



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Taissa de Matos Kasahara

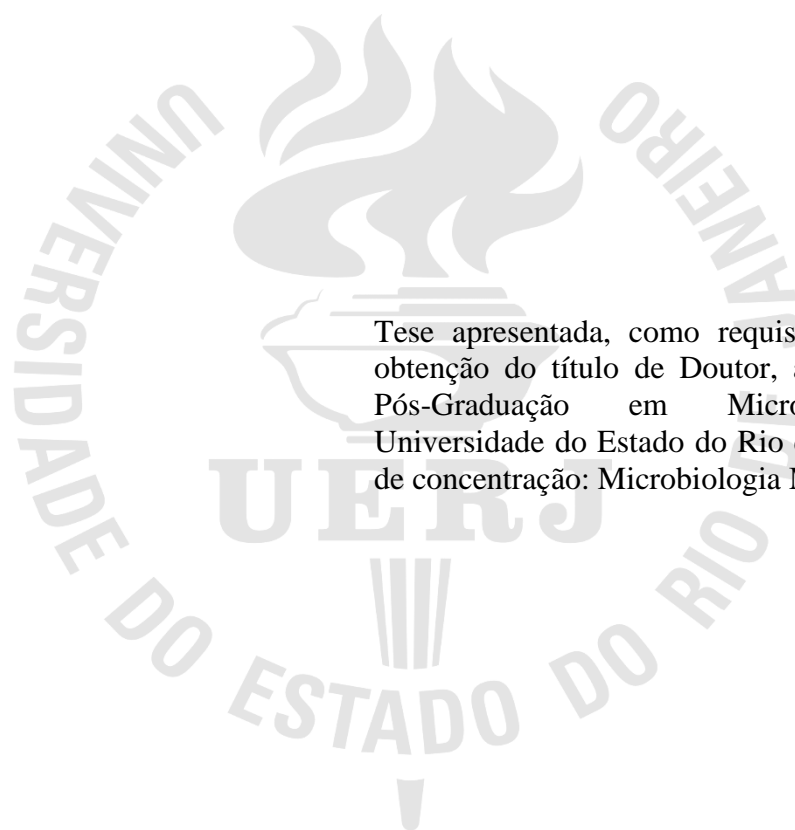
Caracterização fenotípica e funcional das células T helper foliculares em indivíduos imunologicamente diferenciados: gestantes, infectadas ou não pelo HIV-1, e portadores de deficiência na produção de anticorpos

Rio de Janeiro

2019

Taissa de Matos Kasahara

Caracterização fenotípica e funcional das células T helper foliculares em indivíduos imunologicamente diferenciados: gestantes, infectadas ou não pelo HIV-1, e portadores de deficiência na produção de anticorpos



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. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana

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

Coorientador: Prof. Dr. Sudhir Gupta

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

K19 Kasahara, Taissa de Matos.
Caracterização fenotípica e funcional das células T helper foliculares em indivíduos imunologicamente diferenciados: gestantes, infectadas ou não pelo HIV-1, e portadores de deficiência na produção de anticorpos / Taissa de Matos Kasahara. – 2019.
153 f.

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

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

1. Células T - Teses. 2. HIV (Vírus) - Teses. 3. Imunodeficiência de Variável Comum. 4. Gestantes - Teses. 5. Antígeno CTLA-4. I. Bento, Cleonice Alves de Melo. II. Gupta, Sudhir. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.97

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Taissa de Matos Kasahara

Caracterização fenotípica e funcional das células T helper foliculares em indivíduos imunologicamente diferenciados: gestantes, infectadas ou não pelo HIV-1, e portadores de deficiência na produção de anticorpos

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. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 9 de maio de 2019.

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

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Coorientador: Prof. Dr. Sudhir Gupta

Universidade da Califórnia Irvine

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Wânia Ferraz Pereira Manfro

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Amilcar Tanuri

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Dumith Chequer Bou Habib

Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Régis Mariano de Andrade

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que contribuíram para a sua finalização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades e por estar sempre ao meu lado.

A minha amada mãe, Fatima, por todo amor, carinho e apoio.

Ao meu querido pai e meus queridos irmãos, cunhadas e sobrinhos por estarem sempre ao meu lado e dispostos a me ajudarem.

A professora Cleonice, por ser uma orientadora incrível, um exemplo. Obrigada por todos os ensinamentos, o apoio, a dedicação e a paciência.

Ao professor Gupta e sua equipe por toda a receptividade e ensinamentos.

A toda equipe do LILiT, pelo apoio, companheirismo e por tornarem o laboratório um lugar único e especial.

A Joana, Priscila e Thaís pela amizade e ensinamentos.

A Clarice, Priscila, Lana e Aleida pela amizade, paciência e carinho.

Aos meus amigos Camila, Mariana, Andréa, Cecília, Carolina, Marco Antônio e Rayane, pela amizade, pelos momentos de diversão e por todo apoio e incentivo.

A todas as pessoas incríveis que tive a oportunidade de conhecer na UCI. A receptividade e o carinho de vocês fizeram toda a diferença.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro durante toda a minha formação.

Hope lies in dreams, in imagination and in the courage of those who dare to make dreams into reality.

Jonas Salk

RESUMO

KASAHARA, Taissa de Matos. *Caracterização fenotípica e funcional das células T helper foliculares em indivíduos imunologicamente diferenciados: gestantes, infectadas ou não pelo HIV-1, e portadores de deficiência na produção de anticorpos*. 2019. 153f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

As células T CD4⁺ auxiliares foliculares (T_{FH}) são um subtipo de células que regulam o desenvolvimento da imunidade humoral por promover a produção de plasmócitos produtores 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 as células T_{FH} circulantes (cT_{FH}) em indivíduos imunologicamente diferenciados, gestantes, infectadas ou não pelo HIV-1, e pacientes com imunodeficiência comum variável (CVID). 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 cT_{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 (CMV) e anti-vírus da hepatite B (HBs). Portanto, a gestação deve alterar o comportamento das células T_{FH} em situações adversas, tal como na infecção pelo HIV-1. Como esperado, a infecção viral reduziu a frequência de diferentes subtipos de células T_{FH} circulantes, no entanto, a ocorrência de gestação potencializou a capacidade da terapia antirretroviral (TARV) em acelerar a recuperação funcional desses linfócitos que foi determinada pela habilidade em liberar IL-21 e auxiliar as células B autólogas a produzir IgG em sistemas de co-cultura. 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-toxóide tetânico (TT). Além das imunodeficiências adquiridas, algumas imunodeficiências primárias comprometem a produção de anticorpos, o que pode estar associado a alterações nas células T_{FH}. Nossos resultados mostraram uma redução na porcentagem de células cT_{FH}17 em pacientes com CVID e um aumento na razão de células T_{FH}/células T reguladoras foliculares (T_{FR}) apenas em pacientes que apresentam comorbidades de fundo autoimune. Além disso, a porcentagem de células cT_{FH} produtoras de IL-21 foi diretamente relacionada com a porcentagem de células B CD27⁺IgD⁻ nos pacientes com CVID. Coculturas com células cT_{FH} e células B de memória mostraram que alguns pacientes com CVID são capazes de produzir níveis de anticorpos similares ao grupo controle enquanto que outros não. No entanto, as células cT_{FH} dos pacientes que não produziram imunoglobulinas *in vitro* foram capazes de auxiliar as células B de indivíduos controle a produzirem anticorpos, sugerindo um defeito intrínseco nas células B para produzir ou secretar imunoglobulinas.

Palavras-chave: Células T CD4⁺ auxiliares foliculares. Gestantes. HIV-1. Imunodeficiência comum variável.

ABSTRACT

KASAHARA, Taissa de Matos. *Phenotypic and functional characterization of follicular helper T cells in immunologically differentiated individuals: pregnant women, infected or not with HIV-1, and individuals with deficiency in antibody production*. 2019. 153f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Follicular helper T cells (T_{FH}) are a subset of cells that regulate the development of humoral immunity by promoting the production of antibody-producing plasma cells and long-lived memory B cells. Classically, T_{FH} cells are identified by the high expression of CXCR5 associated with high IL-21 production. However, environmental and genetic conditions may impact the functional status of these cells. Thus, the objective of this thesis was to study circulating T_{FH} cells (cT_{FH}) in immunologically differentiated individuals as pregnant, infected or not with HIV-1, and patients with common variable immunodeficiency (CVID). In this context, our results showed that pregnancy in healthy women favors the expansion of $CD45RO^+CXCR5^+CD4^+$ T cells, coexpressing or not the CXCR3, PD-1 and ICOS markers. In addition, pregnancy also increased the percentage of IL-21, IL-10 and IL-6 producing $CXCR3^+cT_{FH}$ cells. Interestingly, a positive correlation was observed between the percentage of $CXCR3^+PD-1^+cT_{FH}$ cells, as well as the IL-21⁺ subtype, with serum estrogen levels and anti-cytomegalovirus (CMV) and anti-hepatitis B virus (HBs) antibodies. Therefore, pregnancy should affect the function of cT_{FH} cells in adverse situations, such as in HIV-1 infection. As expected, viral infection reduced the frequency of different subsets of cT_{FH} cells, however, pregnancy increased the ability of antiretroviral therapy (ARV) to improve the functional recovery of these lymphocytes determined by the ability to produce IL-21 and to assist autologous B cells to produce IgG in co-culture systems. Additionally, an increase in the percentage of IL-21⁺ cT_{FH} cells after ARV was directly correlated to estrogen levels and to anti-HBsAg and anti-tetanus toxoid (TT) IgG titers. In addition to acquired immunodeficiencies, some primary immunodeficiencies compromise the production of antibodies, which may be associated with changes in cT_{FH} cells. Our results showed a reduction in the percentage of $cT_{FH}17$ cells in patients with CVID and an increase in the ratio of T_{FH} /follicular regulatory T cells (T_{FR}) cells only in patients with autoimmune disease. Moreover, the percentage of IL-21 producing cT_{FH} cells was directly related to the percentage of $CD27^+IgD^-$ B cells in patients with CVID. Cocultures with cT_{FH} and memory B cells showed that some patients with CVID were able to produce antibody levels similar to the control group while others do not. However, cT_{FH} cells from patients who did not produce immunoglobulins *in vitro* were able to assist B cells from control individuals to produce antibodies, suggesting an intrinsic B cell defect to produce or secrete immunoglobulins.

Keywords: Follicular helper T cells. Pregnancy. HIV-1. Common variable immunodeficiency.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diferenciação das células T _{FH} e geração de células B de memória e plasmócitos.....	18
Figura 2 – Evolução da infecção pelo HIV-1.....	25
Quadro 1 – Grupos de antirretrovirais utilizados na terapia anti-HIV disponibilizados pelo Ministério da Saúde do Brasil.....	27
Figura 3 – Imunomodulação na interface materno fetal.....	33
Figura 4 – Classificação dos pacientes com CVID de acordo com os subtipos de células B.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3TC	Lamivudine
ABC	Abacavir
AID	Citidina desaminase
Aids	Síndrome da imunodeficiência adquirida
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudine
BAFF	Fator ativador de células B
BAFF-R	Receptor de BAFF
BATF	Fator de transcrição de zíper de leucina básica
Bcl-6	<i>B-cell lymphoma</i>
BCR	Receptor de célula B
Blimp	Proteína de maturação induzida em linfócito B
bNabs	Anticorpos amplamente neutralizantes
CCR	Receptor com motivos C-C
CD	Cluster de diferenciação
CD40L	Ligante de CD40
CG	Centro germinativo
CMV	Citomegalovírus
CpG-ODN	Oligodeoxinucleotídeos ricos em CpG
CPV	Carga viral plasmática
CTL	Linfócito T CD8 ⁺ citotóxico
CTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
CVID	Imunodeficiência comum variável
CXCL	Ligante com motivos C-X-C
CXCR	Receptor com motivos C-X-C
d4t	Estavudina
DC	Célula dendrítica
DRV	Darunavir
DTG	Dolutegravir

E2	Estradiol-17 β
EFV	Efavirenz
ESID	Sociedade Europeia de Imunodeficiências
ETR	Etravirine
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
FPV	Fosamprenavir
FTC	Entricitabina
GITR	Fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoide
HBs	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
ICON	Documento de Consenso Internacional
ICOS	Coestimulador induzível
ICOSL	Ligante de ICOS
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IDP	Imunodeficiência primária
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IP	Inibidor de protease
IRF	Fator regulador de interferon
ITRN	Inibidor da transcriptase análogo sintético de nucleosídeos
ITRNN	Inibidor da transcriptase não análogo sintético de nucleosídeos
LPS	Lipopolissacarídeo
LPV	Lopinavir
mDC	Célula dendrítica mieloide
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MVC	Maraviroque
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	Célula assassina natural
NMOSD	Desordens do espectro da neuromielite óptica
NVP	Nevirapina

PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PD-1	Receptor de morte programada 1
pDC	Célula dendrítica plasmocitoide
PD-L1	Ligante de PD-1
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
RAL	Raltegravir
RTV	Ritonavir
SAC	<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan I
SAP	Proteínas associadas ao SLAM
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
SLAM	Molécula de sinalização para ativação linfocítica
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
T-20	Enfuvirtida
TACI	Ativador transmembrana e interador de CAML
TARV	Terapia antirretroviral
Tc-1	Célula T CD8 ⁺ citolítica
TCR	Receptor de célula T
TDF	Tenofovir
T _{FH}	Célula T CD4 ⁺ auxiliar folicular
T _{FR}	Célula T CD4 ⁺ reguladora folicular
TGF	Fator de crescimento transformador
TGI	Trato gastrointestinal
T _H	Célula T CD4 ⁺ auxiliadora
Tim	Domínio de mucina e imunoglobulina em células T
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
TPV	Tipranavir
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
Treg	Célula T reguladora
TT	Toxóide tetânico
TWEAK	Indutor fraco de apoptose semelhante ao TNF
uNK	Célula assassina natural uterina

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
mL	Mililitro
mm ³	Milímetros cúbicos

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1	Células T CD4⁺ foliculares	17
1.1.1	<u>Células T CD4⁺ auxiliares foliculares</u>	17
1.1.2	<u>Células T CD4⁺ reguladoras foliculares</u>	20
1.1.3	<u>Células T CD4⁺ foliculares circulantes</u>	21
1.2	Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1 e as células T_{FH}	23
1.2.1	<u>Terapia antirretroviral (TARV)</u>	27
1.2.2	<u>Células T_{FH} na infecção pelo HIV-1</u>	29
1.3	A infecção pelo HIV-1 e a gestação	31
1.3.1	<u>Imunomodulação materna no ciclo gestatório</u>	31
1.3.2	<u>Infecção pelo HIV-1, a gestação e o risco de transmissão vertical</u>	35
1.3.2.1	Transmissão vertical.....	36
1.3.2.2	Mecanismos imunológicos envolvidos na proteção contra a transmissão vertical do HIV-1.....	38
1.4	Imunodeficiências primárias	39
1.4.1	<u>Imunodeficiência comum variável</u>	40
1.4.2	<u>Imunopatogênese da imunodeficiência comum variável</u>	41
2	OBJETIVO	46
2.1	Objetivo geral	46
2.2	Objetivos específicos	46
3	ARTIGOS CIENTÍFICOS	48
3.1	Artigo 1 - Pregnancy favors the expansion of circulating functional follicular helper T Cells (Artigo publicado)	48
3.2	Artigo 2 - Pregnancy favors circulating IL-21-secreting T_{FH}-like cell recovery in ARV-treated HIV-1-infected women (Artigo submetido)	58
3.3	Artigo 3 – Impaired antibody production in CVID patients is not related to T_{FH} cells dysfunction (Artigo submetido)	95
4	DISCUSSÃO	121
	CONCLUSÕES	129
	REFERÊNCIAS	131

APÊNDICE – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	150
ANEXO – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	152

INTRODUÇÃO

No contexto da resposta imune, a produção eficiente de anticorpos é essencial tanto na resolução como na prevenção de infecções. Entretanto, a produção de anticorpos neutralizantes depende da interação produtiva das células B com as células T CD4⁺, particularmente as células T CD4⁺ auxiliares foliculares (T_{FH} - *T follicular Helper*). Apesar de serem encontradas no sangue periférico, classicamente as células T_{FH} se localizam nos órgãos linfoides secundários e são caracterizadas pela alta expressão do receptor de quimiocina CXCR5 e produção de interleucina (IL)-21 (NURIEVA et al., 2009). A adicional expressão dos marcadores de superfície receptor de morte programada (PD - *Programmed cell Death*)-1 e da proteína co-estimuladora induzível (ICOS - *Inducible T cell Costimulator*) ajuda a identificar as células T_{FH} mais funcionais (BENTEBIBEL et al., 2013; HE et al., 2013). Nos órgão e tecidos linfoides secundários, os linfócitos T_{FH} auxiliam na formação dos centros germinativos (CGs) através de sinais que sustentam a proliferação e sobrevivência dos linfócitos B (CROTTY, 2011; TANGYE et al., 2013), assim como direcionam os eventos relacionados à troca de classe de imunoglobulina (Ig) e a hipermutação somática (BAUQUET et al., 2009; CROTTY, 2015; LIU et al., 2015).

Diferentes condições genéticas e ambientais podem comprometer vários eventos envolvidos nas reações dos CGs causando quadros de imunodeficiências congênitas e adquiridas, respectivamente. Em ambos cenários, o indivíduo torna-se mais suscetível não apenas a doenças infecciosas e neoplasias, como também às desordens imunológicas de fundo autoimune.

Dentre as imunodeficiências secundárias destaca-se os distúrbios na imunidade humoral específica nos pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida, ou Aids, causada pelo vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1 – *Human Immunodeficiency Virus*). Nesses pacientes a perda funcional das células T_{FH} é um evento precoce e parcialmente revertido após o tratamento tardio da infecção com as drogas antirretrovirais (LINDQVIST et al., 2012). Por outro lado, e de forma interessante, a gestação favorece a produção de anticorpos. Nesse sentido, apesar da gestação ser caracterizada por uma atenuação da resposta imune celular contra diferentes patógenos, inclusive vírus, esta não é considerada um fator de risco para a progressão da doença em mulheres infectadas pelo HIV-1, nem tão pouco uma garantia de que a transmissão vertical do vírus vai sempre ocorrer. Na

ausência de qualquer intervenção materno-infantil, a maioria dos neonatos expostos não é infectada pelo HIV-1, e a proteção do concepto pode ocorrer através de diferentes mecanismos, tal como incremento na resposta imune humoral materna específica contra antígenos do HIV-1. De fato, a gestação parece otimizar a produção de anticorpos por mecanismos ainda pouco conhecidos, e, até o momento, nenhum estudo tinha sido conduzido para avaliar o impacto da gestação no status funcional das células T_{FH} em mulheres infectadas, ou não, pelo HIV-1.

Além da infecção pelo HIV-1, algumas imunodeficiências primárias (IDP) também comprometem a produção de anticorpos, sendo a imunodeficiência comum variável (CVID - *Common Variable Immunodeficiency*) o subtipo mais prevalente de IDP (BONILLA et al., 2016). A CVID é caracterizada por níveis séricos reduzidos de IgG e IgA e/ou IgM, com número normal ou baixo de células B e resposta específica de anticorpos inadequada (PICARD et al., 2018). Na grande maioria dos casos se desconhece a causa molecular, porém uma redução nas células de B memória, principalmente do subtipo que sofreu troca de classe, é característica nesses pacientes, sugerindo alterações nos processos de ativação e diferenciação desses linfócitos (WEHR et al., 2008). É possível que essas alterações possam estar associadas a um dano no compartimento das células T_{FH}.

Diante do exposto, o objetivo geral dessa tese foi estudar as células T_{FH} circulantes em indivíduos imunologicamente diferenciados, gestantes, infectadas ou não pelo HIV-1, e pacientes com CVID. Os resultados obtidos através desse tipo de investigação podem fornecer valiosas informações sobre a função dessas células e auxiliar no desenvolvimento de novas imunoterapias.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Células T CD4⁺ foliculares

1.1.1 Células T CD4⁺ auxiliares foliculares

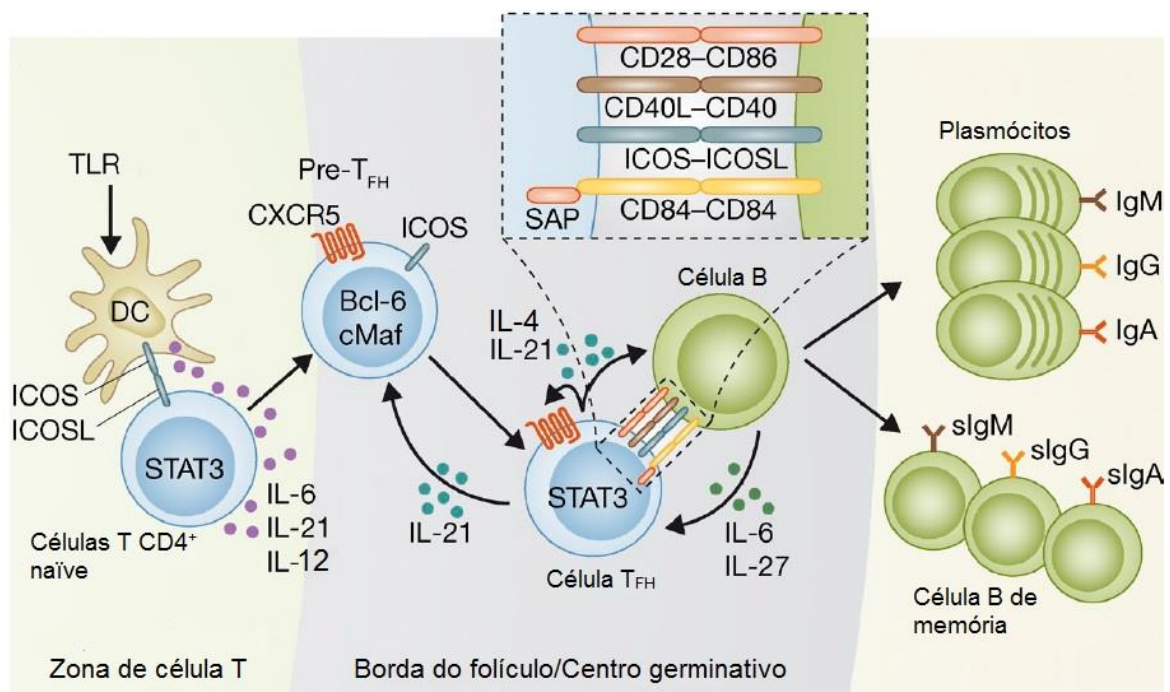
Na dinâmica de uma resposta imune, as células T CD4⁺ ocupam um papel central por regular a função de muitas células da imunidade inata como também dos linfócitos T CD8⁺ e células B. Os linfócitos T CD4⁺, no entanto, para exercerem suas funções precisam ser ativados e diferenciados em fenótipos capazes de secretar padrões diferentes de citocinas que coordenam vários ramos da resposta imune (WAN; FLAVELL, 2009).

Um dos fenótipos em que os linfócitos T CD4⁺ podem ser diferenciados é em células T auxiliares foliculares (T_{FH} - *T follicular helper*). A existência dos linfócitos T_{FH} foi primeiramente proposta por alguns pesquisadores em 2000 e 2001 (BREITFELD et al., 2000; KIM et al., 2001; SCHAERLI et al., 2000). Entretanto, só em 2009, quando a proteína Bcl-6 (*B-cell lymphoma-6*) foi identificada como o fator de transcrição único desse subtipo celular, o linfócito T_{FH} foi aceito como sendo um novo fenótipo de células T CD4⁺ (JOHNSTON et al., 2009; NURIEVA et al., 2009). As células T_{FH} humanas localizadas nos órgãos linfoides secundários são caracterizadas pela alta expressão das moléculas de superfície CXCR5, PD-1 e ICOS, além da produção de IL-21, sua citocina de assinatura. Ademais, as células T_{FH} expressam baixos níveis do receptor de quimiocina CCR7 (NURIEVA et al., 2009).

A diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ virgens (naïves) em linfócitos T_{FH} requer principalmente a indução do fator de transcrição Bcl6. Entretanto, o fator regulador de interferon 4 (IRF4 - *Interferon Regulatory Fator 4*), fator de transcrição de zíper de leucina básica (BATF - *Basic leucine zipper Transcription Fator*), c-MAF e os transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT - *Signal Transducer and Activator of Transcription*)-1, STAT-3 e STAT-4 também estão envolvidos na indução desse fenótipo (VINUESA et al., 2016) (Figura 1). A indução desse fenótipo depende do reconhecimento, por parte das células T CD4⁺ naïves, do complexo peptídeo-complexo principal de histocompatibilidade (MHC – *major histocompatibility complex*) de classe II nas células dendríticas (DC – *dendritic cell*) da zona de células T dos órgãos linfoides secundários (CHOI; YANG; CROTTY, 2013). Em

camundongos, estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que na ausência de IL-6, IL-21, ou de ambas as citocinas, a diferenciação em linfócitos T_{FH} é comprometida (CHOI et al., 2013; ETO et al., 2011). A IL-6 assim como a IL-21 ativam os STAT-1 e -3 que, juntos, induzem a expressão do Bcl-6 e c-MAF (CHOI; YANG; CROTTY, 2013; MA et al., 2009; PALLIKKUTH; PARMIGIANI; PAHWA, 2012). A IL-6 pode ser secretada por DCs convencionais, DCs foliculares e por linfócitos B ativados (TANGYE et al., 2013). A IL-6, por induzir a produção de IL-21 pelos próprios linfócitos T_{FH} (CHOI; YANG; CROTTY, 2013), contribui para o estabelecimento do fenótipo celular.

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 foliculos de células B. Na borda do foliculo, 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.

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., 2009; SCHMITT et al., 2013, 2014). Indivíduos com mutações funcionais em IL-12R β 1, receptor para IL-12 e IL-23,

apresentam redução no número de células T_{FH} (SCHMITT et al., 2013). Por outro lado, a citocina IL-2, tanto em humanos como em camundongos, inibe o fenótipo T_{FH} , já que promove a expressão de 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). Em modelo animal, as citocinas IL-7 e TGF- β também são inibidoras do fenótipo T_{FH} por bloquear a expressão de Bcl-6 (MCCARRON; MARIE, 2014; MCDONALD et al., 2016; SCHMITT et al., 2014).

Além das 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 - *B lymphocyte-induced maturation protein*)-1, envolvida na diferenciação de outros fenótipos de linfócitos T $CD4^+$ enquanto regula positivamente a expressão de CXCR5, PD-1 e ICOS (CHOI et al., 2011; KROENKE et al., 2012).

Classicamente, a função das células T_{FH} é de promover a resposta imune humoral por auxiliar os linfócitos B nos folículos linfoides. Portanto, a alta expressão do CXCR5 associada à baixa expressão do CCR7 permite que os linfócitos T $CD4^+$ migrem, seguindo um gradiente de concentração formado pela quimiocina CXCL13, para os folículos de células B (KIM et al., 2001; SCHAERLI et al., 2000). A interação ICOS-ICOSL também desempenha um papel na migração das células T_{FH} em direção aos folículos (XU et al., 2013), provavelmente por estabilizar a expressão do CXCR5. A interação entre as células T_{FH} e as células B é importante para a completa diferenciação e comprometimento do fenótipo T_{FH} por manter a expressão de Bcl-6 estável (BAUMJOHANN et al., 2013; CHOI et al., 2011). Uma vez diferenciados, os linfócitos T_{FH} auxiliam na formação dos centros germinativos (CGs) através de sinais necessários para a proliferação e sobrevivências dos linfócitos B (BAUMJOHANN et al., 2013; SHULMAN et al., 2014). 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 - *SLAM associated protein*) e PD-1, aos seus respectivos ligantes expressos nas células B e pela produção de IL-21 e IL-4 (MOIR; FAUCI, 2009; PALLIKKUTH; PARMIGIANI; PAHWA, 2012) (Figura 1). A interação da SAP com membros da família de moléculas de sinalização para ativação linfocítica (SLAM - *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 regula 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 - *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} induz a produção de IL-21 (BAUQUET et al., 2009; CROTTY, 2015; LIU et al., 2015). A IL-21 induz a expressão de Bcl-6 nos linfócitos B, permitindo a maturação dessas células e a sua diferenciação em plasmócitos secretores de anticorpos e em células B de memória (RANKIN et al., 2011; YUSUF et al., 2010). A IL-4 promove a sobrevivência dos linfócitos B prevenindo a apoptose (CROTTY, 2011; YUSUF et al., 2010). Ambas citocinas, provavelmente por estabilizar a expressão de CD40 e CD40L, são importantes para os processos de hipermutação somática, maturação de afinidade e troca de classe (RANKIN et al., 2011; YUSUF et al., 2010). Nesse sentido, com a ajuda das células T_{FH}, outras classes de anticorpos além da IgM são produzidas contendo, nas regiões variáveis, mutações pontuais que resultam no aumento da afinidade de reconhecimento dos anticorpos. Consequentemente, quanto maior a afinidade, maior a capacidade dessa molécula em neutralizar antígenos.

1.1.2 Células T CD4⁺ reguladoras foliculares

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). No entanto, 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). Os mecanismos envolvidos no controle dos CGs ainda não estão totalmente elucidados, porém, deve contar com a participação de um subtipo de células T_{FH}, as células T reguladoras foliculares (T_{FR} - *T Follicular Regulatory*) (WOLLENBERG et al., 2011). As 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 (*Forkhead box P3*), além dos marcadores de superfície antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4 - *Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4*), do receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoides (GITR - *Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor*

Receptor) e produção de IL-10 (CHUNG et al., 2011; LINTERMAN et al., 2011; WOLLENBERG et al., 2011).

Ao contrário das células T_{FH} , que são diferenciadas a partir de células T $CD4^+$ naïves, a maioria das células T_{FR} tem como precursoras as células T reguladoras (Treg – *T regulatory cell*) naturais (CHUNG et al., 2011; LINTERMAN et al., 2011). De fato, análises do repertório do receptor das células T (TCR – *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 tem demonstrado que as células T_{FR} também podem ser induzidas a partir de células naïves após imunização com antígenos próprios ou não (ALOULOU 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 humano, mostraram que as células T_{FR} podem inibir a proliferação e a produção de citocinas das 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., 2014a; 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).

