticorpos

(JONES *et al.*, 2019; KANDA; TAMAKI, 1999), o que nos levou a avaliar o efeito direto desses hormônios no compartimento funcional do eixo T_{FH}/B . Nosso grupo sugeriu que, somente o estrogênio foi capaz de elevar diretamente as células cT_{FH} e $cT_{FH} ICOS^+$ capazes de produzir IL-21 e IL-4, além de incrementar a porcentagem de células B de memória. E, ao menos *in vitro*, a progesterona seria capaz de amplificar a produção de IgG induzida pelo estrogênio, fato associado ao aumento da frequência de plasmócitos nessas culturas em respostas à progesterona. Ademais, ainda nesse último estudo, a presença de elevados níveis de progesterona foi suficiente para atenuar a expressão de fenótipos de células T efectoras e potencialmente embriotóxicas produtores de IL-21, IL-4 e IL-17 (MONTEIRO *et al.*, 2020, *submetido*), relevando o papel desse hormônio na manutenção de uma gestação normal. Em acórdância com nossas análises, Parr e Parr (1986) demonstraram a habilidade de P4 em elevar o número de células plasmáticas no útero no início da gestação. Aqui, a capacidade de P4 em elevar plasmócitos *in vitro*, mas a inabilidade de aumentar a produção de IgG na ausência de E2 indica que a ação conjunta de ambos os hormônios são essenciais na promoção da resposta imune humoral na gestação.

O efeito da progesterona, que parece ser direto, também poderia ser indireto ao favorecer a expansão de subtipos de células T reguladoras capazes de produzir IL-10. De fato, observamos uma maior frequência de células T $CD4^+ CXCR5^- IL10^+$ em cultura na presença de estrogênio e progesterona. Embora não tenhamos analisado a expressão de FoxP3, esses achados estão de acordo com outros estudos que demonstram a habilidade de doses relacionadas à gestação de estrogênio e progesterona em favorecer a expansão de células Tregs $CD4^+ IL10^+ CD25^+ FoxP3^+$. (SZEKERES-BARTHO, 2018; SHAH; IMAMI; JOHNSON, 2018; POLANCZYK *et al.*, 2004, 2015). De forma complementar, estrogênio e progesterona também elevaram a proporção do subtipo $T_{FR} IL10^+$, identificado por expressar FoxP3, e apenas o estrogênio foi capaz de aumentar a porcentagem de células $T_{FH} IL10^+ FoxP3^-$. Nesse caso, as células T_{FR} seriam capazes de suprimir respostas autorreativas das células B (FONSECA *et al.*, 2019), enquanto células $T_{FH} IL10^+ FOXP3^-$ poderiam promover respostas no centro germinativo (MORITA *et al.*, 2011; CHEVALIER *et al.* 2011; BENTEBIBEL *et al.*, 2013). Sendo assim, durante a gestação, é possível essa maquinaria envolvendo as células T_{FH} e T_{FR} promova o

controle da produção de autoanticorpos enquanto reduz a produção de imunoglobulinas maternas contra patógenos.

Acredita-se que os efeitos qualitativos desses hormônios sobre as células T CD4⁺ podem estar relacionados à expressão dos seus receptores nas células em questão. Apesar da existência de isoformas de membrana, os efeitos biológicos de estrogênio e progesterona são classicamente mediados pelas isoformas intracelulares do receptor de estrogênio ER (α e β) e pelo receptor de progesterona PGR, respectivamente (YASAR *et al.*, 2016; KYURKCHIEV; IVANOVA-TODOROVA; KYURKCHIEV, 2010). Em humanos, a sinalização de ER α aumenta a produção do fator de ativação de células B (BAFF), citocina importante para a sobrevivência e maturação das células B 3 (PANCHANATHAN; CHOUBEY, 2013) bem como no aumento da produção de imunoglobulinas (ENGDAHL *et al.*, 2018; KANDA; TAMAKI, 1999). De forma interessante, elementos da região de resposta do estrogênio para ER α foi identificada dentro das regiões de troca de cadeia pesada, indicando que o hormônio pode regular a recombinação envolvida na troca de classe (JONES *et al.*, 2016). No presente estudo, a quantificação de ER α foi maior nas células T_{FH} em comparação às não-T_{FH}. E, ainda, embora não tenhamos observado diferença alguma na frequência de células T_{FH} PD1⁺ entre homens e mulheres, a expressão de ER α e PGR foi maior nas células T_{FH} do sexo feminino quando comparada ao masculino. Em nota, estima-se que o nosso grupo avalie a expressão desses receptores em um número maior de homens e mulheres.

Levando em consideração que a influência dos hormônios sobre as células não depende somente das suas concentrações, mas também do estágio de maturação celular, objetivamos avaliar - *in vitro* - se o aumento da proporção das células T_{FH} na presença estrogênio e progesterona poderia influenciar, não somente na proliferação, como também na diferenciação das células T CD4⁺ naíve em células T_{FH}. Embora a progesterona não tenha alterado a porcentagem de células T_{FH} PD1⁺ nas culturas de PBMC policlionalmente ativadas, ambos os hormônios influenciaram na diferenciação de células T CD4⁺ naíve em células T_{FH}. Ainda, o estrogênio aumentou a produção de IL-21 nessas culturas. Esses resultados sugerem que, durante a gestação, os hormônios podem ser um grande fator contribuinte para a produção de anticorpos materna em resposta a esquemas de imunização realizados durante o pré-natal. Adicionalmente, nossos achados também mostraram uma inabilidade do estrogênio em modular a diferenciação das células T_{FH} CXCR3⁺

CCR6⁻ (T_{FH1}) *in vitro*. Acreditamos que esse efeito possa estar associado à diminuição da produção de IFN- γ durante a gestação, evento importante na prevenção da rejeição fetal por células T CD4⁺ e CD8⁺ embriotóxicas maternas (CHAOUAT *et al.*, 1982; DESHMUCK;WAY, 2019) , o que, por outro lado, também contribui para a susceptibilidade materna a infecções por patógenos intracelulares, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes* e diferentes vírus (YAO *et al.*,2017 ; BAUDE;GREUB, 2011). Ainda, doses de estrogênio e progesterona relacionadas a gestação capazes de controlar a produção de IFN- γ também se associam a uma estabilização do curso clínico da Esclerose Múltipla, por exemplo (GOLD;VOSKU, 2009; SEIFERT *et al.*, 2017), cujo - no último trimestre - as taxas de recaídas clínicas diminuem em 70% quando comparadas ao período antes da gestação (AIRAS;KAAJA, 2012). Nossos resultados sugerem que efeitos combinados e balanceados de células não foliculares e do eixo T_{FH}/T_{FR} pode ser importante não apenas para prevenir a rejeição fetal, mas também para aumentar a proteção contra diferentes patógenos, por meio de transferência placentária de IgG após imunização materna.

Nesse sentido, um equilíbrio entre a porcentagem das células T_{FH} e T_{FR} deve ser fundamental para evitar desordens imunes mediadas pela produção excessiva de anticorpos. Camundongos com deficiência de células T_{FR} desenvolveram autoimunidade mediada por anticorpos, e a produção descontrolada de IgG foi associada a perda da funcionalidade do receptor de estrogênio ER em células T CD4⁺ , o que poderia estar relacionado a perda funcional das células T_{FH} (FU *et al.*, 2018). De fato, tratamento com estrogênio leva a um aumento de IgG anti-dsDNA e a expansão de células B periféricas produtoras de anticorpos de alta afinidade (KANDA; TSUCHIDA;TAMAKI,1999;GRIMALDI *et al.*, 2006). Sendo assim, em gestantes, a alta produção de citocinas pró-inflamatórias e a transferência placentária de IgG anti-dsDNA pode levar ao aborto, nascimento prematuro e preeclampsia (BUYON *et al.*, 2015; LEPOUTRE *et al.*, 2012;EMAN *et al.*, 2016) (XU *et al.*, 2017). O desequilíbrio entre as células T_{FH} e T_{FR}, induzido ou não pelos hormônios gestacionais, poderia resultar em uma resposta anormal do CG e contribuir para a patogênese de doenças autoimunes humorais, como a NMOSD.

A NMOSD é uma doença autoimune caracteristicamente humoral, que envolve o ataque de autoanticorpos contra diferentes proteínas do SNC, particularmente a AQP4, expressa nos pés dos astrócitos (KINOSHITA *et al.*, 2009). Apesar de

sugerirem o envolvimento das células B na imunopatogênese da NMOSD, a síntese de IgG pelos plasmócitos depende da capacidade dos linfócitos B em interagir com células T_{FH} (QI, 2016). Em nosso terceiro artigo, uma maior proporção de células T_{FH} IL-21⁺ foi observada no sangue de pacientes portadores de NMOSD após breve estimulação policlonal *ex vivo*, especialmente entre os pacientes soropositivos para IgG anti-AQP4. Esses achados estão em acórdância com outros estudos que têm demonstrado a expansão de células T CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ (LI *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2017) correlacionadas diretamente com os níveis plasmáticos de IL-21 (ZHAO *et al.*, 2017), em pacientes com NMOSD quando comparados ao grupo controle.

De modo interessante, um estudo publicado recentemente por NICOLAS e colaboradores (2019) avaliou - utilizando marcadores de superfície - os diferentes subtipos de células T_{FH} (T_{FH}1, T_{FH}2, T_{FH}17 e T_{FR}) e observou um aumento da frequência das células T_{FH}17 e uma diminuição das células T_{FR} nos pacientes com NMOSD. De fato, observamos em nosso estudo uma menor proporção de células T_{FH} produtoras de IL-10 nos pacientes, especialmente entre aqueles com maiores níveis de incapacidade neurológica. De forma interessante, animais com células T_{FR} incapazes de produzir IL-10 apresentaram uma redução no número de células B no CG e nos níveis de anticorpos específicos (LAIDLAW *et al.*, 2017). Esses dados sugerem que baixas proporções do subtipo T_{FR} em pacientes com NMOSD soropositivos para anti-AQP4 podem impactar na patogenia da doença. Em contraste, observamos também elevadas concentrações de IL-10 nos pacientes quando comparado aos indivíduos saudáveis, indicando que esse parâmetro seja proveniente de células Treg CXCR5⁻ numa tentativa do sistema imune em modular o estado inflamatório mediado pela doença.

Sabendo que diferentes subtipos de células T_{FH} são determinados não só pela associação de marcadores de superfície específicos, como também pela produção combinada de IL-21 com outras citocinas (MORITA *et al.*, 2011; QI, 2016 TANGYE *et al.*, 2013; RASMUSSEN, 2008), observamos de forma inédita que os subtipos T_{FH} IL21⁺ IL-6⁺ e T_{FH} IL21⁺IL-17⁺ foram associados a maior grau de incapacidade neurológica e à ocorrência de novas recaídas clínicas nos pacientes. Evidências têm sugerido, de fato, o envolvimento das citocinas IL-6 e IL-17 na patogênese da NMOSD (CHIHARA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011). Conforme estudo publicado pelo nosso grupo (BARROS *et al.*, 2015), uma relação estreita entre a proporção de células T CD4⁺ positivas para os receptores *toll-like* TLR2 e TLR4 produtoras de IL-6

e IL-17 com a atividade da NMOSD foi observada. Baseado na informação de que diferentes padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) expressos por bactérias podem se ligar a TLR2 e TLR4, revela-se uma possível habilidade de produtos microbianos em modular o comportamento funcional das células T CD4⁺ envolvidas nas lesões clássicas da NMOSD. Apesar de não termos avaliado a expressão de TLR nas células T_{FH} dos nossos pacientes com NMOSD, existe a possibilidade de que uma parcela desses linfócitos T CD4⁺ TLR⁺ IL-17⁺ IL-6⁺ possam coexpressar CXCR5 e IL-21, o que poderia capacitá-las a auxiliar as reações dos centros germinativos na vigência de doenças infecciosas ou disbiose.

No que diz respeito à produção de autoanticorpos, a proporção desses subtipos de células T_{FH} IL21⁺ secretores de IL-6 e IL-17 foi maior nos pacientes com NMOSD soropositivos para IgG anti-AQP4 quando comparada aos pacientes soronegativos para esse anticorpo. Em acordância com nossos resultados, a produção de autoanticorpos foi dependente de células T_{FH} ICOS⁺IL-21⁺IL-17⁺ em modelo animal de Lupus Eritematoso Sistêmico, modelo clássico de doença autoimune de fundo humoral (WU *et al.*, 2008). Sabendo que a IL-6 auxilia na sobrevivência de plasmócitos, amplificando assim, a produção de anti-AQP4 (CHIHARA *et al.*, 2011), o aumento da população de células T_{FH} produtoras dessa citocina pode ajudar a explicar, ao menos parcialmente, a relação entre a soropositividade para anti-AQP4 e o maior risco e/ou pior recuperação de recaídas clínicas nos pacientes com NMOSD (SATO *et al.*, 2014). Infelizmente, não foi possível comparar os títulos de anticorpos anti-AQP4 às porcentagens de células T_{FH} no presente estudo, uma vez que, apesar da sua elevada sensibilidade, a dosagem de esses anticorpos pelo método CBA não é um método quantitativo clássico.

