



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Camilla Teixeira de Castro

**Análise fenotípica e funcional das células T que expressam
receptores do tipo toll (TLR)-2 e TLR-4 e células B no sangue
periférico de pacientes com cavernomas cerebrais e sua relação
com a gravidade da doença**

Rio de Janeiro

2022

Camilla Teixeira de Castro

Análise fenotípica e funcional das células T que expressam receptores do tipo toll (TLR)-2 e TLR-4 e células B no sangue periférico de pacientes com cavernomas cerebrais e sua relação com a gravidade da doença

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

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

Rio de Janeiro

2022

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

C355 Castro, Camilla Teixeira de.
Análise fenotípica e funcional das células T que expressam receptores do tipo toll (TLR)-2 e TLR-4 e células B no sangue periférico de pacientes com cavernomas cerebrais e sua relação com a gravidade da doença / Camilla Teixeira de Castro – 2022.
109f.

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

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

1. Células T - Teses. 2. Lipopolissacarídeos. 3. Células Th17. 4. Receptor 2 Toll-Like. 5. Receptor 4 Toll-Like. I. Bento, Cleonice Alves de Melo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 617.731-002

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Camilla Teixeira de Castro

Análise fenotípica e funcional das células T que expressam receptores do tipo toll (TLR)-2 e TLR-4 e células B no sangue periférico de pacientes com cavernomas cerebrais e sua relação com a gravidade da doença

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 17 de fevereiro de 2022.

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

Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Banca Examinadora:

Prof.^a. Dra. Wânia Ferraz Pereira Manfro

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Pablo Trindade

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a. Dra. Paula Campello Costa Lopes

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2022

Dedico este trabalho a todos do LIIiT que me apoiaram das mais diversas formas possíveis para a realização do estudo e a todos os pacientes dispostos a nos ajudar. Agradeço também aos meus pais, Deize e Ricardo, e ao meu namorado Felipe, por todo o apoio, compreensão, amor e carinho que me deram nos momentos em que precisei.

AGRADECIMENTOS

Diante de todo o desafio apresentado pela pandemia, vimos que empatia e solidariedade é extremamente importante para um futuro harmonioso, por isso, gostaria de agradecer:

Ao laboratório LIIIiT, por todo o apoio prestado durante os anos do meu mestrado, por todos os ensinamentos e por toda a dedicação, me mostrando que apesar das dificuldades que enfrentamos, podemos ser excelentes profissionais. Obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar e a ensinar, mesmo em situações tão difíceis como o período da pandemia.

Obrigada Cléo por todo o apoio e compreensão dados a mim desde que entrei no laboratório. Sua pessoa é incrível, nunca desiste, luta, e sempre tenta de todas as formas, apoiar seus alunos. Obrigada por ser uma orientadora e uma mulher maravilhosa, que inspira a todos ao redor e sempre me inspirou a ser uma ótima pessoa e uma ótima profissional.

Gostaria de agradecer também aos meus pais, Deize e Ricardo, por sempre se esforçarem para me dar uma ótima qualidade de vida. Sou grata a cada batalha, a cada desafio que passaram para que eu pudesse chegar onde estou hoje. Obrigada por me apoiarem em todas as decisões, por mais doidas que possam parecer e me darem sempre muito amor e carinho. Obrigada por serem pais maravilhosos!

Obrigada Felipe, por estar comigo a tanto tempo me apoiando, me “jogando pra cima” e nunca me deixando desistir. Queria agradecer por você sempre se esforçar e sempre somar na minha vida, em conhecimento, vivência, amor, carinho e compreensão. Estar ao seu lado nos momentos difíceis torna minha vida muito mais leve.

Agradeço à Aliança Cavernoma Brasil, em especial ao professor Jorge Marcondes, por ter dado a oportunidade de trabalharmos em um projeto tão interessante e por ter nos confiados o estudo afim de compreender melhor a doença, para ajudar futuramente os pacientes a terem uma qualidade de vida melhor.