1.1.3 Células T $CD4^+$ foliculares circulantes

Devido a sua participação em vários eventos imunes envolvidos em proteção e patogênese, o estudo dessas células é fundamental, pois os resultados podem impactar no desenho de futuras estratégias para aprimorar o desenho de vacinas contra diferentes agentes infecciosos, assim como ferramentas para modular negativamente sua expansão no contexto

de reações de hipersensibilidades. O conhecimento sobre a biologia das células T_{FH} , e a sua contribuição em doenças, tem aumentado nas últimas décadas, principalmente com as recentes descobertas de distintos subtipos funcionais de células T_{FH} circulantes no sangue de humanos (KING; TANGYE; MACKAY, 2008; UENO, 2016).

Estudos têm mostrado que, uma vez diferenciadas, as células T_{FH} auxiliam todos os eventos associados ao desenvolvimento dos CGs antes de deixarem os folículos secundários e transitarem pelos folículos vizinhos (SHULMAN et al., 2013), ou passarem a compor o contingente de célula T de memória circulante, isto é, são $CD45RO^+$ (KITANO et al., 2011). Essas células T_{FH} circulantes apresentam baixa expressão do Bcl-6, mas são fenotipicamente identificadas pela expressão de CXCR5 (BOSSALLER et al., 2006) e 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).

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 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 necessitariam de um tempo maior ou mais sinais de ativação (SCHMITT; BENTEBIBEL; UENO, 2014).

Baseado na habilidade em expressar CXCR3 e CCR6, SCHMITT 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). 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, SCHMITT 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). Linfócitos B virgens (naïves), quando em co-cultura 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, células T_{FH1} não são capazes de auxiliar os linfócitos B naïve *in vitro* porém, são eficientes em induzir a diferenciação das células B de memória em plasmócitos (BENTEBIBEL et al., 2013).

A dinâmica e a caracterização das células T_{FR} circulantes não estão bem definidas como para as células T_{FH} . Estudo realizado por SAGE e colaboradores (2014) mostrou que, em camundongos, as células T_{FR} circulantes, caracterizadas como $CD4^+CXCR5^+FoxP3^+$, apresentam características de células de memória, com menor capacidade supressiva em relação às células efectoras encontradas nos órgãos linfoides (SAGE et al., 2014b). Em humanos, FONSECA e colaboradores (2017) demonstraram que as células caracterizadas como $CD4^+CXCR5^+FoxP3^+$ estão localizadas tanto no sangue periférico como nos CGs e que a maioria dessas células encontradas na circulação não expressam PD-1, ICOS e Bcl-6 e também apresentam menor atividade supressora em comparação com as células dos CGs (FONSECA et al., 2017). Portanto, a descoberta das células T_{FH} e T_{FR} circulantes fornecem ferramentas experimentais que possibilitam o estudo da biologia dessas células em diferentes contextos de imunodeficiências, tal como na síndrome da imunodeficiência adquirida, ou Aids.

1.2 Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1 e as células T_{FH}

A infecção pelo HIV-1, em geral, ocorre após o contato com fluidos orgânicos, como sangue e sêmen, de uma pessoa infectada. Alguns dias após a primeira exposição ao HIV-1, intensa replicação viral pode ser detectada nos linfonodos levando, conseqüentemente, a uma elevada viremia associada a uma queda dos níveis de células T $CD4^+$. Essa fase ocorre geralmente entre 2 a 6 semanas após a primo-infecção e é caracterizada pela soroconversão e por sintomas inespecíficos como febre, linfadenopatia e dor de garganta (FAUCI et al., 1996; STREECK; VAN BOCKEL; KELLEHER, 2008).

A resposta imune específica mediada pelas células T à infecção pelo HIV-1 é semelhante em muitos aspectos à resposta a outros vírus, e serve para eliminar a maioria das partículas virais presentes no sangue. Os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs - *Cytotoxic T Lymphocytes*), por exemplo, exercem um papel capital na identificação dos peptídeos do HIV apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APC – *Antigen presenting cell*) no contexto das moléculas de MHC de classe I. Apesar da importância dos CTLs, células T_H1 são sabidamente fundamentais no combate às doenças virais infecciosas. Nos indivíduos infectados pelo HIV, uma ativação eficiente dos linfócitos T CD8⁺ e a manutenção de uma resposta de memória dependem do auxílio de células T_H1 funcionais (STREECK; VAN BOCKEL; KELLEHER, 2008). 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 da 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).

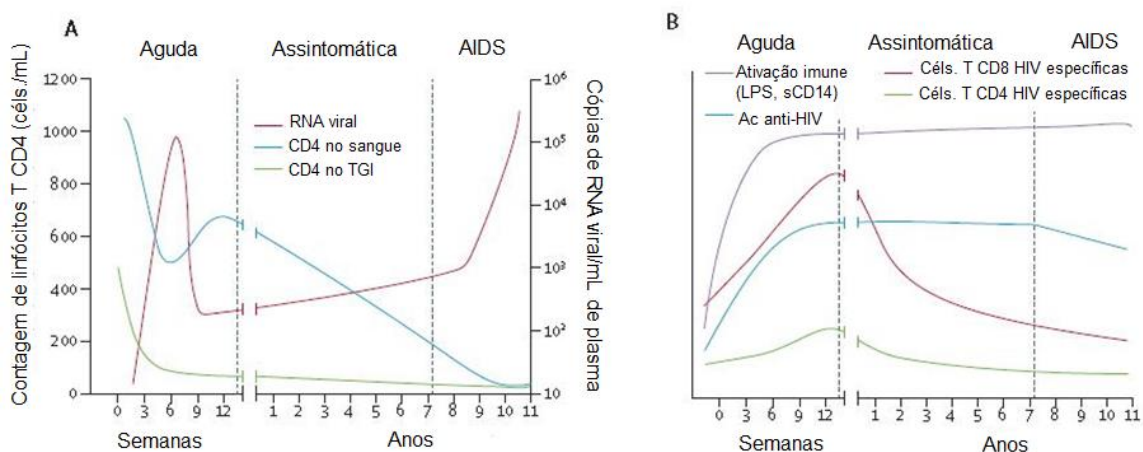
Após a infecção aguda, o equilíbrio entre a replicação viral e a resposta imune do hospedeiro é normalmente alcançado e muitos indivíduos infectados podem não apresentar manifestações clínicas por anos. Durante este período da infecção, chamado de latência clínica, o sistema imune consegue controlar parcialmente a replicação viral, o que permite um aumento na contagem de células T CD4⁺ no sangue periférico e redução da carga viral plasmática (CVP), possibilitando ao paciente lidar com a maioria das co-infecções. Infelizmente, a grande maioria dos pacientes perde o controle imune da replicação viral entre 8 a 10 anos após a infecção, e uma progressiva queda na contagem das células T CD4⁺ circulantes é observada no paciente que progride para Aids (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014).

Em termos quantitativos, a Aids é definida quando a contagem de células T CD4⁺ é menor que 200 células/mm³, valor aonde o paciente passa a ser mais suscetível a infecções oportunistas e a malignidades (Figura 2A). Como a maioria dos linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico não abriga o vírus, a perda dessas células ao longo da infecção tem sido principalmente atrelada ao estado de hiperativação crônica imune no qual o paciente é condicionado (ALIMONTI; BALL; FOWKE, 2003; MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014) (Figura 2B). Esse estado inflamatório crônico é decorrente da resposta imune contra o invasor

e da translocação microbiana intestinal, principalmente nas fases mais tardias da infecção (BRENCHLEY; PRICE; DOUEK, 2006).

Em homeostase, o equilíbrio entre os fenótipos T_H17 , T_H22 e células Treg é fundamental para a manutenção da integridade da mucosa gastrointestinal. Enquanto a IL-17 e o TGF- β colaboram na produção de IgA dimérica responsável pela neutralização de toxinas/patógenos em nível de mucosa, a IL-22 promove a regeneração epitelial e resistência à invasão microbiana por elevar a expressão de defensinas e mucina (KLATT et al., 2012; RYAN et al., 2016; XU; WANG; VEAZEY, 2014). Finalmente, por favorecer a atuação dos neutrófilos, as células T_H17 são fundamentais na proteção contra a invasão de bactérias extracelulares e fungos via mucosas. Clássico estudo por BRENCHLEY e colaboradores (2006) demonstrou uma relação positiva entre a concentração plasmática do padrão molecular associado às bactérias gram-negativas originárias do intestino, o lipopolissacarídeo (LPS), e a progressão para Aids em pacientes infectados pelo HIV-1 (BRENCHLEY et al., 2006). Essa relação adversa foi fomentada pela produção de citocinas inflamatórias capazes de ativar o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B – *Nuclear Transcription Factor kappa B*) (FUNDERBURG et al., 2008; MANGINO et al., 2011). Portanto, a perda da barreira física e imunológica em nível da mucosa intestinal impacta no curso da doença não apenas por favorecer a replicação viral, como também por acelerar os processos de imunossenescência, fenômeno comumente associado à Aids.

Figura 2 - Evolução da infecção pelo HIV-1



Legenda: (A) Na fase aguda ocorre um aumento na carga viral plasmática, uma redução progressiva dos linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico e no trato gastrointestinal (TGI). Após esse período, as células T CD4⁺ continuam a ser destruídas, porém o indivíduo mantém um certo grau de imunocompetência. A infecção progride para Aids quando há uma depleção severa no número de células T CD4⁺ no sangue periférico associada a um aumento na carga viral plasmática. (B) A

resposta aguda à infecção pelo HIV-1 inclui um aumento expressivo de marcadores de ativação imune, a produção de anticorpos anti-HIV não neutralizantes e ativação de células T HIV-específicas.

Fonte: adaptado de Maartens, Celum & Lewin, 2014.

Nos pacientes sem terapia antirretroviral (TARV), a ativação crônica do sistema imune é essencial para a infecção produtiva de células T CD4⁺ (LIEBERMAN et al., 2001). A IL-1β, IL-6 e o TNF-α, por ativarem o fator de transcrição NF-kB, favorecem a replicação viral nas células T CD4⁺ (MANGINO et al., 2011). Devido a sua maior suscetibilidade à ativação durante a resposta imune anti-HIV, as células T_{H1} e T_{H17} 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 - *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 T_{H1} e T_{H17} torna o paciente cada vez mais susceptível às infecções e neoplasias oportunistas (FAVRE et al., 2009). 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, com fenótipo anormal se acumulam periféricamente. Esses linfócitos 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). Consequentemente, 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 (ANDERSSON et al., 2005; EGGENA et al., 2005). No contexto da resposta imune anti-HIV, a capacidade das células T reguladoras em inibir a resposta imune celular do tipo T_{H1} 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).

Em resumo, a grande maioria dos pesquisadores acredita que a principal causa da exaustão imune característica da Aids seja uma consequência do estado de ativação crônica que acelera os processos de imunossenescência no indivíduo infectado. De fato, relatos atuais consideram que indivíduos infectados pelo HIV há mais de 8 anos com 50 anos de idade tenham um sistema imune funcional comparado a um indivíduo de 80 anos (RICKABAUGH; JAMIESON, 2010). Portanto, além de controlar a replicação viral, uma adequada reconstituição imune na era dos antirretrovirais depende do controle da inflamação.

1.2.1 Terapia antirretroviral (TARV)

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 da 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) (Quadro 1).

Quadro 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)			

* www.aids.gov.br. Acessado em 27 de março de 2019.

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, independentemente da contagem de células T CD4⁺. Desde 2017, a primeira linha de tratamento para o início da TARV em adultos e adolescentes no Brasil é composta por tenofovir (TDF) e lamivudina (3TC), dois ITRNs, e dolutegravir (DTG), um inibidor de integrase. O esquema anterior, formado por tenofovir (TDF) e lamivudina (3TC), dois ITRNs, e efavirenz (EFV), um ITRNNs, deve ser mantido em pessoas que já estavam em tratamento.

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 carga viral plasmática (CVP) e, conseqüentemente, a um aumento gradativo no número de células T CD4⁺. Alguns indivíduos, porém, não respondem de forma adequada à TARV, apresentando falha terapêutica. Nesses casos, a CVP continua detectável após seis meses do início de qualquer tratamento com os antirretrovirais e recomenda-se a alteração do esquema terapêutico.

O aumento na contagem de células T CD4⁺ ocorre em duas fases. A primeira fase reflete a 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 mais sutil e 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).

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 (HE et al., 2012; SPITSIN et al., 2012) e humoral, esta última dependente das células T_{FH}.

1.2.2 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 T_{FH} no linfonodo, principalmente T_{FH} 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 T_{FH} 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 ligante de PD-1 (PD-L1 - *PD-ligand 1*) 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 T_{FH} através da ligação com PD-1 (CUBAS et al., 2013). Estudo conduzido em macacos Rhesus infectados com o vírus da imunodeficiência símia (SIV – *Simian Immunodeficiency Virus*) demonstrou uma relação entre a expansão das células T_{FH} 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 - *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 T_{FH} (SADANAND; SUSCOVICH; ALTER, 2015).

Em humanos, diversos estudos têm demonstrado uma associação entre a frequência de células T_{FH} , 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 T_{FH} de memória circulantes que apresentam características semelhantes às células T_{FH} 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_{FH} $CD4^+CXCR5^+PD-1^+$ 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 T_{FH} (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 T_{FH} (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 T_{FH} circulantes após a vacinação em pacientes infectados pelo HIV-1 sob TARV (ABUDULAI et al., 2017).

Como o comprometimento das células T_{FH} 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 T_{FH} 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 T_{FH} 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 capacidade da TARV em recuperar as células T_{FH} circulantes deve ser favorecida por outras condições, como a gestação, onde a produção de anticorpos é sabidamente potencializada (KANDA; TAMAKI, 1999).

1.3 A infecção pelo HIV-1 e a gestação

1.3.1 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; ADAMS WALDORF; PETROFF, 2010). Dentre eles, estão a diminuição da expressão de aloantígenos polimórficos na placenta e as alterações hormonais capazes de modular o status imune materno (DE MESTRE et al., 2010).

Na decídua do primeiro trimestre, a população de células imunes maternas é dominada por células assassinas naturais uterinas (uNK - *uterine natural killer*) não citotóxicas, imunomoduladoras e reguladoras do trofoblasto (KING, 2000; STARKEY; SARGENT; REDMAN, 1988). Ademais, um abundante número de macrófagos maternos com um fenótipo alternativo, conhecidos como M2, tem sido associado ao sucesso da gestação. 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) (Figura 3).

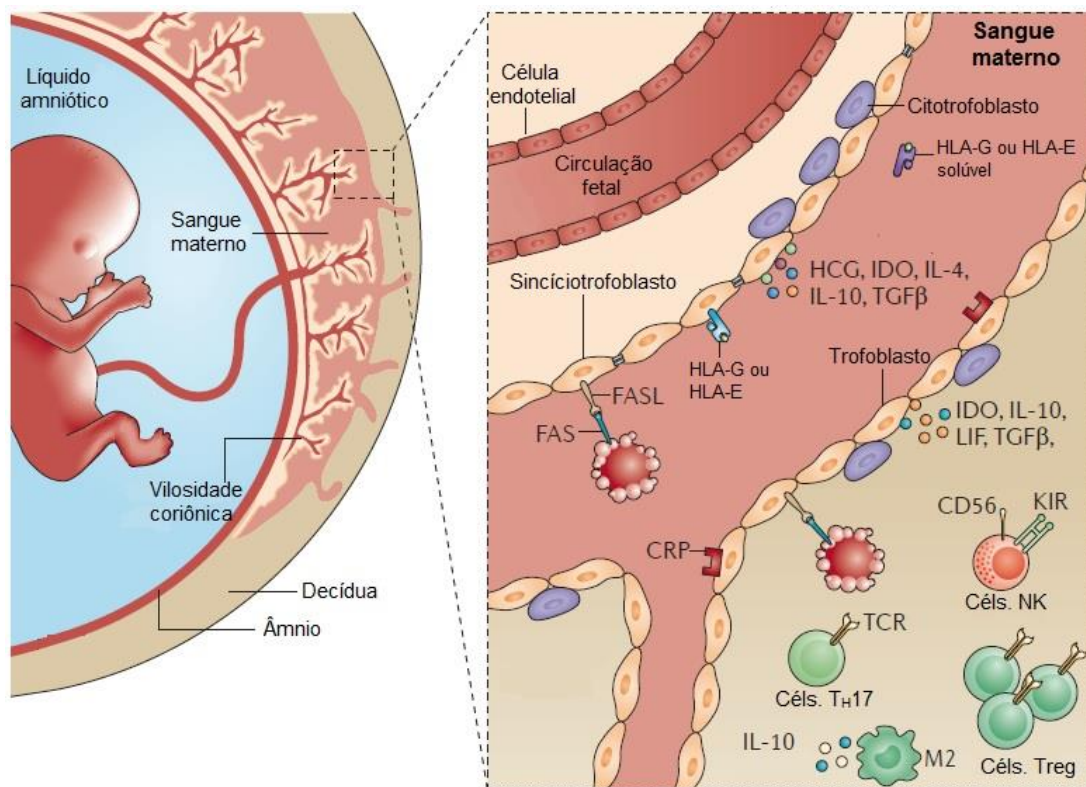
Durante a gestação, um delicado equilíbrio entre os fenótipos efetores e reguladores é fundamental. Nesse sentido, ao longo da gestação, a atividade das células T_H1 e T_H17 deve ser atenuada, pois níveis excessivos de IFN- γ ou de IL-17 são deletérios para o sucesso da gravidez por ativar células T efetoras embriotóxicas (PONGCHAROEN; SUPALAP, 2009). Em muitas mulheres que sofrem abortos espontâneos recorrentes, uma elevada frequência de células T_H17 tem sido detectada no sangue periférico e na decídua, seguindo a interrupção da gestação (SAITO et al., 2010; WANG et al., 2010). Portanto, eventos imunes relacionados ao controle da inflamação devem ser acionados durante a gestação, tais como expansão de células T reguladoras (Tregs).

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 funções executadas pelas 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 B7-1/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).

O estabelecimento de um ambiente mais tolerogênico, que é reversível após o parto, é mantido pelos elevados níveis dos principais hormônios gestacionais, a gonadotrofina coriônica humana (hCG – *human chorionic gonadotropin*), o estrogênio e a progesterona (CUTOLO et al., 2004; GROSSMAN, 1984). A hCG é inicialmente produzida pelo blastocisto, 6 a 8 dias após a fertilização, (BONDUELLE et al., 1988; LOPATA; HAY, 1989) e depois pelo sinciciotrofoblasto (HOSHINA et al., 1985). Entretanto, os seus níveis são elevados apenas no primeiro trimestre e diminuem para 10% dos valores de pico durante o segundo e terceiro trimestres (HEALY et al., 1987). Uma das funções da 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). A hCG também possui propriedades imunomoduladoras, reduzindo, por exemplo, a proliferação e produção de citocinas inflamatórias pelas células T (ADCOCK et al., 1973; HAN, 1974; KAYE; JONES, 1971) e linfócitos B (HAMMARSTRÖM; FUCHS; SMITH, 1979) em resposta a diferentes estímulos. Estudos têm sugerido que os efeitos supressores da hCG sobre os linfócitos efetores devem ser preferencialmente indiretos, através do favorecimento da expansão das células Treg (BANSAL et al., 2012).

Figura 3 - Imunomodulação na interface materno-fetal



Legenda: A placenta é formada pelas vilosidades coriônicas, a parte fetal, e pela decídua, a parte materna. As vilosidades coriônicas são recobertas pelos sincitiotrofoblasto e citotrofoblastos, derivados dos trofoblastos, e projetam-se na decídua de forma que ficam em contato direto com o sangue materno. Durante a gestação, os hormônios produzidos em elevados níveis induzem a expressão de várias moléculas que atenuam a resposta materna contra antígenos fetais. Dentre essas moléculas estão moléculas pouco polimórficas do antígeno leucocitário humano (HLA - *human leukocyte antigen*), FASL e citocinas anti-inflamatórias que favorecem a expansão de fenótipos regulatórios, como macrófagos M2 e células Treg, capazes de produzir IL-10 e TGF- β que inibem respostas maternas embriotóxicas mediadas por células do fenótipo T_H1 e Tc-1.

Fonte: Adaptado de SHECHTER; LONDON; SCHWARTZ, 2013.

Com relação ao estradiol-17 β (E2), o estrogênio mais potente, as concentrações séricas aumentam, em média, de 10 μ M para 40 η M durante a gravidez (HIRANO; FURUTAMA;

HANAFUSA, 2007). Dependendo da sua concentração, o E2 pode exercer um efeito pró-inflamatório ou anti-inflamatório (STRAUB, 2007; VAN VOLLENHOVEN; MCGUIRE, 1994). Em níveis elevados, como na gravidez, o E2 inibe a resposta imunitária celular e diminui a expressão de vários marcadores de ativação (HEL; STRINGER; MESTECKY, 2010). Neste caso, o E2 inibe a produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β pelas células T, macrófagos e DCs (HEL; STRINGER; MESTECKY, 2010), e induz a produção de IL-10 e TGF- β , resultando em um efeito imunossupressor (LUO et al., 2011; ZANG et al., 2002). Nesse microambiente, elevados níveis de estrogênio favorecem a expansão das DCs IDO⁺ que promovem a diferenciação de células Tregs (LIU et al., 2002; UEMURA et al., 2008; XIAO; LIU; LINK, 2004). Por outro lado, apesar dos efeitos sobre as células T_{FH} serem desconhecidos, elevados níveis de E2 favorecem a produção de anticorpos por linfócitos B de memória (KANDA; TAMAKI, 1999), potencializando a resposta imune humoral na gestação.

A progesterona, que é naturalmente produzida no ovário e na placenta, eleva-se linearmente com o tempo de gestação (STITES; SIITERI, 1983). Os efeitos da progesterona sobre o sistema imune são classicamente imunossupressores (SZEKERES-BARTHO, 2009). A progesterona diminui a migração de células NK clássicas (SENTMAN et al., 2004), linfócitos e macrófagos (HEL; STRINGER; MESTECKY, 2010), além de atenuar a capacidade proliferativa dos linfócitos no trato genital feminino (INOUE, 1996; WHITELAW; CROY, 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 (Tc-1). Ao inibir a produção de IFN- γ , a progesterona reduz respostas típicas do fenótipo T_{H1}, e, conseqüentemente, compromete a função microbicida exercida pelos macrófagos (HUGHES; CLARK; WONG, 2013). Por outro lado, em elevadas concentrações, as citocinas pró-inflamatórias podem regular negativamente a secreção de progesterona pelo trofoblasto da placenta e do corpo lúteo (BEST; GRIFFIN; HILL, 1995; FEINBERG, 1994; PEDERSEN et al., 1994) podendo, assim, comprometer o desenvolvimento do conceito por favorecer a expansão de células T embriotóxicas.

Apesar dos efeitos predominantemente imunossupressores exercidos pelos hormônios da gestação, classicamente, a produção de anticorpos pelas células B de memória é amplificada 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 relacionadas aos fenótipos T_{H1}, T_{H2} e T_{H17}. Se a gestação modula o status funcional das células T_{FH} não é conhecido, mas esse tipo de estudo precisa ser conduzido, não apenas pela sua originalidade, como também pela possibilidade de fornecer

novas e valiosas informações à cerca do impacto de eventos adversos sobre esses linfócitos, tal como a infecção pelo HIV-1.

1.3.2 Infecção pelo HIV-1, a gestação e o risco de transmissão vertical

A manutenção da gestação é um evento delicado que pode ser rompido por diferentes intercorrências, tais como as infecções maternas. Nesse contexto, doenças infecciosas maternas podem ter consequências adversas à gestação por diferentes vias, não excludentes. 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. Essas citocinas podem estimular células T_H1 maternas a produzirem grandes quantidades de IL-2 e IFN- γ , citocinas importantes para a ativação de células T $CD8^+$ contra células fetais expressando moléculas do antígeno leucocitário humano (HLA - *human leukocyte antigen*) de origem paterna (MARZI et al., 1996; ZENCLUSSEN et al., 2011). As células T $CD8^+$ sensibilizadas, além de danificarem diretamente os anexos fetais, podem ainda amplificar a resposta local por secretarem citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α que podem aumentar o poder microbicida de macrófagos locais e estimular a atividade citotóxica das células uNK (MARZI et al., 1996; ZENCLUSSEN et al., 2011).

Adicionalmente, a produção de citocinas inflamatórias pode anular a atividade dos linfócitos T reguladores. Sabe-se que doses elevadas de IL-2, associadas à ativação via TCR, bloqueiam a função supressora clássica das células Tregs *in vitro* (PENG et al., 2005; TAKAHASHI et al., 1998). Além disso, as DCs ativadas por diferentes agonistas dos receptores do tipo toll (TLRs – *Toll-Like Receptors*) liberam IL-6 que tornam os linfócitos T efetores resistentes à inibição pelas células Treg (PENG et al., 2005; YANG et al., 2004). A IL-6 também inibe a expressão da enzima IDO por DCs, o que pode diminuir indiretamente a produção endógena da citocina IL-10 (TAKAHASHI et al., 1998). No contexto da inflamação, a liberação de citocinas, como IL-6 e IL-1 β , inibe fortemente a diferenciação e/ou função de células Tregs, além de poder favorecer a indução de respostas inflamatórias mediadas por linfócitos T_H1 , e particularmente pelos T_H17 (GROHMANN et al., 2001).

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, como descrito previamente, a resposta imune protetora contra o vírus em pacientes infectados contrasta dramaticamente com os eventos imunes responsáveis pela tolerância ao feto. No entanto, o risco de progressão clínica da doença não é aumentado pela gestação e, na ausência da TARV, a taxa de transmissão vertical é entre 12 a 40% (SIASSAKOS et al., 2008).

1.3.2.1 Transmissão vertical

A infecção pelo HIV-1 em crianças com menos de 15 anos se deve, em grande parte, à transmissão da mãe para o filho. A transmissão vertical do HIV-1 pode ocorrer durante a gestação (no útero, envolvendo passagem transplacentária), intraparto (no momento do nascimento através da exposição da pele e das membranas mucosas dos lactentes ao sangue materno e secreções vaginais) e durante o aleitamento. Na ausência de qualquer intervenção, o risco de ocorrência de transmissão vertical se encontra dentro da faixa de 12 a 40% (PAINTSIL; ANDIMAN, 2009). Felizmente, com a disponibilidade de diferentes manobras clínicas em gestantes soropositivas para o HIV-1, como a TARV, o parto cesáreo e a não amamentação, a taxa de transmissão vertical caiu para menos de 1% (HAZRA; SIBERRY; MOFENSON, 2010; MOFENSON, 2010; PRENDERGAST et al., 2007).

No Brasil, para reduzir o risco de transmissão vertical do HIV, desde 2015 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). 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). O TDF poderia ser substituído pela zidovudina (AZT) ou

abacavir (ABC) e o EFV pela nevirapina. Na impossibilidade de uso do ITRNN, a segunda linha de tratamento era composta por dois ITRN e um inibidor de protease (IP) combinado com ritonavir (RTV), utilizando-se TDF, 3TC, associado com lopinavir (LPV) e RTV. Caso o LPV não pudesse ser utilizado, este poderia ser substituído pelo atazanavir (ATV). 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) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Em relação à 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 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.

1.3.2.2 Mecanismos imunológicos envolvidos na proteção contra a transmissão vertical do HIV-1

Diversos fatores clínicos e virológicos maternos estão associados a um maior risco de transmissão do HIV-1, como por exemplo: (a) elevada 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) co-infecção 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).

A presença de partículas virais já foi detectada em fetos abortados no primeiro, no segundo e no terceiro trimestre de gestação (LAPOINTE et al., 1985; LEWIS et al., 1990; MANO; CHERMANN, 1991; SPRECHER et al., 1986), sugerindo que a transmissão vertical pode ocorrer em qualquer fase da gestação. A transmissão transplacentária do HIV-1 pode ocorrer pela passagem direta de células maternas infectadas para o feto através de micro brechas em uma barreira placentária danificada (BURTON et al., 1996), através da transcitose de partículas virais livres (LAGAYE et al., 2001) ou pelo contato direto do linfócito/macrófago com o trofoblasto (ARIAS; MUÑOZ; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, 2003; DOUGLAS et al., 1991; MATTERN et al., 1992). Porém, quando comparado ao parto normal e ao aleitamento materno, o período intrauterino representa o de menor risco para a transmissão (BURGESS; YORK, 2001). De fato, 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

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 utero* apresentava elevada produção de citocinas e quimiocinas associadas a 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 outros mecanismos, na proteção da transmissão vertical do HIV-1. Para tanto, células T_{FH} funcionais são necessárias, e, até o momento, nenhum estudo avaliou o comportamento funcional desses linfócitos em gestantes, infectadas ou não, pelo HIV-1.

1.4 Imunodeficiências primárias

Apesar da Aids afetar vários compartimentos do sistema imune no paciente infectado pelo HIV-1 comprometendo a produção de anticorpos, algumas imunodeficiências primárias (IDPs) afetam mais diretamente a produção dessas proteínas.

As IDPs são consideradas condições raras, sendo a deficiência de anticorpos a mais prevalente, correspondendo a cerca de 50% dos casos (MAHLAOUI et al., 2014; MODELL et al., 2018; PICARD et al., 2018; SLADE et al., 2018). Estas são categorizadas em 4 grupos; redução sérica de todos os isotipos de imunoglobulinas acompanhada de uma redução severa ou ausência de células B, conhecida também como agamaglobulinemia; redução sérica de pelo menos 2 isotipos de imunoglobulinas com número normal ou baixo de células B; baixos níveis séricos de IgG e IgA com níveis elevados de IgM e número normal de células B; e deficiências em um dos isotipos de imunoglobulinas com número normal de células B (PICARD et al., 2018). Em algumas dessas doenças, mutações em genes necessários para o desenvolvimento e sobrevivência das células B já foram identificadas, porém algumas não apresentam causa genética conhecida (PICARD et al., 2018).