Por fim, ZHAO e colaboradores (2017) demonstraram a habilidade do rituximabe – medicamento imunobiológico constituído de mAb anti-CD20 que depleta as células B – em atenuar a atividade da NMOSD. Esse efeito benéfico foi relacionado a uma significativa redução na proporção de células cT_{FH} circulantes e nos níveis plasmáticos de IL-21 e IL-6 (ZHAO *et al.*, 2017). Por outro lado, em nosso estudo, todos os pacientes com NMOSD estavam sob a ação de algum tratamento, não necessariamente com rituximabe, e não observamos qualquer impacto na porcentagem das células T_{FH} no que diz respeito à modalidade de tratamento. Entretanto, o grupo avaliado nesse estudo foi muito pequeno e acreditamos que, ao

aumentar o número de participantes, alguma significância nesses resultados seja observada.

Em conclusão, nossos resultados sugerem que a gestação e a NMOSD favorecem a expansão das células T_{FH} periféricas funcionais capazes de auxiliar as células B na produção de anticorpos, sendo esse fenômeno associado a alterações na concentração de hormônios, como o estrogênio e a progesterona, promovida pela gestação. Além disso, a gestação também potencializa a capacidade da terapia antirretroviral em reconstituir a resposta imune humoral em mulheres infectadas pelo HIV-1, doença que sabidamente acomete as células T_{FH}.

CONCLUSÕES

- a) A gestação, em mulheres saudáveis, favorece a expansão de células T CD4⁺ CD45RO⁺ CXCR5⁺, capazes de expressar, ou não, os marcadores ICOS, PD-1 e CXCR3;
- b) As células TFH de gestantes saudáveis são capazes de produzir maiores quantidades de IL-21, IL-6 e IL-10, principalmente pelo compartimento de células TFH CXCR3⁺;
- c) A frequência de células TFH CXCR3⁺PD-1⁺IL-21⁺ circulantes foi diretamente relacionada aos níveis sistêmicos de estrogênio e de anticorpos anti-CMV e anti-HBsAg em gestantes;
- d) A infecção pelo HIV-1 reduziu a frequência de diferentes subtipos de células TFH em gestantes;
- e) A ocorrência de gestação amplificou a capacidade da terapia antirretroviral (TARV) em reconstituir o status funcional dos linfócitos TFH, determinada pela capacidade em produzir IL-21 e em ajudar os linfócitos B autólogos a produzir IgG;
- f) Em gestantes infectadas pelo HIV-1, a frequência de células TFH IL-21⁺ foi diretamente relacionada aos níveis sistêmicos de estrogênio e anticorpos anti-HBsAg;
- g) A capacidade da gestação em amplificar a recuperação de células TFH IL-10⁺ em detrimento a uma queda na porcentagem do subtipo de células TFH IL-6⁺ nas pacientes infectadas pelo HIV-1 em sucesso terapêutico pode ajudar a reduzir a expansão de células TFH disfuncionais;
- h) A frequência de células TFH foi maior nos pacientes com NMOSD que produziam anticorpos anti-AQP4;
- i) A frequência de células TFH IL-6⁺ e IL-17⁺ foi maior nos pacientes IgG anti-AQP4⁺ na NMOSD, fato correlacionado diretamente com o EDSS e com a ocorrência de recaídas clínicas;
- j) Os níveis plasmáticos de IL-6, IL-10, IL-17 and IL-21 foi maior na NMOSD, independente da produção de anticorpos anti-AQP4 e seus níveis foram associados com a frequência de células TFH produtoras das respectivas citocinas, exceto pela IL-10;

k) A frequência de TFH IL-10+ foi menor nos pacientes com NMOSD produtores de IgG anti-AQP4 e a sua porcentagem foi associada ao EDSS dos pacientes;

l) O estrogênio elevou a porcentagem de cTFH, cTFHICOS+, assim como dos subtipos de cTFH capazes de produzir IL-21 e IL-17;

m) Estrogênio e progesterona aumentaram a porcentagem de células TFR;

n) A ação em conjunto do estrogênio com progesterona reduziu a porcentagem de células B naïve, já o subtipo de células B de memória aumentou apenas na presença de estrogênio;

o) A progesterona reduziu a proporção de plasmablastos à medida que aumentou a porcentagem de plasmócitos secretores de anticorpos na presença de estrogênio, além de promover a produção de IgG;

p) A produção de IL-21 resultante de cocultura das células TFH com células B foi incrementada na presença de estrogênio e de progesterona;

q) A expressão do receptor de estrogênio foi maior nas células TFH, quando comparada às células não-TFH, e em mulheres (quando comparado à amostra masculina);

Nossos resultados sugerem que a gestação, através da elevada produção dos hormônios estrogênio e progesterona, modula a proporção e a diferenciação de células T_{FH} funcionais, responsáveis por auxiliar as células B na produção de anticorpos. Esse efeito dos hormônios gestacionais pode estar atrelado a atividade de doenças autoimunes de fundo humoral, como a NMOSD, na qual um desequilíbrio no eixo T_{FR}/T_{FH} estaria associado a produção de autoanticorpos. Ainda, intercorrências durante a gestação, como a infecção pelo HIV-1, prejudicam a expansão das células T_{FH} em níveis normais mesmo com introdução da terapia antirretroviral no início da gestação. Apesar disso, o uso da terapia antirretroviral por estas gestantes favorece a expansão de células cT_{FH} funcionais.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Cellular and Molecular Immunology. [s.l.] Elsevier/Saunders, 2012.

ABOUL-ENEIN, F. *et al.* Neuromyelitis Optica in Austria in 2011: To Bridge the Gap between Neuroepidemiological Research and Practice in a Study Population of 8.4 Million People. PLoS ONE, v. 8, n. 11, p. e79649, 5 nov. 2013.

ABRAHAMS, V. M. *et al.* First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. Molecular Human Reproduction, v. 10, n. 1, p. 55–63, 2004a.

ABRAHAMS, V. M. *et al.* Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989), v. 51, n. 4, p. 275–82, abr. 2004b.

ABUDULAI, L. N. *et al.* Production of IgG antibodies to pneumococcal polysaccharides is associated with expansion of ICOS⁺ circulating memory T follicular-helper cells which is impaired by HIV infection. PLoS ONE, v. 12, n. 5, p. 1–22, 2017.

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V *et al.* Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. Nature immunology, v. 8, n. 6, p. 639–646, 2007.

ADCOCK, E.W.; *et al* Human Chorionic Gonadotropin: Its Possible Role in Maternal Lymphocyte Suppression. Science, 181(4102):845–7, 1973

AIRAS, L.;KAAJA, R. Pregnancy and multiple sclerosis. Obstetric Medicine. 5: 94 – 97, 2012.

AKAZA, M. *et al.* Can anti-AQP4 antibody damage the blood-brain barrier? European neurology, v. 72, n. 5–6, p. 273–7, 2014.

ALOULO, M. *et al.* Follicular regulatory T cells can be specific for the immunizing antigen and derive from naive T cells. Nature Communications, v. 7, p. 1–10, 2016.

ALUVIHARE, V. R.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A. G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. Nature immunology, v. 5, n. 3, p. 266–71, mar. 2004.

ALY, E. *et al.* Middle East Fertility Society Journal Pregnancy outcome in patients with systemic lupus erythematosus: A single center study in the High Risk Pregnancy unit. Volume 21, Issue 3, Pages 168-174, 2016.

ANDERSSON, J. *et al.* The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. Journal of immunology (Baltimore,

Md. : 1950), v. 174, n. 6, p. 3143–3147, 2005.

ANNUNZIATO, F.; COSMI, L.; LIOTTA, F.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S. Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends Immunol*, 33: 505–512, 2012.

ANNUNZIATO, F.; et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.*, 204(8): 1849-1861, 2007.

ANTONELLI, A.; et al. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*.13(3):272-80, 2014.

APPAY, V. et al. HIV-specific CD8+ T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J. Exp. Med.*, v. 192, n. 1, p. 63–75, 2000.

ARAKI, M. et al. Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica: a pilot study. *Neurology*, v. 82, n. 15, p. 1302–6, 15 abr. 2014.

AREIA, A., et al., Can membrane progesterone receptor alpha on T regulatory cells explain the ensuing human labour? *J. Reprod. Immunol.*, 113: p. 22–6, 2016.

ARGYRIOU, A A; MAKRIS, N. Neuromyelitis optica: a distinct demyelinating disease of the central nervous system. *Acta neurologica Scandinavica*, v. 118, n. 4, p. 209–17, out. 2008.

ARIAS, R. A.; MUÑOZ, L. D. ÍA.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A. Transmission of HIV-1 infection between trophoblast placental cells and T-cells take place via an LFA-1-mediated cell to cell contact. *Virology*, v. 307, n. 2, p. 266–277, mar. 2003.

ARRUVITO, L.; et al. NK cells expressing a progesterone receptor are susceptible to progesterone-induced apoptosis. *Journal of immunology*,180(8):5746–53, 2008.

ASGARI, N. et al. A population-based study of neuromyelitis optica in Caucasians. *Neurology*, v. 76, n. 18, p. 1589–95, 3 maio 2011.

BALANDYA, E.; WIELAND-ALTER, W.; SANDERS, K.; LAHEY, T. Human seminal plasma fosters CD4(+) regulatory T-cell phenotype and transforming growth factor- β 1 expression. *Am J Reprod Immunol.*, 68:322–330, 2012.

BALLESTEROS-TATO, A. et al. Interleukin-2 Inhibits Germinal Center Formation by Limiting T Follicular Helper Cell Differentiation. *Immunity*, v. 36, n. 5, p. 847–856, 2012.

BANSAL, A.S.; et al. Mechanism of human chorionic gonadotrophin-mediated immunomodulation in pregnancy. *Expert Rev Clin Immunol.* ,8(8):747-53, 2012.

BARIN, F. et al. Revisiting the role of neutralizing antibodies in mother-to-child transmission of HIV-1. *Journal of Infectious Diseases*, v. 193, n. 11, p. 1504–1511, 2006.

BARNES, P. J. Corticosteroids: The drugs to beat. *European Journal of*

Pharmacology, v. 533, n. 1–3, p. 2–14, 8 mar. 2006.

BARROS, P. O. et al. Prediction of disease severity in neuromyelitis optica by the levels of IL-6 produced during remission phase. *Clinical and experimental immunology*, n. II, p. 1–10, 2015.

BARUG, D. et al. Maternal pertussis vaccination and its effects on the immune response of infants aged up to 12 months in the Netherlands: an open-label, parallel, randomised controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 19, n. 4, p. 392–401, 2019.

BAUD D, GREUB G. Intracellular bacteria and adverse pregnancy outcomes. *Clin Microbiol Infect.* 17:1312±1322, 2011.

BAUMJOHANN, D. et al. Persistent Antigen and Germinal Center B Cells Sustain T Follicular Helper Cell Responses and Phenotype. *Immunity*, v. 38, n. 3, p. 596–605, 2013.

BAUQUET, A. T. et al. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nature Immunology*, v. 10, n. 2, p. 167–175, 2009.

BEAMAN, K.; In pregnancy: active maternal immunity is induced by capacitated sperm. *Fertility and Sterility*, 96(3):S94–S95, 2011.

BENNETT, J. L. et al. Intrathecal pathogenic anti-aquaporin-4 antibodies in early neuromyelitis optica. *Annals of neurology*, v. 66, n. 5, p. 617–29, nov. 2009.

BENNETT, J. L. Finding NMO: The Evolving Diagnostic Criteria of Neuromyelitis Optica. *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*, v. 36, n. 3, p. 238–45, set. 2016.

BENTEBIBEL SE, et al. Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Science Translational Medicine*. 5:176ra132, 2013.

BERTRAMS, J.; KUWERT, E.; LOHMEYER, H.H. THE specificity of leukocyte antibodies in histocompatibility testing of serum from prima- and multiparas. *Bibliotheca haematologica*, 37:98–106, 1971.

BEST, C.L.; GRIFFIN, P.M.; HILL, J.A. Interferon gamma inhibits luteinized human granulosa cell steroid production in vitro. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 172(5):1505–10, 1995.

BICHUETTI, D. B. et al. Neuromyelitis Optica Treatment. *Archives of Neurology*, v. 67, n. 9, p. 126–138, 1 set. 2010.

BICHUETTI, D. B. et al. Patients with neuromyelitis optica have a more severe disease than patients with relapsingremitting multiple sclerosis, including higher risk

of dying of a demyelinating disease. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 71, n. 5, p. 275–279, maio 2013.

BILLINGTON, W.D. The immunological problem of pregnancy: 50 years with the hope of progress. A tribute to Peter Medawar. *Journal of Reproductive Immunology*. Elsevier, 60(1):1–11, 2003.

BLANCHE, S. et al. A prospective study of infants born to women seropositive for human immunodeficiency virus type 1. HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group. *The New England journal of medicine*, v. 320, n. 25, p. 1643–8, jun. 1989.

BONNAN, M. et al. Plasma exchange in severe spinal attacks associated with neuromyelitis optica spectrum disorder. *Multiple Sclerosis Journal*, v. 15, n. 4, p. 487–492, 1 abr. 2009.

BOSSALLER, L. et al. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 177, n. 7, p. 4927–4932, 2006.

BOSWELL, K. L. et al. Loss of Circulating CD4 T Cells with B Cell Helper Function during Chronic HIV Infection. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2014.

BRADL, M. et al. Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Annals of neurology*, v. 66, n. 5, p. 630–43, nov. 2009.

BRADL, M.; LASSMANN, D. H. Anti-aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica: how to prove their pathogenetic relevance? *International MS journal*, v. 15, n. 3, p. 75–8, set. 2008.

BREITFELD, D. et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *The Journal of experimental medicine*, v. 192, n. 11, p. 1545–52, 2000.