Agradeço também às agências de fomento, CNPq e Faperj, pois sem essa ajuda financeira o projeto não poderia ser desenvolvido. Graças às agências foi possível

adquirir todos os reagentes necessários para o desenvolvimento desse trabalho maravilhoso.

Agradeço também aos pacientes que se mostraram dispostos a cooperar com o estudo, doando literalmente seus sangues para a pesquisa. Sem vocês, seria impossível que o estudo fosse feito. Muito obrigada pelo apoio e confiança!

Agradeço aos professores que passaram pela minha vida e contribuíram com inúmeros conhecimentos e me ajudaram a chegar onde estou hoje. Obrigada por deixarem um pedaço de vocês comigo, fazendo com que eu, aos poucos, me torne uma profissional melhor.

À todos que de alguma forma me auxiliaram para eu chegar onde estou hoje, muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq).

As pessoas mais felizes não têm o melhor, mas fazem o melhor com o que tem.

Autor desconhecido

RESUMO

CASTRO, Camilla Teixeira de. **Análise fenotípica e funcional das células T que expressam receptores do tipo toll (TLR)-2 e TLR-4 e células B no sangue periférico de pacientes com cavernomas cerebrais e sua relação com a gravidade da doença.** 2022. 109 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

As malformações cavernosas cerebrais (CCM) são lesões vasculares contendo capilares grosseiramente dilatados e alterados em sua permeabilidade, predispondo os pacientes a um risco de acidente vascular cerebral hemorrágico, epilepsia e deficiências neurológicas diversas. O desfecho da doença parece ser influenciado por elementos da resposta imune. Esta hipótese é reforçada pelo achado de intenso infiltrado de células T e B nas regiões dos cavernomas e o envolvimento do receptor toll-like (TLR) 4, com o desenvolvimento dos CCM. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de citocinas de células T expressando TLR2 e TLR4, bem como subconjuntos de células B, em pacientes assintomáticos (CCM_{Assint}, n=14) e sintomáticos (CCM_{Sint}, n=23). Para tanto, amostras de sangue foram colhidas e as células mononucleares, ou linfócitos T, foram estimuladas com ativadores policlonais das células T (anticorpos anti-CD3/anti-CD28) ou com ligantes de TLR2 (Pam3C) e TLR4 (lipopolissacarídeo, LPS). A caracterização fenotípica das células T e células B foi conduzida através de citometria de fluxo. A liberação de citocinas nos sobrenadantes das culturas foi quantificada através da técnica ELISA. No presente estudo foi observado que, quando comparado a pacientes CCM_{Assint}, os pacientes CCM_{Sint} apresentaram maior frequência e densidade de TLR4 expressos em células T CD4⁺ e T CD8⁺. A porcentagem de células Th17 que expressam TLR2 e TLR4 também foi maior nos pacientes CCM_{Sint}. Além disso, a ocorrência de sintomas nos pacientes com CCM associou-se com maior expansão de células Tc-1TLR4⁺, bem como células Tc-17 e Th17.1 expressando TLR2 e TLR4. Por outro lado, a porcentagem de células T CD4⁺TLR4⁺IL-10⁺ foi maior no grupo CCM_{Assint}. *In vitro*, o Pam3C e o LPS foram mais eficientes em elevar a frequência de células T CD4⁺IL-6⁺ e células Th17.1 no grupo CCM_{Sint}. Além disso, em comparação com CCM_{Assint}, as células T purificadas do grupo CCM_{Sint} liberaram níveis mais altos de citocinas relacionadas a Th17 em resposta a Pam3C e, principalmente, em resposta ao LPS. O mesmo comportamento foi observado nas culturas de células T desses pacientes após estimulação via TCR/CD28. Em relação aos subtipos de células B, uma maior frequência de células B de memória ativada foi observada no grupo CCM_{Sint}. Apesar de preliminares, nossos achados revelam um aumento nos subtipos de células Th17/Tc-17 circulantes expressando moléculas funcionais de TLR2 e, especialmente, TLR4, associado a um aumento nos subconjuntos de células B de memória, em pacientes CCM com atividade clínica da doença.