1.4.1 Imunodeficiência comum variável

A imunodeficiência comum variável (CVID - *Common Variable Immunodeficiency*) é a imunodeficiência primária sintomática mais comum, sendo caracterizada pela redução sérica de IgG e IgA e/ou IgM com número normal, ou baixo, de células B e resposta específica de anticorpos inadequada (CUNNINGHAM-RUNDLES, 2019; PICARD et al., 2018). Estima-se que a prevalência da CVID seja entre 1:100.000 a 1:10.000 na população, dependendo da região (BONILLA et al., 2016). Dados recentes da Fundação Jeffrey Modell mostram que há 5.475 casos na América do Norte, 970 casos da América Latina, 4.279 casos na Europa, 316 no Oriente Médio, 143 na Ásia, 657 na Austrália e 156 na África (MODELL et al., 2018). O diagnóstico geralmente ocorre entre 20 e 40 anos, afetando igualmente homens e mulheres (YAZDANI et al., 2019).

As patologias que podem acometer um paciente com CVID são bem amplas e heterogêneas, sendo que a maioria apresenta infecções recorrentes, principalmente do trato respiratório. As infecções recorrentes do trato respiratório como pneumonia, bronquite e sinusite geralmente são os sintomas iniciais da doença. Os principais microrganismos que acometem pacientes com CVID são *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (OKSENHENDLER et al., 2008). Infecções respiratórias virais também são comuns. Devido a infecções recorrentes, alguns indivíduos podem desenvolver complicações como bronquiectasia e doença pulmonar intersticial. Outras manifestações clínicas incluem doenças

autoimunes, doenças linfoproliferativas, granulomatosas, gastrointestinais, alergias e malignidades (BONILLA et al., 2016; FEUILLE et al., 2017; JØRGENSEN; FEVANG; AUKRUST, 2018). As doenças autoimunes estão presentes em cerca de 30% dos pacientes com CVID, sendo as citopenias autoimunes (trombocitopenia púrpura, anemia hemolítica autoimune e neutropenia autoimune) as mais comuns. No entanto, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e hipotireoidismo também podem estar presentes (FEUILLE et al., 2017).

O diagnóstico da CVID é baseado tanto nas manifestações clínicas como nos exames laboratoriais. De acordo com o Documento de Consenso Internacional (ICON - *International Consensus Document*) de 2016, um indivíduo é diagnosticado com CVID quando: apresenta pelo menos uma das manifestações clínicas associadas a CVID como infecção, autoimunidade ou linfoproliferação; baixos níveis de IgG e de IgA ou IgM, de acordo com as referências locais e de idade; resposta ineficiente a vacinas; outras causas de hipogamaglobulinemia foram excluídas (BONILLA et al., 2016). É recomendado que o diagnóstico não seja feito em crianças com menos de 4 anos (BONILLA et al., 2016). A resposta a vacinas geralmente é avaliada através da dosagem de IgG específicas após vacina antipneumocócica ou antitetânica (BONILLA et al., 2016).

O tratamento padrão da CVID é baseado na reposição de IgG, podendo ser de forma intravenosa ou subcutânea. A dose recomendada varia de indivíduo para indivíduo, sendo recomendada doses mais altas para aqueles que possuem complicações clínicas como bronquiectasia e esplenomegalia (BONILLA et al., 2016). A reposição de imunoglobulinas reduz as taxas de infecções melhorando a qualidade de vida dos pacientes (LUCAS et al., 2010).

1.4.1.1 Imunopatogênese da Imunodeficiência Comum Variável

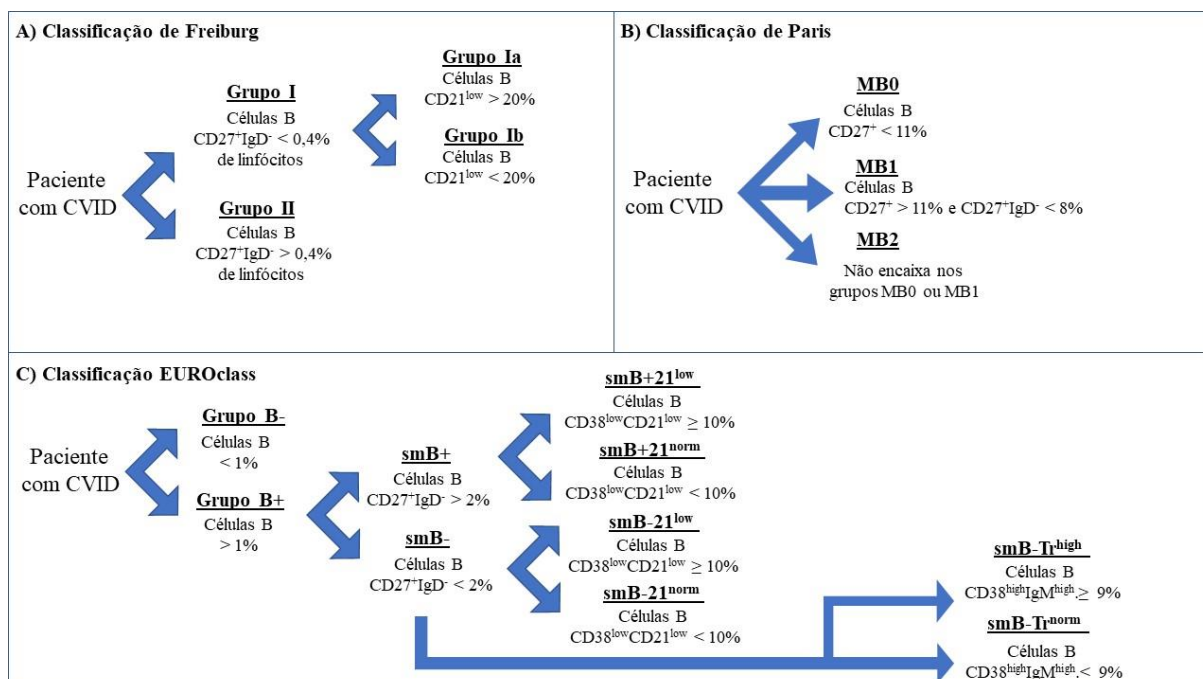
Mutações monogênicas em diversos genes relacionados ao desenvolvimento e função das células B têm sido observadas em alguns pacientes com CVID, porém a grande maioria dos casos desconhece a causa molecular, sendo a CVID considerada uma doença de causa poligênica (CHAPEL et al., 2008). Nesse sentido, mutações em genes que codificam correceptores ou coestimuladores como CD19, CD20, CD21 e CD81, assim como para o receptor da IL-21 já foram descritas (BOGAERT et al., 2016). Mutações em genes

relacionados à regulação da resposta imune, como ICOS, CTLA-4, também foram identificadas em pacientes com manifestações clínicas e laboratoriais semelhantes à CVID (BOGAERT et al., 2016). Porém, esses indivíduos também costumam apresentar deficiências no compartimento de células T, sendo classificados então em outro grupo de imunodeficiência (BONILLA et al., 2016; PICARD et al., 2018).

Diferentes membros da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF - *tumor necrose fator*) estão associados à patogênese da CVID. Mutações nos genes que codificam para as proteínas ativador transmembrana e interador de CAML (TACI - *Transmembrane Activator and CAML Interactor*), fator ativador de células B (BAFF - *B cell activating factor*), receptor de BAFF (BAFF-R - *BAFF Receptor*), indutor fraco de apoptose semelhante ao TNF (TWEAK - *TNF-like weak inducer of apoptosis*) e CD27 tem sido descritas (BOGAERT et al., 2016). As proteínas TACI e BAFF-R são expressas na membrana de células B maduras, apresentando funções no desenvolvimento e ativação das células B após interação com seus ligantes APRIL e BAFF e indivíduos com mutações nos genes que codificam essas proteínas mostraram uma incapacidade das células B em produzirem IgG e IgA (CASTIGLI et al., 2005; LOSI et al., 2005). Apesar de mutações no gene que codifica para a proteína TACI serem encontradas em cerca de 5 a 8% dos indivíduos com CVID, cerca de 1% da população sem a doença apresenta mutações nesse gene, sugerindo que outros genes também podem estar envolvidos no desenvolvimento da doença (MARTINEZ-GALLO et al., 2013).

Estudos de imunofenotipagem das células B em indivíduos com CVID mostraram que a maioria deles apresenta contagem normal de células B, porém com alterações nos subtipos dessas células (PIQUERAS et al., 2003; WARNATZ et al., 2002; WEHR et al., 2008). Uma característica comum nesses pacientes é a redução no número de células B de memória que sofreram troca de classe, definidas como CD27⁺IgD⁻, podendo ser mais acentuada em alguns indivíduos do que em outros (PIQUERAS et al., 2003; WARNATZ et al., 2002; WEHR et al., 2008). O aumento no número de células B transitórias e células B CD21^{low} também tem sido observado (WARNATZ et al., 2002; WEHR et al., 2008). De forma interessante, as alterações nesses subtipos tem sido associadas com as apresentações clínicas nos pacientes com CVID, sugerindo a classificação dos pacientes em diferentes grupos (Figura 4) (PIQUERAS et al., 2003; WARNATZ et al., 2002; WEHR et al., 2008).

Figura 4 - Classificação dos pacientes com CVID de acordo com os subtipos de células B



Legenda: (A) Classificação de Freiburg de acordo com a porcentagem de células B de memória com troca de classe, caracterizadas como CD27⁺IgD⁻, e células B CD21^{low} no total de linfócitos no sangue periférico. (B) Classificação de Paris de acordo com a porcentagem de células B de memória total, caracterizadas pela expressão de CD27, e a porcentagem de células B de memória que sofreram troca de classe, caracterizadas como CD27⁺IgD⁻. (C) Classificação EUROclass de acordo com as porcentagens das células B de memória de troca de classe (CD27⁺IgD⁻), células B de transição (CD38^{high}IgM^{high}) e células B CD21^{low} (CD38^{low}CD21^{low}).

Fonte: autora.

Assim, na classificação de Freiburg, em que os pacientes foram divididos de acordo com a porcentagem de células B CD27⁺IgD⁻ e células B CD21^{low} no total de linfócitos no sangue periférico, pacientes do grupo Ia, formado por indivíduos com porcentagem de células B CD27⁺IgD⁻ inferior a 0,4% e porcentagem de células B CD21^{low} superior a 20%, foram associados ao maior risco de apresentar esplenomegalia e doenças autoimunes (WARNATZ et al., 2002). Na classificação de Paris, a partir da análise de células B de memória total, caracterizadas pela expressão de CD27 e de células B CD27⁺IgD⁻, os pacientes do grupo MB0, com ≤ 11% de células B CD27⁺, apresentaram maior incidência de esplenomegalia, doenças linfoproliferativas e granulomatosas (PIQUERAS et al., 2003). Por último, na classificação EUROclass o grupo smB-, ≤ 2% de células B CD27⁺IgD⁻, foi associado a maior risco de esplenomegalia e doenças granulomatosas; o grupo smB- Tr^{hi}, com frequência de células B CD38^{high}IgM^{high} igual ou superior a 9%, mostrou maior incidência de pacientes com linfadenopatias; e o grupo CD21^{low}, com mais de 10% de células B CD21^{low}, mostrou mais chances de apresentar esplenomegalia e doenças granulomatosas (WEHR et al., 2008).

Além disso, alterações nesses subtipos de células B têm permitido identificar distúrbios em diferentes estágios de maturação, ativação e diferenciação dos linfócitos B (WEHR et al., 2008). Nesse sentido, diversos estudos têm sido realizados para tentar identificar os mecanismos envolvidos na imunopatogênese da doença. De forma interessante, trabalho realizado por FOERSTER e colaboradores (2011) mostrou que as células B naïve de pacientes classificados no grupo Ia da classificação de Freiburg, ou seja, pacientes com menos de 0,4% de células B $CD27^+IgD^-$, apresentaram uma redução no influxo de Ca^{2+} após estímulo do receptor de célula B (BCR – *B cell receptor*), resultando em uma ativação ineficiente dessas células com redução na expressão de CD86 e na proliferação (FOERSTER et al., 2010). A redução no influxo de Ca^{2+} não foi observada nos pacientes dos outros grupos e não foi associada a defeitos na sinalização do BCR, sugerindo alterações nos canais de cálcio da membrana plasmática ou na homeostase intracelular do cálcio (FOERSTER et al., 2010). Outro mecanismo que pode estar envolvido na redução de células B de memória em indivíduos com CVID é uma maior susceptibilidade a apoptose após ativação. CLEMENTE e colaboradores (2013) observaram que as células B $CD27^+$ de pacientes do grupo MB0 da classificação de Paris sofreram mais apoptose e apresentaram maior expressão do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL – *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) em comparação com o grupo controle e dos outros pacientes (CLEMENTE et al., 2013).

Em relação a produção *in vitro* de imunoglobulinas, BRYANT e colaboradores (1990) classificaram os pacientes com CVID após estímulo das células mononucleares do sangue periférico (PBMC – *Peripheral blood mononuclear cells*) com *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) ou anti-IgM e IL-2 naqueles capazes de produzirem níveis normais de IgG, IgA e IgM, aqueles capazes de produzirem apenas IgM e os que não produziram nenhuma imunoglobulina (BRYANT et al., 1990). Estudo realizado por BORTE e colaboradores (2009) demonstrou que em culturas de PBMC de pacientes com CVID, a adição de IL-21 aos estímulos IL-4 e anti-CD40 foi capaz de induzir a diferenciação de células secretoras de IgG e IgA e de células plasmáticas, caracterizadas pela expressão de CD138, além de reduzir a apoptose dessas células. Por outro lado, CLEMENTE e colaboradores (2011) mostraram que células B purificadas de pacientes com CVID produziram baixos níveis de IgG e IgA quando estimuladas, *in vitro*, com CpG-ODN ou anti-CD40 e IL-21 em comparação com as células de indivíduos controle (CLEMENTE et al., 2011). Apesar das diferentes condições dos experimentos realizados, esses dois trabalhos sugerem que a ativação e diferenciação eficientes das células B em células secretoras de anticorpos dependem de diversos fatores, como citocinas e interação célula-célula.

De fato, alguns estudos têm mostrado alterações nas células dendríticas (DCs) e monócitos de pacientes com CVID. Uma redução na contagem de DCs mieloides (mDC – *myeloid DC*) e plasmocitoides (pDC – *plasmocytoid DC*) já foi observada em pacientes com CVID, além de reduzida expressão de coestimuladores como CD86, HLA-DR e incapacidade de secretar IL-12 (BAYRY et al., 2004; CUNNINGHAM-RUNDLES; RADIGAN, 2005; TARALDSRUD et al., 2014). Por outro lado, monócitos de pacientes mostraram elevada produção de IL-12 e expressão de HLA-DR em comparação com indivíduos saudáveis (BARBOSA et al., 2012; CAMBRONERO et al., 2000). Alterações nesses compartimentos celulares podem influenciar na ativação e diferenciação das células T.

Anormalidades nas células T, que podem afetar as funções da resposta imune humoral através de seus efeitos nas células B, também têm sido encontradas em pacientes com CVID (CUNNINGHAM-RUNDLES; BODIAN, 1999). Uma diminuição no número de células T CD4⁺ e T CD8⁺ naïves tem sido encontrada em pacientes, sendo a perda de células T CD4⁺ junto com maior expressão de marcadores de ativação como CD95 e HLA-DR associadas a manifestações clínicas mais graves como esplenomegalia e doenças autoimunes (BATEMAN et al., 2012; GIOVANNETTI et al., 2007; MOUILLOT et al., 2010). Deficiências funcionais como a redução na produção de IL-17 e IL-10 pelas células T CD4⁺ foram relacionadas a menor frequência de células B de memória em pacientes com CVID (BARBOSA et al., 2011; BERRÓN-RUIZ et al., 2016). Além disso, estudo realizado por TARALDSRUD e colaboradores (2017) sugere que alterações na sinalização de IL-4 favoreça um fenótipo do tipo T_H1 e estaria associada a manifestações clínicas mais graves como doenças autoimunes e inflamatórias (TARALDSRUD et al., 2017). Uma redução na frequência e função das células Treg têm sido observadas em pacientes com CVID e associada ao desenvolvimento de doenças autoimunes e esplenomegalia (KOFOD-OLSEN et al., 2016; YU et al., 2009).

Devido ao seu papel fundamental em controlar de forma eficiente a produção de anticorpos, alguns estudos recentes têm mostrado alterações na frequência das células cT_{FH}, com elevada frequência do subtipo T_{FH}1 em pacientes com reduzida frequência de células B de memória com troca de classe (CUNILL et al., 2017; TURPIN et al., 2018; UNGER et al., 2018). Porém, até o momento, não há estudos avaliando como alterações na frequência dessas células afeta a produção de anticorpos. Dessa forma, estudos avaliando a capacidade funcional dessas células, através da produção de anticorpos, irão fornecer novas informações sobre o papel das células cT_{FH} nesses pacientes.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a porcentagem e perfil funcional das células cT_{FH} em gestantes infectadas ou não pelo HIV-1 e em pacientes com imunodeficiência comum variável (CVID).

2.2 Objetivos 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. J Reprod Immunol. 2017 Apr 27;121:1-10. doi: 10.1016/j.jri.2017.04.007. [Epub ahead of print]

* The first two authors contributed equally to this work

- ✓ Avaliar o impacto da gestação na porcentagem de células T_{FH} no sangue periférico de gestantes saudáveis;
- ✓ Determinar o perfil de citocinas produzido pelas células T_{FH} do sangue periférico de gestantes saudáveis;
- ✓ Correlacionar a frequência das células T_{FH} com a produção de hormônios gestacionais;
- ✓ Correlacionar a frequência das células T_{FH} com a produção de anticorpos IgG contra citomegalovírus (CMV) e antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBs).

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

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

* The first two authors contributed equally to this work

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

Artigo 3: – Impaired antibody production in CVID patients is not related to T_{FH} cells dysfunction (Artigo submetido)

- ✓ Avaliar as células T_{FH} e T_{FR} circulantes através de múltiplos marcadores de superfície em pacientes com CVID;
- ✓ Determinar o perfil de citocinas intracelulares (IL-21, IL-17, IL-4, $IFN\gamma$) produzido pelas células T_{FH} em pacientes com CVID;
- ✓ Avaliar a expressão do receptor de IL-21 nas células B de pacientes com CVID;
- ✓ Analisar a capacidade funcional das células T_{FH} dos pacientes com CVID, *in vitro*, através de coculturas com células B.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 Artigo 1 - Pregnancy favors the expansion of circulating functional follicular helper T Cells (Artigo 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_{FH} 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_{FH}) cells, typically identified by the expression of CD45RO and CXCR5, has not been previously investigated. Here, the percentage of T_{FH} 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_{FH} 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_{FH} cells. Finally, peripheral estrogen levels, but not progesterone, were positively related to either PD-1⁺ CXCR3⁺ T_{FH} 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_{FH}) 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_{FH} 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_{FH} cells are important for the process of heavy chain class switch of antibodies (Ma and Deenick, 2014). At the T_{FH} 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_{FH} cells in the pool of circulating memory T cells (Chevalier et al., 2011; Morita et al., 2011). Phenotypically, these circulating T_{FH}

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_{FH}, 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@globo.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.

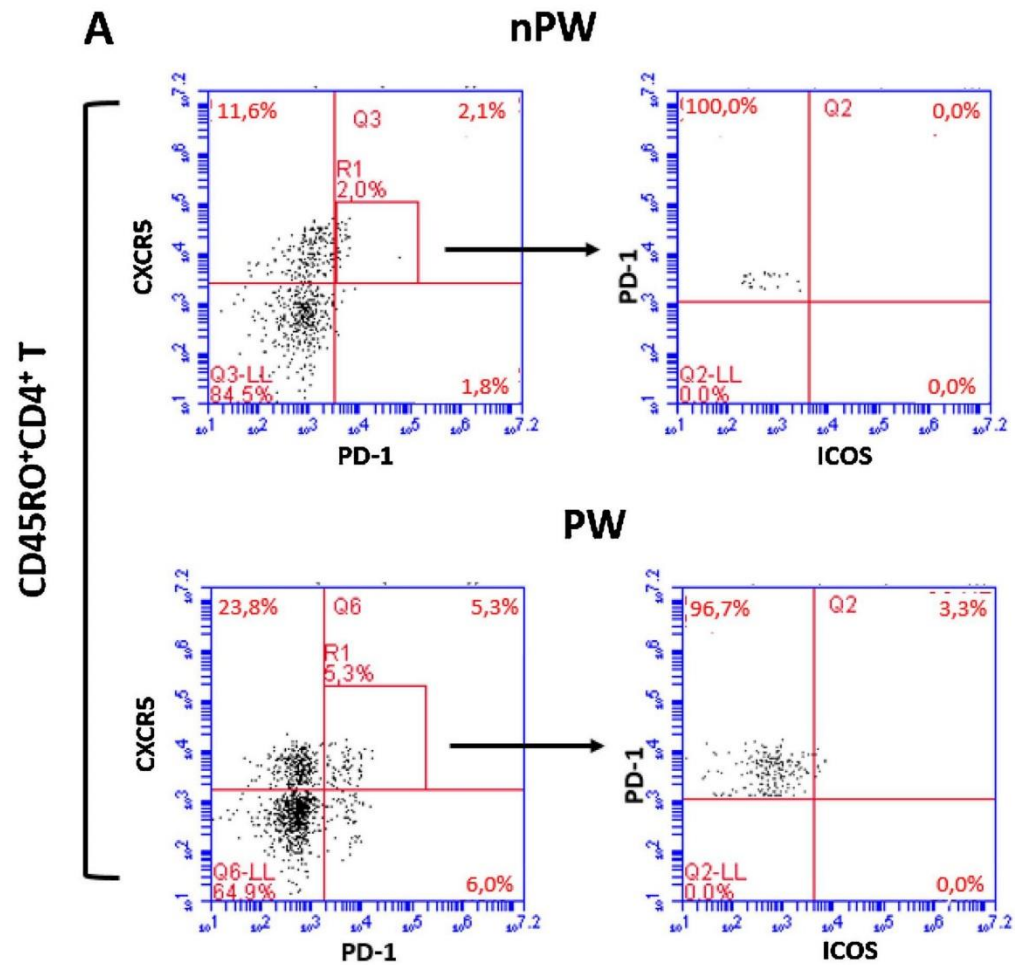


Fig. 1. The impact of pregnancy on the percentage of circulating T_H cells. Peripheral blood was obtained from healthy women, pregnant (PW, n = 10) or not (nPW, n = 10), and submitted to staining with fluorescent monoclonal antibodies against CD3, CD4, CXCR5, CD45RO, ICOS and PD-1 markers. The percentage of T_H cells was evaluated through flow cytometry. In (A), representative dot plots. In (B), the percentage of T_H 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 (Locci et al., 2013; Tsai and Yu, 2014;) appears to identify a more efficient circulating T_H 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_H 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_H cells, a previously uninvestigated phenomenon.

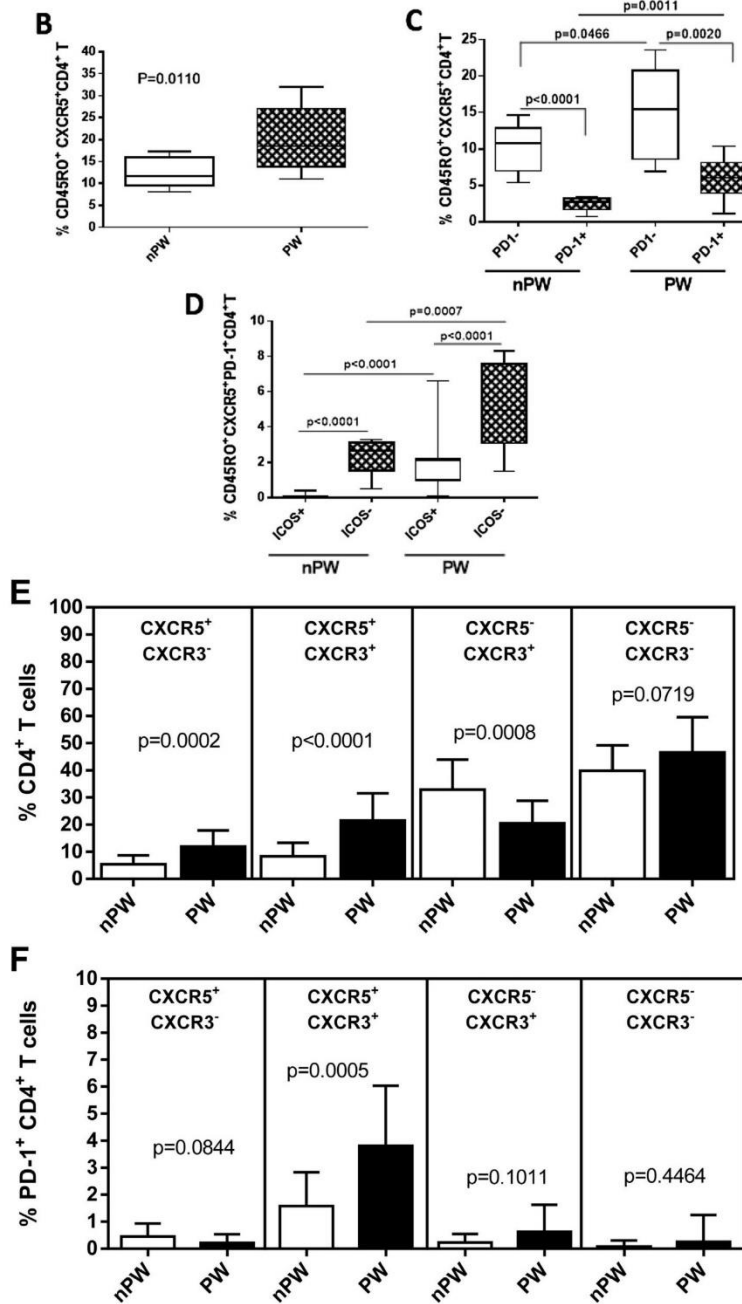


Fig. 1. (continued)

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

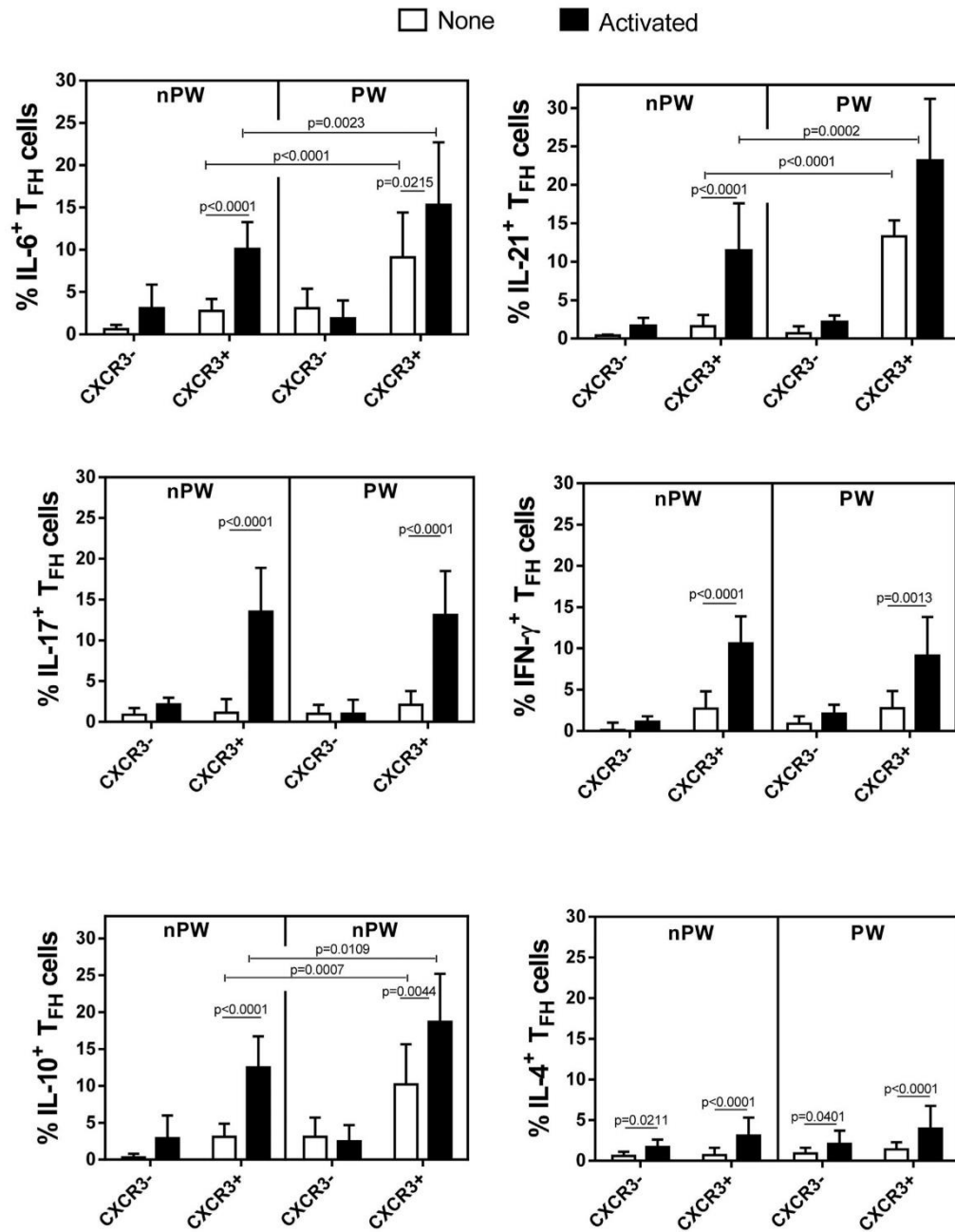


Fig. 2. The impact of pregnancy on the percentage of cytokine-producing T_{FH} cells expressing or not CXCR3 marker. Peripheral blood was obtained from healthy women, both pregnant (PW, n = 20) or not (nPW, n = 20), and was stimulated with PMA and Ionomycin. After 4 h, the cells were submitted to staining 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_{FH} 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_{FH} cells.