BRYANT VL, et al. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. *J Immunol*.179(12):8180-90, 2007.

BURGESS, T.; YORK, N. *From Mother to Child*. v. 44, n. 2, p. 198–209, 2001.

BURTON, G. J. et al. Physical breaks in the placental trophoblastic surface: significance in vertical transmission of HIV. *AIDS (London, England)*, v. 10, n. 11, p. 1294–6, set. 1996.

CABRE, P. Environmental changes and epidemiology of multiple sclerosis in the French West Indies. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 286, n. 1–2, p. 58–61, 15 nov. 2009.

CABRE, P. et al. MS and neuromyelitis optica in Martinique (French West Indies). *Neurology*, v. 56, n. 4, p. 507–14, 27 fev. 2001.

CABRERA-GÓMEZ, J. A. et al. An epidemiological study of neuromyelitis optica in Cuba. *Journal of Neurology*, v. 256, n. 1, p. 35–44, 9 jan. 2009.

CAMPBELL, A. W. Autoimmunity and the gut. *Autoimmune diseases*, v. 2014, p. 152428, 2014.

CARLSON, T. et al. The Th17-ELR+ CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease. *The Journal of experimental medicine*, v. 205, n. 4, p. 811–23, 14 abr. 2008.

CEDERBOM, L.; HALL, H.; IVARS, F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate costimulatory molecules on antigen-presenting cells. *European journal of immunology*, v. 30, n. 6, p. 1538–43, jun. 2000.

CHAILLON, A. et al. The breadth and titer of maternal HIV-1-specific heterologous neutralizing antibodies are not associated with a lower rate of mother-to-child transmission of HIV-1. *Journal of virology*, v. 86, n. 19, p. 10540–6, 2012.

CHANG, K.-H. et al. Biomarkers for neuromyelitis optica. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, v. 440, p. 64–71, 2 fev. 2015.

CHAOUAT, G, MONNOT P, HOFFMANN M, VOISIN GA. Regulatory T cells in pregnancy. VI. Evidence for T-cell-mediated suppression of CTL generation toward paternal alloantigens. *Cell Immunol.* 68(2):322-31, 1982.

CHECK, J.H.; et al. Miscarriage in the first trimester according to the presence or absence of the progesterone-induced blocking factor at three to five weeks from conception in progesterone supplemented women. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 32:13–14, 2005.

CHEN, J.Z.; WONG, M.H.; BRENNECKE, S.P.; KEOGH, R.J. The effects of human chorionic gonadotrophin, progesterone and oestradiol on trophoblast function. *Mol Cell Endocrinol.* 342(1-2):73-80, 2011.

CHEVALIER N, et al. CXCR5 Expressing Human Central Memory CD4 T Cells and Their Relevance for Humoral Immune Responses. *J Immunol.* 186:5556–5568, 2011.

CHEVALIER, M. F. et al. Phenotype alterations in regulatory T-cell subsets in primary HIV infection and identification of Tr1-like cells as the main interleukin 10-producing CD4+ T cells. *Journal of Infectious Diseases*, v. 211, n. 5, p. 769–779, 2015.

CHIHARA, N., et al. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 108(9):3701-3706, 2011.

CHOI, Y. S. et al. ICOS Receptor Instructs T Follicular Helper Cell versus Effector Cell Differentiation via Induction of the Transcriptional Repressor Bcl6. *Immunity*, v. 34, n. 6, p. 932–946, 2011.

CHOI, Y. S.; YANG, J. A.; CROTTY, S. Dynamic regulation of Bcl6 in follicular helper

CD4 T (TFH) cells. *Current Opinion in Immunology*, v. 25, n. 3, p. 366–372, 2013.

CHRISTENSEN J. R., BÖRNSEN L., RATZER R., et al. Systemic inflammation in progressive multiple sclerosis involves follicular T-helper, Th17- and activated B-cells and correlates with progression. *PLoS ONE*.8(3), 2013.

CHUNG, Y., et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med*. 17:983–988, 2011.

CLEMENS, L.E.; SIITERI, P.K.; STITES, D.P. Mechanism of immunosuppression of progesterone on maternal lymphocyte activation during pregnancy. *Journal of immunology. American Association of Immunologists*,122(5):1978–85, 1979.

CLERICI, M. et al. Cellular immune factors associated with mother-to-infant transmission of HIV. *AIDS (London, England)*, v. 7, n. 11, p. 1427–33, nov. 1993.

COCCHI, F. et al. Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the Major HIVSuppressive Factors Produced by CD8 \sup ;+ \sup ; T Cells. *Science*, v. 270, n. 5243, p. 1811 LP-1815, 15 dez. 1995.

CODES, L. et al. Liver fibrosis in women with chronic hepatitis C: evidence for the negative role of the menopause and steatosis and the potential benefit of hormone replacement therapy. *Gut*, v. 56, n. 3, p. 390–395, 2007.

COHEN, K. et al. Early Preservation of CXCR5+ PD-1+ Helper T Cells and B Cell Activation Predict the Breadth of Neutralizing Antibody Responses in Chronic HIV-1 Infection. *Journal of Virology*, v. 88, n. 22, p. 13310–13321, 2014.

COLLONGUES, N. et al. Neuromyelitis optica in France: a multicenter study of 125 patients. *Neurology*, v. 74, n. 9, p. 736–42, 2 mar. 2010.

COSMI, L.; ANNUNZIATO, F.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S.; MANETTI, R. Chemoattractant receptors expressed on type 2 T cells and their role in disease. *Int Arch Allergy Immunol.*, 125(4):273-9, 2001.

COSSBURN, M. et al. The prevalence of neuromyelitis optica in South East Wales. *European Journal of Neurology*, v. 19, n. 4, p. 655–659, abr. 2012.

COSTANZI, C. et al. Azathioprine: Tolerability, efficacy, and predictors of benefit in neuromyelitis optica. *Neurology*, v. 77, n. 7, p. 659–666, 16 ago. 2011.

CROTTY, S. A brief history of T cell help to B cells. *Nature reviews. Immunology*, v. 15, n. 3, p. 185–9, 2015.

CROTTY, S. Follicular Helper CD4 T Cells (T FH). *Annual Review of Immunology*, v. 29, n. 1, p. 621–663, 23 abr. 2011.

CUBAS, R. A et al. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nature medicine*, v. 19, n. 4, p. 494–9, 2013.

CUNNINGHAM M, GILKESON G. Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. *Clin*

Rev Allergy Immunol. 40(1):66-73, 2011.

CUTOLO, M.; et al. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus*, 13(9):635–8, 2004.

DAY, C. L. et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, v. 443, n. 7109, p. 350–4, 2006.

DE BREE, G. J.; LYNCH, R. M. B cells in HIV pathogenesis. *Current opinion in infectious diseases*, v. 29, n. 1, p. 23–30, 2016.

DE CLERCQ, E. The design of drugs for HIV and HCV. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 6, n. 12, p. 1001–1018, 2007.

DE MESTRE, A. et al. Split immunological tolerance to trophoblast. *International Journal of Developmental Biology*, v. 54, n. 2–3, p. 445–455, 2010.

DENISON F.C; GRANT, V.E.; CALDER, A.A.; KELLY, R.W. Seminal plasma components stimulate interleukin-8 and interleukin-10 release. *Mol Hum Reprod.*, 5(3):220-6, 1999.

DESHMUKH H, WAY SS. Immunological Basis for Recurrent Fetal Loss and Pregnancy Complications. *Annu Rev Pathol.* 14:185-210, 2019.

DICKOVER, R. et al. Role of maternal autologous neutralizing antibody in selective perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 escape variants. *Journal of virology*, v. 80, n. 13, p. 6525–6533, 2006.

DIETL, J. et al. Natural killer cells and dendritic cells at the human feto-maternal interface: an effective cooperation? *Placenta*, v. 27, n. 4–5, p. 341–7, jan. 2006.

DIMITRIJEVIĆ M, et al.

Sex differences in TFH cell help to B cells contribute to sexual dimorphism in severity of rat collagen-induced arthritis. *Sci Rep.* 10(1):1214, 2020.

DOUEK, D. C. et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*, v. 417, n. 6884, p. 95–98, 2002.

DOUGLAS, G. C. et al. Cell-mediated infection of human placental trophoblast with HIV in vitro. *AIDS research and human retroviruses*, v. 7, n. 9, p. 735–40, set. 1991.

DUAX WL, GRIFFIN JF, WEEKS CM, KORACH KS. Molecular conformation, receptor binding, and hormone action of natural and synthetic estrogens and antiestrogens. *Environ Health Perspect.* 61:111-21, 1985.

DUSTIN, M.L; TSENG, S.Y.; VARMA, R.; CAMPI, G. T-cell-dendritic cell immunological synapses. *Cur Opin Immunol*,18:512-16, 2006.

EGGENA, M. et al. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol*, v. 174, n. 7, p. 4407–4414, 2005.

ELLER, M. A. et al. Expansion of inefficient HIV-specific CD8+ T cells during acute infection. *Journal of Virology*, v. 90, n. February, p. JVI.02785-15, 2016.

ENGDAHL C, BONDT A, HARRE U, et al.

Estrogen induces St6gal1 expression and increases IgG sialylation in mice and patients with rheumatoid arthritis: a potential explanation for the increased risk of rheumatoid arthritis in postmenopausal women. *Arthritis Res Ther*. 20(1):84, 2018.

ENSOLI, F. et al. Decreased T cell apoptosis and T cell recovery during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, v. 97, n. 1, p. 9–20, 2000.

ERLANDSSON MC, et al. Oestrogen receptor specificity in oestradiol-mediated effects on B lymphopoiesis and immunoglobulin production in male mice. *Immunology* 108(3):346–351, 2003.

ETO, D. et al. IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (TFH) differentiation. *PLoS One*. 6(3):e17739, 2011.

EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY. Risk factors for mother-to-child transmission of HIV-1. *The Lancet*, v. 339, n. 8800, p. 1007–1012, abr. 1992.

FAN, X. et al. Circulating Memory T Follicular Helper Cells in Patients with Neuromyelitis Optica/Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. *Mediators of Inflammation*, v. 2016, p. 1–13, 2016.

FANG L, et al. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-IgG Contributes to Oligodendrocytopathy in the Presence of Complement, Distinct from Astrocytopathy Induced by AQP4-IgG. *Neurosci Bull*. 35(5):853-866, 2019.

FARRAR, J.D.; ASNAGLI, H.; MURPHY, K.M. T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J Clin Invest*, 109: 431–435, 2002.

FAUCI AS, et al. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med*. 124:654-663, 1996.

FAVRE, D. et al. Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection. *PLoS Pathogens*, v. 5, n. 2, 2009.

FEINBERG, B.B. Cytokine regulation of trophoblast steroidogenesis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 78(3):586–91, 1994.

FERNANDEZ, N.; et al. A critical review of the role of the major histocompatibility complex in fertilization, preimplantation development and feto-maternal interactions. *Human reproduction update*, 5(3):234–48, 1999.

FEST, S. et al. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York,*

N.Y. : 1989), v. 57, n. 1, p. 55–66, jan. 2007.

FONSECA VR, GRACA L. Contribution of FoxP3+ Tfr cells to overall human blood CXCR5+ T cells. *Clin Exp Immunol.* 195(3):302-304, 2019.

FONSECA, V. R. et al. Human blood Tfr cells are indicators of ongoing humoral activity not fully licensed with suppressive function. *Science Immunology*, v. 2, n. 14, p. eaan1487, 2017.

FONTENOT, J. D.; et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.*, 22(3):329-41, 2005.

FRANCO, J. M. et al. T-cell repopulation and thymic volume in HIV-1-infected adult patients after highly active antiretroviral therapy. *Blood*, v. 99, n. 10, p. 3702–3706, 2002.

FU W, LIU X, LIN X, et al. Deficiency in T follicular regulatory cells promotes autoimmunity. *J Exp Med.* 215(3):815-825, 2018.

FUJIHARA, K. et al. Neuromyelitis optica should be classified as an astrocytopathic disease rather than a demyelinating disease. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, v. 3, n. 2, p. 58–73, maio 2012.

GARCIA, P. M. et al. Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *The New England journal of medicine*, v. 341, n. 6, p. 394–402, ago. 1999.

GARCÍA-MIRANDA, P., et al. Predictive Value of Serum Antibodies and Point Mutations of AQP4, AQP1 and MOG in A Cohort of Spanish Patients with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. *Int J Mol Sci.* 20(22), 2019.

GOLD SM, VOSKU RR. Estrogen Treatment in Multiple Sclerosis. *J Neurol Sci.* 286(1-2): 99–103, 2009.

GRAY, G. E.; MCINTYRE, J. A. HIV and pregnancy. *BMJ*, v. 334, n. 7600, p. 950–953, 2007. GROHMANN, U. et al. IL-6 Inhibits the Tolerogenic Function of CD8 + Dendritic Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *The Journal of Immunology*, v. 167, n. 2, p. 708– 714, 2001.

GRIMALDI CM, JEGANATHAN V, DIAMOND B. Hormonal regulation of B cell development: 17 β -estradiol impairs negative selection of high-affinity DNAREactive B cells at more than one developmental checkpoint. *J Immunol.* 176:2703–10, 2006.

GROSSMAN, C.J. Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrine reviews*, 5(3):435–55, 1984.

GUERIN, L.R. PRINS, J.R.; ROBERTSON, S. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Human reproduction update*, 15(5):517–35, 2009.