Palavras-chave: Malformações cavernosas cerebrais. Células T. Células Th17. TLR. Citocinas. Células B. LPS

ABSTRACT

CASTRO, Camilla Teixeira de. **Phenotypic and functional analysis of T cells expressing toll-like receptors (TLR)-2 and TLR-4 and B cells in peripheral blood of patients with brain cavernomas and their relationship with disease severity.** 2022. 109 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Cerebral cavernous malformations (CCM) are vascular lesions containing grossly dilated capillaries and altered permeability, predisposing patients to a risk of hemorrhagic stroke, epilepsy and various neurological deficiencies. The outcome of the disease appears to be influenced by elements of the immune response. This hypothesis is reinforced by the finding of intense T and B cell infiltration in the cavernoma regions and the involvement of the toll-like receptor (TLR) 4 with the development of CCM. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the cytokine profile of T cells expressing TLR2 and TLR4, as well as subsets of B cells, in asymptomatic (CCM_{Assint}, n=14) and symptomatic (CCM_{Sint}, n=23) patients. For that, blood samples were collected and the mononuclear cells, or T lymphocytes, were stimulated with polyclonal activators of T cells (anti-CD3/anti-CD28 antibodies) or with TLR2 (Pam3C) and TLR4 (lipopolysaccharide, LPS) ligands. Phenotypic characterization of T cells and B cells was conducted by flow cytometry. The release of cytokines in the culture supernatants was quantified using the ELISA technique. In the present study, it was observed that, when compared to CCM_{Assint} patients, CCM_{Sint} patients had a higher frequency and density of TLR4 expressed in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The percentage of Th17 cells expressing TLR2 and TLR4 was also higher in CCM_{Sint} patients. Furthermore, the occurrence of symptoms in patients with CCM was associated with greater expansion of Tc-1TLR4⁺ cells, as well as Tc-17 and Th17.1 cells expressing TLR2 and TLR4. On the other hand, the percentage of CD4⁺TLR4⁺IL-10⁺ T cells was higher in the CCM_{Assint} group. *In vitro*, Pam3C and LPS were more efficient in increasing the frequency of CD4⁺IL-6⁺ T cells and Th17.1 cells in the CCM_{Sint} group. In addition, compared to CCM_{Assint}, purified T cells from the CCM_{Sint} group released higher levels of Th17-related cytokines in response to Pam3C and, especially, in response to LPS. The same behavior was observed in the T cell cultures of these patients after stimulation via TCR/CD28. Regarding B cell subtypes, a higher frequency of activated memory B cells was observed in the CCM_{Sint} group. Although preliminary, our findings reveal an increase in circulating Th17/Tc-17 cell subtypes expressing functional TLR2 molecules, and especially TLR4, associated with an increase in memory B cell subsets in CCM patients with clinical disease activity.