	% CXCR3 ⁺ T _{FH}		% CXCR3 ⁺ PD-1 ⁺ T _{FH}	
	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_{FH} cells, according to 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_{FH} 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 Cytotfix/ 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 Abcañs 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 mUI/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_{FH} cells

Taking into consideration the most typical markers for T_{FH} 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_{FH} 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_{FH} functions (Bentebibel et al., 2013; Gensous et al., 2016). In the present study, pregnancy significantly increased the percentage of T_{FH} 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_{FH} cells. The PD-1 was mainly expressed on CXCR3⁺ T_{FH} 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_{FH} 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_{FH} 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_{FH} cells between PW and nPW (Fig. 2). Moreover, the frequency T_{FH} cell producers of IL-6, IL-10 and IL-21 was directly correlated with the proportion of CXCR3⁺ T_{FH} cells, but not PD-1⁺ CXCR3⁺ T_{FH} cell subset (Table 1).

3.3. The proportion of circulating CXCR3⁺ T_{FH} 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_{FH} 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_{FH} 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_{FH} cell subset (Fig. 3C). We also verified the correlation between the percentage of cytokine producing CXCR3⁺ T_{FH} cells and the production of those antibodies. As

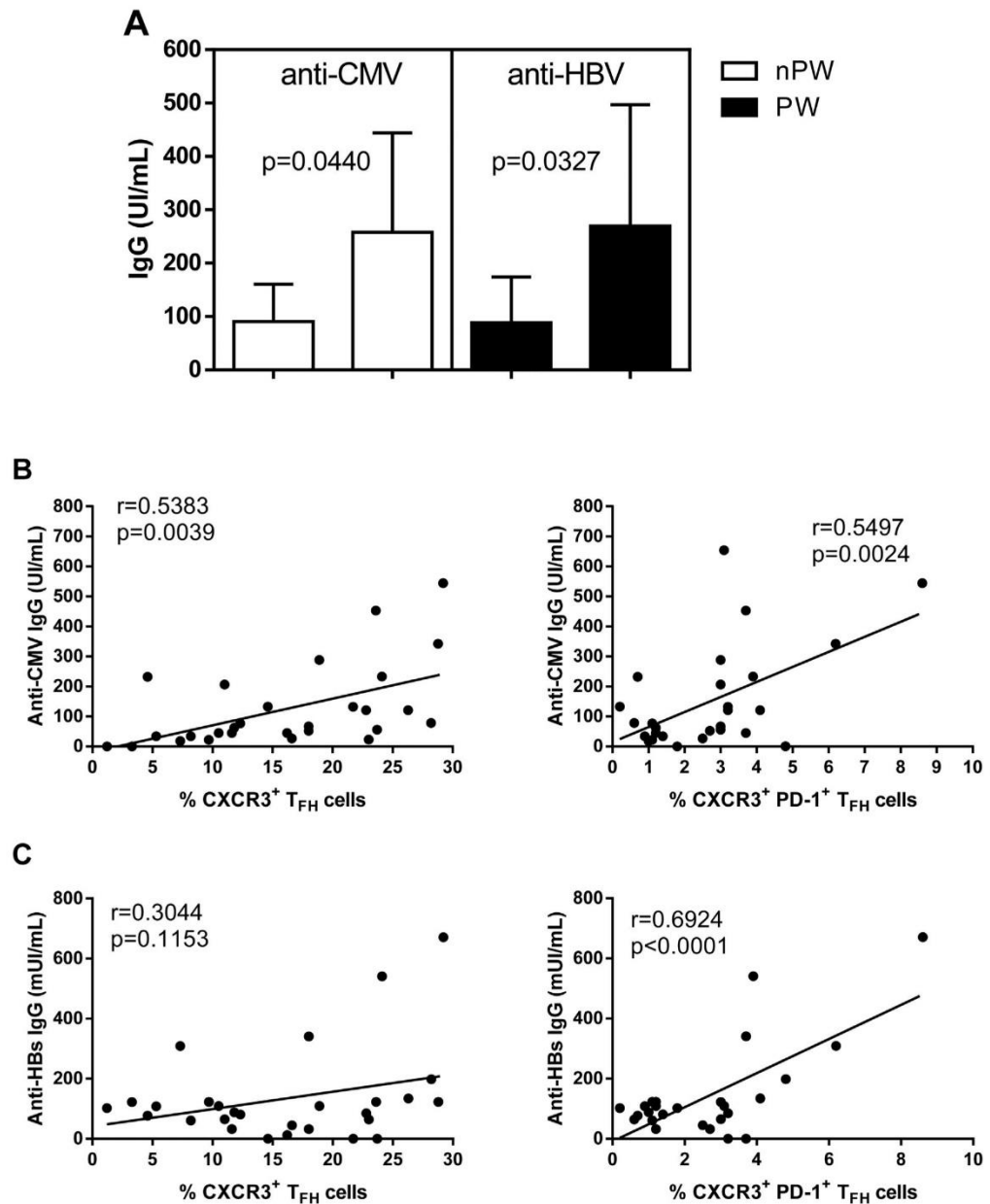


Fig. 3. The relationship between the percentage of CXCR3⁺ T_{FH} cells, according to the expression of PD-1, and plasmatic levels of anti-CMV and anti-HBs IgG. In (A), the mean plasmatic levels of anti-CMV and anti-HBs IgG antibodies in nPW (n = 14) and PW (n = 14) is shown. The relationship between the percentage of T_{FH} cells, according to the expression of PD-1 marker, with anti-CMV (B) and anti-HBs (C) antibodies is 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,

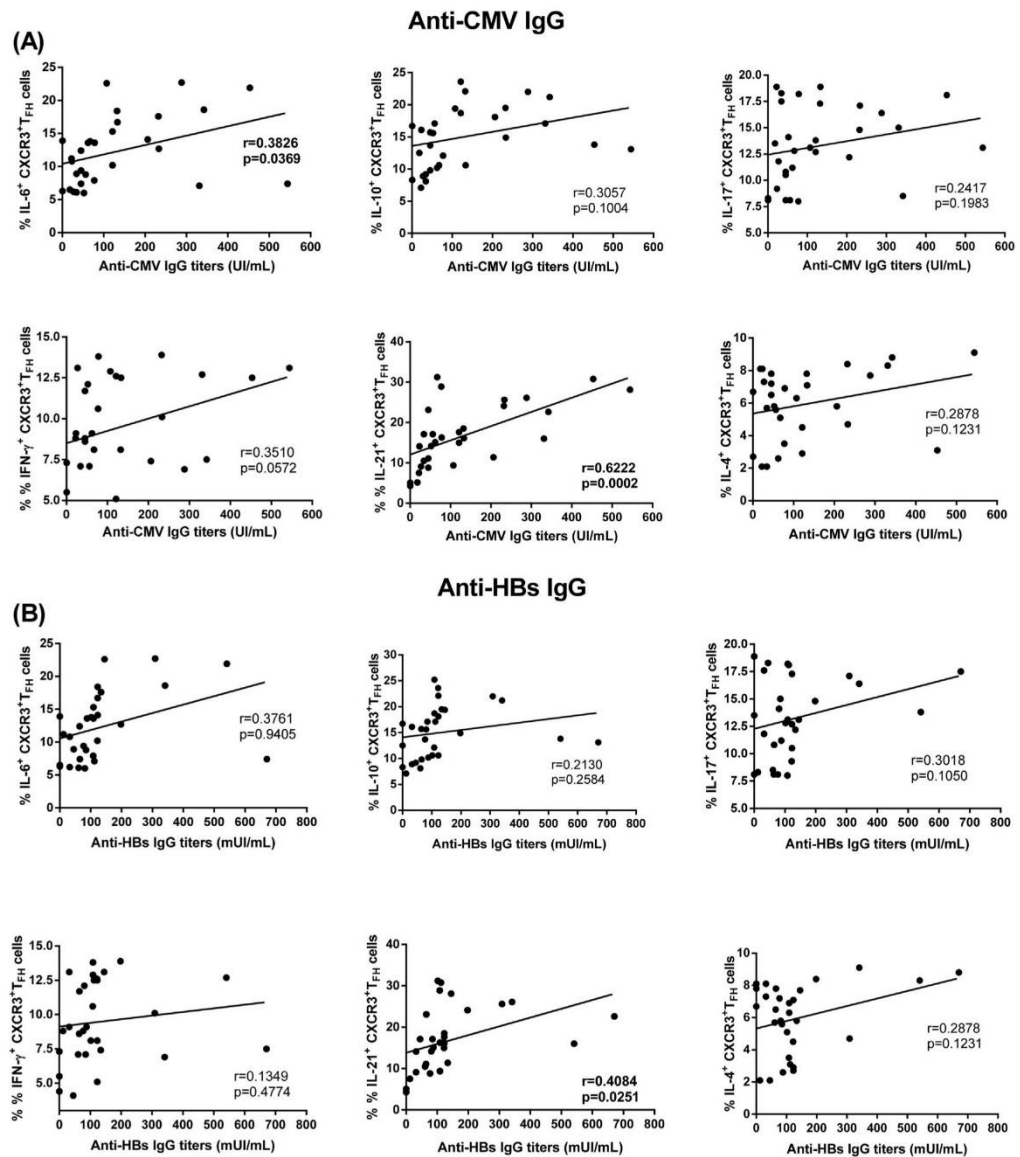


Fig. 4. The relationship between the percentage of cytokine-producing CXCR3⁺ T_{FH} cells and antibody production. The figure shows the relationship between the percentage of circulating cytokine-producing CXCR3⁺ T_{FH} cells with the peripheral levels of anti-CMV (A) and anti-HBs (B), determined by 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_{FH} 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_{FH} 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_{FH} 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_{FH} cells.

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

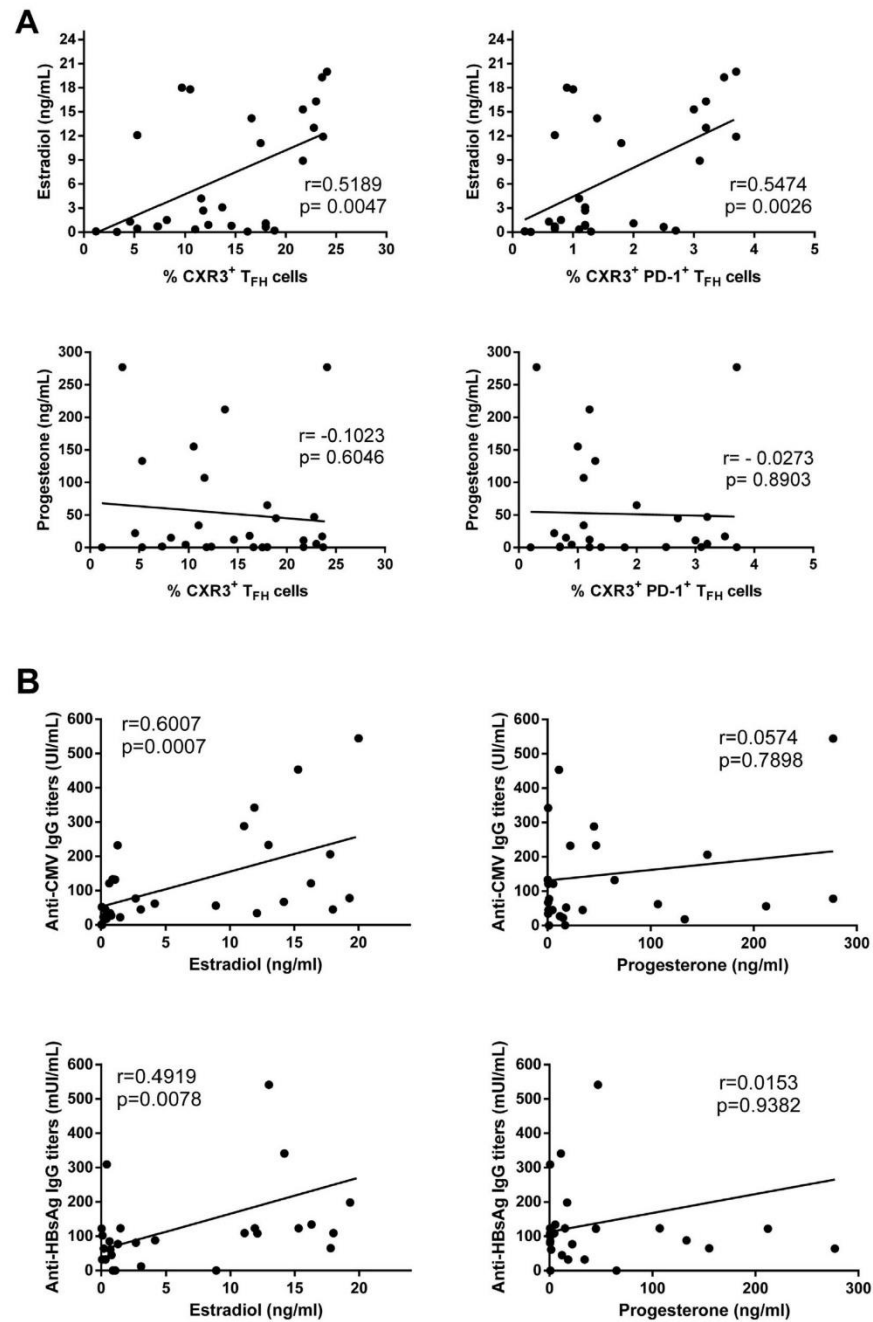


Fig. 5. The relationship between pregnancy hormone levels with the percentage of CXCR3⁺ T_{FH} cells and the antibody production. In (A), the percentage of whole CXCR3⁺ T_{FH} cells and PD-1 positive subset, was evaluated in relation to estrogen and progesterone levels in plasma of pregnant and non-pregnant 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;

Nakayama 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_{FH} cells, although these represent a minor T_{FH} cell subset.

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

Despite the importance of cognitive interactions between T_{FH} 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_{FH} 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_{FH} cells. Additionally, we also observed the same relationship between anti-CMV IgG levels and IL-6- or IL-21-producing T_{FH} cells, regardless of the expression of PD-1. These findings are in agreement with other studies that show the importance of T_{FH} 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_{FH} 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_{FH} 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_{FH} 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_{FH} cells may also be identified by the differential expression of CXCR3 and CCR6. While IFN- γ -secreting T_{FH}-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_{FH} 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_{FH}, its frequency was low. To better identify each circulating T_{FH} 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; Luo et al., 2011; Kwak-Kim et al., 2014). Interestingly, the percentage of circulating IL-10⁺ CXCR3⁺ T_{FH} 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_{FR} 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_{FH} cells identified here.

In terms of pregnancy-related hormones, the levels of estrogen, but not progesterone, positively correlated with both whole CXCR3⁺ T_{FH} 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_{FH} cells. Most significantly, the *in vitro* effects of estrogen on survival and function of human T_{FH} 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 (Mackern-Oberti et al., 2017). An increase in circulating PD-1⁺ ICOS⁺ T_{FH} 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_{FH} or T_{FR} 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., Obermoser, 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., Obermoser, 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., Knöth, 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, C.S., Yu, D., et al., 2011. CXCR5 expressing human central memory CD4T cells and their relevance for humoral immune responses. *J. Immunol.* 186 (10), 5556–5568.
- Crotty, S., 2011. Follicular helper CD4T cells (TFH). *Ann. Rev. Immunol.* 29, 621–663.
- Cubas, R.A., Mudd, J.C., Savoye, A.L., Perreau, 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.
- Geginat, J., Paroni, M., Maglie, S., Alfieri, J.S., Kastir, I., Gruarin, P., et al., 2014. Plasticity of human CD4⁺ T cell subsets. *Front. Immunol.* 5, 630.
- Gensous, N., Schmitt, N., Richez, C., Ueno, H., Blanco, P., 2016. T follicular helper cells, interleukin-21 and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*(August (7)) pii: kew297.
- Grimaldi, C.M., Cleary, J., Dagtas, A.S., Moussai, D., Diamond, B., 2002. Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J. Clin. Invest.* 109 (12), 1625–1633.
- Heikkinen, J., Möttönen, M., Alanen, A., Lassila, O., 2004. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin. Exp. Immunol.* 136 (2), 373–378.
- Hel, Z., Stringer, E., Mestecky, 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., Wong, 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., Poholek, A.C., DiToro, 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., Hikida, 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., Bao, S., Lee, S.K., Kim, J.W., Gilman-Sachs, A., 2014. Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors, 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., Deenick, E.K., 2014. Human T follicular helper (Tfh) cells and disease. *Immunol. Cell Biol.* 92 (1), 64–71.
- Ma, C.S., Suryani, S., Avery, D.T., Chan, A., Nanan, R., Santner-Nanan, B., et al., 2009. Early commitment of naive human CD4⁺ T cells to the T follicular helper (TFH) cell lineage is induced by IL-12. *Immunol. Cell Biol.* 87, 590–600.
- Mackern-Oberti, J.P., Jara, E.L., Riedel, 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., Bentebibel, S.E., Ranganathan, R., Bourdery, 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), 108–121.
- Nakayama, S., Tanaka, Y., 2016. T follicular helper (Tfh) cells in autoimmune diseases. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 39 (1), 1–7.
- Nurieva, R.L., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., et al., 2009. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325 (5943), 1001–1005.
- Ortona, E., Pierdominici, M., Berstein, L., 2014. Autoantibodies to estrogen receptors and their involvement in autoimmune diseases and cancer. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 144 (Pt B), 260–267.
- Pallikkuth, S., Parmigiani, A., Pahwa, 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. Tfh 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., Nakashima, 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 Th cells come with colors. *Immunity* 39 (4), 629–630.
- Schmitt, N., Bentebibel, S.E., Ueno, H., 2014. Phenotype and functions of memory th cells in human blood. *Trends Immunol.* 35 (9), 436–442.
- Shulman, Z., Gitlin, A.D., Targ, S., Jankovic, M., Pasqual, G., Nussenzweig, 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 fetomaternal immune tolerance. *Chin. Med. J.* 127 (17), 3171–3180.
- Su, Z., Lu, H., Jiang, H., Zhu, H., Li, Z., Zhang, P., et al., 2015. IFN- γ -producing Th17 cells bias by HMGBl-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., 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.
- 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., Ditoro, 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., Linswall, 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 T_{FH}-like cell recovery in ARV-treated HIV-1-infected women (Artigo submetido à revista *Cytokine*)

Elsevier Editorial System(tm) for Cytokine +
OA Mirror
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Pregnancy favors circulating IL-21-secreting TFH-like cell recovery in ARV-treated HIV-1-infected women

Article Type: Full length article

Keywords: HIV/Aids, pregnancy, cytokines, TFH cells, IL-21, anti-HBV IgG, anti-gp41 IgG, ARV, estrogen

Corresponding Author: Mrs. Cleonice Bento,

Corresponding Author's Institution: Federal University of State of Rio de Janeiro

First Author: Taissa Kasahara

Order of Authors: Taissa Kasahara; Clarice Monteiro; Joana Hygino; Marcos Cafasso; Hugo A Yamada; Simone A Leite; Vander G Silva; Regis M Andrade; Sudhir Gupta; Cleonice Bento

Abstract: Pregnancy appears to favor maternal antibody production. In contrast, by damaging follicular helper T cells (TFH), HIV-1 infection compromises protective humoral immune response. Our results demonstrate that antiretroviral (ARV) therapy was more efficient in elevating the percentage of circulating IL-21-secreting TFH 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+TFH frequency and plasma concentration of estrogen. In summary, our results suggest that pregnancy favors the recovery of TFH-like cells after ARV therapy in HIV-1-infected women.

Suggested Reviewers: Corey Smith
Associate Professor, Immunology, Queensland Institute of Medical Research
Corey.Smith@qimrberghofer.edu.au

Mercio Perrin
Associate Professor, Developmental, Molecular and Chemical Biology, Tufts University School of Medicine
maperrin@yahoo.com

Ana Eespada Sousa
Associate Professor, Institute of Molecular Medicine, University of Lisboa
asousa@fm.ul.pt

Cover Letter



FEDERAL UNIVERSITY OF STATE OF RIO DE JANEIRO

Frei Caneca, 94/CENTRO
22220-040 Rio de Janeiro
Rio de Janeiro/Brazil
Tel: 55 21 2531-7906

22 January 2019.

To: Dear Editor from *Cytokine*

Dear Sir or Madam

We are sending you the article entitled "**Pregnancy favors circulating IL-21-secreting T_{FH}-like cells recovery in ARV-treated HIV-1-infected women**" to be considered for publication in the *Cytokine*. As corresponding author, I warrant that the manuscript has not been submitted for publication elsewhere and that all the authors of the paper have read and have given their approval of the manuscript. Furthermore, none of the authors has any potential financial conflict of interest related to the manuscript. Finally, I also state that no other related work is "in press" or under consideration for publication elsewhere.

I look forward to hearing from you, and thank you in advance.

Kind regards,

Cleonice Alves de Melo Bento, PhD.
Head Professor of Immunology
Department of Microbiology and Parasitology
Federal University of Rio de Janeiro State, Brazil
+ 55 21 2531-7906

Highlights**Highlights**

Pregnancy favors T_{FH} cells recovery after ARV therapy in HIV-1-infected women.

HBV immunization was more efficient in ARV-treated HIV-1-infected pregnant women.

Anti-HBV IgG titers was associated with percentage of T_{FH} cells and estrogen levels.

*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

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

Taissa M. Kasahara^{a,c*}, Clarice Monteiro^{a,c*}, Joana Hygino^a, Marcos O. S. D. Cafasso^a, Hugo
A. A. Oyamada^a, Regis M. Andrade^b, Simone Leite^d, Vander G. Silva^d, Sudhir Gupta^e, and
Cleonice A. M. Bento^{a,c}

From ^aDepartment of Microbiology and Parasitology and ^bDepartment of General Medicine
Department/Federal University of the State of Rio de Janeiro, Brazil; ^cDepartment of
Microbiology, Immunology and Parasitology, State University of Rio de Janeiro, Brazil;
^dFerando Figueiras Institute /IOC, Rio de Janeiro, Brazil; ^eUniversity of California, Irvine,
CA, USA.

Conflict of Interest Statement

All authors declare that there are no conflicts of interest.

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

* 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@globo.com

Abstract

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. 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. In summary, our results suggest that pregnancy favors the recovery of T_{FH} -like cells after ARV therapy in HIV-1-infected women.

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 (ICOS), CD40 ligand (CD40L/CD154) and the production of IL-21 [4-6]. 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 CG development, T_{FH} cells can leave secondary follicles and join the pool of circulating memory T cells [10,11]. 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 [11,12]. Although most cT_{FH} cells do not express ICOS or PD-1, a very small number of ICOS⁺PD-1⁺ T_{FH} cells (less than 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 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 anti-retroviral (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 which 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 less than 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 (San Diego, CA, USA). 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 h. For cytokine measurement optimization, brefeldin A (10 μ g/mL; Sigma-Aldrich) was also added. Briefly, whole blood cells were incubated with various combinations of mAbs for surface markers, for 30 min at room temperature in the dark, according to manufacturer's instructions. The cells were washed with PBS+2%FBS and then permeabilized by incubating cells with Cytofix/Cytoperm solution (BD Pharmingen, San Diego, CA) at 4°C for 20 min. The whole blood cells were lysed with Fix/Lyse solution (eBiosciences) for 10 min at room temperature before cell permeabilization. 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 min at 4°C. The cells were acquired on Accuri C6 (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 100,000 to 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 cells 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 Technology, Canada). Briefly, 50 µL of the isolation cocktail was added to a PBMC suspension (1×10^7 cells/1mL) 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, 4mL 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 (1×10^4 /500 µL) and B (1×10^4 /500 µL) cell co-cultures were stimulated with 1 µg/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 wells 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, USA). 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, Pharmigen, San Diego, CA), 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'-tetramethyl-benzidine (TMB) as substrate. Recombinant human cytokines, at concentrations ranging from 3.5–500 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 (Belo Horizonte, BRA) for anti-HBV IgG and Creative Diagnostics (NY, USA) for anti-TT IgG], 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 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 hr at 37°C. After washing, bound antibodies were detected by goat anti-human Ig's peroxidase conjugate (120 min at 37°C), followed by substrate (TMB) incubation for 25 min at room temperature. The OD was obtained by reading the samples at 450nm.

2.6 Hormone determination

Peripheral progesterone and estrogen levels were 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 0–1000 pg/mL for estrogen and 0–40 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 as $p < 0.05$.

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 (Fig. 1A), we observed that ARV significantly diminished the percentage of whole cT_{FH} -like cells, as well as $PD-1^+$ subset, only in HIV-1-infected PW (Fig. 1B). Regarding the cytokine profile, no significant difference was observed between the two HIV-1-infected groups before ARV therapy (Fig. 1C). HIV-1 treatment reduced the proportion of IL-6-secreting T_{FH} cells, but elevated the frequency of $IFN-\gamma^+$ T_{FH} cell subset in those patients (Fig. 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 (Fig. 1C). Finally, the percentage of $IL-10^+$ cell subsets was also higher in PW after ARV therapy (Fig. 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 (Fig. 2A) and IL-21 release (Fig. 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 or B cells, alone or in combination, produced IL-21 (data not shown).

1.2 *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 (Fig. 3A), the *in vivo* anti-HBsAg IgG titers following HBV immunization was significantly higher in ARV-treated PW (Fig. 3B). Similar results were observed after the booster dose of tetanus vaccine (Fig. 3B). Anti-HBsAg IgG titers were directly correlated with both IL-21⁺T_{FH}-like cell frequency and plasma estrogen levels (Table 2). 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) (Table 2).

3.2 *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 (Fig. 4). The percentage of whole 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 (Fig. 4 B

and C). By contrast, no difference was observed for IL-6⁺ T_{FH}-like cell subsets between the two experimental groups (Fig. 4C). In terms of circulating antibodies, anti-HBsAg IgG titers were also significantly higher in healthy HIV-1 negative PW (Fig. 5A). Finally, concerning hormones (Fig. 5B and C), HIV-1-infected PW have significantly lower estrogen levels than healthy PW (Fig. 5C).

4. Discussion

Some studies have reported a tendency of pregnancy to enhance acquired humoral immunity by favoring the expansion of memory B and T_{FH} cells [30,32]. In contrast, by infecting T_{FH} cells, HIV-1 primarily damages the production of neutralizing antibodies. 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 [20,25,26,34].

ARV 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 less than 1 to 2 years of successful ARV therapy [35,36]. Boswell et al. [16] observed an increase in the frequency of circulating Tfh cells 1 year after starting ARV therapy. We did not observe any changes 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. On the other hand, the frequency of those cells diminished in pregnant patients receiving ARV. 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 of 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 production [38] 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- γ ⁺ 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- γ is important to induce HIV-1-specific IgG antibodies [40]. Some T_{FH} cells, named T_{FH1} cells, co-express IL-21 and IFN- γ [11], and the frequency of the T_{FH} cell subset during acute HIV-1 infection correlates negatively with set point viral load and positively with anti-p24 IgG titers [41]. In our study, there is a possibility that ARV raised the frequency of T_{FH}-like cells capable of simultaneously producing IL-21 and IFN- γ in HIV-1 PW. Due to technical limitations, we were unable to investigate what proportion of IFN- γ -producing T_{FH} cells are IL-21 positive.

A previous study published by us described a tendency of pregnancy to favor the increase of circulating IL-21-secreting T_{FH}-like cells [32]. This phenomenon could help immunized, healthy mothers to protect their newborns from infectious diseases by transferring IgG across the placenta. 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 *Staphylococcus 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, although pregnant patients responded better to ARV therapy than non-pregnant ones, both anti-HBsAg titers and the percentage of T_{FH}-like lymphocytes able to produce IL-21, IL-10 and IFN- γ was 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. Nevertheless, immune recovery 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 al* [29] 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 of 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 favors a better functional circulating T_{FH} cells recovery in HIV-1-infected women after ARV introduction.

5. References

- [1] Schaerli, P. *et al.* CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *The Journal of Experimental Medicine* 192(2000) 1553-1562.
- [2] Victora, G.D. *et al.* Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 143 (2010) 592–605.
- [3] Chtanova, T. *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. *The Journal of Immunology* 173 (2004) 68-78.
- [4] 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* 192 (2000) 1545-1552.
- [5] 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* 193 (2001) 1373–1381.
- [6] Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (T_{FH}). *The Annual Review of Immunology* 29 (2011) 621–63.
- [7] Deenick, E. K.; Ma, C. S. The regulation and role of T follicular helper cells in immunity. *Immunology* 134 (2011) 361-367.
- [8] Linterman, M. A. *et al.* IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *The Journal of Experimental Medicine* 207 (2010) 353-363.
- [9] Zotos, D. *et al.* IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *The Journal of Experimental Medicine* 207(2010) 365-378.
- [10] Shulman, Z. *et al.* T follicular helper cell dynamics in germinal centers. *Science* 341(2013) 673-677.

- [11] 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* 34(2011) 108-121.
- [12] Chevalier, N. *et al.* CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. *The Journal of Immunology* 186(2011) 5556-5568.
- [13] Schmitt, N.; Bentebibel, S. E.; Ueno, H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunology* 35(2014) 436-442.
- [14] 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* 39 (2013) 758-769.
- [15] 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 (2013) 770-781.
- [16] Boswell, K. L. *et al.* Loss of circulating CD4 T cells with B cell helper function during chronic HIV infection. *PLoS Pathogens* 10:e1003853 (2014).
- [17] Ueno, H. Human Circulating T Follicular Helper Cell Subsets in Health and Disease. *Journal of Clinical Immunology* 36 (2016), 34-39.
- [18] 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* 210 (2013) 143-156.
- [19] Lindqvist, M. *et al.* Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *The Journal of Clinical Investigation* 122 (2012) 3271-3280.
- [20] Cubas, R. A. *et al.* Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nature Medicine* 19 (2013) 494-499.