GUERIN, L.R.; et al. Seminal fluid regulates accumulation of FOXP3+regulatory T

cells in the preimplantation mouse uterus through expanding the FOXP3+cell pool and CCL19-mediated recruitment. *Biol Reprod.*, 85:397-408, 2011.

GUSTAFSSON, C.; et al. Gene expression profiling of human decidual macrophages: evidence for immunosuppressive phenotype. *Public Library of Science*, 3(4):e2078, 2008.

HALL, O.J.; KLEIN, S.L. Progesterone-based compounds affect immune responses and susceptibility to infections at diverse mucosal sites. *Mucosal Immunol.* 10(5):1097-1107, 2017.

HAMMARSTRÖM, L. ; FUCHS, T. ; SMITH, C.I. The immunodepressive effect of human glucoproteins and their possible role in the nonrejection process during pregnancy. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, 58(5):417–22, 1979.

HAN, T. Inhibitory effect of human chorionic gonadotrophin on lymphocyte blastogenic response to mitogen, antigen and allogeneic cells. *Clinical and experimental immunology*, 18(4):529–35, 1974.

HARUKI Y, et al. Estrogen receptor in the “non-lymphocytes” in the thymus of the ovariectomized rat. *Tokai J Exp Clin Med* 8(1):31–39, 1983.

HAZRA, R.; SIBERRY, G. K.; MOFENSON, L. M. Growing up with HIV: children, adolescents, and young adults with perinatally acquired HIV infection. *Annual review of medicine*, v. 61, p. 169–85, 2010.

HE, J.; et al. Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5⁺ CD4⁺ T cells indicate TFH cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity*, 39(4):770-81, 2013.

HEALY, D.L.; Contributions of in vitro fertilization to knowledge of the reproductive endocrinology of the menstrual cycle. *Baillière’s clinical endocrinology and metabolism*, 1(1):133–52, 1987.

HEIKKINEN, J.; MÖTTÖNEN, M.; ALANEN, A.; LASSILA, O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol.*, 136:373-378, 2004.

HEIT, A. et al. Vaccination establishes clonal relatives of germinal center T cells in the blood of humans. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 214, n. 7, p. 2139–2152, 2017.

HEL, Z.; STRINGER, E.; MESTECKY, J. Sex steroid hormones, hormonal contraception, and the immunobiology of human immunodeficiency virus-1 infection. *Endocrine reviews*, 31(1):79–97, 2010.

HENRICKSON, S.E.; VON ADRIAN, U.H. Single-cell dynamics of T-cell priming. *Cur Opin Immunol*, 19: 249-58, 2007.

HERSHOW, R. C. et al. Increased vertical transmission of human immunodeficiency

virus from hepatitis C virus-coinfected mothers. Women and Infants Transmission Study. *The Journal of infectious diseases*, v. 176, n. 2, p. 414–20, ago. 1997.

HEYDARLOU, H. et al. Investigation of follicular helper T cells, as a novel player, in preeclampsia. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 120, n. 3, p. 3845–3852, 2019.

HIERWEGER, A.M. Progesterone modulates the T-cell response via glucocorticoid receptor-dependent pathways. *Am J Reprod Immunol*. 81(2):e13084, 2019.

HINSON, S. R. et al. Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2. *The Journal of experimental medicine*, v. 205, n. 11, p. 2473–81, 27 out. 2008.

HINSON, S. R. et al. Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica. *Neurology*, v. 69, n. 24, p. 2221–2231, 2007.

HIRANO, S.; FURUTAMA, D.; HANAFUSA, T. Physiologically high concentrations of 17beta-estradiol enhance NF-kappaB activity in human T cells. *American journal of physiology*, 292(4):R1465–71, 2007.

HÖFTBERGER R, LEISSER M, BAUER J, LASSMANN H. Autoimmune encephalitis in humans: how closely does it reflect multiple sclerosis ? *Acta Neuropathol Commun*. 3:80, 2015.

HÖFTBERGER, R. et al. Antibodies to MOG and AQP4 in adults with neuromyelitis optica and suspected limited forms of the disease. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, v. 21, n. 7, p. 866–74, jun. 2015.

HONG, J. J. et al. Early lymphoid responses and germinal center formation correlate with lower viral load set points and better prognosis of simian immunodeficiency virus infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 193, n. 2, p. 797–806, 2014.

HOSHINA, M.; et al. Linkage of human chorionic gonadotrophin and placental lactogen biosynthesis to trophoblast differentiation and tumorigenesis. *Placenta*,6(2):163–72, 1985.

HUANG, S. J. et al. Regulation of chemokine production in response to pro-inflammatory cytokines in first trimester decidual cells. *Journal of reproductive immunology*, v. 72, n. 1–2, p. 60–73, dez. 2006.

HUGHES, G.C.; CLARK, E.A.; WONG, A.H. The intracellular progesterone receptor regulates CD4+ T cells and T cell-dependent antibody responses. *Journal of leukocyte biology*, 93(3):369–75, 2013.

HUNT, J. S.; LANGAT, D. L. HLA-G: a human pregnancy-related immunomodulator. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 9, n. 4, p. 462–469, 2009.

HUPPERT, J. et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *The FASEB Journal*, v. 24, n. 4, p. 1023–1034, 1 abr. 2010.

HUTTER, H.; DOHR, G. HLA expression on immature and mature human germ cells. *Journal of Reproductive Immunology*, 38(2):101–22, 1988.

HYGINO, J. et al. The impact of pregnancy on the HIV-1-specific T cell function in infected pregnant women. *Clinical Immunology*, v. 145, n. 3, p. 177–188, 2012.

IÇÖZ, S.; et al. Enhanced IL-6 production in aquaporin-4 antibody positive neuromyelitis optica patients. *Int J Neurosci*. 120(1):71-5, 2010.

INOUE, T. Progesterone stimulates the induction of human endometrial CD56+ lymphocytes in an in vitro culture system. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81(4):1502–7, 1996.

INUI A, OGASAWARA H, NAITO T et al. Estrogen receptor expression by peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 26(10):1675–1678, 2007.

IORIO, R. et al. Astrocytic autoantibody of neuromyelitis optica (NMO-IgG) binds to aquaporin-4 extracellular loops, monomers, tetramers and high order arrays. *Journal of Autoimmunity*, v. 40, p. 21–27, fev. 2013.

ISHIZU, T. et al. Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, v. 128, n. Pt 5, p. 988–1002, maio 2005.

ISOBE, N. et al. Distinct features of immunoglobulin G2 aquaporin-4 antibody carriers with neuromyelitis optica. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, v. 6, n. 2, p. 154–158, 2015.

ITO, A.; et al. Estrogen inhibits systemic T cell expression of TNF-alpha and recruitment of TNF-alpha+ T cells and macrophages into the CNS of mice developing experimental encephalomyelitis. *Clin Immunol*, 102:275–282, 2002.

IYER, A. et al. A review of the current literature and a guide to the early diagnosis of autoimmune disorders associated with neuromyelitis optica. *Autoimmunity*, v. 47, n. 3, p. 154–161, 10 maio 2014.

JACOB, A. et al. Neuromyelitis optica: Changing concepts. *Journal of Neuroimmunology*, v. 187, n. 1–2, p. 126–138, jul. 2007.

JAISSWAL, M.K; et al. V-ATPase upregulation during early pregnancy: a possible link to establishment of an inflammatory response during preimplantation period of pregnancy. *Reproduction*, 143(5):713–25, 2012.

JARIUS, S. et al. Contrasting disease patterns in seropositive and seronegative neuromyelitis optica: A multicentre study of 175 patients. *Journal of Neuroinflammation*, v. 9, n. 1, p. 14, 19 jan. 2012.

JARIUS, S. et al. Mechanisms of disease: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. *Nature clinical practice. Neurology*, v. 4, n. 4, p. 202–14, abr. 2008.

JARIUS, S. et al. MOG-IgG in NMO and related disorders: a multicenter study of 50 patients. Part 1: Frequency, syndrome specificity, influence of disease activity, long-term course, association with AQP4-IgG, and origin. *Journal of Neuroinflammation*, v. 13, n. 1, p. 279, 2016.

JARIUS, S.; WILDEMANN, B. AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance. *Nature reviews. Neurology*, v. 6, n. 7, p. 383–92, jul. 2010.

JARIUS, S.; WILDEMANN, B. Aquaporin-4 antibodies (NMO-IgG) as a serological marker of neuromyelitis optica: A critical review of the literature. *Brain Pathology*, v. 23, n. 6, p. 661–683, 2013.

JASIAK-ZATONSKA M, et al. The Immunology of Neuromyelitis Optica-Current Knowledge, Clinical Implications, Controversies and Future Perspectives. *Int J Mol Sci*.17(3):273, 2016.

JASPER, M. J.; TREMELLEN, K. P.; ROBERTSON, S. A. Reduced expression of IL-6 and IL-1alpha mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. *J. Reprod. Immunol.*, 73: 74–84, 2007.

JINGWEN S, et al. PD-1 Controls Follicular T Helper Cell Positioning and Function. *Immunity*. 49(2): 264–274.e4, 2018.

JOHNSON, E. L.; CHAKRABORTY, R. Placental Hofbauer cells limit HIV-1 replication and potentially offset mother to child transmission (MTCT) by induction of immunoregulatory cytokines. *Retrovirology*, v. 9, n. 1, p. 101, 2012.

JOHNSTON, R. J. et al. Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Cell Differentiation*, v. 325, n. 5943, p. 1006–1010, 2009.

JOHNSTONE, F. et al. Vertical HIV transmission in pregnancy. *The Lancet*, v. 338, n. 8770, p. 829–830, set. 1991.

JONES BG, et al. Binding of estrogen receptors to switch sites and regulatory elements in the immunoglobulin heavy chain locus of activated B cells suggests a direct influence of estrogen on antibody expression. *Mol Immunol*. 77:97– 102, 2016.

JONES, M. V et al. Pathogenic aquaporin-4 reactive T cells are sufficient to induce mouse model of neuromyelitis optica. *Acta Neuropathologica Communications*, v. 3, p. 28, 21 maio 2015.

JONULEIT, H.; et al. Identification and functional characterization of human CD4(+) CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med.*, 193:1285–1294, 2001.

KALLURI, S. R. et al. Quantification and Functional Characterization of Antibodies to Native Aquaporin 4 in Neuromyelitis Optica. *Archives of Neurology*, v. 67, n. 10, p. 805–815, 1 out. 2010.

KANDA N, TSUCHIDA T, TAMAKI K. Estrogen enhancement Of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 42(2):328-37, 1999.

KANDA, N.; TAMAKI, K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *The Journal of allergy and clinical immunology*, v. 103, n. 2 Pt 1, p. 282–8, fev. 1999.

KAY, A. W. et al. Pregnancy Does Not Attenuate the Antibody or Plasmablast Response to Inactivated Influenza Vaccine. *Journal of Infectious Diseases*, v. 212, n. 6, p. 861–870, 2015.

KAYE, M.D.; JONES, W.R. (1971). Effect of human chorionic gonadotropin on in vitro lymphocyte transformation. *American journal of obstetrics and gynecology*, 109(7):1029–31.

KEBIR, H. et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature Medicine*, v. 13, n. 10, p. 1173–5, out. 2007.

KELLY, R.W.; CRITCHLEY, H.O. Immunomodulation by human seminal plasma: a benefit for spermatozoon and pathogen? *Human Reproduction*, 12(10):2200–7, 1997.

KIESEIER, B. C. et al. Disease amelioration with tocilizumab in a treatment-resistant patient with neuromyelitis optica: implication for cellular immune responses. *JAMA Neurology*, v. 70, n. 3, p. 390–3, 1 mar. 2013.

KIM DH, et al. Estrogen receptor α in T cells suppresses follicular helper T cell responses and prevents autoimmunity. *Exp Mol Med.* 51(4):1-9, 2019.

KIM, C. H. et al. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *The Journal of experimental medicine*, v. 193, n. 12, p. 1373–1381, 2001.

KIM, S-H. et al. Clinical spectrum of CNS aquaporin-4 autoimmunity. *Neurology*, v. 78, n. 15, p. 1179–1185, 10 abr. 2012a.

KING, A. Uterine leukocytes and decidualization. *Human reproduction update*, 6(1):28–36, 2000.

KING, C.; TANGYE, S. G.; MACKAY, C. R. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annual review of immunology*, v. 26, n. 1, p. 741–766, 2008.

KINOSHITA, M., et al. Astrocytic necrosis is induced by anti-aquaporin-4 antibody-positive serum. *NeuroReport*, 20(5), pp.508-512, 2009.

KIRA, J.-I. Neuromyelitis optica and opticospinal multiple sclerosis: Mechanisms and

pathogenesis. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP*, v. 18, n. 1, p. 69–79, fev. 2011.

KITANO, M. et al. Bcl6 Protein Expression Shapes Pre-Germinal Center B Cell Dynamics and Follicular Helper T Cell Heterogeneity. *Immunity*, v. 34, n. 6, p. 961–972, 2011.

KITLEY, J. et al. Myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies in adults with a neuromyelitis optica phenotype. *Neurology*, v. 79, n. 12, p. 1273–7, 18 set. 2012.

KLEIN, C. Pregnancy Recognition and Implantation of the Conceptus in the Mare. *Adv Anat Embryol Cell Biol.*, 216:165-88, 2015.

KOLTE, L. et al. Association between Larger Thymic Size and Higher Thymic Output in Human Immunodeficiency Virus–Infected Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 185, n. 11, p. 1578–1585, 2002.