Keywords: Cerebral cavernous malformations. T cells. Th17 cells. TLR. Cytokines. B cells. LPS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imunidade inata e adaptativa	18
Figura 2 - Apresentação de antígenos	22
Figura 3 - Diferenciação de células T CD4+.....	25
Figura 4 - Diferenciação de células T CD8+.....	25
Figura 5 - Diferenciação de células reguladoras.....	29
Figura 6 - Esquema e foto do cérebro, mostrando uma malformação cavernosa cerebral.....	32
Figura 7 - Imagem de ressonância magnética de uma malformação cavernosa cerebral.....	33
Figura 8 - Complexo proteico dos genes de CCMs.....	36
Figura 9 - Paciente tratado com propranolol por via oral.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígeno
BCL-6	<i>B-cell Lymphoma Protein 6</i>
BCRs	Receptores de Células B
BHE	Barreira Hematoencefálica
Blimp-1	<i>B Lymphocyte-induced Maturation Protein-1</i>
CASH	<i>Cerebral Cavernous Angioma</i> com sintomas hemorrágicos
CCM	<i>Cerebral Cavernous Malformation</i>
CCM1	<i>Cerebral Cavernous Malformations 1 Protein</i>
CCM2	<i>Cerebral Cavernous Malformations 2 Protein</i>
CCM3	<i>Cerebral Cavernous Malformations 3 Protein</i>
CCM _{Asympt}	Malformações Cavernosas Cerebrais Assintomáticas
CCM _{Sympt}	Malformações Cavernosas Cerebrais Sintomáticas
CCR	<i>C-C Motif Chemokine Receptor</i>
CDR3	<i>Complementarity-Determining Regions 3</i>
CXCL	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand</i>
DAMPs	<i>Damage-associated Molecular Patterns</i>
DCs	<i>Dendritic Cells</i>
DVAs	<i>Developmental Venous Anomalies</i>
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
Eomes	<i>Eomesodermin</i>
FND	<i>Focal Neurological Deficit</i>
FoxO1	<i>Forkhead Box O1</i>
FOXO1	<i>Forkhead Box 1</i>
FoxP3	<i>Forkhead Box P3</i>
GATA-3	<i>GATA Binding Protein 3</i>
GD	<i>Gut Dysbiosis</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GNB	Bactérias Gram-negativas
GPB	Bactérias Gram-positivas
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>

Id2	<i>Inhibitor of DNA-binding 2</i>
IFN	<i>Interferon</i>
Ig	Imunoglobulina
IL	<i>Interleukin</i>
IRF4	<i>Interferon Regulatory Factor 4</i>
iTregs	Células T Reguladoras Induzidas
KDR	<i>Kinase Insert Domain Receptor</i>
KLF	<i>Kruppel-like Factor</i>
KRIT1	<i>Krev Interaction Trapped 1</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
mCD14	CD14 de Membrana
Mf	Macrófagos
MGC	<i>Mammalian Gene Collection</i>
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MMP2	<i>Matrix Metalloproteinase-2</i>
MS	<i>Multiple Sclerosis</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κB</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NMOSD	<i>Neuromyelitis Optic Spectrum Disorders</i>
Notch1	<i>Notch Receptor 1</i>
nTregs	Células T Reguladoras Naturais
PAMPs	<i>Pathogen-associated Molecular Patterns</i>
PCR	Proteína C Reativa
PDCD10	<i>Programmed Cell Death 10</i>
PRRs	Receptores de Reconhecimento Padrão
RAP1	<i>Ras-related 1</i>
RM	Ressonância Magnética
RORγT	<i>Retinoic Acid-related Orphan Receptor Gama T</i>
sCD14	CD14 solúvel
SI	Índices de Estimulação
SNC	Sistema Nervoso Central

SOD2	<i>Superoxide Dismutase 2</i>
sROBO4	<i>Soluble Roundabout 4</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
STK26	<i>Serine/Threonine Kinase 26</i>
T-bet	<i>T-box Transcription Factor</i>
Tc-1	<i>Cytotoxic T Cells 1</i>
TCF-7	<i>Transcription Factor 7</i>
TCRs	Receptores de Células T
tDCs	<i>Tolerogenic Dendritic Cells</i>
TFH	<i>T Follicular Helper</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-Beta</i>
Th1	<i>T Helper 1</i>
TLR4	<i>Toll-like Receptor 4</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor Alfa</i>
Tregs	Células T Reguladoras
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR2	<i>Vascular Endothelial Growth Fator Receptor 2</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS.....	45
1.1	Geral	45
1.2	Específicos	45
2	DESENVOLVIMENTO	45
2.1	Elevated proportion of TLR2- and TLR4-expressing Th17-like cells and activated memory B cells was associated with clinical activity of cerebral cavernous malformations.....	45
	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	95
	ANEXO – Carta de Aceite do Artigo Submetido	109

INTRODUÇÃO

Considerações gerais

As malformações cavernosas cerebrais (CCM, do inglês *cerebral cavernous malformation*), mais conhecidas como cavernomas cerebrais, são lesões vasculares constituídas principalmente por aglomerados de capilares cerebrais grosseiramente dilatados e alterados em sua permeabilidade, revestidos por uma única camada de endotélio, predispondo os pacientes a um risco de acidente vascular cerebral hemorrágico, epilepsia e deficiências neurológicas diversas (MARAIRE; AWAD, 1995).