- [21] 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* 12 (2017), e0176641.
- [22] De Bree, G. J.; Lynch, R. M. B cells in HIV pathogenesis. *Current opinion in infectious diseases* 29 (2016) 23-30.
- [23] Martin-Gayo, E. *et al.* Circulating CXCR5⁺CXCR3⁺PD-1^{lo} Tfh-like cells in HIV-1 controllers with neutralizing antibody breadth. *JCI Insight* 2 (2017):e89574.
- [24] Caskey, M. *et al.* Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. *Nature* 522 (2015) 487-491.
- [25] Pallikkuth, S. *et al.* Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine. *Blood* 120 (2012) 985-993.
- [26] Muir, R. *et al.* Altered Memory Circulating T Follicular Helper-B Cell Interaction in Early Acute HIV Infection. *PLoS Pathogens* 12 (2016) e1005777.
- [27] Robinson, D. P.; Klein, S. L. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Hormones and behavior* 62 (2012) 263-271.
- [28] Heikkinen, J. *et al.* Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clinical and Experimental Immunology* 136 (2004) 372-378.
- [29] Fu, Y. *et al.* Estrogen promotes B cell activation in vitro through down-regulating CD80 molecule expression. *Gynecological endocrinology* 27 (2011) 593-596.
- [30] Kay, A. W. *et al.* Pregnancy does not attenuate the antibody or plasmablast response to inactivated Influenza vaccine. *Journal of Infectious Diseases* 212 (2015) 861-870.
- [31] Faucette, A. N. *et al.* Immunization of pregnant women: Future of early infant protection. *Human vaccines & immunotherapeutics* 11 (2015) 2549-2555.
- [32] Monteiro, C. *et al.* Pregnancy favors the expansion of circulating functional follicular helper T cells. *Journal of reproductive immunology* 121 (2017) 1-10.

- [33] Streeck, H. *et al.* T-cell responses in primary HIV-1 infection. *Curren opinion in HIV and AIDS* 2 (2008) 52-59.
- [34] Colineau, L. *et al.* HIV-infected spleens present altered follicular helper T cell (Tfh) subsets and skewed B cell maturation. *PLoS One* 10 (2015):e0140978.
- [35] Chéret, A. *et al.* Combined ART started during acute HIV infection protects central memory CD4⁺ T cells and can induce remission. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (2015) 2108-2120.
- [36] Laanani, M. *et al.* Impact of the timing of initiation of antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection on the decay of cell-associated HIV-DNA. *Clinical Infectious Disease* 160 (2015) 1715-1721.
- [37] Petrovas, C. *et al.* CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. *The Journal of Clinical Investigation* 122 (2012) 3281-3294.
- [38] Bento, C. A. *et al.* IL-10-secreting T cells from HIV-infected pregnant women downregulate HIV-1 replication: effect enhanced by antiretroviral treatment. *AIDS* 23 (2009) 9-18.
- [39] Velu, V. *et al.* Induction of Th1 biased Tfh (Tfh1 cells) in lymphoid tissues during chronic SIV infection defines functionally distinct germinal center Tfh cells. *The Journal of Immunology* 197 (2016) 1832-1842.
- [40] Baiyegunhi, O. *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. *Journal of Virology* 92 (2018) e00659.
- [41] Borrow, P.; Moody, M. A. Immunologic characteristics of HIV-infected individuals who make broadly neutralizing antibodies. *Immunological reviews* 275 (2017) 62-78 (2017).
- [42] Zwart, G. *et al.* Antibody responses to HIV-1 envelope and gag epitopes in HIV-1 seroconverts with rapid versus slow disease progression. *Virology* 201 (1994) 285-293.

- [43] 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* 26 (2012) 685-694.
- [44] Landolt, N. K. *et al.* Efavirez, in contrast to nevirapine, is associated with unfavorable progesterone and antiretroviral levels when coadministered with combined oral contraceptives. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 62 (2013) 534-539.
- [45] Papp, E. *et al.* HIV protease inhibitor use during pregnancy is associated with decreased progesterone levels, suggesting a potential mechanism contributing to fetal growth restriction. *The Journal of Infectious Diseases* 211 (2015) 10-18.
- [46] Siou, K. *et al.* Progesterone supplementation for HIV-positive pregnant women on protease inhibitor-based antiretroviral regimes (the ProSPAR study): a study protocol for a pilot randomized controlled trial. *Pilot and Feasibility studies* 2 (2016) 49.
- [47] Schwartz, O. *et al.* Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature Medicine* 2 (1996) 338-342.

Table 1. Characteristics of the HIV-1-infected pregnant and non-pregnant women.¹

	HIV-1 pos.nPW	HIV-1 pos.PW
N ⁰ of subjects	30	30
Mean age [years (SD)]	27.6 (4.1)	27.1 (6.1)
Mean T CD4 ⁺ cell count [cells/ μ L (SD)] ²		
at baseline	368.8 (167)	440.6 (271)
end point	617.9 (311)*	718.1 (310)*
Mean T CD8 ⁺ cell count [cells/ μ L (SD)] ²		
at baseline	922.4 (291.1)	866 (310.3)
end point	1,031 (554)	916 (447)
Mean viral load [copies RNA/mL (SD)] ³		
at baseline	45,613 (26,433)	36,961 (47071)
end point	6,131 (5,409)[#]	1,306 (3701)[#]
Time of ARV therapy [days (SD)] ⁴	189.1 (9.1)	151.4 (27.1)
Schedule ARV ⁵		
AZT/3TC/RTV/LPV	16	16
TDF/3TC/EFZ	8	7
ATV/RTV/TDF/3TC	2	3
AZT/3TC/ATV/RTV	4	4

¹The mean count of CD4⁺ and CD8⁺ T cells before (at baseline) and after (end point) antiretroviral (ARV) therapy; ²Mean plasma viral load before (at baseline) and after (end point) antiretroviral (ARV) therapy [limit of detection: 40 copies/mL]; ³time before (at baseline) and after (end point) antiretroviral (ARV) therapy; ⁴time of ARV therapy; ⁵ARV schedule: AZT

(zidovudine), 3TC (lamivudine), RTV (ritonavir), LPV (lopinavir), TDF (tenofovir), EFZ (efavirenz), and ATV (atazanavir). * and # indicate $p < 0.05$.

Figure legends

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 (Naïve) and after ARV therapy. In (B), the mean percentage of circulating T_{FH}-like cells, and PD-1⁺ T_{FH}-like cell subsets in PW and nPW. In (C), the mean percentage of different T_{FH}-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-1 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.

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.

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-1neg) 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.

Table

Table 2. Correlation coefficient (r) between the proportion of different T_H-like subsets and circulating levels of antibodies and hormones in HIV-1-infected women.

	Anti-HBsAg IgG		Anti-gp41 IgG		Estradiol		Progesterone	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
% CXCR5 ⁺ CD4 ⁺ T cells								
<i>IL-6</i> ⁺	0.0232	0.8962	0.2544	0.5820	0.1071	0.8171	0.4171	0.1156
<i>IFN-γ</i> ⁺	0.2573	0.1418	0.4671	0.2478	0.0482	0.9218	0.431	0.2745
<i>IL-21</i> ⁺	0.4963	0.0054	0.3789	0.2180	0.5671	0.0013	0.3818	0.2788
<i>IL-10</i> ⁺	0.3456	0.1060	0.0531	0.6386	0.0893	0.8491	0.5692	0.1823

The proportion of different circulating T_H-like cells from ARV-treated HIV-1-infected pregnant or non-pregnant women were correlated (Spearman's correlation) with plasma antibodies (anti-HBsAg and anti-gp41) and hormones (estradiol and progesterone).

Figure

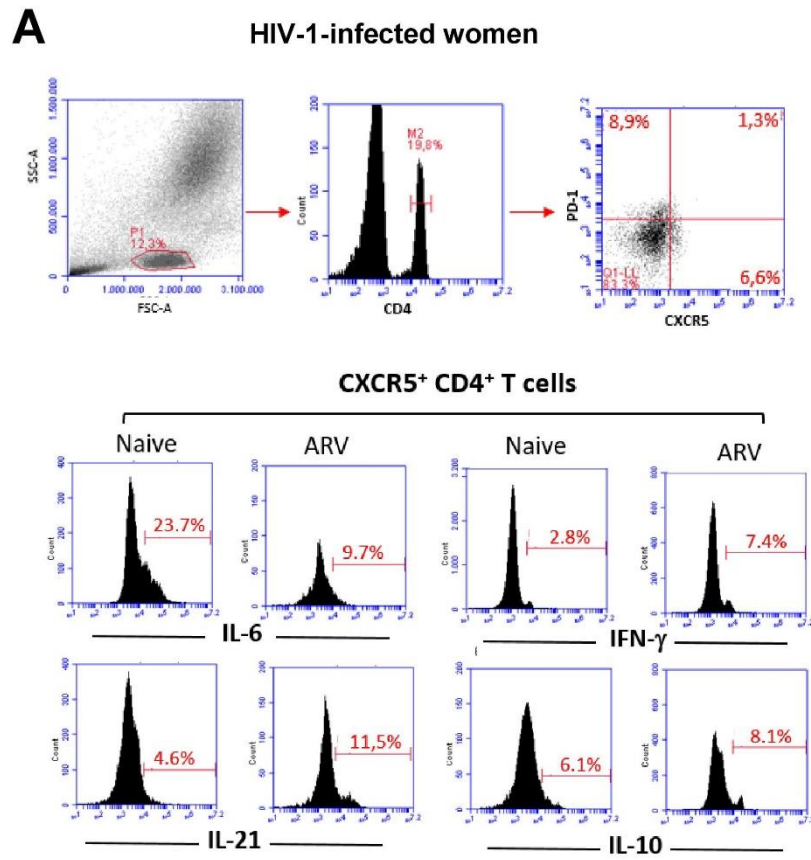


Fig. 1A

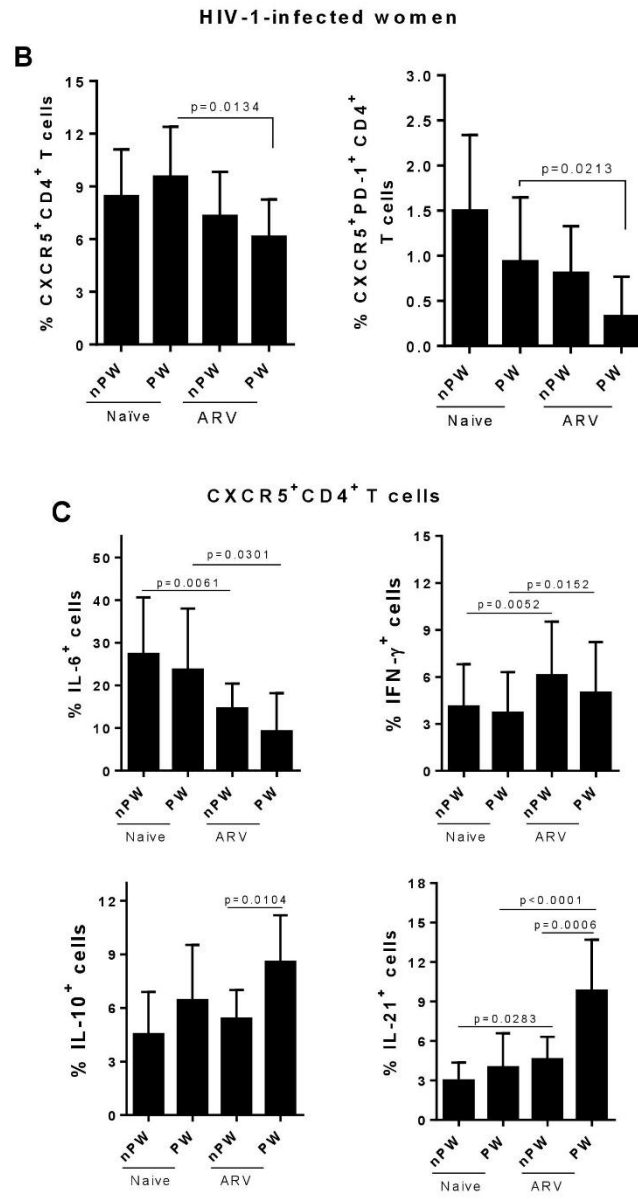


Fig. 1B and C

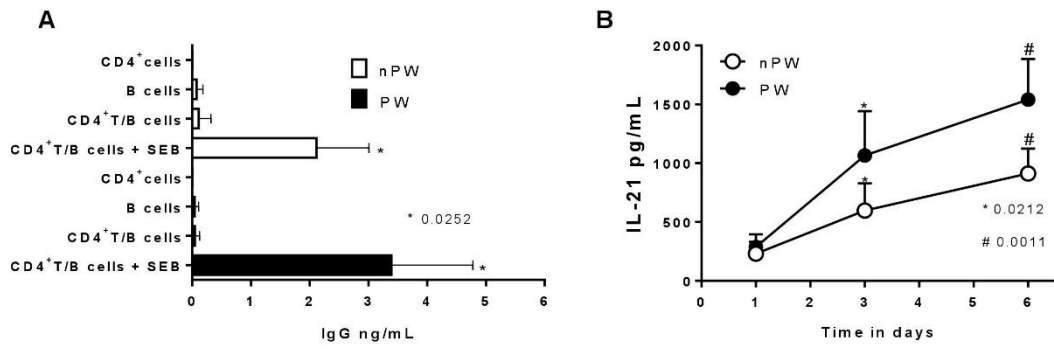


Fig. 2

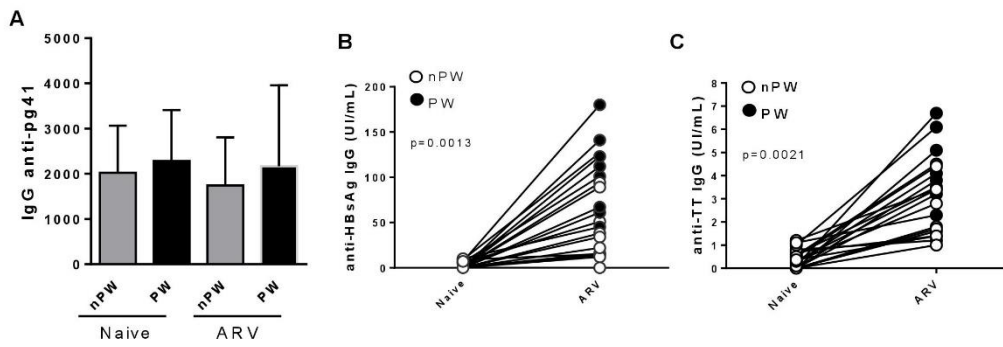


Fig. 3

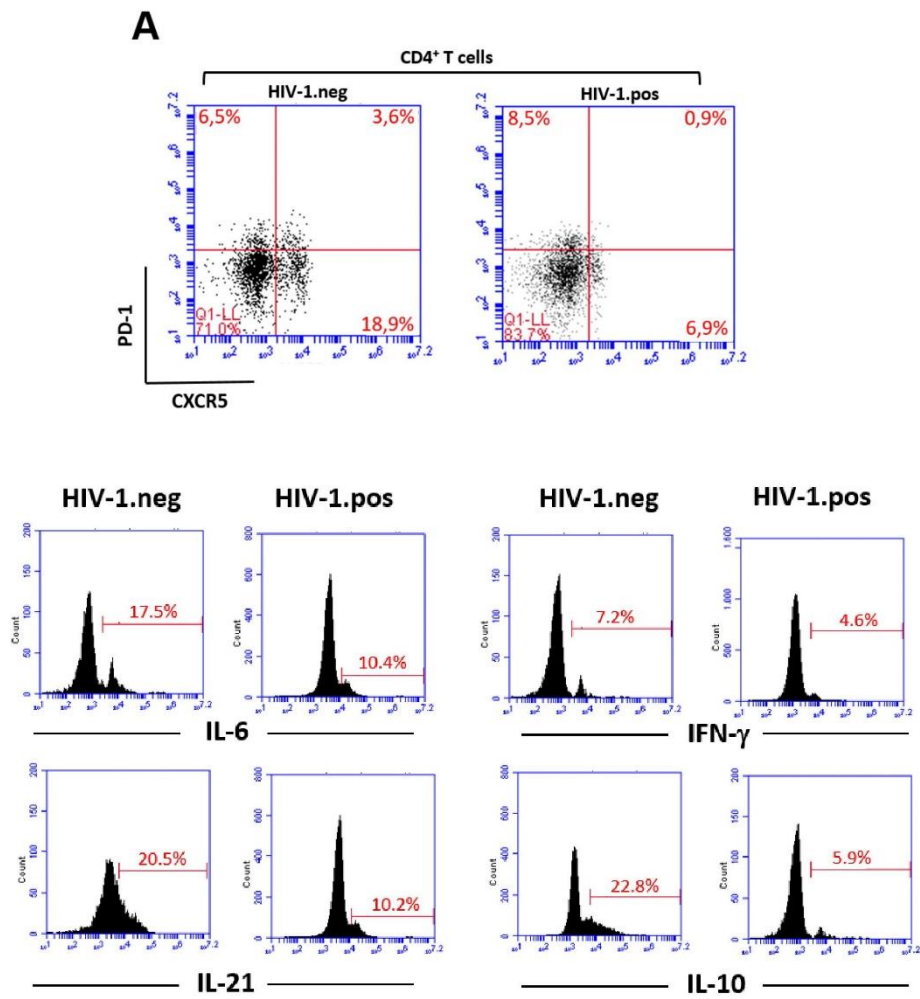


Fig. 4A

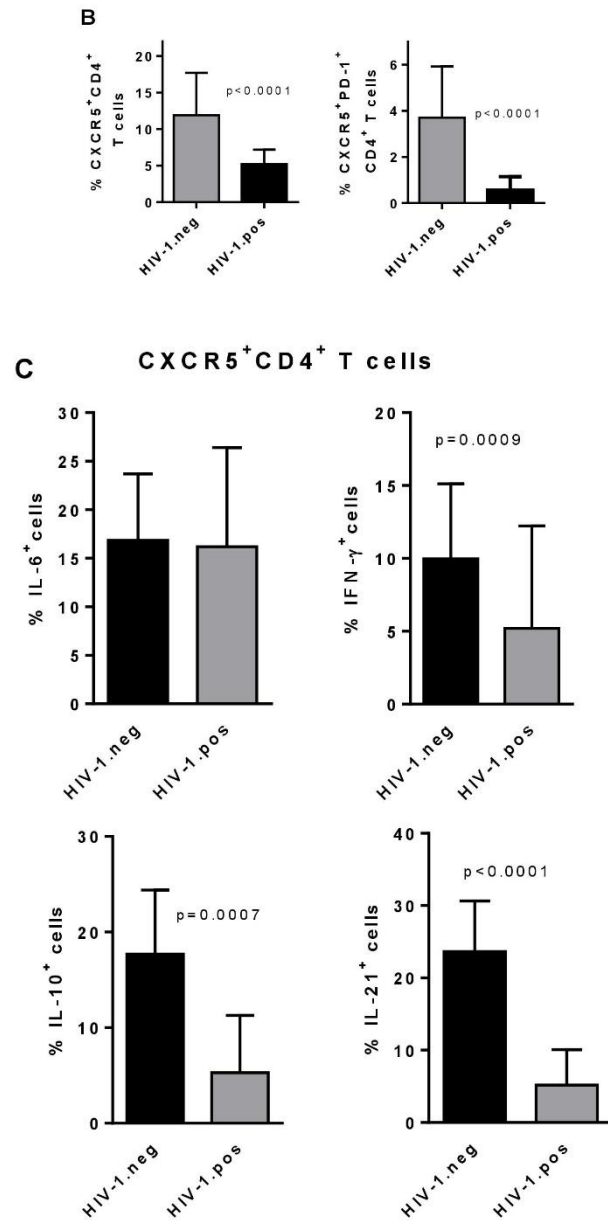


Fig. 4B and C

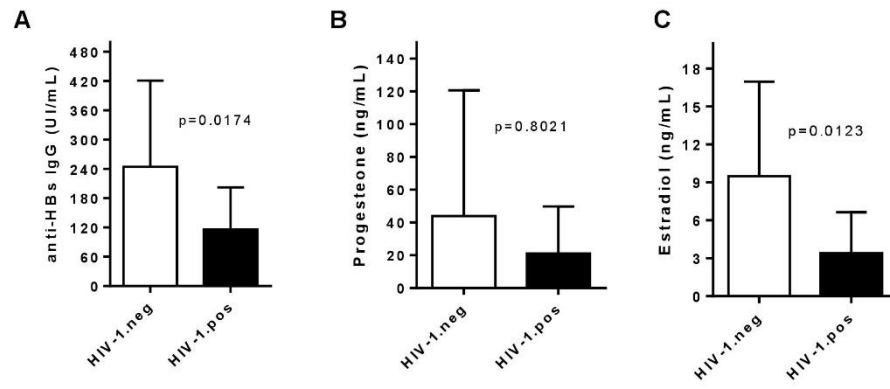


Fig. 5

Declaration of Interest Statement*Declaration of interests**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

3.3 Artigo 3 - Impaired antibody production in CVID patient is not related to T_{FH} cells dysfunction (Artigo submetido)

Impaired antibody production in CVID patients is not related to T_{FH} cells dysfunction

Taissa de M. Kasahara^{1,2}, Cleonice Alves de Melo Bento¹, Sudhir Gupta²

¹Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, State University of Rio de Janeiro, Brazil ² Division of Basic and Clinical Immunology, Department of Medicine, University of California, Irvine, Irvine, CA, United States

Abstract

Due to its pivotal role in regulate the development of humoral immunity, any disturbances in the follicular helper T (T_{FH}) cell compartment may compromise the antibody production. CVID is the most frequent form of symptomatic primary hypogammaglobulinemia with decreased serum IgG and IgA levels and variable levels of IgM. Most of CVID patients show normal numbers of B cells, but reduced numbers of class switched memory B cells, suggesting that the process of activation and differentiation of B cell can be impaired in these patients. Therefore, we aimed evaluate the role of T_{FH} and T_{FR} cells in the pathogenesis of CVID. Our results showed a reduction in the percentage of cT_{FH}17 cells in patients with CVID and an increase in the ratio of T_{FH}/follicular regulatory T (T_{FR}) cells only in patients with autoimmune disease. Moreover, the percentage of IL-21-producing cT_{FH} cells was directly related to the percentage of CD27⁺ IgD⁻ B cells in CVID patients. Cocultures with cT_{FH} and memory B cells showed that some patients with CVID were able to produce antibody levels similar to the control group while others do not. However, cT_{FH} cells from patients who did not produce immunoglobulins *in vitro* were able to assist B cells from control individuals to produce antibodies, suggesting an intrinsic B cell defect to produce or secrete immunoglobulins.

1 Introduction

Common variable immunodeficiency (CVID) is the most frequent symptomatic form of primary hypogammaglobulinemia in adults with decreased serum IgG and IgA or IgM levels and poor response to vaccines (1). The clinical manifestations are very heterogeneous with most of CVID patients showing recurrent infections, especially in respiratory tract. Additionally, about 30% of the patients can be affected with autoimmune and inflammatory diseases (2–4). Mutation in different genes associated with B cell development and functions have been observed in patients with CVID, but most of them have an unknown molecular cause. Therefore, the mechanisms related to the pathogenesis of the disease remain unknown (5).

The analysis of B cells subsets in CVID patients showed that a majority of them have normal numbers of B cells, but reduced numbers of class switched memory B cells, suggesting that the process of activation and differentiation of B cell can be impaired in these patients (6–8). This reduction is also associated with worst clinical presentation like splenomegaly, lymphadenopathy and autoimmune diseases (6–8). Some intrinsic defects in B cells have been described, such as impaired calcium influx after BCR activation, reduced activation after TLR stimulation and increased susceptible to apoptosis of memory B cells (9–11). On the other side, some studies showed that B cells from some CVID patients are able to produce normal levels of immunoglobulins *in vitro*, suggesting abnormalities in other events associated with, or after, germinal center reaction (12).

The germinal center (GC) formation is essential for B cell differentiation into memory cells and long-lived plasma cells able to produce high-affinity antibodies. All of these events require a complex cooperation between dendritic cells and CD4⁺ T cells with B lymphocytes (13). The ability of CD4⁺ T cells to migrate toward and support GC reaction depends on expression of high levels of chemokine receptor CXCR5 (14,15). These cells, called follicular helper T (T_{FH}), are additionally characterized by expression of 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 by their ability of production of IL-21 and IL-4 (14–16). Signaling through cytokines and cognitive interactions between T_{FH} and B cells support proliferation, survival and antibody affinity maturation in B cells, as well as differentiation of B lymphocytes into antibody-producing plasma cells and long-lived memory B cells (13,15). On the other hand, another T_{FH} cell subset, called follicular regulatory T (T_{FR}) cells, express FoxP3 protein and can interact with T_{FH} cells and B cells to regulate GC reactions (17,18).

It is known that both T_{FH} and T_{FR} cells can leave secondary follicles and compose the pool of circulating memory T cells (19,20). Phenotypically, the circulating memory T_{FH} cells (cT_{FH}), which are Bcl-6 negative, can be identified as $CD45RA^{-}CXCR5^{+}CD4^{-}$ T cells (19). According to the expression of CXCR3 and CCR6 markers, cT_{FH} cells are classified as T_{FH1} ($CXCR5^{+}CXCR3^{+}CCR6^{-}$), T_{FH2} ($CXCR5^{+}CXCR3^{-}CCR6^{-}$) and T_{FH17} ($CXCR5^{+}CXCR3^{-}CCR6^{+}$), all of them able to induce antibody response efficiently by memory B cells, but only T_{FH2} and T_{FH17} are able to assist naïve B cells *in vitro* (19,21). Furthermore, the expression of ICOS and PD-1 has helped to identify a more functional peripheral T_{FH} cells (19,21–23). Although most of cT_{FH} cells do not express ICOS or PD-1, a very small number of $ICOS^{+}PD-1^{+}$ T_{FH} cells can be found, and this population is considered recently activated memory T_{FH} cells (23). Circulating T_{FR} cells also do not express Bcl-6 and the identification of $CD45RA^{-}CXCR5^{+}FoxP3^{+}CD4^{+}$ T cells in the peripheral blood indicate GC activity (20).

The knowledge on the biology of T_{FH} and T_{FR} cells and their contribution to disease has significantly increased in the past decade (24). Considering the important role of humoral immunity in response to an infection or following immunization, studies have demonstrated a positive association between the percentage of different subtypes of cT_{FH} cells and the production of neutralizing IgG against some virus, like Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Influenza (25,26). Additionally, disturbances into T_{FH} and T_{FR} cells compartment is also associated with development and severity of some autoimmune diseases (AID) (19,27,28). Patients with

autoimmune diseases like juvenile dermatomyositis, systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome and multiple sclerosis showed lower levels of T_{FH1} cells, but higher frequency of T_{FH2} or T_{FH17} cells associated with reduced proportion of T_{FR} cells than healthy individuals (19,27,28). Further, in those patients with progressive forms of AID, elevated levels of T_{FH2} or T_{FH17} cells are associated with expansion of blood plasmablasts and autoantibody titers (19,27,28).

In addition, abnormalities in T_{FH} cell subsets may be involved in the functional damage of B cells found in CVID patients. Previous studies have shown differences in the frequency of T_{FH} cells between CVID patients and health subjects (29–32). However, no study, so far, was dedicated to evaluate how these differences can impact on the antibody production. Here we aimed determine the role of T_{FH} and T_{FR} cells in the pathogenesis of CVID.

2 Materials and Methods:

2.1 Patients

For this study, blood sample were obtained for 32 patients (18 female and 14 male) diagnosed with CVID. The mean age at the time of recruitment was 53.4 years. The clinical data were obtained from medical records and 12 patients were diagnosed with autoimmune diseases (Table 1). The great majority of patients (n=30) were receiving intravenous or subcutaneous gammaglobulin replacement therapy. Blood samples from 29 age and sex matched health subjects were also obtained as control. The protocol was approved by the Institution Review Board of the University of California, Irvine and the informed consent was signed by each subject.

2.2 Flow cytometry analysis

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC), separated by density gradient centrifugation with Lymphocyte Separation Medium (Life Technology), were resuspend with RPMI medium

supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 1×10^6 cells/mL and then incubated with various combinations of monoclonal antibodies. The following antibodies were used to identify different T cells and B cells subsets: anti-CD4-PerCP, anti-CD45RA-BV510, anti-CXCR5-Alexa Fluor 488, anti-CCR6-PE, anti-CXCR3-BV421, anti-PD-1-PE-CF594, anti-IgM-APC, anti-IL-21R-PE-CF594 (all from BD Bioscience), anti-ICOS-BV786, anti-CD19-PerCP, anti-CD27-FITC, anti-IgD-BV510 and anti-CD38-PE (from Biolegend).

For cytokine measurement, PBMC was stimulated in 24-well flat bottom plates with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 50 ng/mL; Sigma-Aldrich) plus ionomycin (IO, 1 µg/mL; Sigma-Aldrich) and brefeldin A (BD Pharmigen, San Diego, CA) at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator overnight. Briefly, the cells were incubated with various combinations of mAbs for surface markers for 20 min at room temperature in the dark, according to manufacturer's instructions. The cells were washed with wash solution and then permeabilized by incubating cells with Cytofix/Cytoperm solution (BD Pharmigen, San Diego, CA) at 4°C for 20 min. After washing, the mAbs for intracellular staining (anti-IL-21-BV786, IFN- γ -BV786, anti-IL-4-BV786, anti-IL-17-BV786 from BD Biosciences, San Diego) were added in different combinations and incubated for 30 min at 4°C.

For FoxP3 staining, fresh PBMC was incubated with anti-CD4-PerCP, anti-CD45RA-BV510, anti-CXCR5-Alexa Fluor 488, anti-CD25-BV421 and anti-PD-1-PE-CF594 for 20 minutes at room temperature for surface staining. The cells were fixated and permeabilized using the Human FoxP3 Buffer Set from BD Pharmingen™, according to manufacturer's instructions. After wash, the cells were stained with anti-FoxP3-PE for 30 minute at room temperature.

The cells were acquired using FACsCelesta (Beckton-Dickinson, San Jose, CA) and analyzed using 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 to 200,000 events,

lymphocytes were gated based on forward and side scatter properties after the exclusion of dead cells and doublets.

2.3 Cell sorting and coculture assay

After PBMC isolation, CD4⁺ T cell and B cells were enriched by negative and positive selection, respectively, using magnetic columns according to manufacturer's instructions (EasySep™, StemCell Technology, Canada). The CD4⁺ T cells were stained with anti-CD4-PerCP-Cy5.5, anti-CD45RA-APC and anti-CXCR5-Alexa Fluor 488 and B cells were stained with anti-CD19-PerCP-Cy5.5 and anti-CD27-PE (all antibodies from BD Biosciences, San Diego). The T_{FH} cells, defined as CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺, and memory B cells, defined as CD19⁺CD27⁺, were sorted with FACSaria II cell sorter.