KOMI, J., LASSILA, O. Nonsteroidal anti-estrogens inhibit the functional differentiation of human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 95(9):2875–2882, 2000.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*, v. 27, n. 1, p. 485–517, abr. 2009.

KROENKE, M. A et al. Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 188, n. 8, p. 3734– 44, 2012.

KROON, F. P. et al. Antibody response to influenza, tetanus and pneumococcal vaccines in HIV-seropositive individuals in relation to the number of CD4+ lymphocytes Protection of infants from infection with influenza A virus by transplacentally acquired antibody, 1994.

KUMAR, S. B. et al. Elevated cytokine and chemokine levels in the placenta are associated with in-utero HIV-1 mother-to-child transmission. *Aids*, v. 26, n. 6, p. 685–694, 2012.

KURTZKE, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, v. 33, n. 11, p. 1444–1452, 1983.

KWAK-KIM, J.; et al. Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors, and stress. *Am J Reprod Immunol.*, 72(2):129-40, 2014.

KYURKCHIEV D, IVANOVA-TODOROVA E, KYURKCHIEV SD. New target cells of the immunomodulatory effects of progesterone. *Reprod Biomed Online*. 21(3):304-11, 2010.

LAGAYE, S. et al. Cell-to-Cell Contact Results in a Selective Translocation of Maternal Human Immunodeficiency Virus Type 1 Quasispecies across a Trophoblastic Barrier by both Transcytosis and Infection Cell-to-Cell Contact Results

in a Selective Translocation of Maternal. *Journal of virology*, v. 75, n. 10, p. 4780–4791, maio 2001.

LAIDLAW, B. J. et al. Interleukin-10 from CD4 + follicular regulatory T cells promotes the germinal center response. *Science Immunology*, v. 2, n. 16, p. eaan4767, 2017.

LANA-PEIXOTO, M. A. Devic's neuromyelitis optica: a critical review. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 66, n. 1, p. 120–138, mar. 2008a.

LANDESMAN, S. H. et al. Obstetrical factors and the transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to child. The Women and Infants Transmission Study. *The New England journal of medicine*, v. 334, n. 25, p. 1617–23, jun. 1996.

LANGRISH, C. L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine*, v. 201, n. 2, p. 233–40, 17 jan. 2005.

LAPOINTE, N. et al. Transplacental transmission of HTLV-III virus. *The New England journal of medicine*, v. 312, n. 20, p. 1325–6, maio 1985.

LAWN, S. D.; WILKINSON, R. J. Immune reconstitution disease associated with parasitic infections following antiretroviral treatment. *Parasite Immunology*, v. 28, n. 11, p. 625–633, 2006.

LEE, B. et al. Inflammatory Cytokine Expression Is Correlated with the Level of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Transcripts in HIV-Infected Placental Trophoblastic Cells. *Journal of virology*, v. 71, n. 5, p. 3628–3635, 1997.

LENG, Q. et al. CTLA-4 upregulation during HIV infection: Association with anergy and possible target for therapeutic intervention. *Aids*, v. 16, n. 4, p. 519–529, 2002.

LENNON, V. A et al. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *The Journal of experimental medicine*, v. 202, n. 4, p. 473–7, 15 ago. 2005.

LENNON, V. A. et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *The Lancet*, v. 364, n. 9451, p. 2106–2112, dez. 2004.

LEWIS, S. H. et al. HIV-1 in trophoblastic and villous Hofbauer cells, and haematological precursors in eight-week fetuses. *The Lancet*, v. 335, n. 8689, p. 565–568, mar. 1990.

LI, Y., et al. Association of circulating follicular helper T cells with disease course of NMO spectrum disorders. *Journal of Neuroimmunology*. 278:239-246, 2015.

LI, Y.-J. et al. Association of circulating follicular helper T cells with disease course of NMO spectrum disorders. *Journal of Neuroimmunology*, v. 278, p. 239–246, jan. 2015.

LIEBERMAN, J. et al. Dressed to kill ? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection Review article Dressed to kill ? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-. *Blood*, v. 98, n. 6, p. 1667–1677, 2001.

LINDGREN, S. et al. HIV and child-bearing: clinical outcome and aspects of mother-to-infant transmission. *AIDS (London, England)*, v. 5, n. 9, p. 1111–6, set. 1991.

LINDQVIST, M. Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J Clin Invest.*, v. 122, n. 9, p. 3271–3280, 2012.

LINDSEY, J. W. et al. Variable results after rituximab in neuromyelitis optica. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 317, n. 1–2, p. 103–105, 15 jun. 2012.

LINHARES, U. C. et al. The Ex Vivo Production of IL-6 and IL-21 by CD4(+) T Cells is Directly Associated with Neurological Disability in Neuromyelitis Optica Patients. *Journal of clinical immunology*, v. 33, n. 1, p. 179–89, 5 jan. 2013.

LINTERMAN, M. A. et al. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nature Medicine*, v. 17, n. 8, p. 975–82, 2011.

LIU, C.; WANG, X.; SUN, X. Assessment of sperm antigen specific T regulatory cells in women with recurrent miscarriage. *Early Human Dev.*,89:95-100, 2013.

LIU, D. et al. T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature*, v. 517, n. 7533, p. 214–8, 2015.

LIU, H.Y; et al. Estrogen inhibition of EAE involves effects on dendritic cell function. *Journal of Neuroscience Research*, 70(2):238–48, 2002.

LIU, S. M.; KING, C. IL-21-Producing Th Cells in Immunity and Autoimmunity. *The Journal of Immunology*, v. 191, n. 7, p. 3501–3506, 1 out. 2013.

LOCCI, M. et al. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory TFH cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity*, v. 39, n. 4, p. 758–769, 2013.

LOCCI, M. et al. Activin A programs the differentiation of human T FH cells. *Nature Immunology*, v. 17, n. 8, p. 976–984, 2016.

LOPATA, A.; HAY, D.L. The potential of early human embryos to form blastocysts, hatch from their zona and secrete HCG in culture. *Human Reproduction*, 4(1):87–94, 1989.

LUAN, X. et al. An investigation of the relationship between recurrent spontaneous abortion and memory T follicular helper cells. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 78, n. 5, p. 1–9, 2017.

LUO, C.Y.; WANG, L.; SUN, C.; LI, D.J. Estrogen enhances the functions of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation

and bone resorption in vitro. *Cellular & molecular immunology*, 8(1):50–8, 2011.

LYNCH, J. B. et al. The breadth and potency of passively acquired human immunodeficiency virus type 1-specific neutralizing antibodies do not correlate with the risk of infant infection. *Journal of virology*, v. 85, n. March, p. 5252–5261, 2011

M. CEKIC, I. SAYEED, D.G. Stein, Combination treatment with progesterone and vitamin D hormone may be more effective than monotherapy for nervous system injury and disease, *Front. Neuroendocrinol.* 30 (2) 158–172, 2009.

MA, C.S.; DEENICK, E.K. Human T follicular helper (TFH) cells and disease. *Immunol Cell Biol.*, 92(1):64-71, 2014.

MA, C.S.; Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells. *Blood*, 119(17):3997-4008, 2012.

MA, J. et al. Increased Frequency of Circulating Follicular Helper T Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2012, p. 1–7, 2012.

MAARTENS G, CELUM C, LEWIN SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet*. 384(9939):258-71, 2014.

MACEIRAS, A. R. et al. T follicular helper and T follicular regulatory cells have different TCR specificity. *Nature Communications*, v. 8, p. 15067, 2017.

MADER, S. et al. Complement activating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in neuromyelitis optica and related disorders. *Journal of Neuroinflammation*, v. 8, n. 1, p. 184, jan. 2011.

MADER, S. et al. Patterns of Antibody Binding to Aquaporin-4 Isoforms in Neuromyelitis Optica. *PLoS ONE*, v. 5, n. 5, p. 7, 2010.

MANETTI, R.; et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 IL-12) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med*, 177: 1199–1204, 1993.

MANGINO, G. et al. HIV-1 Nef induces proinflammatory state in macrophages through its acidic cluster domain: involvement of TNF alpha receptor associated factor 2. *PloS one*, v. 6, n. 8, p. e22982, jan. 2011.

MANNEL, D.N.; FALK, W.; YRON, I. Inhibition of murine cytotoxic T cell responses by progesterone. *Immunology letters*, 26(1):89–94, 1990.

MANO, H.; CHERMANN, J. C. Fetal human immunodeficiency virus type 1 infection of different organs in the second trimester. *AIDS research and human retroviruses*, v. 7, n. 1, p. 83–8, jan. 1991.

MARAŞH, KARA B, ANIK Y. Seropositive neuromyelitis optica: a pediatric case report and 6-year follow-up. *Pediatr Neurol.* 2013 Sep;49(3):198-202, 2013.

MARIGNIER, R. et al. Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain : a journal of neurology*, v. 133, n. 9, p. 2578–2591, set. 2010.

MARLIN, R. et al. Decidual soluble factors participate in the control of HIV-1 infection at the maternofetal interface. *Retrovirology*, v. 8, n. 1, p. 58, 2011

MARTÍN-VILLA, et al. Diploid expression of human leukocyte antigen class I and class II molecules on spermatozoa and their cyclic inverse correlation with inhibin concentration. *Biology of reproduction*, 55(3):620–9, 1996.

MATIELLO, M. et al. Familial neuromyelitis optica. *Neurology*, v. 75, n. 4, p. 310–5, 27 jul. 2010.

MATSUOKA, T. et al. Heterogeneity of aquaporin-4 autoimmunity and spinal cord lesions in multiple sclerosis in Japanese. *Brain*, v. 130, n. 5, p. 1206–1223, 2 abr. 2007.

MATTERN, C. F. T. et al. Localization of Human Immunodeficiency Virus Core Antigen in Term Human Placentas The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : Illinois , 60007 . Copyright © 1992 by the American. *Pediatrics*, v. 89, n. 2, p. 207–9, 1992.

MCCARRON, M. J.; MARIE, J. C. TGF- β prevents T follicular helper cell accumulation and B cell autoreactivity. *Journal of Clinical Investigation*, v. 124, n. 10, p. 4375–4386, 2014.

MCDONALD, P. W. et al. IL-7 signalling represses Bcl-6 and the TFH gene program. *Nature communications*, v. 7, p. 10285, 2016.

MCDONALD, J. W. et al. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nature Medicine*, v. 4, n. 3, p. 291–7, mar. 1998.

MCKINSTRY, K. K.; STRUTT, T. M.; SWAIN, S. L. The potential of CD4 T-cell memory. *Immunol.*, 130(1):1-9. 2010.

MEALY, M. A. et al. Epidemiology of Neuromyelitis Optica in the United States. *Archives of Neurology*, v. 69, n. 9, p. 894–895, 1 set. 2012.

MEDAWAR, P.B. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 7:320-338, 1953.

MERLE, H. et al. Natural history of the visual impairment of relapsing neuromyelitis optica. *Ophthalmology*, v. 114, n. 4, p. 810–5, abr. 2007.

MILLIGAN, C. et al. Maternal neutralization-resistant virus variants do not predict infant HIV infection risk. *mBio*, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA ADULTOS VIVENDO COM HIV / AIDS Versão preliminar. Brasília: [s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para prevenção da transmissão vertical de HIV, sífilis e hepatites virais. 2015.

MIOSSEC, P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microb. Infect.*, 11:625-630, 2009.

MIYAMOTO, K.; KUSUNOKI, S. Intermittent Plasmapheresis Prevents Recurrence in Neuromyelitis Optica. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, v. 13, n. 6, p. 505–508, dez. 2009.

MOFENSON, L. M. Prevention in neglected subpopulations: prevention of mother-to-child transmission of HIV infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 50 Suppl 3, n. Suppl 3, p. S130-48, maio 2010.

MOIR, S.; FAUCI, A. B cells in HIV infection and disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, n. 4, p. 235–245, 2009.

MOLDENHAUER, L.M.; et al. Cross-presentation of male seminal fluid antigens elicits T cell activation to initiate the female immune response to pregnancy. *Journal of immunology*, 182(12):8080–93, 2009.

MONTEIRO, C. et al. Pregnancy favors the expansion of circulating functional follicular helper T Cells. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 121, n. March, p. 1–10, 2017.

MONTEIRO, C. et al. The expansion of circulating IL-6 and IL-17-secreting follicular helper T cells is associated with neurological disabilities in neuromyelitis optica spectrum disorders. *Journal of Neuroimmunology*, v. 330, n. December 2018, p. 12–18, 2019.

MORITA, R. et al. Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. *Immunity*, v. 34, n. 1, p. 108–121, 2011.

MOULTON VR. Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease. *Front. Immunol.*9:2279, 2018.

MUIR, R. et al. Altered Memory Circulating T Follicular Helper-B Cell Interaction in Early Acute HIV Infection. *PLoS Pathogens*, v. 12, n. 7, p. 1–17, 2016

MUZZIO, D.; ZENCLUSSEN, A.C.; JENSEN, F. The role of B cells in pregnancy: the good and the bad. *Am J Reprod Immunol.* 69(4):408-12, 2013.

NAGAISHI, A. et al. Clinical features of neuromyelitis optica in a large Japanese cohort: comparison between phenotypes. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 82, n. 12, p. 1360–1364, 1 dez. 2011.

NDUMBI, P. et al. Characteristics and determinants of T-cell phenotype normalization in HIV-1-infected individuals receiving long-term antiretroviral therapy. *HIV Medicine*, v. 15, n. 3, p. 153–164, 2013

NEELY, J. D. et al. Heterotetrameric Composition of Aquaporin-4 Water Channels. *Biochemistry*, v. 38, n. 34, p. 11156–11163, 24 ago. 1999.