É uma das malformações vasculares do Sistema Nervoso Central (SNC) mais frequentes na população mundial, estimando-se que a sua prevalência varie de 0,4 a 0,8% (MARANHA; ARAÚJO, 2018; STAPLETON; BARKER, 2018; ALIANÇA CAVERNOMA BRASIL, 2022; ORPHA.NET, 2022). Entretanto, uma fração significativa dos portadores (20-50%) permanece estável e livre de qualquer sintoma, sendo o cavernoma descoberto acidentalmente através de exames de imagem do SNC, especialmente a ressonância magnética (DODD; STEINBERG, 2015; ZAFAR et al., 2019; ALIANÇA CAVERNOMA BRASIL, 2022).

A ressonância magnética é o teste mais sensível para detecção das CCM (DE SOUZA et al., 2008). O cavernoma pode ocorrer na forma esporádica ou familiar (hereditária), podendo apresentar-se como única ou múltiplas lesões. Aproximadamente 20 a 30% dos casos apresentam-se como lesões múltiplas, a maioria com história familiar positiva consistente com uma doença hereditária autossômica dominante (DODD; STEINBERG, 2015; MARANHA; ARAÚJO, 2018; ALIANÇA CAVERNOMA BRASIL, 2022).

Apesar de mutações nos genes *CCM1* (KRIT1), *CCM2* (MGC 4607) ou *CCM3* (PDCD10) sabidamente aumentarem o risco de CCM, o desfecho da doença é heterogêneo, indicando que outros fatores impactam no curso da doença, alguns dos quais envolve provavelmente a expressão de genes relacionados à resposta inflamatória (SHI et al., 2009; CHOQUET et al., 2014; GIRARD et al., 2018a). De fato, tanto marcadores inflamatórios no sangue periférico dos pacientes com CCM, como intensa infiltração de monócitos, células B e T nas áreas cavernosas, têm sido detectados em pacientes (SHI et al., 2009, 2014, 2016).

Recentemente, estudo por Tang e colaboradores (2017) conduzido em modelo experimental de CCM demonstrou uma interessante relação entre a expressão dos receptores do tipo toll 4 (TLR4, do inglês *toll-like receptor 4*) nas células endoteliais cerebrais, alterações no microbioma intestinal do animal e gravidade da CCM. Nesse elegante estudo, a ativação das células endoteliais de camundongos com CCM via TLR4 por bactérias Gram-negativas, ou por lipopolissacarídeos (LPS), acelerou a formação de CCM maduros, enquanto o bloqueio da sinalização intracelular via TLR4 exerceu um efeito protetor (TANG et al., 2017).

Apesar dos TLRs serem classicamente expressos nas células do sistema imune inato, esses receptores de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) e ao dano celular (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*) são também detectados em células T cronicamente ativadas (MILLS, 2011), particularmente no contexto de doenças autoimunes (FERREIRA et al., 2018; DIAS et al., 2019). No contexto das CCM, células T são identificadas nas lesões cerebrais e, no entanto, até a presente data, nenhum estudo tinha sido desenhado para investigar o padrão de expressão de TLR nas células T CD4⁺ e T CD8⁺ destes pacientes. Ademais, a presença de linfócitos B nas proximidades deve implicar uma mútua cooperação entre estas células da imunidade específica na atividade clínica da doença. O entendimento do comportamento das células T e células B nos pacientes com CCM, além de original, pode fornecer valiosas informações que podem contribuir no desenho de manobras imunoterapêuticas no manejo clínico dos pacientes.