T_{FH} cells (1×10^5 cell/mL) were cocultured with memory B cells (2×10^5 cell/mL) in AIM-V serum-free medium in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 beads and CpG-ODN (2.5 µg/mL) in 96-well U bottom plate at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator. As control, memory B cells were also culture alone without any stimulus or with CpG-ODN (2.5 µg/mL). After 7 days, the supernatants were collected and B cells were stained to identify plasmablast cells. The T_{FH} cells were cultured alone with or without anti-CD3 and anti-CD28 beads. After 3 days, the supernatants were collected and the cells were stained with monoclonal antibodies for the analysis of costimulatory molecules (anti-PD-1-PECF594, anti-ICOS-BV786, anti-CD40L-APC).

2.4 Immunoglobulins and cytokine measurements

The concentration of IgG, IgA and IgM from cocultures were determined by ELISA kit from ThermoFisher Scientific. The plates were read at 450 nm in ELISA reader (Dynex Technologies, USA). The results were interpolated from standard curve construct by using the standard provided with the kits. The detection limit of IgG, IgA and IgM was 1.6 ng/mL, 1.6 ng/mL and 15.6 ng/mL,

respectively. The cytokines IL-4, IL-10, IL-21 and IFN- γ from T_{FH} cells culture were analyzed by multiplex assay (ThermoFisher).

2.5 Statistical analysis

All statistical analysis of the tests were conducted using the program GraphPad Prism graphic version 6.0 for Windows. To compare more than 2 groups, we used one-way ANOVA followed by the Turkey test for data with Gaussian distribution and the Kruskal-Wallis followed by the Dunn's test for data without Gaussian distribution. Correlations between variables were ascertained using Pearson's or Spearman's correlation. The significance in all experiments was defined as $p < 0.05$.

3 Results

3.1 CVID patients showed reduced frequency of T_{FH17} and cT_{FR} cells

The immunophenotyping analysis of CD4⁺ T cells was performed and circulating memory T_{FH} cells (cT_{FH}), defined as CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺, and non-T_{FH} memory (non-cT_{FH}) cells, defined as CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁻ were evaluated (Figure 1A). Regarding cT_{FH} cells, no difference was found in the percentage of these cells between the control group and CVID patients, with or without associated autoimmune disease (Figure 1B). In contrast, CVID patients showed lower percentage of cT_{FR} cells, defined as CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺FoxP3⁺CD25⁺⁺, and an increase in the ratio T_{FH}/T_{FR} (Figure 1C).

Identification of different cT_{FH} subsets by CXCR3 and CCR6 expression was also performed, as shown in Figure 1A. The percentage of T_{FH17} (CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁺) was significantly reduced in CVID patients, with or without autoimmune disease, as compared to the control subjects. No difference was found in the percentage of T_{FH1} (CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁻), T_{FH2} (CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁻), and T_{FH1/17} (CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁺) subsets between healthy subjects and CVID patients (Figure 1D).

3.2 PD-1 and ICOS expression on cT_{FH} cells from CVID patients

The PD-1 and ICOS expression has helped to identify a more functional peripheral T_{FH} cells (23). As shown in Figure 2B, the most of cT_{FH} cells do not express both ICOS and PD-1, and a very small frequency of these cells are ICOS⁺PD-1⁺ or ICOS⁺PD-1⁻. This pattern was similar between the control and CVID patients, without significant difference between the groups regarding PD-1 and ICOS expression on cT_{FH} cells (Figure 2B). Besides the decrease in cT_{FH}17 subset, we did not observe any difference in PD-1 and ICOS expression on analyzed T_{FH} subsets (Figure 2C).

3.3 IL-21-producing cT_{FH} is associated with class-switched memory B cells in CVID patients

The cytokine production by T_{FH}, especially IL-21, provide signal for B cells to proliferate and differentiate. In the present study, however, we did not find differences between CVID and control group with regard to the frequency of IL-21, IL-4, IL-17 and IFN- γ -producing cT_{FH} cells (Figure 3A). Also, no difference was observed in the production percentage of IL-21 by cT_{FH} subsets (Figure 3B). Interestingly, we found a positive correlation between the percentage of IL-21-producing cT_{FH} cells and the proportion of class-switched memory B cells in CVID patients, although the percentage of IL-21-producing T_{FH} cell subsets had been similar in patients and healthy subjects (Figure 3C). As the percentage of cytokine-producing cT_{FH} cells was not impaired in CVID patients, we analyzed the expression of IL-21 receptor (IL-21R) on B cells of these patients. The percentage of total B and naïve B cells, defined as CD27⁻, expressing IL-21R was not different between CVID patients and control group. In contrast, CVID patients showed higher percentage of CD19⁺CD27⁻ IL-21R⁻ cells comparing to the control group (Table 2).

3.4 cT_{FH} cells from CVID patients are able to help the antibody production *in vitro*

We further evaluated the *in vitro* functional abilities of cT_{FH} cells in assisting B cells. We observed that memory B cells from some CVID patients (CVID+) produced similar levels of antibody comparing to the control group (Figure 4A). Interestingly, B cells from some CVID patients

(CVID-) were incapable to produce any detectable levels of IgG and IgA when activated only with CpC-ODN, and coculture with cT_{FH} did not improve the antibody production. On the other hand, IgM production was similar between patients and control. To verify if the impaired antibody production in CVID- patients was due to inability of cT_{FH} cells to help the B cells, we cocultured T_{FH} cells from CVID patients with B cells from control groups. In another well, T_{FH} cells from healthy individuals were cocultured with B cells from CVID patients. As observed in the figure 4B, the production of IgG and IgA by CVID B cells was not recovery after coculturing with the T_{FH} cells from the control group, but the IgG and IgA production in the coculture with T_{FH} cells from CVID patients and B cells healthy subjects was similar to the cocultures with autologous cells from control group. The T_{FH} cells were also activated with anti-CD3 and anti-CD28 beads alone for 3 days to verify the expression of CD40L, PD-1 and ICOS and the production of IL-21, IL-4 and IFN- γ . As shown in Table 3, no difference was observed concerning the expression of CD40L, PD-1 and ICOS and the production of IL-21, IL-4 and IFN- γ by T_{FH} cells.

4 Discussion

Individuals diagnosed with CVID present low levels of serum IgG and IgA or IgM, poor response to vaccines and more susceptible to immune dysregulation (1,4). The reduced numbers of class switched memory B cells is a characteristic of these patients, suggesting some defect during germinal center process implicated in both activation and differentiation of B cells (6–8). Due to its pivotal role in controlling efficient antibody production, disturbances in the follicular helper T (T_{FH}) cell compartment have been related to the immunopathogenesis of various human diseases, such as infections, autoimmunity and primary immunodeficiencies (19,25,32).

Autoimmune diseases are common manifestations among patients with primary immunodeficiencies, affecting about 30% of them (2). For this reason, we stratified CVID patients according to the presence of autoimmune manifestations. In our cohort, the most prevalent

autoimmune diseases (AID) were autoimmune thrombocytopenia, hypothyroidism and rheumatoid arthritis. Interestingly, these AID are mediated by autoantibodies, and studies have showed not only an expansion of cT_{FH} cells in patients, comparing to control, but also an associated with the autoantibodies titers (33–36). Furthermore, higher percentage of PD-1⁺ cT_{FH} and T_{FH}17 cell subsets was positively correlated with anti-thyroglobulin antibody levels in Hashimoto's thyroiditis (35). Here, CVID patients with autoimmune diseases showed increased, but not significantly, the percentage of T_{FH} cells, but they showed a significant lower percentage of cT_{FH}17 cells. Moreover, we observed that CVID patients had reduced percentage of cT_{FR} cells comparing to the control group. Indeed, studies have associated T_{FR} deficiencies with the development of autoimmunity in mice (37). In human, studies showed divergent results about the percentage of these cells in patients suffering from AID, but all studies have observed an imbalance of T_{FH}/T_{FR} ratio with elevated percentage of cT_{FR} cells (34,38–40). In rheumatoid arthritis patients a higher frequency of cT_{FR} cells were associated with lower levels of autoantibodies (34,38–40). Interestingly, Romberg *et al.* observed an increased number of T_{FH} cells and a decrease Treg cells frequency in GC of CVID patients with autoimmune cytopenias, as compared with both CVID patients without AID and healthy individuals (41). Furthermore, Cunill *et al.* observed reduction in cT_{FR} cells from CVID patients with less than 2% of CD27⁺IgD⁻ B cells (29).

Recent studies have identified increased levels of cT_{FH} cells and the T_{FH}1 subset in CVID patients with complications, such as splenomegaly, lymphadenopathy, enteropathy, granulomatous and AID when compared with patients without these clinical complications (30–32). In these studies, the patients were not divided according to the number of CD27⁺IgD⁻ B cells, and reduced numbers of class switched memory B cells is associated with worst clinical presentation (6–8). Here, we did not observe these alterations on T_{FH} cells, and it could be explained, at least in part, to absence of splenomegaly in our patients associated with a percentage higher than 2% of CD27⁺IgD⁻ B cells in the majority of our cohort (6). In agreement with our results, Cunill *et al.* observed increased

percentages of cT_{FH} and $T_{FH}17$ cells only in CVID patients with less than 2% of $CD27^+IgD^-$ B cells with no alteration regarding the patients with than 2% of $CD27^+IgD^-$ B cells (29).

The cytokines produced by T_{FH} provide signals for B cells to proliferate, survive and differentiate. Besides IL-21, the signature cytokine of T_{FH} cells, subsets of circulating T_{FH} cells are also able to secrete IFN- γ , IL-4 and IL-17 (13). Reduced production of IL-17 by $CD4^+$ T cells has been associated with reduced number of $CD27^+IgD^-$ B cells from CVID patients and healthy subjects (42,43). Moreover, stimulation of PBMC from CVID patients with IL-4 and IL-21 prevented apoptosis of B cells and potencialized immunoglobulins production (44). Here, we did not observe any difference in cytokine production by cT_{FH} cells from CVID patients, but we found a positive correlation between the percentage of IL-21-producing cT_{FH} cells and the frequency of class-switched memory B cells in CVID patients. Loss-of-function mutation in IL-21 receptor (IL-21R) gene cause immunodeficiencies in human, and IL-21 receptor-deficient mice showed diminished serum levels of IgG1, IgG2, and IgG3 associated with impaired memory B cell response (45,46). Therefore, we evaluated the percentage of B cells expressing IL-21R. Interestingly, the percentage of $CD27^+$ B cells expressing IL-21R was increased in CVID patients comparing to control group suggesting a compensatory mechanism.

In addition to cytokine production, the cognitive interactions between T_{FH} cells and B cells are also essentials for GC reaction and differentiation of B cells into memory B cells and long-lived high-affinity plasma cells. In this context, we cocultured cT_{FH} cells with memory B cells to evaluate the immunoglobulins production. Even in the presence of cT_{FH} cells, the B cells from some CVID were unable to produce IgG and IgA but not IgM. Previous studies also observed that B cells or PBMC from some CVID patients have normal immunoglobulin production and others not (12,47). Experiments with allogenic cocultures showed that T_{FH} cells from CVID unable to produce antibody were capable to help B cells. In contrast, the B cells from these patients failure in producing antibodies even when cocultured with T_{FH} cells from healthy individuals, suggesting that T_{FH} cells from CVID patients have preserved function. Indeed, we did not observe any difference

concerning the production of IL-21, IL-4 and IFN- γ by T_{FH} cells, as well as the expression of CD40L, PD-1 and ICOS, following activation with anti-CD3 and anti-CD28 beads.

In conclusion, our results showed that besides some alterations in the percentage of cT_{FH} cells had been observed in CVID patients, these cells are able to assist B cells to produce antibodies and differentiate to plasmablast cells *in vitro*, suggesting that an intrinsic defect on B cells is the reason by which these patients have impaired immunoglobulins production.

Reference

1. Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol. Journal of Clinical Immunology*; 2018;38(1):96–128.
2. Feuille EJ, Anooshiravani N, Sullivan KE, Fuleihan RL, Cunningham-Rundles C. Autoimmune Cytopenias and Associated Conditions in CVID: a Report From the USIDNET Registry. *J Clin Immunol. Journal of Clinical Immunology*; 2017;38(1):28–34.
3. Jørgensen SF, Fevang B, Aukrust P. Autoimmunity and Inflammation in CVID: a Possible Crosstalk between Immune Activation, Gut Microbiota, and Epigenetic Modifications. *J Clin Immunol*. 2018;
4. Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Carvalho BTC-, Cunningham-Rundles C, Morena MT de la, et al. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pr*. 2016;4(1):38–59.
5. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders : division into distinct clinical phenotypes. 2015;112(2):277–87.
6. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial:

- defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2008;111(1):77–85.
7. Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-vorbeck G, et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27+ IgM- IgD-) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. 2002;99(5):1544–51.
 8. Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-Van Der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol*. 2003;23(5):385–400.
 9. Clemente A, Pons J, Lanio N, Matamoros N, Ferrer JM. CD27+ B cells from a subgroup of common variable immunodeficiency patients are less sensitive to apoptosis rescue regardless of interleukin-21 signalling. *Clin Exp Immunol*. 2013;174(1):97–108.
 10. Foerster C, Voelxen N, Rakhmanov M, Keller B, Gutenberger S, Goldacker S, et al. B Cell Receptor-Mediated Calcium Signaling Is Impaired in B Lymphocytes of Type Ia Patients with Common Variable Immunodeficiency. *J Immunol* [Internet]. 2010;184(12):7305–13. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1000434>
 11. Borzutzky A, Rauter I, Fried A, Rachid R, McDonald DR, Hammarstrom L, et al. Defective TLR9-driven STAT3 activation in B cells of patients with CVID. *Clin Immunol* [Internet]. Elsevier; 2018;197(August):40–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.08.008>
 12. Bryant A, Calver NC, Toubi E, Webster ADB, Farrant J. Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cell secretion of IgM and IgG in response to anti-IgM and interleukin-2. *Clin Immunol Immunopathol*. 1990;56(2):239–48.
 13. Vinuesa CG, Linterman MA, Goodnow CC, Randall KL. T cells and follicular dendritic

- cells in germinal center B-cell formation and selection. *Immunol Rev.* 2010;237:72–89.
14. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* [Internet]. 2000;192(11):1545–52. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193094&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 15. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC. 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(12):1373–81.
 16. Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, et al. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* (80-). 2009;325(5943):1001–5.
 17. Wollenberg I, Agua-Doce A, Hernández A, Almeida C, Oliveira VG, Faro J, et al. Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells. *J Immunol.* 2011;187:4553–60.
 18. Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva R, Martinez GJ, Rawal S, et al. Follicular regulatory T (Tfr) cells with dual Foxp3 and Bcl6 expression suppress germinal center reactions. *Nat Med.* 2011;17(8):983–8.
 19. Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, et al. Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. *Immunity* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;34(1):108–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.012>
 20. Fonseca VR, Agua-Doce A, Maceiras AR, Pierson W, Ribeiro F, Romão VC, et al. Human

- blood T fr cells are indicators of ongoing humoral activity not fully licensed with suppressive function. *Sci Immunol*. 2017;2(14):eaan1487.
21. Ma CS, Wong N, Rao G, Avery DT, Torpy J, Hambridge T, et al. Monogenic mutations differentially affect the quantity and quality of T follicular helper cells in patients with human primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(4):993–1006e1.
 22. Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG, 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 Rheum*. 2010;62(1):234–44.
 23. He J, Tsai LM, Leong Y, Hu X, Ma CS, Chevalier N, 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*. 2013;39(4):770–81.
 24. Ueno H. Human Circulating T Follicular Helper Cell Subsets in Health and Disease. *J Clin Immunol*. 2016;36:34–9.
 25. Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, Arlehamn CL, et al. Human circulating PD-1⁺CXCR3⁻CXCR5⁺ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity*. 2013;39(4):758–69.
 26. Bentebibel S-E, Lopez S, Obermoser G, Schmitt N, Mueller C, Harrod C, et al. Induction of ICOS⁺CXCR3⁺CXCR5⁺ T H cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci Transl Med*. 2013;5(176).
 27. Le Coz C, Joublin A, Pasquali JL, Korganow AS, Dumortier H, Monneaux F. Circulating TFH Subset Distribution Is Strongly Affected in Lupus Patients with an Active Disease. *PLoS One*. 2013;8(9):1–12.
 28. Li X yi, Wu Z biao, Ding J, Zheng Z hui, Li X yan, Chen L na, et al. Role of the frequency of blood CD4 + CXCR5 + CCR6 + T cells in autoimmunity in patients with Sjögren's

- syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;422(2):238–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.133>
29. Cunill V, Clemente A, Lanio N, Barceló C, Andreu V, Pons J, et al. Follicular T Cells from smB– Common Variable Immunodeficiency Patients Are Skewed Toward a Th1 Phenotype. *Front Immunol*. 2017;8.
 30. Turpin D, Furudoi A, Parrens M, Blanco P, Viillard J-F, Duluc D. Increase of follicular helper T cells skewed toward a Th1 profile in CVID patients with non-infectious clinical complications. *Clin Immunol* [Internet]. Elsevier; 2018;197(May):130–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.09.006>
 31. Unger S, Seidl M, van Schouwenburg P, Rakhmanov M, Bulashevskaya A, Frede N, et al. The TH1 phenotype of follicular helper T cells indicates an IFN- γ -associated immune dysregulation in patients with CD21low common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2018;141(2):730–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.041>
 32. Coraglia A, Galassi N, Fernández Romero DS, Juri MC, Felippo M, Malbrán A, et al. Common Variable Immunodeficiency and Circulating TFH. *J Immunol Res*. 2016;2016.
 33. Xie J, Cui D, Liu Y, Jin J, Tong H, Wang L, et al. Changes in follicular helper t cells in idiopathic thrombocytopenic purpura patients. *Int J Biol Sci*. 2015;11(2):220–9.
 34. Niu Q, Huang Z chun, Wu X juan, Jin Y xiong, An Y fei, Li Y mei, et al. Enhanced IL-6/phosphorylated STAT3 signaling is related to the imbalance of circulating T follicular helper/T follicular regulatory cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther. Arthritis Research & Therapy*; 2018;20(1):1–9.
 35. Zhao J, Chen Y, Zhao Q, Shi J, Yang W, Zhu Z, et al. Increased circulating Tfh17 and PD-1+Tfh cells are associated with autoantibodies in Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity*

- [Internet]. Taylor & Francis; 2018 Oct 3;51(7):352–9. Available from:
<https://doi.org/10.1080/08916934.2018.1516761>
36. Audia S, Rossato M, Santegoets K, Spijkers S, Wichers C, Bekker C, et al. Splenic TFH expansion participates in B-cell differentiation and antiplatelet-antibody production during immune thrombocytopenia. *Blood*. 2014;124(18):2858–66.
 37. Fu W, Liu X, Lin X, Feng H, Sun L, Li S, et al. Deficiency in T follicular regulatory cells promotes autoimmunity. *J Exp Med*. 2018;215(3):815–25.
 38. Zhao J, Chen Y, Xu Z, Yang W, Zhu Z, Song Y, et al. Increased circulating follicular regulatory T cells in Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity* [Internet]. Taylor & Francis; 2018 Oct 3;51(7):345–51. Available from:
<https://doi.org/10.1080/08916934.2018.1516759>
 39. Liu C, Wang D, Lu S, Xu Q, Zhao L, Zhao J, et al. Increased Circulating Follicular Treg Cells Are Associated With Lower Levels of Autoantibodies in Patients With Rheumatoid Arthritis in Stable Remission. *Arthritis Rheumatol*. 2018;70(5):711–21.
 40. Wang X, Yang C, Xu F, Qi L, Wang J, Yang P. Imbalance of circulating Tfr/Tfh ratio in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med* [Internet]. Springer International Publishing; 2019;19(1):55–64. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10238-018-0530-5>
 41. Romberg N, Le Coz C, Glauzy S, Schickel J-N, Trofa M, Nolan BE, et al. Patients with common variable immunodeficiency with autoimmune cytopenias exhibit hyperplastic yet inefficient germinal center responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(1):258–65.
 42. Berrón-Ruiz L, López-Herrera G, Vargas-Hernández A, Santos-Argumedo L, López-Macías C, Isibasi A, et al. Impaired selective cytokine production by CD4+ T cells in Common Variable Immunodeficiency associated with the absence of memory B cells. *Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2016;166–167:19–26. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2016.03.013>

43. Barbosa RR, Silva SP, Silva SL, Melo AC, Pedro E, Barbosa MP, et al. Primary B-cell deficiencies reveal a link between human IL-17-producing CD4 T-cell homeostasis and B-cell differentiation. *PLoS One*. 2011;6(8).
44. Borte M, Pan-Hammarstrom Q, Liu C, Sack U, Borte S, Wagner U, et al. Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Blood*. 2009;114(19):4089–98.
45. Rankin AL, MacLeod H, Keegan S, Andreyeva T, Lowe L, Bloom L, et al. IL-21 Receptor Is Critical for the Development of Memory B Cell Responses. *J Immunol* [Internet]. 2011;186(2):667–74. Available from:
<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0903207>
46. Kotlarz D, Ziętara N, Uzel G, Weidemann T, Braun CJ, Diestelhorst J, et al. Loss-of-function mutations in the IL-21 receptor gene cause a primary immunodeficiency syndrome. *J Exp Med* [Internet]. 2013;210(3):433–43. Available from:
<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20111229>
47. Desjardins M, Béland M, Dembele M, Lejtenyi D, Drolet J-P, Lemire M, et al. Modulation of the Interleukin-21 Pathway with Interleukin-4 Distinguishes Common Variable Immunodeficiency Patients with More Non-infectious Clinical Complications. *J Clin Immunol. Journal of Clinical Immunology*; 2018;38(1):45–55.

Table 1. Characteristics of CVID patients and control subjects

	CVID Patients		
	Control	No Autoimmune disease	With Autoimmune disease
Number of subjects	29	20	12
Mean age (years)	47.8	53.7	52.9
Sex (Female/Male)	17/12	10/10	8/4
Characteristics of CVID patients			
Splenomegaly	N/A	0	0
Autoimmune manifestation	N/A	N/A	
Autoimmune Thrombocytopenia			4
Hypothyroidism			4
Rheumatoid arthritis			2
ANCA vasculitis			1
Adrenal insufficiency			1
Treatment	N/A		
Intravenous		11	5
Subcutaneous		4	6
CD19 ⁺ cells (%) ¹	5.6	5.0	6.6
CD27 ⁺ IgD ⁻ [% of CD19 ⁺ (mean)] ¹	16.0	9.5*	8.9*

¹Values obtained from sample blood at the time of recruitment. **p* value = 0.0083 comparing to control group.

Table 2. Percentage of IL-21R on B cells.

	Control	CVID	<i>p</i>
% IL-21R in CD19 ⁺ cells (mean)	1.46	1.46	0.9772
% IL-21R CD19 ⁺ CD27 ⁻ cells (mean)	1.66	1.36	0.4357
% IL-21R CD19 ⁺ CD27 ⁺ cells (mean)	0.66	1.73	0.0203

PBMC from CVID patients and health subjects were isolated and stained with specific monoclonal antibodies to analyze the expression of IL-21R on B cells. The mean values were compared and the significant *p* values showed in the table.

Table 3. Expression of PD-1, ICOS and CD40L and cytokine production in cT_{FH} cells after stimulation in CVID patients.

	Control	CVID	<i>p</i>
% PD-1 in CXCR5 ⁺ CD4 ⁺ T cells	57.3	32.8	0.3929
% ICOS in CXCR5 ⁺ CD4 ⁺ T cells	57.9	33.5	0.3929
% CD40L in CXCR5 ⁺ CD4 ⁺ T cells	1.4	2.3	0.6786
IL-4 (pg/mL)	44.8	148.5	>0.9999
IL-10 (pg/mL)	87.9	105.0	0.7857
IFN- γ (pg/mL)	370.1	286.3	0.7857
IL-21 (pg/mL)	38.0	37.6	0.8571

Sorted cT_{FH} cells from CVID patients (n=6) and control group (n=3) were stimulated with anti-CD3/CD28 beads for 3 days. The cytokines were measured by multiplex assay and the expression of costimulatory molecules was analyzed by flow cytometry. The mean values were compared and the significant *p* values showed in the table.

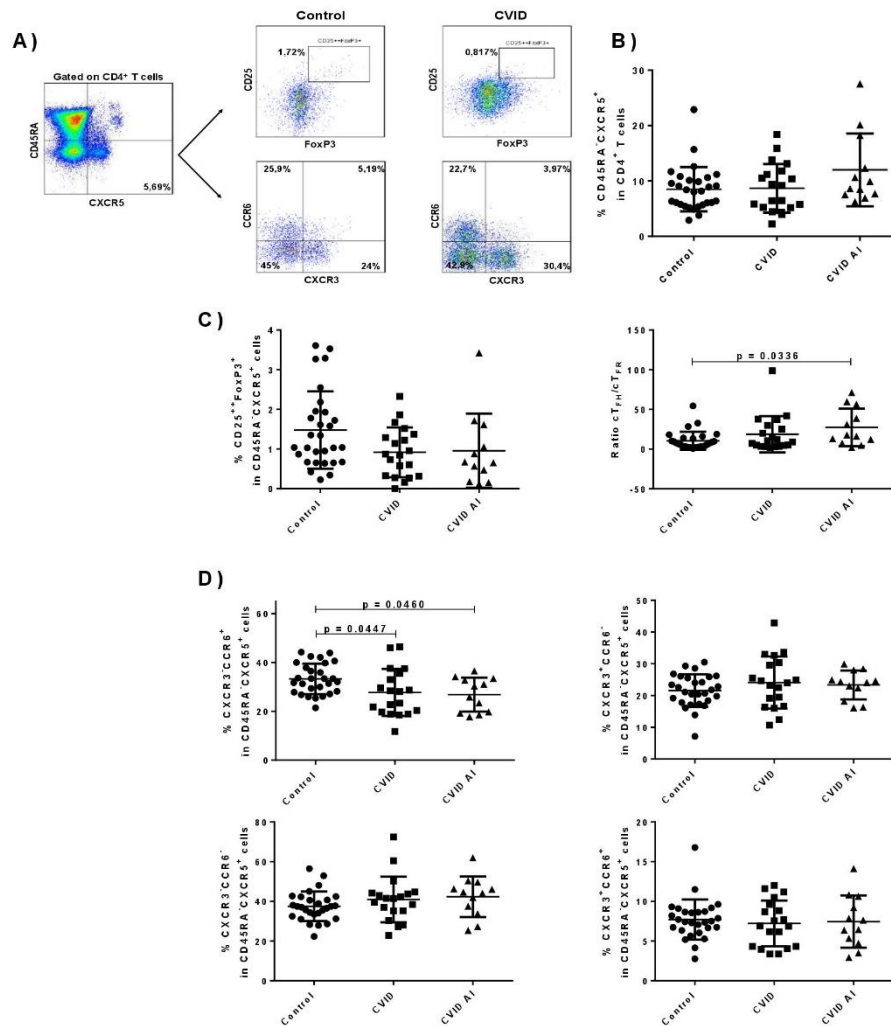


Figure 1. The percentage of circulating T_{FH}, T_{FR} cells and different subsets of cT_{FH} cells in CVID patients. In (A) representatives dot-plots of cT_{FH} cells (CD4⁺CD45RA⁺CXCR5⁺), cT_{FR} cells (CD4⁺CD45RA⁺CXCR5⁺FoxP3⁺CD25⁺) and subsets of cT_{FH} cells T_{FH17} (CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁺), T_{FH1} (CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁺), T_{FH2} (CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁺), and T_{FH1/17} (CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁺). In (B), the cT_{FH} cells were analyzed in health subjects (control) and CVID patients with (CVID AI) or without autoimmune disease (CVID). In (B), the cT_{FR} cells and cT_{FR}/cT_{FH} ratio were analyzed in health subjects (control) and CVID patients with (CVID AI) or without autoimmune disease (CVID). In (C), cT_{FH} subsets in health subjects (control) and CVID patients with (CVID AI) or without autoimmune disease (CVID). The mean values were compared and the significant *p* values showed in the figure.

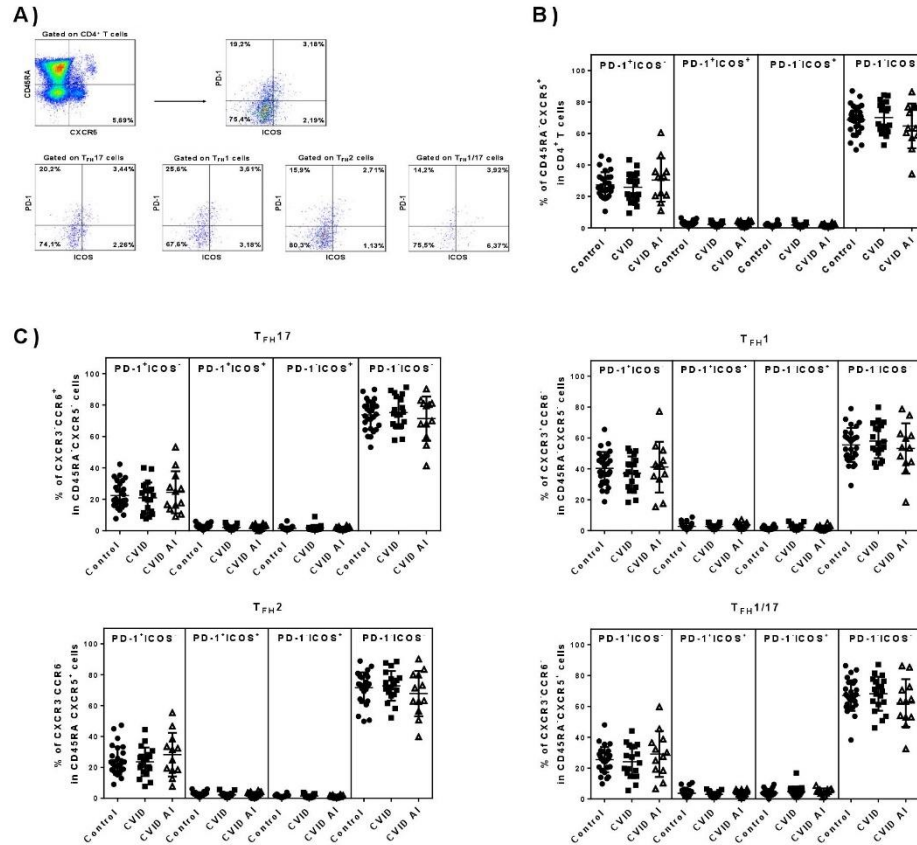


Figure 2. PD-1 and ICOS expression on cT_H cells (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺) and their subsets in CVID patients. PBMC from CVID patients and health subjects were isolated and stained with specific monoclonal antibodies to identify cT_H cells. In (A) representatives dot-plots of PD-1 and ICOS expression cT_H cells and their subsets. In (B), PD-1 and ICOS expression were analyzed in cT_H cells from health subjects (control) and CVID patients with (CVID AI) or without autoimmune disease (CVID). In (C) PD-1 and ICOS expression were analyzed in T_H17, T_H1, T_H2, and T_H1/17 subsets in CVID patients and control group with (CVID AI) or without autoimmune disease (CVID).