NIELSEN, S. et al. Specialized Membrane Domains for Water Transport in Glial Cells: High-Resolution Immunogold Cytochemistry of Aquaporin-4 in Rat Brain. *Journal of Neuroscience*, v. 17, n. 1, 1997.

NOTO, A.; PANTALEO, G. B-cell abnormalities and impact on antibody response in HIV infection. *Current opinion in HIV and AIDS*, p. 1, 2017.

NURIEVA, R. I. et al. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science*, v. 325, n. 5943, p. 1001–1005, 2009.

OHKURA, N.; KITAGAWA, Y.; SAKAGUCHI, S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*. 38:414–423, 2013.

OMENDA, M. M. et al. Evidence for efficient vertical transfer of maternal HIV-1 envelopespecific neutralizing antibodies but no association of such antibodies with reduced infant infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, v. 64, n. 2, p. 163–6, 2013

ONABAJO, O. O.; GEORGE, J.; LEWIS, M.G; MATTAPALLIL, J.J. Rhesus Macaque lymph node PD1hiCD4+ T cells express high levels of CXCR5 and IL-21 and display a CCR7loICOS+Bcl6+ T-follicular helper (TFH) cell phenotype. *PlosOne*, 8: e59758, 2013.

PAHARKOVA-VATCHKOVA V, MALDONADO R, KOVATS S. Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c+CD11b(intermediate) dendritic cells from bone marrow precursors. *J Immunol* 172(3):1426–1436, 2004.

PALDI A, et al. Expression of the gene coding for the progesterone receptor in activated human lymphocytes. *Endocr J*. 2:317–320, 1994.

PALLIKKUTH, S. et al. Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIVinfected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine. *Blood*, v. 120, n. 5, p. 985–993, 2012.

PALLIKKUTH, S.; PARMIGIANI, A.; PAHWA, S. Role of IL-21 and IL-21 receptor on B cells in HIV infection. *Critical reviews in immunology*, v. 32, n. 2, p. 173–95, 2012.

PANCHANATHAN R, CHOUBEY D. Murine BAFF expression is upregulated by estrogen and interferons: implications for sex bias in the development of autoimmunity. *Mol Immunol*. 53:15–23, 2013.

PANDIT, L. et al. Optimizing the management of neuromyelitis optica and spectrum disorders in resource poor settings: Experience from the Mangalore demyelinating disease registry. *Annals of Indian Academy of Neurology*, v. 16, n. 4, p. 572–6, out.

2013.

PANKRATZ, S.; RUCK, T.; MEUTH, S. G.; WIENDL, H. CD4+HLA-G+ regulatory T cells: Molecular signature and pathophysiological relevance. *Hum Immunol.* S0198-8859(16)00025-2, 2016.

PAPADOPOULOS, M. C. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *The FASEB Journal*, 18 jun. 2004.

PAPADOPOULOS, M. C.; VERKMAN, A. S. Aquaporin 4 and neuromyelitis optica. *Lancet neurology*, v. 11, n. 6, p. 535–44, jun. 2012.

PAPAIIS-ALVARENGA, R. M. et al. Central Nervous System Idiopathic Inflammatory Demyelinating Disorders in South Americans: A Descriptive, Multicenter, Cross-Sectional Study. *PloS one*, v. 10, n. 7, p. e0127757, 2015a.

PAPAIIS-ALVARENGA, R. M. et al. Familial forms of multiple sclerosis and neuromyelitis optica at an MS center in Rio de Janeiro State, Brazil. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 356, n. 1–2, p. 196–201, 15 set. 2015b.

PARIKH, G., et al., Vitamin D regulates steroidogenesis and insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) production in human ovarian cells. *Horm. Metab. Res.*, 42(10): p. 754–7, 2010.

PARR MB, PARR EL. Effects of oestradiol-17 beta and progesterone on the number of plasma cells in uteri of ovariectomized mice. *J Reprod Fertil.* 77(1):91-7, 1986.

PATAS, K.; ENGLER, J.B.; FRIESE, M.A.; GOLD, S.M. Pregnancy and multiple sclerosis: fetomaternal immune cross talk and its implications for disease activity. *J Reprod Immunol.*, 97(1):140-6, 2013.

PAUL, F. Hope for a rare disease: eculizumab in neuromyelitis optica. *The Lancet Neurology*, v. 12, n. 6, p. 529–531, jun. 2013.

PEDERSEN, A.; et al. Macrophage conditioned media affects steroid hormone production by placental cultures. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 24(6):548–54, 1994.

PEPPER, M. et al. Opposing Signals from the Bcl6 Transcription Factor and the Interleukin-2 Receptor Generate T Helper 1 Central and Effector Memory Cells. *Immunity*, v. 35, n. 4, p. 583–595, 2011.

PEREIRA, W. L. DE C. J. et al. Epidemiological, clinical, and immunological characteristics of neuromyelitis optica: A review. *Journal of the neurological sciences*, v. 355, n. 1–2, p. 7–17, 15 ago. 2015.

PEREIRA, W.L.C.J. et al. Epidemiological, clinical, and immunological characteristics of neuromyelitis optica: A review. *Journal of the Neurological Sciences*. 355: 7–17, 2015.

PERREAU, M. et al. Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *The Journal of experimental medicine*, v. 210, n. 1, p. 143–56, 2013.

PEUCHMAUR, M. et al. HIV proteins absent from placentas of 75 HIV-1-positive women studied by immunohistochemistry. *AIDS (London, England)*, v. 5, n. 6, p. 741–5, jun. 1991.

PICCINNI, M.P.; et al. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nature medicine*, 4(9):1020–4, 1998.

PICCINNI, M.P.; et al. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *Journal of immunology*, 155(1):128–33, 1995.

PITT, D.; WERNER, P.; RAINE, C. S. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nature Medicine*, v. 6, n. 1, p. 67–70, jan. 2000.

PITTOCK, S. J. et al. Eculizumab in AQP4-IgG-positive relapsing neuromyelitis optica spectrum disorders: an open-label pilot study. *The Lancet Neurology*, v. 12, n. 6, p. 554–562, jun. 2013.

PITTOCK, S. J. et al. Neuromyelitis Optica and Non–Organ-Specific Autoimmunity. *Archives of Neurology*, v. 65, n. 1, p. 1107–1114, 1 jan. 2008.

POLANCZYK MJ, et al. Estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *Immunol.* 173(4):2227-30, 2004.

POLANCZYK, M.J. Enhanced FoxP3 expression and Treg cell function in pregnant and estrogen-treated mice. *J Neuroimmunol* 170(1–2):85–92, 2005.

POLIKARPOVA AV, et al. Immunomodulatory effects of progesterone and selective ligands of membrane progesterone receptors. *Steroids*.145:5-18, 2019.

PONGCHAROEN, S.; SUPALAP, K. Interleukin17 Increased Progesterone Secretion by JEG-3 Human Choriocarcinoma Cells. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 61(4):261-4, 2009.

PRABHUDAS, M. et al. Commentary Immune mechanisms at the maternal-fetal interface : perspectives and challenges. *Nat. Immunol.*, v. 16, n. 4, p. 328–334, 2015.

PRENDERGAST, A. et al. International perspectives, progress, and future challenges of paediatric HIV infection. *Lancet*, v. 370, n. 9581, p. 68–80, 2007.

PRÖBSTEL, A.-K. et al. Anti-MOG antibodies are present in a subgroup of patients with a neuromyelitis optica phenotype. *Journal of Neuroinflammation*, v. 12, n. 1, p. 46, 8 dez. 2015.

QI, H. T follicular helper cells in space-time. *Nature Reviews Immunology*.16(10):612-625, 2016.

Qi, H.; et al. TFH cell differentiation and their function in promoting B-cell responses. *Adv Exp Med Biol.*,841:153-80, 2014.

QUEK, A. M. L. et al. Effects of age and sex on aquaporin-4 autoimmunity. *Archives of Neurology*, v. 69, n. 8, p. 1039–43, 1 ago. 2012.

QUILLAY, H. et al. NK cells control HIV-1 infection of macrophages through soluble factors and cellular contacts in the human decidua. *Retrovirology*, v. 13, n. 1, p. 39, 2016.

RAFIEE M, et al. Vitamin D3 induces the expression of membrane progesterone receptors (mPRs) on naive CD4+ T lymphocyte cells in women of reproductive age. *Int Immunopharmacol.* 72:55-61, 2019.

RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology Today*, 18(10):478–82, 1997.

RAGUPATHY, V. et al. Effect of sex steroid hormones on replication and transmission of major HIV subtypes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 138, p. 63–71, 2013.

RAIMONDI, G.; TURNER, M.S.; THOMSON, A.W.; MOREL, P.A. Naturally occurring regulatory T cells: recent insights in health and disease. *Crit Rev Immunol.*, 27:61–95, 2007.

RASH, J. E. et al. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n. 20, p. 11981–6, 29 set. 1998.

RASMUSSEN, T. Follicular T helper cells and IL-21 in rheumatic diseases. *J Immunol.* 181(9):6038-6050, 2008.

REBOLDI, A. et al. C-C chemokine receptor 6–regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nature Immunology*, v. 10, n. 5, p. 514–523, 22 maio 2009.

REEVES, H. M.; WINTERS, J. L. The mechanisms of action of plasma exchange. *British Journal of Haematology*, v. 164, n. 3, p. 342–351, fev. 2014.

RITVO, P.-G. et al. High-resolution repertoire analysis reveals a major bystander activation of TFH and Tfr cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 115, n. 38, p. 9604–9609, 2018.

RIVERA, J. F. et al. Characteristics of Devic's disease (neuromyelitis optica) in Mexico. *Journal of Neurology*, v. 255, n. 5, p. 710–715, 19 maio 2008.

ROBERTSON, S. A.; et al. Role of high molecular weight seminal vesicle proteins in eliciting the uterine inflammatory response to semen in mice. *Journal of reproduction and fertility*, 107(2):265–77, 1996.

ROBERTSON, S. A.; et al. Transforming growth factor beta-a mediator of immune deviation in seminal plasma. *Journal of reproductive immunology*, 57(1-2):109–28, 2002.

ROBERTSON, S.A. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *Journal of animal science*, 85(13):e36–44, 2007.

ROBERTSON, S.A. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell and tissue research*, 322(1):43–52, 2005.

ROBERTSON, S.A. ; GUERIN, L.R. ; MOLDENHAUER, L.M. ; HAYBALL, J.D. Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy - the contribution of seminal fluid. *Journal of reproductive immunology*, 83(1-2):109–16, 2009.

ROBERTSON, S.A.; et al. Seminal fluid drives expansion of the CD4+CD25+ T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. *Biology of reproduction*, 80(5):1036–45, 2009.

ROBINSONA, D.P.; KLEINA, S.L. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Horm Behav.* 62(3): 263–271, 2012.

RODRIGUEZ, N. et al. Mechanisms associated with defective TH1 cytokine production in HIV infection. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 43(7):951-8, 1997.

RONCAROLO, M.G.; et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev.*, 212:28–50, 2006.

ROSALES, D.; KISTER, I. Common and Rare Manifestations of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Current Allergy and Asthma Reports*, v. 16, n. 6, 2016.

ROSSI, A. et al. Consequences of NMO-IgG binding to aquaporin-4 in neuromyelitis optica. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 24, p. E1511–E1511, 12 jun. 2012.

RUBTSOV, Y.P.; et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*, 28(4):546-58, 2008.

SAADOUN, S. et al. Neuromyelitis optica MOG-IgG causes reversible lesions in mouse brain. p. 1–9, 2014.

SAADOUN, S.; PAPADOPOULOS, M. C. Role of membrane complement regulators in neuromyelitis optica. *Multiple Sclerosis Journal*, v. 21, n. 13, p. 1644–1654, 1 nov. 2015.

SADANAND, S.; SUSCOVICH, T. J.; ALTER, G. Broadly Neutralizing Antibodies Against HIV: New Insights to Inform Vaccine Design. *Annual Review of Medicine*, v.

67, n. 1, p. 185–200, 2015.

SAGE PT, et al. Suppression by TFR cells leads to durable and selective inhibition of B cell effector function. *Nat Immunol.* 17(12):1436-1446, 2016.

SAGE, P. T. et al. The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. *Immunity*, v. 41, n. 6, p. 1026–1039, 2014.

SAGE, P. T. et al. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat Immunol*, v. 14, n. 2, p. 152–161, 2013.

SAGE, P.; SHARPE, A. T follicular regulatory cells. *Immunological Reviews.* 271(1):246-259.2016

SAITO, S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *Journal of Reproductive Immunology*, 47(2):87–103, 2000.

SAITO, S.; NAKASHIMA, A.; SHIMA, T.; ITO, M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *American journal of reproductive immunology*, 63(6):601–10, 2010.

SALTER, M. G.; FERN, R. NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. *Nature*, v. 438, n. 7071, p. 1167–1171, 22 dez. 2005.

SÁNCHEZ GOMAR I, et al. Comparative Analysis for the Presence of IgG Anti-Aquaporin-1 in Patients with NMO-Spectrum Disorders. *Int J Mol Sci.* 23;17(8), 2016.

SATO, D. K. et al. Aquaporin-4 antibody-positive cases beyond current diagnostic criteria for NMO spectrum disorders. *Neurology*, v. 80, n. 24, p. 2210–2216, 11 jun. 2013.