Ativação, diferenciação, e funções das células T

O sistema imune é composto por células e moléculas responsáveis pelo reconhecimento e combate a elementos estranhos ao organismo e capazes de perturbar a homeostase (KIM, 2018; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

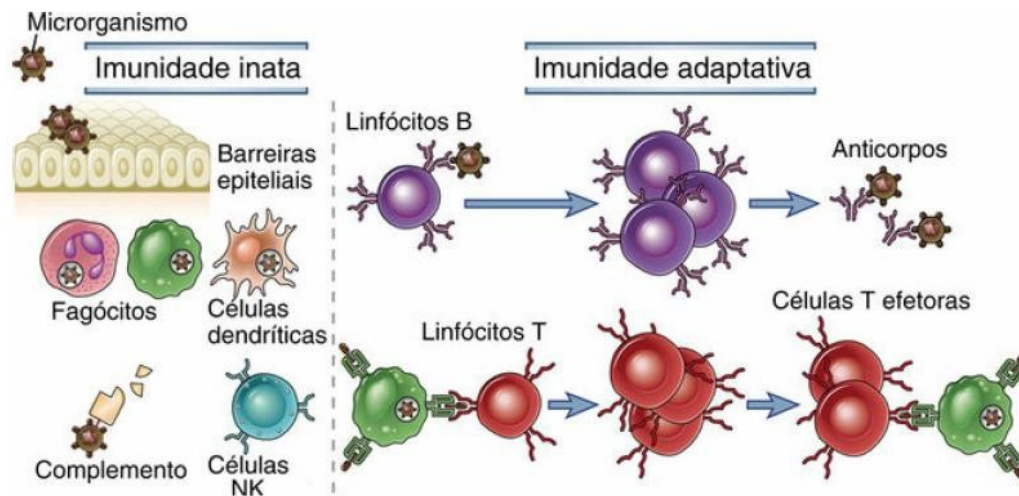
No contexto de doenças infecciosas, a identificação e início da resposta primária a diferentes componentes moleculares de microrganismos, os antígenos, é realizada pelas células da imunidade inata, particularmente células da linhagem

fagocítica locais, como os macrófagos (M ϕ) e células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*) (Fig. 1) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Na dinâmica da resposta imune à primo-infecção, M ϕ e DCs residentes são ativados por diferentes PAMPs. Esses padrões irão ativar, nesses fagócitos, a expressão de diferentes genes que codificam proteínas envolvidas na destruição do invasor, tais como complexos enzimáticos responsáveis pela produção de radicais livres do oxigênio e do nitrogênio, as catepsinas, além da produção de diferentes mediadores pró-inflamatórios solúveis, particularmente as citocinas (Fig. 1) (MAHLA, 2013; HERWALD; EGESTEN, 2016; RIERA ROMO; PÉREZ-MARTÍNEZ; CASTILLO FERRER, 2016; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019). Várias citocinas irão amplificar os mecanismos de resistência aos patógenos por induzir o recrutamento e ativação de outras células do sistema imune inato circulantes, tais como neutrófilos e células NK (do inglês *natural killer*) (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; QUINN; DELEO, 2014; MASI et al., 2017; RIBATTI, 2017; CONG; WEI, 2019). Enquanto os neutrófilos são particularmente importantes no combate a bactérias extracelulares e fungos, através da morte mediada por fagocitose e formação de armadilhas extracelulares (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; QUINN; DELEO, 2014; DELGADO-RIZO et al., 2017), as células NK são capazes de identificar células hospedeiras infectadas por vírus e liberar um conjunto de substâncias citotóxicas, as granzimas e perforinas, culminando na fragmentação do material genético da célula hospedeira junto ao patógeno (KRZEWSKI; COLIGAN, 2012; RIBATTI, 2017; CONG; WEI, 2019).

Apesar da resposta imune inata ser importante no combate inicial ao invasor, ativação dos elementos celulares da resposta imune adaptativa, os linfócitos T e B, é fundamental para debelar a infecção e/ou conter o invasor (Fig. 1) (SHRIKANT et al., 2010; KIM, 2018; SANTAMARIA et al., 2018).