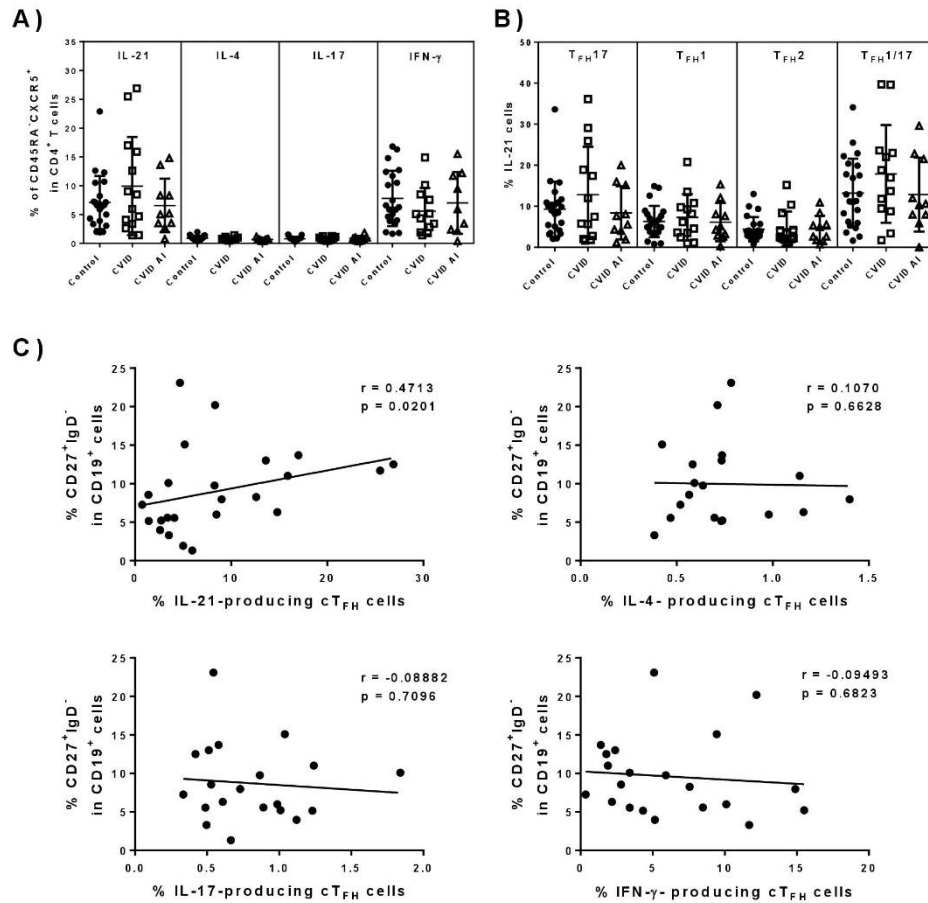


Figure 3. Cytokine production by cT_{FH} cells in CVID patients. PBMC from CVID patients and health subjects were isolated, incubated with PMA, ionomycin and brefeldin A overnight and stained with specific monoclonal antibodies to identify cytokine-producing cT_{FH} cells. In (A), the percentage of cT_{FH} cells able to produce IL-21, IL-4, IL-17 and IFN-γ and (B) the percentage of cT_{FH} subsets able to produce IL-21 in CVID patients and control group. In (C), correlation of percentage of cytokine-producing-T_{FH} cells and the percentage of class switched memory B cells in CVID patients. The mean values were compared and the significant *p* values showed in the figure.

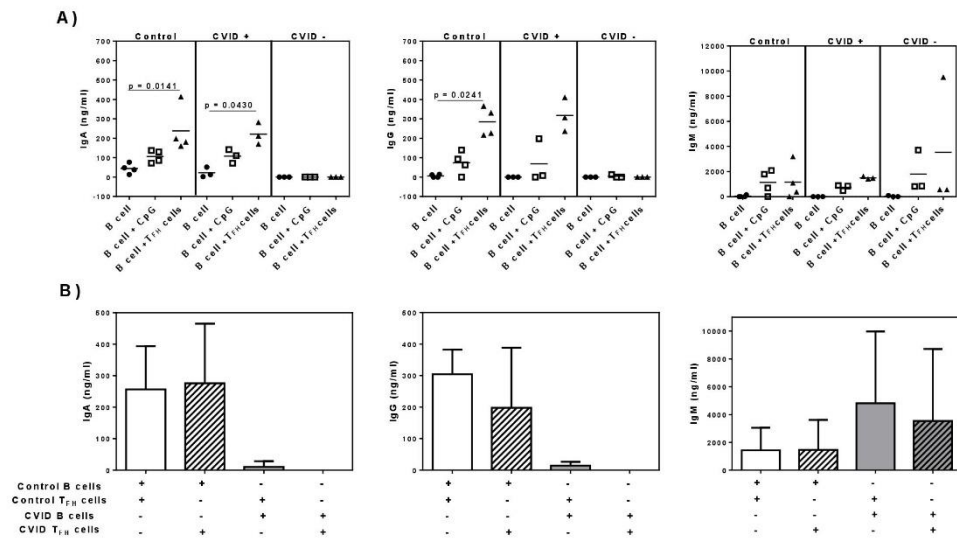


Figure 4. Cytokine production by cT_{FH} cells in CVID patients. In (A), cT_{FH} cells and memory B cell from CVID patients (n=6) and control group (n=4) were cocultured for 7 days and IgA, IgG and IgM production were dosed in the supernatants by ELISA. In (B), T_{FH} cells from CVID- patients (n=3) and B cells from control groups or T_{FH} cells from control group and B cells from CVID- patients (n=3) were cocultured for 7 days for immunoglobulins detection. The mean values were compared and the *p* values presented in the figures.

4 DISCUSSÃO

As células T CD4⁺ auxiliares foliculares (T_{FH}), identificadas pela expressão de Bcl-6, PD-1, ICOS, CXCR5 e pela produção de IL-21 nos órgãos linfoides secundários, estão envolvidas na resposta humoral de alta eficiência, por regular positivamente vários eventos das células B nos centros germinativos (KIM et al., 2001; YUSUF et al., 2010). Periféricamente as células T_{FH}, identificadas pela coexpressão de CXCR5 e CD45RO, compartilham a capacidade funcional de ajudar as células B fora dos folículos linfoides secundários (BOSSALLER et al., 2006). A associação com outros marcadores, como ICOS, PD-1, CCR6 e CXCR3, tem auxiliado a identificação de células T_{FH} circulantes (cT_{FH}) mais eficientes em ajudar na produção de anticorpos protetores, seguindo imunizações e infecções, e patogênicos, no contexto das reações de hipersensibilidade (MA et al., 2015; MORITA et al., 2011; SIMPSON et al., 2010). Entretanto, alguns eventos ambientais, conhecidos por alterar a produção de anticorpos, podem atuar no comportamento funcional das células T_{FH}, como a gestação.

Durante a gestação, apesar de eventos hormonais direcionados em reduzir a resposta imune materna mediada pelas células T_{H1} e Tc-1 potencialmente embriotóxicas serem fundamentais, a produção de anticorpos parece ser favorecida (KANDA; TAMAKI, 1999; WANG et al., 2010). Numa gestação sem intercorrências, o incremento na produção de IgG, por exemplo, pode ajudar a proteger a criança desde a cavidade uterina até os primeiros meses de vida do recém-nascido contra doenças infecciosas e toxigênicas devido a capacidade dessa classe de anticorpos de atravessar a placenta (BARUG et al., 2019; ZHONG et al., 2019). Por outro lado, no contexto de doenças autoimunes de fundo humoral, tais como lúpus e tireoidite de Hashimoto, esse fenômeno pode estar associado a consequências adversas à gestação (BUYON et al., 2015; LEPOUTRE et al., 2012). Essa imunomodulação, com favorecimento na imunidade humoral, tem sido associado aos efeitos imunoestimuladores do estrogênio nas células B de memória (KANDA; TAMAKI, 1999). Porém, além das células B, a função de outras células envolvidas na produção de anticorpos pode ser modulada pelos hormônios gestacionais estrogênio e progesterona, tal como as células T_{FH}.

Nesse sentido, em nosso primeiro trabalho publicado (MONTEIRO et al., 2017), nós observamos, pela primeira vez, um aumento na porcentagem de células T CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺ circulantes em gestantes saudáveis, no terceiro trimestre de gestação, em comparação com mulheres não grávidas. Adicionalmente, nós também

observamos um aumento na porcentagem do subtipo celular capaz de expressar os marcadores PD-1 e ICOS nas amostras de sangue periférico das gestantes. Nos órgãos linfoides secundários, enquanto a ligação do PD-1, expresso nas células T_{FH} , regula negativamente a formação do CG (WANG; HILLSAMER; KIM, 2011), a ligação de ICOS ao seu ligante, chamado ICOSL, nos linfócitos B induz a produção de IL-21 pelas células T_{FH} (BAUQUET et al., 2009; CROTTY, 2015; LIU et al., 2015). Na circulação, uma pequena porcentagem de células T_{FH} são $ICOS^+PD-1^+$ seguido de células $ICOS^-PD-1^+$, sendo ambos subtipos celulares considerados os mais eficientes em auxiliar as células B (MA et al., 2015; MORITA et al., 2011; SIMPSON et al., 2010). Esses resultados sugerem então que a gestação favorece a expansão de células cT_{FH} funcionais no sangue periférico. Vale a pena ressaltar que, infelizmente, por limitações financeiras, não foi possível fazer uma análise da frequência dessas células em tempos mais iniciais da gestação. O último trimestre foi escolhido por ser o período gestacional com os maiores níveis circulantes de estrogênio e progesterona.

Além dos marcadores PD-1 e ICOS, subtipos de células cT_{FH} também podem ser identificados através da expressão dos marcadores CXCR3 e CCR6. O subtipo $CXCR5^+CXCR3^+CCR6^-$, ou cT_{FH1} , apesar de não ser muito eficiente em auxiliar os linfócitos B naive *in vitro*, são capazes de induzir a diferenciação das células B de memória em plasmócitos (BENTEBIBEL et al., 2013). Em nosso primeiro artigo, devido a limitações técnicas, não foi possível usar o marcador CCR6 associado ao CXCR3, porém, nós observamos uma maior porcentagem de células T $CD4^+CXCR5^+CXCR3^+$ em gestantes em comparação com mulheres não grávidas. Entretanto, de forma interessante, o compartimento de células T $CD4^+CXCR5^+CXCR3^+$ apresentou maior porcentagem de células positivas para PD-1.

BENTEBIBEL e colaboradores (2013) demonstraram, em indivíduos saudáveis, uma correlação positiva entre a frequência de células T $CD4^+CXCR5^+CXCR3^+ICOS^+$ e a produção de anticorpos específicos contra Influenza após vacinação, sendo que essas células T_{FH} foram capazes de produzir IL-2, IL-10, IL-21 e IFN- γ quando estimuladas *in vitro* com o antígeno do vírus influenza, a hemaglutinina (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).

A produção de anticorpos neutralizantes é necessária tanto para o desenvolvimento de uma imunidade protetora contra doenças infecciosas como para o sucesso de diversas vacinas que dependem da produção de anticorpos de alta eficácia (TANGYE et al., 2013). No contexto da gestação, a resposta a vacinas é fundamental tanto para oferecer imunidade à mãe

como para o feto (BARUG et al., 2019; KAY et al., 2015; ZHONG et al., 2019). Como apresentado no artigo 1, os títulos séricos de IgG anti-CMV e anti-HBV foram superiores nas gestantes e foram correlacionados positivamente com a porcentagem de células T $CD4^+CXCR5^+CXCR3^+PD-1^+$ circulantes (MONTEIRO et al., 2017). Esses resultados sugerem que, biologicamente, as mudanças na gestação têm como objetivo maior criar um ambiente de tolerância imune ao feto ao mesmo tempo que favorece a transmissão de proteção passiva contra diferentes agentes infecciosos através da passagem placentária de anticorpos maternos.

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, nós caracterizamos o perfil de citocinas produzido pelas células T $CD4^+CXCR5^+$ através de uma rápida ativação com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) e ionomicina, ambos considerados potentes estimuladores da síntese de diferentes citocinas. No estudo publicado no primeiro artigo, nós demonstramos uma correlação positiva entre os níveis séricos de IgG anti-CMV e anti-HBV com a porcentagem de células cT_{FH} positivas para a PD-1 e para a IL-21 (MONTEIRO et al., 2017). Como a frequência dessas células também foi positivamente correlacionada às concentrações plasmáticas de estrogênio, nossos dados sugerem que a gestação, através das mudanças hormonais, deve favorecer a resposta humoral por elevar a proporção das células cT_{FH} capazes de produzir IL-21.

A manutenção dos eventos imunes que garantem a gestação a termo é um evento complexo e provavelmente delicado que pode ser rompido por diferentes intercorrências, tais como as infecções maternas. No caso específico da infecção pelo HIV-1, a resposta imune protetora contra o vírus em indivíduos infectados contrasta dramaticamente com os eventos imunes responsáveis pela tolerância ao feto. No entanto, o risco de progressão clínica da doença não é aumentado pela gestação (GRAY; MCINTYRE, 2007). 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 $T_H1/Tc-1$, inibem diretamente a replicação viral, o que deve contribuir para reduzir o risco de transmissão vertical do vírus (HYGINO et al., 2012). Dessa forma, nosso próximo objetivo foi avaliar o impacto da infecção pelo HIV-1 sobre as células cT_{FH} em mulheres grávidas ou não. Ademais, a capacidade da TARV em reconstituir esse subtipo de célula T $CD4^+$ foi investigado.

Na ausência de qualquer intervenção, o risco de transmissão vertical é de 12 a 40%. Porém, um conjunto de medidas, tais como o tratamento materno com drogas antirretrovirais, combinado ao parto cesáreo e a não amamentação da criança com leite materno, tem reduzido a taxa de transmissão vertical para < 2% (PRENDERGAST et al., 2007). 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, preservar e restaurar o sistema imunológico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). 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). Até o momento nenhum estudo tinha sido conduzido para avaliar o impacto da TARV na recuperação quantitativa e qualitativa das células cT_{FH} no contexto da gestação.

Nesse sentido, nossos resultados submetidos à revista *Cytokine* (artigo 2) mostraram que, como esperado, a infecção pelo HIV-1 diminuiu a porcentagem de células cT_{FH} em gestantes infectadas quando comparada às mães não-infectadas. Apesar de nenhuma diferença ter sido observada na frequência de células cT_{FH} nas mulheres portadoras do vírus antes da TARV, a terapia antirretroviral reduziu a proporção dessas células, assim como do subtipo PD-1⁺, apenas nas gestantes. Na infecção pelo HIV-1, estudos tem mostrado uma expansão das células T_{FH} nos linfonodos de indivíduos sem tratamento durante a fase crônica da infecção e que a frequência dessas células diminui em indivíduos em uso da TARV (LINDQVIST, 2012; PETROVAS et al., 2012). Por outro lado, BOSWELL e colaboradores (2014) mostraram um aumento nas frequência de células T CD4⁺CXCR5⁺ e T CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ no sague periférico de indivíduos infectados pelo HIV-1 após 1 ano de tratamento (BOSWELL et al., 2014). A divergência em nossos resultados em mulheres não grávidas pode ser explicada, em parte, pelo período em que nossas análises foram realizadas após o início da TARV, de 6 meses. A TARV eficiente é capaz de reduzir a carga viral plasmática e aumentar o número de células T CD4⁺ após 6 meses de uso, resultado observado em todas as mulheres incluídas no estudo. Todavia, a reconstituição funcional das células T CD4⁺ pode levar até 2 anos para ser observada (NDUMBI et al., 2013; ZHANG et al., 2013). Em relação a gestantes infectadas, a diminuição das células cT_{FH} pode ser devido as alterações imunológicas da gestação envolvendo a rede de citocinas.

Em relação a produção de citocinas pelas células cT_{FH}, nós observamos uma redução na porcentagem de células produtoras de IL-6, tanto em mulheres grávidas ou não, após a o início da TARV. No entanto, um aumento na porcentagem de células produtoras de IL-10 foi

observado somente em gestantes após a TARV. Dentro dos órgãos linfoides secundários, as células T CD4⁺CXCR5⁺ que expressam o fator de transcrição FoxP3 têm sido descritas como responsáveis por regular as reações do centro germinativo, em parte, através da produção de IL-10 (LINTERMAN et al., 2011). Infelizmente, no presente estudo não foi possível determinar a origem do subtipo de T_{FH} IL-10⁺, mas o aumento da proporção desse subtipo celular pode exercer efeitos protetores no contexto da infecção pelo HIV-1 em gestantes. No compartimento das células T, estudos anteriores conduzidos pelo nosso grupo mostraram que gestantes infectadas pelo HIV-1 que controlam a CVP possuem maior frequência de células T CD4⁺ reguladoras produtoras de IL-10 específicas para o HIV-1 no sangue periférico quando comparado a pacientes virêmicas (HYGINO et al., 2012). Ainda nesse estudo, uma correlação direta foi encontrada entre o aumento na produção de IL-10 e a baixa replicação viral em cultura de células T (HYGINO et al., 2012). Ademais, incremento na produção de IL-10 pode auxiliar na redução na produção de IL-6, uma 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 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, como pode ser observado em nosso segundo artigo, a TARV foi capaz de aumentar a porcentagem de células cT_{FH} produtoras de 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 cT_{FH} foi correlacionada positivamente com a produção de anticorpos após a vacinação contra o influenza (PALLIKKUTH 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 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} produtoras de IFN- γ foi observado particularmente nas amostras de sangue obtidas de gestantes sob TARV. Coletivamente, esses dados sugerem que a gestação acelera a capacidade da TARV em recompor as células cT_{FH}.

Uma determinação mais direta da recuperação funcional dessas células foi realizada através da cultura 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-HBs e anti-TT foram maiores nas gestantes infectadas pelo HIV-1 em comparação com as pacientes não grávidas. E assim como em mulheres saudáveis, uma correlação positiva foi encontrada entre os níveis séricos de IgG anti-HBs e a porcentagem de células cT_{FH} produtoras de IL-21. No contexto da infecção pelo HIV-1, a presença de anticorpos neutralizantes contra o vírus tem sido observada em indivíduos capazes de controlar a carga viral (BAIYEGUNHI et al., 2018; MARTIN-GAYO et al., 2017). Dessa forma, a presença desses anticorpos em gestantes poderia contribuir na redução da transmissão vertical do vírus. Entretanto, nós não observamos diferenças nos níveis séricos de IgG anti-gp41 entre mulheres infectadas pelo HIV-1, grávidas ou não, antes ou após o início da TARV. 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.

A imunomodulação que ocorre durante a gestação é particularmente mediada pelos hormônios gestacionais, entre eles o estrogênio e 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 T_{H1} , T_{H17} e T_c-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} . De fato, uma elevada frequência de células cT_{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 relação as células T_{FH} , não existem estudos avaliando os efeitos do estrogênio e da progesterona nessas células. Em nosso primeiro estudo, as concentrações plasmáticas de estrogênio, mas não de progesterona, foram positivamente correlacionados com a porcentagem de células cT_{FH} , produtoras ou não de IL-21, e com os títulos de IgG anti-HBs (MONTEIRO et al., 2017). Em mulheres infectadas pelo HIV-1, nós também encontramos uma correlação direta entre esse hormônio circulante e a

porcentagem das células $cT_{FH}IL-21^+$. Estudos têm demonstrado que o estrogênio atua diretamente nas células B, promovendo a produção de anticorpos (JONES et al., 2019; KANDA; TAMAKI, 1999). Apesar de não termos observado nenhuma correlação com os níveis plasmáticos de progesterona, existe a possibilidade de que esse hormônio exerça um efeito indireto protetor no contexto da gestação por atenuar a expressão de fenótipos de células T efectoras e potencialmente embriotóxicas (HUGHES et al., 2008). Ademais, a manutenção das células $T_{FH}IL-10^+$ talvez dependa da progesterona, um hormônio conhecido em favorecer a expansão de fenótipos de células T reguladoras.

Nossos resultados sugerem 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 HIV-1 negativas. Em nosso segundo artigo, nós finalizamos nossas análises demonstrando que as gestantes infectadas pelo HIV-1 apresentaram menor porcentagem de células cT_{FH} totais produtoras de IL-21, IL-10 e IFN- γ . Além disso, os títulos de IgG anti-HBs foram significativamente inferiores nas gestantes infectadas. De forma interessante, as gestantes infectadas apresentaram níveis séricos de estrogênio inferiores em comparação com as gestantes saudáveis. 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 pode contribuir 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.

Além das imunodeficiências adquiridas, algumas imunodeficiências primárias comprometem a produção de anticorpos, podendo estar associado a um dano no compartimento das células T_{FH} . Assim, o terceiro e último objetivo dessa tese foi avaliar as células cT_{FH} em pacientes com imunodeficiência comum variável (CVID). Indivíduos diagnosticados com CVID apresentam baixos níveis séricos de IgG e IgA ou IgM, baixa resposta às vacinas e são mais suscetíveis a doenças autoimunes, granulomatosas e malignidades (BONILLA et al., 2016; FEUILLE et al., 2017; PICARD et al., 2018). O número reduzido de células B de memória que sofreram troca de classe, definidas como $CD19^+CD27^+IgD^-$, é uma característica comum desses pacientes, sugerindo uma deficiência durante as reações do centro germinativo, de ativação e diferenciação de células B (PIQUERAS et al., 2003; WARNATZ et al., 2002; WEHR et al., 2008).

As doenças autoimunes são manifestações comuns entre os pacientes com imunodeficiências primárias, afetando cerca de 30% dos pacientes com CVID (FEUILLE et al., 2017). Ademais, alterações no compartimento das células cT_{FH} , como elevados níveis de cT_{FH2} e/ou cT_{FH17} a redução nos níveis de cT_{FH1} têm sido associadas ao desenvolvimento e a gravidade de doenças autoimunes (LE COZ et al., 2013; MORITA et al., 2011). De forma interessante, estudo recente publicado pelo nosso grupo demonstrou elevada frequência de células cT_{FH} capaz de produzir simultaneamente IL-21, IL-6 e IL-17 com gravidade de desordens do espectro da neuromielite óptica (NMOSD) (MONTEIRO et al., 2019), um conjunto de doenças desmielinizantes de fundo autoimune do sistema nervoso central mediado por autoanticorpos (MONTEIRO et al., 2019). Por esse motivo, para todas as nossas análises, os pacientes com CVID foram estratificados de acordo com a presença de manifestações autoimunes, sendo as mais prevalentes a trombocitopenia autoimune, hipotireoidismo e artrite reumatoide. Curiosamente, essas doenças são mediadas por autoanticorpos e estudos mostraram uma expansão das células cT_{FH} em pacientes, em comparação com o controle, associado aos níveis de autoanticorpos (AUDIA et al., 2014; NIU et al., 2018; XIE et al., 2015; ZHAO et al., 2018a). Além disso, uma maior porcentagem de células $cT_{FH}PD-1^+$ e cT_{FH17} foi positivamente correlacionada com os níveis de anticorpos antitiroglobulina na tireoidite de Hashimoto (ZHAO et al., 2018a).

No nosso estudo, pacientes com CVID com doenças autoimunes mostraram um aumento, mas não significativo, da porcentagem de células cT_{FH} , caracterizadas como $CD4^+CD45RA^-CXCR5^+$, e menor porcentagem de células cT_{FH17} periféricas, definidas como $CXCR3^-CCR6^+$. Em contraste, nós observamos que os pacientes com CVID apresentaram redução significativa na porcentagem de células T_{FR} em comparação ao grupo controle. De fato, estudos associaram deficiências nas células T_{FR} ao desenvolvimento de autoimunidade em camundongos (FU et al., 2018). Em humanos, estudos mostraram resultados divergentes sobre a porcentagem dessas células em pacientes, mas todos observaram um desequilíbrio da relação T_{FH}/T_{FR} e a porcentagem elevada de células cT_{FR} periféricas foi associada a níveis mais baixos de autoanticorpos em pacientes com artrite reumatoide (LIU et al., 2018; NIU et al., 2018; WANG et al., 2019; ZHAO et al., 2018b). De forma interessante, ROMBERG e colaboradores (2019) observaram um aumento no número de células T_{FH} e uma diminuição de células Treg no centro germinativo de pacientes com CVID apresentando citopenias autoimunes em comparação com pacientes com CVID sem doença autoimune e o grupo controle (ROMBERG et al., 2019). Além disso, CUNILL e colaboradores também observaram redução nas células cT_{FR} em pacientes com CVID com menos de 2% de células B

CD27⁺IgD⁻, que são considerados mais suscetíveis a desenvolverem complicações como doenças autoimunes (CUNILL et al., 2017). Nos pacientes com NMOSD, uma menor frequência de células T_{FH}IL-10⁺ foi relacionada à atividade clínica da doença, determinada pelo grau de incapacidade neurológica e número de novas recaídas (MONTEIRO et al., 2019).

Estudos recentes têm identificado um aumento de células cT_{FH} e do subtipo cT_{FH}1 em pacientes com CVID com complicações como esplenomegalia, linfadenopatia, enteropatia, doenças granulomatosas e autoimunes, quando comparados com pacientes sem essas complicações (CORAGLIA et al., 2016; TURPIN et al., 2018; UNGER et al., 2018). Nesses estudos, os pacientes não foram divididos de acordo com o número de células B CD27⁺IgD⁻ e o número reduzido dessas células está associado à pior apresentação clínica (PIQUERAS et al., 2003; WARNATZ et al., 2002; WEHR et al., 2008). Em nosso estudo, no entanto, nós não observamos essas alterações nas células cT_{FH} nos pacientes analisados, porém nenhum deles apresentava esplenomegalia e a maioria apresentava mais de 2% de células B CD27⁺IgD⁻ (WEHR et al., 2008). Em concordância com nossos resultados, Cunill e colaboradores observaram aumento nas porcentagens de células T_{FH} e T_{FH}17 apenas em pacientes com menos de 2% de células B CD27⁺IgD⁻, sem alteração em relação aos pacientes com mais de 2% de células B CD27⁺IgD⁻ (CUNILL et al., 2017).

A produção reduzida de IL-17 pelas células T CD4⁺ tem sido associada a redução de células B CD27⁺IgD⁻ tanto em pacientes com CVID como em indivíduos saudáveis (BARBOSA et al., 2011; BERRÓN-RUIZ et al., 2016). Além disso, a estimulação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com CVID com IL-4 e IL-21 preveniu a apoptose de células B e potencializou a produção de imunoglobulinas (BORTE et al., 2009). Dessa forma, alterações na produção de citocinas pelas células T_{FH} poderiam estar influenciando na diferenciação das células B e na produção de anticorpos em nossos pacientes. Nos nossos resultados, nós não observamos diferença na porcentagem das células cT_{FH} produtoras de IL-21, IL-4, IL-17 e IFN- γ em pacientes com CVID em comparação com o grupo controle. Entretanto, uma correlação positiva foi encontrada entre a porcentagem de células cT_{FH} produtoras de IL-21 e a porcentagem de células B de memória que sofreram troca de classe em pacientes com CVID. Estudos tem observado que mutação de perda de função no gene do receptor de IL-21 (IL-21R) está associado a imunodeficiências relacionadas a resposta imune humoral tanto em humanos como em camundongos (KOTLARZ et al., 2013; RANKIN et al., 2011). Dessa forma, para verificar se a redução nas células B CD27⁺IgD⁻ estaria associada a redução na expressão do receptor de IL-21, nós

avaliamos a porcentagem de células B capazes de expressar esse receptor. De forma interessante, a porcentagem de células B CD27⁺ expressando IL-21R foi maior em pacientes com CVID em comparação ao grupo controle, o que pode sugerir uma forma de compensação.

Além da produção de citocinas, a interação entre células T_{FH} e células B através interações cognitivas também é essencial para a reação do CG e a diferenciação de células B em células de memória e plasmócitos de longa vida e capaz de produzir anticorpos de alta afinidade. Neste contexto, nós cocultivamos células cT_{FH} com células B de memória dos pacientes para avaliar a produção de imunoglobulinas. Mesmo na presença de células T_{FH} circulantes, as células B de alguns pacientes com CVID foram incapazes de produzir IgG e IgA, mas não IgM, enquanto que em coculturas de outros pacientes a produção foi semelhante ao grupo controle. Estudos prévios também observaram uma produção normal de imunoglobulinas em culturas de células B ou PBMC de alguns pacientes com CVID (BRYANT et al., 1990; DESJARDINS et al., 2018). As coculturas alogênicas mostraram que as células T_{FH} de pacientes com CVID incapazes de produzirem anticorpos foram eficazes em auxiliar as células B de indivíduos do grupo controle. Por outro lado, as células B desses pacientes foram incapazes de produzir anticorpos na presença de células T_{FH} circulantes do grupo controle, sugerindo que as células T_{FH} de pacientes com CVID mantêm sua função preservada. De fato, nenhuma diferença foi observada na secreção de IL-21, IL-4 e IFN- γ pelas células T_{FH} ativadas com anti-CD3 e anti-CD28 e na expressão de CD40L, PD-1 e ICOS pelas células T_{FH} células após ativação.