SATO, D., et al. Distinction between MOG antibody-positive and AQP4 antibody-positive NMO spectrum disorders. *Neurology.* 82(6):474-481, 2014.

SCHAERLI, P. et al. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *The Journal of experimental medicine*, v. 192, n. 11, p. 1553–62, 4 dez. 2000.

SCHMITT, N AND UENO, H. Regulation of Human Helper T Cell Subset Differentiation by Cytokines. *Curr Opin Immunol.* 34: 130–136, 2015.

SCHMITT, N. et al. IL-12 receptor b1 deficiency alters in vivo T follicular helper cell response in humans. *Blood*, v. 121, n. 17, p. 3375–3385, 2013.

CHMITT, N. et al. The cytokine TGF- β co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nature Immunology*, v. 15, n. 9, p. 856–865, 2014.

SCHMITT, N.; BENTEBIBEL, S. E.; UENO, H. Phenotype and functions of memory TFH cells in human blood. *Trends in Immunology*, v. 35, n. 9, p. 436–442, 2014.

SCHOENBERGER, S. P. et al. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40–CD40L interactions. *Nature*, v. 393, n. February, p. 480–483, 1998.

SEDDIKI, N. et al. Proliferation of weakly suppressive regulatory CD4⁺ T cells is associated with over-active CD4⁺ T-cell responses in HIV-positive patients with mycobacterial immune restoration disease. *European Journal of Immunology*, v. 39, n. 2, p. 391–403, 2009.

SEIFERT, H.A., et al.

Estrogen protects both sexes against EAE by promoting common regulatory cell subtypes independent of endogenous estrogen. *Metab Brain Dis.* 32(5):1747-1754, 2017.

SENTMAN, C.L.; et al. Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone. *Journal of Immunology*, 173(11):6760–6, 2004.

SEOL, H.; The role of CD4⁺CD25^{bright} regulatory T cells in the maintenance of pregnancy, premature rupture of membranes, and labor. *Yonsei Med J.*, 49:366, 2008.

SHAH NM, IMAMI N, JOHNSON MR. Progesterone Modulation of Pregnancy-Related Immune Responses. *Front Immunol.*9:1293, 2018.

SHANKAR, P. et al. Impaired function of circulating HIV-specific CD8⁽⁺⁾ T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood*, v. 96, n. 9, p. 3094–3101, 2000.

SHARKEY, D.J.; et al. Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus. *Journal of Immunology*, 188(5):2445–54, 2012a.

SHARKEY, D.J.; et al. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Molecular Human Reproduction*, 13 (7):491-501, 2007.

SHARKEY, D.J.; et al. TGF- β mediates proinflammatory seminal fluid signaling in human cervical epithelial cells. *Journal of Immunology*, 189(2):1024–35, 2012b.

SHEARER, W. T. et al. Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. Women and Infants Transmission Study Group. *The New England journal of medicine*, v. 336, n. 19, p. 1337–42, maio 1997.

SHIM GJ, GHERMAN D, KIM HJ et al. Differential expression of oestrogen receptors in human secondary lymphoid tissues. *J Pathol* 208(3):408–414, 2006.

SHIMIZU Y, et al. Pregnancy-related relapse risk factors in women with anti-AQP4 antibody positivity and neuromyelitis optica spectrum disorder. *Mult Scler.* 2016 Oct;22(11):1413-1420, 2015.

SHIMIZU, Y. et al. Development of extensive brain lesions following interferon beta therapy in relapsing neuromyelitis optica and longitudinally extensive myelitis. *Journal of Neurology*, v. 255, n. 2, p. 305–307, 21 fev. 2008.

SHOSHA E, PITTOCK SJ, FLANAGAN E, WEINSHENKER BG. Neuromyelitis optica spectrum disorders and pregnancy: Interactions and management. *Mult Scler.* 23(14):1808-1817, 2017.

SHULMAN, Z.; et al. T follicular helper cell dynamics in germinal centers. *Science*, 341(6146): 673-677, 2013.

SIASSAKOS, D. et al. HIV and pregnancy. *Journal of Integrated Care Pathways*, v. 12, n. 1, p. 32–42, maio 2008.

SIMPSON, N. et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, v. 62, n. 1, p. 234–244, 2010.

SMITHSON G, MEDINA K, PONTING I, KINCADE PW. Estrogen suppresses stromal cell-dependent lymphopoiesis in culture. *J Immunol* 155(7):3409–3417, 1995.

SOLLWEDEL, A.; et al. Protection from abortion by heme oxygenase-1 up-regulation is associated with increased levels of Bag-1 and neuropilin-1 at the fetal-maternal interface. *J Immunol.*, 15;175(8):4875-85, 2005.

SONG, X.; GAO, H.; QIAN, Y. Th17 Differentiation and Their Pro-inflammation Function. In: [s.l.] Springer Netherlands, p. 99–151, 2014.

SPITSIN, S. et al. Programmed death 1 receptor changes ex vivo in hiv-infected adults following initiation of highly active antiretroviral therapy. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 19, n. 5, p. 752–756, 2012.

SPRECHER, S. et al. Vertical transmission of HIV in 15-week fetus. *Lancet*, v. 2, n. 8501, p. 288–9, ago. 1986.

STARKEY, P.M.; SARGENT, I.L.; REDMAN, C.W. Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunology*, 65(1):129–34, 1988.

STECKEL, N.K.; KUHN, U.; BEELEN, D.W.; ELMAAGACLI, A.H. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation and in pregnant women: association with the induction of allogeneic immune tolerance? *Scand J Immunol*, 57:185–191, 2003.

STIMSON WH. Oestrogen and human T lymphocytes: presence of specific receptors in the T-suppressor/cytotoxic subset. *Scand J Immunol* 28(3):345–350, 1988.

STRAUB, R.H. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocrine reviews*, 28(5):521–74, 2007.

STREECK, H.; VAN BOCKEL, D.; KELLEHER, A. T-cell responses in primary HIV-1 infection. *Current opinion in HIV and AIDS*, v. 3, n. 1, p. 52–9, 2008.

SZEKERES-BARTHO J, et al. Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. *Cell Immunol.* 122:281–294, 1989.

SZEKERES-BARTHO J, et al. Reactivity of lymphocytes to a progesterone receptor-specific monoclonal antibody. *Cell Immunol.* 125:273–283, 1990.

SZEKERES-BARTHO, J. Progesterone-mediated immunomodulation in pregnancy: its relevance to leukocyte immunotherapy of recurrent miscarriage. *Immunotherapy*, 1(5):873-82, 2009.

SZEKERES-BARTHO, J. The Role of Progesterone in Feto-Maternal Immunological Cross Talk. *Med Princ Pract.* 27(4):301-307, 2018.

TAFURI, A.; et al. T Cell Awareness of Paternal Alloantigens During Pregnancy. *Science*, 270(5236):630–3, 1995.

TAGLAUER, E. S.; ADAMS WALDORF, K. M.; PETROFF, M. G. The hidden maternalfetal interface: Events involving the lymphoid organs in maternal-fetal tolerance. *International Journal of Developmental Biology*, v. 54, n. 2–3, p. 421–430, 2010.

TAI, P.; WANG, J., JIN, H; et al. Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *J Cell Physiol* 214(2):456–464, 2008.

TANAKA, M. et al. Distinct CSF cytokine/chemokine profiles in atopic myelitis and other causes of myelitis. *Neurology*, v. 71, n. 13, p. 974–981, 23 set. 2008.

TANGYE, S. G. et al. The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nature reviews. Immunology*, v. 13, n. 6, p. 412–426, 2013.

TELES, A.; et al. Control of uterine microenvironment by Foxp3+ cells facilitates embryoimplantation. *Front Immunol.*, 4:158, 2013.

THALER, C.J. Immunological Role for Seminal Plasma in Insemination and Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 21(3-4):147–50, 1989.

THANGAMANI, S., ET al., Cutting edge: progesterone directly upregulates vitamin d receptor gene expression for efficient regulation of T cells by calcitriol. *J. Immunol.*, 194(3): p. 883–6, 2015.

TILLING, R. et al. Parallel decline of CD8+/CD38++ T cells and viraemia in response to quadruple highly active antiretroviral therapy in primary HIV infection. *Aids*, v. 16, n. 4, p. 589–596, 2002.

TONG Y, et al. Influences of pregnancy on neuromyelitis optica spectrum disorders and multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 25:61-65, 2018.

TREBST, C. et al. Update on the diagnosis and treatment of neuromyelitis optica: recommendations of the Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS). *Journal of neurology*, v. 261, n. 1, p. 1–16, 23 nov. 2014.

TREMELLEN, K.; SEAMARK, R.F.; ROBERTSON, S.A. Seminal transforming growth factor beta1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus. *Biol. Reprod.*, 58(5):1217-25, 1998.

TROWSDALE, J.; BETZ, A.G. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nature immunology*, 7(3):241–6, 2006.

TRUNDLEY, A.; MOFFETT, A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens*, 63(1):1–12, 2004

UEMURA, Y.; LIU, T-Y; NARITA, Y.; SUZUKI, M.; MATSUSHITA, S. 17 Beta-estradiol (E2) plus tumor necrosis factor-alpha induces a distorted maturation of human monocyte-derived dendritic cells and promotes their capacity to initiate T-helper 2 responses. *Human immunology*, 69(3):149–57, 2008.

UENO, H. Human Circulating T Follicular Helper Cell Subsets in Health and Disease. *Journal of Clinical Immunology*, v. 36, p. 34–39, 2016.

UZAWA, A. et al. Cerebrospinal fluid interleukin-6 and glial fibrillary acidic protein levels are increased during initial neuromyelitis optica attacks. *Clinica Chimica Acta*, v. 421, p. 181–183, 2013.

VAN HOEK AN, MA T, YANG B, VERKMAN AS, BROWN D. Aquaporin-4 is expressed in basolateral membranes of proximal tubule S3 segments in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 278(2):F310-6, 2000.

VAN VOLLENHOVEN, R.F.; MCGUIRE, J.L. Estrogen, progesterone, and testosterone: Can they be used to treat autoimmune diseases? *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 61(4):276–84, 1994.

VARRIN-DOYER, M. et al. Aquaporin 4-specific T cells in neuromyelitis optica exhibit a Th17 bias and recognize Clostridium ABC transporter. *Annals of Neurology*, v. 72, n. 1, p. 53–64, jul. 2012.

VELU, V. et al. Induction of Th1-Biased T Follicular Helper (TFH) Cells in Lymphoid Tissues during Chronic Simian Immunodeficiency Virus Infection Defines Functionally Distinct Germinal Center TFH Cells. *The Journal of Immunology*, v. 197, n. 5, p. 1832–1842, 2016.

VERBOOGEN, D.R.; et al. The dendritic cell side of the immunological synapse. *Biomol Concepts*, 7(1):17-28, 2016.

VERKMAN, A. S.; ANDERSON, M. O.; PAPADOPOULOS, M. C. Aquaporins: important but elusive drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 13, n. 4, p. 259–277, 14 mar. 2014.

VIGNALI, D. A. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. *Nature reviews. Immunology*, v. 8, n. 7, p. 523–32, jul. 2008.

VINUESA, C. G. et al. Follicular Helper T Cells. *Annual Review of Immunology*, v. 34, n. 1, p. 335–368, 2016. WALKER, C. M. et al. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science*, v. 234, n. 4783, p. 1563 LP-1566, 19 dez. 1986.

VON WOLFF, M.; et al. Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. *Mol. Hum. Reprod.*, 6:627–634, 2000.

WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. How Diverse — CD4 Effector T Cells and their Functions. *Journal of Molecular Cell Biology*, v. 1, p. 20–36, 2009.

WANG, C. J. et al. CTLA-4 controls follicular helper T-cell differentiation by regulating the strength of CD28 engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 112, n. 2, p. 524–529, 2015.

WANG, C.; HILLSAMER, P.; KIM, C. H. Phenotype, effector function, and tissue localization of PD-1-expressing human follicular helper T cell subsets. *BMC Immunology*, v. 12, n. 1, p. 53, 2011a.

WANG, H., et al. Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *Journal of Clinical Neuroscience*.18(10):1313-1317, 2011b.

WANG, W.; et al. The deregulation of regulatory T cells on interleukin-17-producing T helper cells in patients with unexplained early recurrent miscarriage. *Human Reproduction*, 25(10):2591–6, 2010.

WATANABE, S. et al. Low-dose corticosteroids reduce relapses in neuromyelitis optica: a retrospective analysis. *Multiple Sclerosis Journal*, v. 13, n. 8, p. 968–974, 10 set. 2007.

WATERS, P. J. et al. Evaluation of aquaporin-4 antibody assays. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, v. 5, n. 3, p. 290–303, 22 out. 2014.

WATERS, P. J. et al. Serologic diagnosis of NMO: a multicenter comparison of aquaporin-4-IgG assays. *Neurology*, v. 78, n. 9, p. 665–71; discussion 669, 28 fev. 2012.

WEGMANN, T.G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MOSMANN, T.R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology today*, 14(7):353–6, 1993.

WEINSHENKER, B. G.; WINGERCHUK, D. M. The two faces of neuromyelitis optica.

Neurology, v. 82, n. 6, p. 466–7, 11 fev. 2014. .

WEISS RA. How does HIV cause AIDS? *Science*. 260:1273–1279, 1993.

WHITELAW, P.F.; CROY, B.A. Granulated lymphocytes of pregnancy. *Placenta*, 17(8):533–43, 1996.

WILCZYŃSKI, J. R. Th1/Th2 cytokines balance--yin and yang of reproductive immunology. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, .122(2):136–43, 2005.

WING, J. B. et al. A distinct subpopulation of CD25 – T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 114, n. 31, p. E6400–E6409, 2017.

WINGERCHUK, D. M. et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology*, v. 85, n. 2, p. 177–189, 14 jul. 2015.

WINGERCHUK, D. M. et al. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology*, v. 66, n. 10, p. 1485–9, 23 maio 2006.

WINGERCHUK, D. M. et al. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology*, v. 53, n. 5, p. 1107–14, 22 set. 1999.

WINGERCHUK, D. M.; WEINSHENKER, B. G. Neuromyelitis optica: clinical predictors of a relapsing course and survival. *Neurology*, v. 60, n. 5, p. 848–53, 11 mar. 2003.

WOLBURG, H.; PAULUS, W. Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, v. 119, n. 1, p. 75–88, jan. 2010.

WOLINSKY, S. M. et al. Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants. *Science (New York, N.Y.)*, v. 255, n. 5048, p. 1134–7, fev. 1992.

WOLLENBERG, I. et al. Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, v. 187, p. 4553–60, 2011.

WOLLENBERG, I., et al.. Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells. *J Immunol*. 187:4553– 4560, 2011.

WONG, C. K.; et al. Estrogen controls embryonic stem cell proliferation via store-operated calcium entry and the nuclear factor of activated T-cells (NFAT). *Journal of cellular physiology*, 227(6):2519–30, 2012.

WU, A. et al. Cerebrospinal fluid IL-21 levels in Neuromyelitis Optica and multiple sclerosis. *The Canadian journal of neurological sciences. Le Journal Canadien des Sciences Neurologiques*, v. 39, n. 6, p. 813–20, nov. 2012.

WU, H.; QUINTANA, F.; WEINER, H. Nasal Anti-CD3 Antibody Ameliorates Lupus by Inducing an IL-10-Secreting CD4+CD25-LAP+ Regulatory T Cell and Is Associated with Down-Regulation of IL-17+CD4+ICOS+CXCR5+ Follicular Helper T Cells. *The Journal of Immunology*. 181(9):6038-6050, 2008.

XIANG, J. et al. Ritonavir binds to and downregulates estrogen receptors: Molecular mechanism of promoting early atherosclerosis. *Experimental Cell Research*, v. 327, n. 2, p. 318–330, 2014.

XIAO, B.G.; LIU, X.; LINK, H. Antigen-specific T cell functions are suppressed over the estrogen-dendritic cell-indoleamine 2,3-dioxygenase axis. *Steroids*, 69(10):653–9, 2004.

XIONG, Y.; YUAN, Z.; HE, L. Effects of estrogen on CD4+CD25+ regulatory T cell in peripheral blood during pregnancy. *Asian Pac J Trop Med*, 6:748-752, 2013.
Xu B, Wang S, Zhou M, et al.

The ratio of circulating follicular T helper cell to follicular T regulatory cell is correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2017 Oct;183:46-53.

XU, H. et al. Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 523–7, 2013.

YAMAZAKI, T. et al. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *Journal of Immunology*, v. 181, n. 12, p. 8391–401, 15 dez. 2008.

YAO Y, LI H, DING J, XIA Y, WANG L. Progesterone impairs antigen-non specific immune protection by CD8 T memory cells via interferon- γ gene hypermethylation. *PLoS Pathog*. 13(11):e1006736, 2017.

YAPING, Y, et al. Autoantibody to MOG suggests two distinct clinical subtypes of NMOSD. *Sci China Life Sci*. 59(12): 1270–1281, 2016.

YAŞAR P, AYAZ G, USER SD, GÜPÜR G, MUYAN M. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol*.16(1):4-20, 2016.

YE, P.; KIRSCHNER, D. E.; KOURTIS, A. P. The thymus during HIV disease: role in pathogenesis and in immune recovery. *Current HIV research*, v. 2, n. 2, p. 177–83, 2004.

YOCKEY, L.J.; IWASAKI, A. Interferons and Proinflammatory Cytokines in Pregnancy and Fetal Development. *Immunity*. 49(3):397-412, 2018.

YUSUF, I. et al. Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 185, n. 1, p. 190–202, 2010.

ZAMVIL SS, SLAVIN AJ. Does MOG Ig-positive AQP4-seronegative opticospinal

inflammatory disease justify a diagnosis of NMO spectrum disorder? *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2(1):e62, 2015.

ZANG, Y.C.; et al. Regulatory effects of estriol on T cell migration and cytokine profile: inhibition of transcription factor NF- κ B. *Journal of Neuroimmunology*, 124(1-2):106–14, 2002.

ZENG, X.-N. et al. Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 34, n. 1, p. 34–39, jan. 2007.

ZHANG, J. Y. et al. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood*, v. 109, n. 11, p. 4671–4678, 2007.

ZHANG, L. et al. A higher frequency of CD4+CXCR5+ T follicular helper cells in patients with newly diagnosed IgA nephropathy. *Immunology Letters*, v. 158, n. 1, p. 101–108, 2014a.

ZHANG, M. et al. Thymic TFH cells involved in the pathogenesis of myasthenia gravis with thymoma. *Experimental Neurology*, v. 254, p. 200–205, 2014b.

ZHAO, C., et al. Increased Circulating T Follicular Helper Cells Are Inhibited by Rituximab in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Frontiers in Neurology*.8. 2017.

ZHONG, Z. et al. The impact of timing of maternal influenza immunization on infant antibody levels at birth. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 195, n. 2, p. 139–152, 2019.

ZHOU, M.; MELLOR, A.L. Expanded cohorts of maternal CD8+ T-cells specific for paternal MHC class I accumulate during pregnancy. *Journal of reproductive immunology*, 40(1):47–62, 1998.

ZHOU, Q.; et al. Isolated CD39 Expression on CD4+ T Cells Denotes both Regulatory and Memory Populations. *Am J Transplant.*, 9(10): 2303–2311, 2009.

ZHU, Y.; ZOU, L.; LIU, Y.-C. T follicular helper cells, T follicular regulatory cells and autoimmunity. *International immunology*, v. 28, n. 4, p. 173–179, 2015.

ANEXO A - Parecer consubstanciado do CEP 01

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
GAFFREE E
GUINLE/HUGG/UNIRIO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMPACTO DA TERAPIA ANTI-RETROVIRAL NA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS TFH EM GESTANTES INFECTADAS PELO HIV-1.

Pesquisador: Cleonice Alves de Melo Bento

Área Temática:

Versão:

CAAE: 30286514.4.0000.5258

Instituição Proponente: Hospital Universitário Gaffree e Guinle/HUGG/UNIRIO

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 666.631

Data da Relatoria: 29/05/2014

Apresentação do Projeto:

Estudo longitudinal, sobre 2 grupos de pacientes infectadas pelo HIV-1, sendo o primeiro grupo constituído por 20 gestantes do Instituto Fernandes Figueira sem outras comorbidades e não usuárias de drogas ilícitas, e o segundo grupo de pacientes não gestantes e oriundas do Hospital Gaffree e Guinle, onde serão quantificadas as células THf no sangue periférico dessas pacientes, antes e 4-6 meses a exposição ao TARV.

Objetivo da Pesquisa:

- 1- Determinar a frequência de células THF no sangue periférico de gestantes infectadas pelo HIV-1 antes de depois da TARV;
- 2- Avaliar a capacidade das células THF em ajudar as células B a produzirem in vitro IgG contra antígenos do HIV-1 antes de depois da TARV;
- 3- Correlacionar a frequência das células THF com a rede de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias produzida por culturas de células Th1/Th17 e Treg maternas em resposta ao vírus HIV-1 antes e depois da TARV;
- 4- Correlacionar a frequência de células THF com a contagem de células T CD4+ periféricas e da carga viral plasmática antes e depois da TARV;

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775

Bairro: Tijuca

CEP: 22.270-004

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)1264-5317

Fax: (21)1264-5177

E-mail: hugg@unirio.br;cephugg@gmail.com

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido



SERVIÇO DE OBSTETRÍCIA - CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Impacto da terapia antirretroviral na frequência de células T_{FH} em gestantes infectadas pelo HIV-1”

Pesquisador principal: Dr^a. Cleonice Alves de Melo Bento

Obstetra responsável: Dr. Vander Guimarães, Médico Obstetra do IFF

Telefones: +55 21 2531-7906 – 2554 1740

EXPLICAÇÃO PARA A PACIENTE SOBRE A PROPOSTA DO ESTUDO

1 - Objetivos do estudo

O objetivo desse projeto será avaliar a frequência das células T_{HF} , importantes células T $CD4^+$ envolvidas na produção de anticorpos protetores contra o vírus da AIDS.

2- Procedimentos

Para o nosso estudo, iremos colher duas amostras do seu sangue periférico no volume de 20 mL cada coleta. A primeira coleta (20 mL) será realizada pela enfermeira antes do médico iniciar o tratamento contra o vírus HIV-1 e a segunda será feita no último trimestre da gestação. Nenhuma coleta de sangue a mais será necessária. Toda a coleta do material biológico será conduzida com material adequado e estéril. Seu sangue não será usado nem para estudos genéticos nem tampouco com propósito comercial, e apenas os pesquisadores irão ter acesso a este material.

3- Riscos e Desconfortos

O procedimento usado para colher o seu sangue é o mesmo utilizado nos exames de rotina. Portanto, este não lhe trará qualquer risco ou desconforto adicionais.

4- Benefícios

Os resultados de nossos estudos não irão beneficiar diretamente nem você nem o seu filho. Eles irão nos ajudar a compreender como as drogas contra o HIV-1 podem melhorar a função das células $TCD4^+$ envolvidas em induzir a produção de anticorpos protetores contra o vírus. Esse conhecimento

possivelmente ajudará no desenvolvimento futuro de novas estratégias terapêuticas contra o HIV em gestantes, como por exemplo, a construção de futuras vacinas contra o HIV-1. Entretanto, nós não podemos lhe dar nenhuma garantia que você será beneficiada por participar dessa pesquisa.

5- Alternativa de participação

A sua participação nesse estudo é voluntária. Você pode desistir a qualquer momento. Mesmo desistindo, você continuará recebendo do nosso serviço o melhor acompanhamento e tratamento disponível.

6- Custos e compensações

Você não irá pagar nem receber nada para participar desse estudo.

7- Confidencialidade

Todas as informações referentes a você, assim como todos os resultados obtidos serão mantidas sob sigilo. Seu nome não será revelado, exceto para o grupo envolvido na pesquisa. Nenhuma publicação científica irá identificar você ou seu filho.

8- Questões e problemas

Caso você tenha qualquer questão ou problema com relação a este estudo, favor contactar o Dr. Vander, obstetra responsável do grupo de pesquisa, ou a Dr^a. Cleonice Bento, coordenadora do projeto.

9- Consentimento

Caso você tenha lido e entendido todas as informações previamente descritas, e você ESPONTANEAMENTE concorde em participar desse estudo, favor assinar na linha abaixo:

Assinatura da Paciente: _____

Número do prontuário: _____

Eu certifico que expliquei a proposta do estudo a paciente, e parece que ela entendeu os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios do estudo.

Assinatura do pesquisador: _____

Testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Data: _____

ANEXO C - Parecer consubstanciado do CEP 02

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
GAFFREE E
GUINLE/HUGG/UNIRIO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO E FUNCIONAL DOS LINFÓCITOS T DE PACIENTES COM NEUROMIELITE ÓPTICA

Pesquisador: Cleonice Alves de Melo Bento

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 31117614.0.0000.5258

Instituição Proponente: Hospital Universitário Gaffree e Guinle/HUGG/UNIRIO

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 666.770

Data da Relatoria: 29/05/2014

Apresentação do Projeto:

Avaliação fenotípica e funcional dos linfócitos T de pacientes com neuromielite óptica.”

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar nos pacientes com neuromielite óptica o comportamento das células T com prováveis implicações na patogênese e na resposta terapêutica ao corticoide. Esse tipo de estudo pode nos fornecer pistas valiosas quanto aos distúrbios imunes implicados na NMO, e conseqüentemente, ajudar no desenvolvimento de novas e mais eficazes imunoterapias

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A aplicação das perguntas não oferece nenhum tipo de risco ou desconforto. Caso você esteja se sentido desrespeitado, pode interrompê-lo a

qualquer momento. A obtenção do sangue periférico será conduzida por seu médico e utilizará todo o material sob condições adequadas e oferece

riscos mínimos.

Benefícios:

Os resultados obtidos pelo estudo serão analisados pelo nosso grupo. Estes resultados poderão

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775

Bairro: Tijuca

CEP: 22.270-004

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)1264-5317

Fax: (21)1264-5177

E-mail: hugg@unirio.br,cephugg@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
GAFFREE E
GUINLE/HUGG/UNIRIO



Continuação do Parecer: 666.770

fornecer informações importantes relacionadas à NMO. Mas, eles podem não lhe trazer benefícios imediatos, desde que são necessários vários anos de estudos em um número elevado de pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

projeto previamente aprovado pelo Comitê de ética do HUGG. A emenda apresenta um novo cronograma sem alterações importantes no projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Completo

Recomendações:

nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

nenhuma

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 29 de Maio de 2014

Assinado por:
Pedro Eder Portari Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775

Bairro: Tijuca

CEP: 22.270-004

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)1264-5317

Fax: (21)1264-5177

E-mail: hugg@unirio.br;cephugg@gmail.com