Em conclusão, nossos resultados sugerem 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. Por outro lado, em pacientes com deficiências na produção de anticorpos, como na imunodeficiência comum variável, as células T_{FH} apresentam função normal sugerindo deficiências nas células B.

CONCLUSÕES

- a) A gestação, em mulheres saudáveis, favorece a expansão de células T CD4⁺ auxiliares foliculares circulantes (cT_{FH}), caracterizadas como T CD4⁺ CD45RO⁺ CXCR5⁺, capazes de expressar, ou não, os marcadores ICOS, PD-1 e CXCR3;
- b) As células cT_{FH} de mulheres grávidas saudáveis são capazes de produzir maior quantidade de IL-21, IL-6 e IL-10, sendo que a produção dessas citocinas é principalmente pelo compartimento de células T_{FH} CXCR3⁺;
- c) A frequência de células T_{FH} CXCR3⁺PD-1⁺ circulantes produtoras ou não de IL-21, em gestantes saudáveis, foi diretamente relacionada aos níveis sistêmicos de estrogênio e anticorpos anti-CMV e anti-HBs;
- d) A infecção pelo HIV-1 reduziu a frequência de diferentes subtipos de células T_{FH} em gestantes, que pode estar relacionado, ao menos em parte, pelos menores níveis de estrogênio. No entanto, a ocorrência de gestação amplificou a capacidade da terapia antirretroviral (TARV) em reconstituir o status funcional desses linfócitos, determinada pela capacidade em produzir IL-21 e ajudar os linfócitos B autólogos a produzir IgG;
- e) Em gestantes infectadas pelo HIV-1, a frequência de células T_{FH} circulantes produtoras de IL-21 foi diretamente relacionada aos níveis sistêmicos de estrogênio e anticorpos anti-HBs;
- f) A capacidade da gestação em amplificar a recuperação de células T_{FH} IL-10⁺ em detrimento à uma queda na porcentagem do subtipo de células T_{FH} IL-6⁺ nas pacientes infectadas pelo HIV-1 em sucesso terapêutico, pode ajudar a reduzir a expansão de células T_{FH} disfuncionais;
- g) Os pacientes com CVID, com doenças autoimunes ou não, apresentam porcentagem reduzida de células cT_{FH}17;
- h) A razão T_{FH}/T_{FR} foi maior em pacientes com CVID com doenças autoimunes;
- i) A porcentagem de células cT_{FH} produtoras de IL-21 foi diretamente relacionada com a porcentagem de células B CD27⁺IgD⁻ em pacientes com CVID;
- j) As células T_{FH} de pacientes com CVID foram capazes de auxiliar *in vitro* a produção de anticorpos;

Nossos resultados sugerem que a gestação favorece a expansão das células T_{FH} periféricas funcionais capazes de auxiliar as células B na produção de anticorpos, sendo esse

fenômeno muito provavelmente associado ao estrogênio. Esse fenômeno natural descrito nas grávidas deve ser determinante para potencializar a capacidade da terapia antirretroviral em reconstituir a resposta imune humoral em mulheres grávidas infectadas pelo HIV-1, que sabidamente danifica as células T_{FH} . No entanto, em pacientes com deficiências na produção de anticorpos, como na imunodeficiência comum variável, a ineficiente imunidade humoral não é decorrente de falhas funcionais das células T_{FH} .

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMAS, 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.
- ABRAHAMAS, 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**, v. 181, n. 4102, p. 845–847, ago. 1973.
- ALIMONTI, J. B.; BALL, T. B.; FOWKE, K. R. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 7, p. 1649–1661, 2003.
- ALLOULOU, M. et al. Follicular regulatory T cells can be specific for the immunizing antigen and derive from naïve 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.
- 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.
- 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.
- 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 (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 8, p. 5746–53, abr. 2008.
- AUDIA, S. et al. Splenic TFH expansion participates in B-cell differentiation and antiplatelet-antibody production during immune thrombocytopenia. **Blood**, v. 124, n. 18, p. 2858–2866, 2014.
- BAIYEGUNHI, O. 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. **Journal of Virology**, v. 92, n. 15, p. 1–15, 2018.
- 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 Review of Clinical Immunology**, v. 8, n. 8, p. 747–753, 1 nov. 2012.
- BARBOSA, R. R. et al. Primary B-cell deficiencies reveal a link between human IL-17-producing CD4 T-cell homeostasis and B-cell differentiation. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.
- BARBOSA, R. R. et al. Monocyte activation is a feature of common variable immunodeficiency irrespective of plasma lipopolysaccharide levels. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 169, n. 3, p. 263–272, 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.
- 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.
- BATEMAN, E. A. L. et al. T cell phenotypes in patients with common variable immunodeficiency disorders: Associations with clinical phenotypes in comparison with other groups with recurrent infections. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 170, n. 2, p. 202–211, 2012.
- 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.
- BAYRY, J. et al. Common variable immunodeficiency is associated with defective functions of dendritic cells. **Blood**, v. 104, n. 8, p. 2441–2443, 2004.
- BENTEBIBEL, S.-E. et al. Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ T H cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 176, 2013.
- BERRÓN-RUIZ, L. et al. Impaired selective cytokine production by CD4+ T cells in Common Variable Immunodeficiency associated with the absence of memory B cells. **Clinical Immunology**, v. 166–167, p. 19–26, 2016.
- 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**, v. 172, n. 5, p. 1505–1510, maio 1995.
- 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.
- BOGAERT, D. J. A. et al. Genes associated with common variable immunodeficiency: One diagnosis to rule them all? **Journal of Medical Genetics**, v. 53, n. 9, p. 575–590, 2016.
- BONDUELLE, M. L. et al. Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from tripronucleate zygotes. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 3, n. 7, p. 909–14, out. 1988.
- BONILLA, F. A. et al. International Consensus Document (ICON): Common Variable

Immunodeficiency Disorders access. **J Allergy Clin Immunol Pract**, v. 4, n. 1, p. 38–59, 2016.

BORTE, M. et al. Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. **Blood**, v. 114, n. 19, p. 4089–4098, 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.

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.

BRENCHLEY, J. M. et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. **Nat Med**, v. 12, n. 12, p. 1365–1371, 2006.

BRENCHLEY, J. M. et al. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. **Blood**, v. 112, n. 7, p. 2826–2835, 2008.

BRYANT, A. et al. Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cell secretion of IgM and IgG in response to anti-IgM and interleukin-2. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 56, n. 2, p. 239–248, 1990.

BURGESS, T. Determinants of transmission of HIV from mother to child. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, 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.

BUYON, J. P. et al. Predictors of Pregnancy Outcome in a Prospective, Multiethnic Cohort of Lupus Patients. **Ann Intern Med.**, v. 163, n. 3, p. 153–163, 2015.

CAMBRONERO, R. et al. Up-regulation of IL-12 in monocytes: a fundamental defect in common variable immunodeficiency. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 164, n. 1, p. 488–94, 2000.

CASTIGLI, E. et al. TAC1 is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. **Nature Genetics**, v. 37, n. 8, p. 829–834, 2005.

CEDERBOM, L.; HALL, H.; IVARS, F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory 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.

CHAPEL, H. et al. Common variable immunodeficiency disorders : division into distinct clinical phenotypes. **Blood**, v. 112, n. 2, p. 277–287, 2008.

CHEN, J. Z. J. et al. The effects of human chorionic gonadotrophin, progesterone and oestradiol on trophoblast function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 342, n. 1–2,

p. 73–80, 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.

CHEVALIER, N. et al. CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 186, n. 10, p. 5556–68, 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. et al. Cutting Edge: STAT1 Is Required for IL-6 – Mediated Bcl6 Induction for Early Follicular Helper Cell Differentiation. **Journal of Immunology**, v. 190, p. 3049–3053, 2013.

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.

CHUNG, Y. et al. Follicular regulatory T (Tfr) cells with dual Foxp3 and Bcl6 expression suppress germinal center reactions. **Nature Medicine**, v. 17, n. 8, p. 983–988, 2011.

CLEMENTE, A. et al. B cells from common variable immunodeficiency patients fail to differentiate to antibody secreting cells in response to TLR9 ligand (CpG-ODN) or anti-CD40+IL21. **Cellular Immunology**, v. 268, n. 1, p. 9–15, 2011.

CLEMENTE, A. et al. CD27+ B cells from a subgroup of common variable immunodeficiency patients are less sensitive to apoptosis rescue regardless of interleukin-21 signalling. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 174, n. 1, p. 97–108, 2013.

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 HIV-Suppressive Factors Produced by CD8+ 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.

CORAGLIA, A. et al. Common Variable Immunodeficiency and Circulating TFH. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.

CROTTY, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). **Annual review of immunology**, v. 29, p. 621–663, 2011.

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

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.
- CUNILL, V. et al. Follicular T Cells from smB– Common Variable Immunodeficiency Patients Are Skewed Toward a Th1 Phenotype. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.
- CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Common variable immune deficiency: Dissection of the variable. **Immunological Reviews**, v. 287, n. 1, p. 145–161, 2019.
- CUNNINGHAM-RUNDLES, C.; BODIAN, C. Common Variable Immunodeficiency: Clinical and Immunological Features of 248 Patients. **Clinical Immunology**, v. 92, n. 1, p. 34–48, 1999.
- CUNNINGHAM-RUNDLES, C.; RADIGAN, L. Deficient IL-12 and dendritic cell function in common variable immune deficiency. **Clinical Immunology**, v. 115, n. 2, p. 147–153, 2005.
- CUTOLO, M. et al. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. **Lupus**, v. 13, n. 9, p. 635–638, set. 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.
- DESJARDINS, M. et al. Modulation of the Interleukin-21 Pathway with Interleukin-4 Distinguishes Common Variable Immunodeficiency Patients with More Non-infectious Clinical Complications. **Journal of Clinical Immunology**, v. 38, n. 1, p. 45–55, 2018.
- 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 fetomaternal interface: an effective cooperation? **Placenta**, v. 27, n. 4–5, p. 341–7, jan. 2006.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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**, v. 6, n. 3, 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.
- FAUCI, A. S. et al. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. **Annals of Internal Medicine**, v. 124, n. 7, p. 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**, v. 78, n. 3, p. 586–591, mar. 1994.
- 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.
- FEUILLE, E. J. et al. Autoimmune Cytopenias and Associated Conditions in COVID: a Report From the USIDNET Registry. **Journal of Clinical Immunology**, v. 38, n. 1, p. 28–34, 2017.
- FOERSTER, C. et al. B Cell Receptor-Mediated Calcium Signaling Is Impaired in B Lymphocytes of Type Ia Patients with Common Variable Immunodeficiency. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, p. 7305–7313, 2010.
- FONSECA, V. R. et al. Human blood T fr cells are indicators of ongoing humoral activity not fully licensed with suppressive function. **Science Immunology**, v. 2, n. 14, p. eaan1487, 2017.
- 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. et al. Deficiency in T follicular regulatory cells promotes autoimmunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 3, p. 815–825, 2018.
- FUNDERBURG, N. et al. Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis. **PLoS ONE**, v. 3, n. 4, p. 1–7, 2008.
- 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.
- GIOVANNETTI, A. et al. Unravelling the Complexity of T Cell Abnormalities in Common Variable Immunodeficiency. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 6, p. 3932–3943, 2007.
- 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.
- GROSSMAN, C. J. Regulation of the immune system by sex steroids. **Endocrine reviews**, v. 5, n. 3, p. 435–55, jan. 1984.

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**, v. 58, n. 5, p. 417–22, jan. 1979.

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

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**, v. 39, n. 4, p. 770–781, 2013.

HE, Y. et al. A Randomized Case–Control Study of Dynamic Changes in Peripheral Blood Th17/Treg Cell Balance and Interleukin-17 Levels in Highly Active Antiretroviral-Treated HIV Type 1/AIDS Patients. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 28, n. 4, p. 339–345, 2012.

HEALY, D. L. et al. Contributions of in vitro fertilization to knowledge of the reproductive endocrinology of the menstrual cycle. **Baillière's clinical endocrinology and metabolism**, v. 1, n. 1, p. 133–52, fev. 1987.

HEIKKINEN, J. et al. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. **Clinical and experimental immunology**, v. 136, n. 2, p. 373–8, maio 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**, v. 31, n. 1, p. 79–97, 2010.

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.

HIRANO, S.; FURUTAMA, D.; HANAFUSA, T. Physiologically high concentrations of 17beta-estradiol enhance NF-kappaB activity in human T cells. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 292, n. 4, p. R1465–71, abr. 2007.

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**, v. 6, n. 2, p. 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. et al. Cutting Edge: Progesterone Regulates IFN- Production by Plasmacytoid Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 4, p. 2029–2033, 2008.

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**, v. 93, n. 3, p. 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.

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.

INOUE, T. Progesterone stimulates the induction of human endometrial CD56+ lymphocytes in an in vitro culture system. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, n. 4, p. 1502–1507, abr. 1996.

JASPER, M. J.; TREMELLEN, K. P.; ROBERTSON, S. A. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. **Molecular human reproduction**, v. 12, n. 5, p. 301–8, maio 2006.

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.

JOHNSON, E. L.; CHAKRABORTY, R. HIV-1 at the placenta: immune correlates of protection and infection. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 3, p. 248–255, 2016.

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

JOHNSTON, R. J. et al. STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 2, p. 243–250, 2012.

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

JONES, B. G. et al. Complex sex-biased antibody responses: Estrogen receptors bind estrogen response elements centered within immunoglobulin heavy chain gene enhancers. **International Immunology**, v. 31, n. 3, p. 141–156, 2019.

JØRGENSEN, S. F.; FEVANG, B.; AUKRUST, P. Autoimmunity and Inflammation in COVID: a Possible Crosstalk between Immune Activation, Gut Microbiota, and Epigenetic Modifications. **Journal of Clinical Immunology**, 2018.

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. Effect of human chorionic gonadotropin on in vitro lymphocyte transformation. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 109, n. 7, p. 1029–31, abr. 1971.

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.

KING, A. Uterine leukocytes and decidualization. **Human reproduction update**, v. 6, n. 1, p. 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.

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.

KLATT, N. R. et al. Loss of mucosal CD103+ DCs and IL-17+ and IL-22+ lymphocytes is associated with mucosal damage in SIV infection. **Mucosal Immunology**, v. 5, n. 6, p. 646–657, 2012.

KOFOD-OLSEN, E. et al. Altered fraction of regulatory B and T cells is correlated with autoimmune phenomena and splenomegaly in patients with COVID. **Clinical Immunology**, v. 162, p. 49–57, 2016.

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.

KOTLARZ, D. et al. Loss-of-function mutations in the IL-21 receptor gene cause a primary immunodeficiency syndrome. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 3, p. 433–443, 2013.

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. **AIDS**, v.8, n. 4, p. 469-476, 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.

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. **Journal of virology**, v. 75, n. 10, p. 4780–4791, maio 2001.

LAILAW, 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.

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.

- 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.
- LE COZ, C. et al. Circulating TFH Subset Distribution Is Strongly Affected in Lupus Patients with an Active Disease. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–12, 2013.
- 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.
- LEPOUTRE, T. et al. Reduction of miscarriages through universal screening and treatment of thyroid autoimmune diseases. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 74, n. 4, p. 265–273, 2012.
- 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.
- LIEBERMAN, J. et al. Dressed to kill ? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection. **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.
- 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. et al. Increased Circulating Follicular Treg Cells Are Associated With Lower Levels of Autoantibodies in Patients With Rheumatoid Arthritis in Stable Remission. **Arthritis and Rheumatology**, v. 70, n. 5, p. 711–721, 2018.
- 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**, v. 70, n. 2, p. 238–248, out. 2002.
- 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**, v. 4, n. suppl 1, p. 87–94, nov. 1989.

- LOSI, C. G. et al. Mutational Analysis of Human BAFF Receptor TNFRSF13C (BAFF-R) in Patients with Common Variable Immunodeficiency. **Journal of Clinical Immunology**, v. 25, n. 5, p. 496–502, 2005.
- 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.
- LUCAS, M. et al. Infection outcomes in patients with common variable immunodeficiency disorders: Relationship to immunoglobulin therapy over 22 years. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 6, p. 1354–1360.e4, 2010.
- LUO, C. Y. et al. Estrogen enhances the functions of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. **Cellular & molecular immunology**, v. 8, n. 1, p. 50–8, jan. 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.
- MA, C. S. et al. Early commitment of naïve human CD4+ T cells to the T follicular helper (TFH) cell lineage is induced by IL-12. **Immunology and Cell Biology**, v. 87, n. 8, p. 590–600, 2009.
- MA, C. S. et al. Monogenic mutations differentially affect the quantity and quality of T follicular helper cells in patients with human primary immunodeficiencies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, n. 4, p. 993–1006.e1, 2015.
- MAARTENS, G.; CELUM, C.; LEWIN, S. R. HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. **The Lancet**, v. 384, n. 9939, p. 258–271, 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.
- MAHLAOUI, N. et al. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) Registry : recent advancements in the epidemiology of Primary Immunodeficiencies and how does that translate in clinical care. **Rare diseases and orphan drugs. An International Journal of Public Health**, v. 1, n. 4, p. 25–27, 2014.
- 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.
- 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.
- 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.
- MARTIN-GAYO, E. et al. Circulating CXCR5+CXCR3+PD-1^{lo} Tfh-like cells in HIV-1 controllers with neutralizing antibody breadth. **JCI Insight**, v. 2, n. 2, 2017.
- MARTINEZ-GALLO, M. et al. TACI mutations and impaired B-cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 2, p. 468–476, 2013.

- MARZI, M. et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 106, n. 1, p. 127–133, 1996.
- MATTERN, C. F. T. et al. Localization of Human Immunodeficiency Virus Core Antigen in Term Human Placentas. **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.
- 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 manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília: 2013.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para prevenção da transmissão vertical de HIV, sífilis e hepatites virais. Brasília: 2015.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico E Diretrizes Terapêuticas Para Prevenção Da Transmissão Vertical De HIV, Sífilis e Hepatites Virais. Brasília: 2018.
- MODELL, V. et al. Global report on primary immunodeficiencies: 2018 update from the Jeffrey Modell Centers Network on disease classification, regional trends, treatment modalities, and physician reported outcomes. **Immunologic Research**, v. 66, n. 3, p. 367–380, 2018.
- MOFENSON, L. M. Prevention in neglected subpopulations: prevention of mother-to-child transmission of HIV infection. **Clinical infectious diseases**, 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.
- 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.
- MOUILLOT, G. et al. B-cell and T-cell phenotypes in CVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 5, p. 746–755, 2010.
- 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.
- 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.

NIU, Q. et al. Enhanced IL-6/phosphorylated STAT3 signaling is related to the imbalance of circulating T follicular helper/T follicular regulatory cells in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 20, n. 1, p. 1–9, 2018.

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.

OKSENHENDLER, E. et al. Infections in 252 Patients with Common Variable Immunodeficiency. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 10, p. 1547–1554, 2008.

OMENDA, M. M. et al. Evidence for efficient vertical transfer of maternal HIV-1 envelope-specific 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.

PAINTSIL, E.; ANDIMAN, W. A. Update on successes and challenges regarding mother-to-child transmission of HIV. **Current opinion in pediatrics**, v. 21, n. 1, p. 94–101, 2009.

PALLIKKUTH, S. et al. Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected 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.

PEDERSEN, A. et al. Macrophage conditioned media affects steroid hormone production by placental cultures. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v. 24, n. 6, p. 548–554, nov. 1994.

PENG, G. et al. Toll-Like Receptor 8-Mediated Reversal of CD4+ Regulatory T Cell Function. **Science**, v. 309, n. 5739, p. 1380–1384, 26 ago. 2005.

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.

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.

PETROVAS, C. et al. CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. **J Clin Invest.**, v. 5, n. 9, p. 1–14, 2012.

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.

PICARD, C. et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. **Journal of Clinical Immunology**, v. 38, n. 1, p. 96–128, 2018.

PIQUERAS, B. et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. **Journal of Clinical Immunology**, v. 23, n. 5, p. 385–400, 2003.

- PONGCHAROEN, S.; SUPALAP, K. Interleukin- 17 Increased Progesterone Secretion by JEG- 3 Human Choriocarcinoma Cells. **American Journal of Reproductive**, v. 41, n. 4, p. 261-264, 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.
- 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.
- 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.
- RANKIN, A. L. et al. IL-21 Receptor Is Critical for the Development of Memory B Cell Responses. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 2, p. 667–674, 2011.
- RICKABAUGH, T. M.; JAMIESON, B. D. A challenge for the future: Aging and HIV infection. **Immunologic Research**, v. 48, n. 1–3, p. 59–71, 2010.
- 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.
- RODRIGUEZ, N. et al. Mechanisms associated with defective TH1 cytokine production in HIV infection. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 43, n. 7, p. 951-958, 1997.
- ROMBERG, N. et al. Patients with common variable immunodeficiency with autoimmune cytopenias exhibit hyperplastic yet inefficient germinal center responses. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 1, p. 258–265, 2019.
- RYAN, E. S. et al. Loss of Function of Intestinal IL-17 and IL-22 Producing Cells Contributes to Inflammation and Viral Persistence in SIV-Infected Rhesus Macaques. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 2, p. 1–22, 2016.
- 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, 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. 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, 2014a.
- SAGE, P. T. et al. Circulating T follicular regulatory and helper cells have memory-like properties. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 12, p. 5191–5204, 2014b.
- SAGE, P. T.; SHARPE, A. H. T follicular regulatory cells. **Immunological Reviews**, v. 271, n. 1, p. 246–259, 2016.
- SAITO, S. et al. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 601–610, 2010.

- 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, 2000.
- 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.
- SCHMITT, 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.
- 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 (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 11, p. 6760–6, dez. 2004.
- SEOL, H. J. et al. The role of CD4⁺CD25^{bright} regulatory T cells in the maintenance of pregnancy, premature rupture of membranes, and labor. **Yonsei Medical Journal**, v. 49, n. 3, p. 366–371, 2008.
- 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.
- 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.
- SHECHTER, R.; LONDON, A.; SCHWARTZ, M. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 206–218, 2013.
- SHULMAN, Z. et al. T follicular helper cell dynamics in germinal centers. **Science**, v. 341, p. 673–677, 2013.
- SHULMAN, Z. et al. Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. **Science**, v. 345, n. 6200, p. 1058–1062, 2014.
- 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.
- SLADE, C. A. et al. Delayed Diagnosis and Complications of Predominantly Antibody Deficiencies in a Cohort of Australian Adults. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. May, 2018.
- 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**, v. 65, n. 1, p. 129–34, 1988.

STITES, D. P.; SIITERI, P. K. Steroids as immunosuppressants in pregnancy. **Immunological reviews**, v. 75, p. 117–38, jan. 1983.

STRAUB, R. H. The complex role of estrogens in inflammation. **Endocrine reviews**, v. 28, n. 5, p. 521–74, ago. 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. Progesterone-mediated immunomodulation in pregnancy: its relevance to leukocyte immunotherapy of recurrent miscarriage. **Immunotherapy**, v. 1, n. 5, p. 873–882, 1 set. 2009.

TAGLAUER, E. S.; ADAMS WALDORF, K. M.; PETROFF, M. G. The hidden maternal-fetal interface: Events involving the lymphoid organs in maternal-fetal tolerance. **International Journal of Developmental Biology**, v. 54, n. 2–3, p. 421–430, 2010.

TAKAHASHI, T. et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25 + CD4 + naturally anergic and suppressive T cells: Induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. **International Immunology**, v. 10, n. 12, p. 1969–1980, 1998.

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.

TARALDSRUD, E. et al. Common variable immunodeficiency revisited: Normal generation of naturally occurring dendritic cells that respond to Toll-like receptors 7 and 9. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 175, n. 3, p. 439–448, 2014.

TARALDSRUD, E. et al. Defective IL-4 signaling in T cells defines severe common variable immunodeficiency. **Journal of Autoimmunity**, v. 81, p. 110–119, 2017.

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.

TRUNDLEY, A.; MOFFETT, A. Human uterine leukocytes and pregnancy. **Tissue Antigens**, v. 63, n. 1, p. 1–12, 2004.

TURPIN, D. et al. Increase of follicular helper T cells skewed toward a Th1 profile in COVID patients with non-infectious clinical complications. **Clinical Immunology**, v. 197, n. May, p. 130–138, 2018.

UEMURA, Y. et al. 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**, v. 69, n. 3, p. 149–57, mar. 2008.

UENO, H. Human Circulating T Follicular Helper Cell Subsets in Health and Disease. **Journal of Clinical Immunology**, v. 36, p. 34–39, 2016.

- UNGER, S. et al. The TH1 phenotype of follicular helper T cells indicates an IFN- γ -associated immune dysregulation in patients with CD21^{low} common variable immunodeficiency. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 2, p. 730–740, 2018.
- VAIDYA, N. K. et al. Correlation between Anti-gp41 antibodies and virus infectivity decay during primary HIV-1 infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUN, p. 1–9, 2018.
- VAN VOLLENHOVEN, R. F.; MCGUIRE, J. L. Estrogen, progesterone, and testosterone: Can they be used to treat autoimmune diseases? **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 61, n. 4, p. 276–284, jul. 1994.
- 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.
- VERMA, P. et al. Altered crosstalk of estradiol and progesterone with Myeloid-derived suppressor cells and Th1/Th2 cytokines in early miscarriage is associated with early breakdown of maternal-fetal tolerance. **American Journal of Reproductive Immunology**, n. 81, v. 2, p. 1–11, 2019.
- 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. 1563–1566, 19 dez. 1986.
- 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.; 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, 2011.
- 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, W. J. et al. The deregulation of regulatory T cells on interleukin-17-producing T helper cells in patients with unexplained early recurrent miscarriage. **Human Reproduction**, v. 25, n. 10, p. 2591–2596, 2010.
- WANG, X. et al. Imbalance of circulating Tfr/Tfh ratio in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 19, n. 1, p. 55–64, 2019.
- WARNATZ, K. et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27⁺ IgM⁻ IgD⁻) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. **Blood**, v. 99, n. 5, p. 1544–1551, 2002.
- WEHR, C. et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. **Blood**, v. 111, n. 1, p. 77–85, 2008.
- WHITELAW, P. F.; CROY, B. A. Granulated lymphocytes of pregnancy. **Placenta**, v. 17, n. 8, p. 533–43, nov. 1996.
- 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.

- 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.
- 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**, v. 69, n. 10, p. 653–9, set. 2004.
- XIE, J. et al. Changes in follicular helper t cells in idiopathic thrombocytopenic purpura patients. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 2, p. 220–229, 2015.
- XIONG, Y.-H.; YUAN, Z.; HE, L. Effects of estrogen on CD4(+) CD25(+) regulatory T cell in peripheral blood during pregnancy. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 6, n. 9, p. 748–52, 2013.
- 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.
- XU, H.; WANG, X.; VEAZEY, R. S. Th17 cells coordinate with Th22 cells in maintaining homeostasis of intestinal tissues and both are depleted in SIV-infected macaques. **Journal of AIDS and Clinical Research**, v. 5, n. 5, 2014.
- YANG, Y. et al. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. **Nature Immunology**, v. 5, n. 5, p. 508–515, 2004.
- YAZDANI, R. et al. Common Variable Immunodeficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical manifestations, Diagnosis, Classification and Management. **Journal of investigational allergology & clinical immunology**, v. 30, n. 1, p. 0, 2019.
- 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.
- YU, G. P. et al. Regulatory T cell dysfunction in subjects with common variable immunodeficiency complicated by autoimmune disease. **Clinical Immunology**, v. 131, n. 2, p. 240–253, 2009.
- 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.
- 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**, v. 124, n. 1–2, p. 106–114, mar. 2002.
- ZENCLUSSEN, A. C. et al. Abnormal T-Cell Reactivity against Paternal Antigens in Spontaneous Abortion. **The American Journal of Pathology**, v. 166, n. 3, p. 811–822, 2011.
- ZHANG, J.-C. et al. Changes in levels of T cell subpopulations to monitor the response to antiretroviral therapy among HIV-1-infected patients during two years of HIV-1 replication suppression. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 45, n. 5, p. 368–377, 1 maio

2013.

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.

ZHAO, J. et al. Increased circulating Tfh17 and PD-1⁺Tfh cells are associated with autoantibodies in Hashimoto's thyroiditis. **Autoimmunity**, v. 51, n. 7, p. 352–359, 3 out. 2018a.

ZHAO, J. et al. Increased circulating follicular regulatory T cells in Hashimoto's thyroiditis. **Autoimmunity**, v. 51, n. 7, p. 345–351, 3 out. 2018b.

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.

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.

ZWART, G. et al. Antibody responses to HIV-1 envelope and GAG epitopes in HIV-1 seroconverters with rapid versus slow disease progression. **Virology**, v. 201, n. 2, p. 285-293, 1994.

APÊNDICE - Termo de consentimento livre e esclarecido



SERVIÇO DE OBSTETRÍCIA - CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Impacto da terapia antirretroviral na frequência de células T_{HF} 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.

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. *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.

5. *Custos e compensações*

Você não irá pagar nem receber nada para participar desse estudo.

6. *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.

7. *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.

8. *Consentimento*

Caso você tenha lido e entendido todas as informações previamente descritas, e você ESPONTANEAMENTE concorde em participar desse estudo, favor assinar na linha a baixo.

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 - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

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 e 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 e 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

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
GAFFREE E
GUINLE/HUGG/UNIRIO



Continuação do Parecer: 666.631

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa não apresenta quaisquer riscos para as pacientes do estudo, promovendo outrossim, novos conhecimentos sobre o comportamento do sistema imunológico das mesmas, antes e após o Tratamento antirretroviral.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo patrocinado pela Faperj, de elevado interesse no comportamento imunológico diferenciado entre as mulheres infectadas pelo HIV-1, gestantes e não-gestantes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os itens do estudo, estão adequadamente relacionados e redigidos.

Recomendações:

sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não há pendências

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