Figura 1 - Imunidade inata e adaptativa



Legenda: Integridade das barreiras físicas e a presença de células da imunidade inata, tais como os fagócitos, células dendríticas e NK, além da ativação das proteínas do sistema complemento, participam dos primeiros eventos envolvidos no combate ao invasor. Já na imunidade adaptativa, tem-se linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos, e as células T que pode exercer diferentes funções efetoras após sua ativação por células apresentadoras de antígenos.

Fonte: Adaptado de Abbas et al., 2015.

Classicamente, diferente das células da imunidade inata, os linfócitos T ($CD4^+$ ou $CD8^+$) e as células B clássicas possuem receptores capazes de reconhecer diferenças mínimas entre proteínas antigênicas dos diferentes patógenos (JIN et al., 2012; KAECH; CUI, 2012; COSMI et al., 2014; LIANG; PAN; YE, 2015b; LEFF-GELMAN et al., 2016; BEUREL; LOWELL, 2018; FLORES-SANTIBÁÑEZ et al., 2018; KIM, 2018).

Na hierarquia da resposta imune, as células T ocupam uma posição de destaque graças as diversas citocinas liberadas por seus fenótipos que irão regular a função de todas as outras células da imunidade inata, e promover a produção de anticorpos de maior afinidade pelas células B. (KIM, 2018; SABBAGH et al., 2018; SANTAMARIA et al., 2018; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019). No entanto, eficiente ativação e diferenciação das células T dependem do *status* funcional das células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *antigen presenting cells*), particularmente das DCs (MILLS, 2011; JIN et al., 2012; TERRA et al., 2012; MITTRÜCKER; VISEKRUNA; HUBER, 2014; BEUREL; LOWELL, 2018; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; PATENTE et al., 2019; SNYDER; AMIEL, 2019).

Ativação de linfócitos T

A ligação entre a imunidade inata e adaptativa durante resposta imune primária contra patógenos se dá através da formação de sinapse imunológica entre as células T com as APCs imunogênicas. Nesse sentido, células T CD4⁺ e células T CD8⁺, através de seus receptores de antígenos (TCRs, do inglês *T-cell receptors*), reconhecem antígenos peptídicos acoplados, respectivamente, às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) de classe II ou I expressos na superfície das DCs profissionais (MILLS, 2011; JIN et al., 2012; TERRA et al., 2012; MITTRÜCKER; VISEKRUNA; HUBER, 2014; BEUREL; LOWELL, 2018; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019). Entretanto, a completa e adequada ativação desses linfócitos depende de outras interações cognatas e citocinas liberadas pelas DCs maduras que foram particularmente ativadas por PAMPs.

Os PAMPs são reconhecidos por diferentes famílias de receptores de padrão (PRRs, do inglês *pattern recognition receptor*), como por exemplo membros da família TLR (Tabela 1). Apesar de TLRs serem identificados em diferentes células (CARAMALHO et al., 2003; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006), sua expressão é particularmente elevada nas células do sistema imune inato (CARAMALHO et al., 2003). Classicamente, diferentes ligantes de TLRs modulam indiretamente a resposta imune adaptativa por ativar as APCs, particularmente as DCs (RANJAN et al., 2009; YANAI et al., 2009; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011; OSORIO; REIS E SOUSA, 2011).

Inúmeros produtos bacterianos são reconhecidos pelos TLRs, entre eles, destacam-se o LPS (do inglês, *lipopolysaccharides*) e o ácido lipoteitoico, ambos constituintes de paredes celulares de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente (Tabela 1) (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; JIN et al., 2012; SPASOVA; SURH, 2014; ZHANG; LU, 2015; LEFF-GELMAN et al., 2016; KORNEEV et al., 2017; RAJASEKARAN; ANURADHA; BETHUNAICKAN, 2017; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Tabela 1 - Os TLRs e seus respectivos ligantes microbianos e endógenos

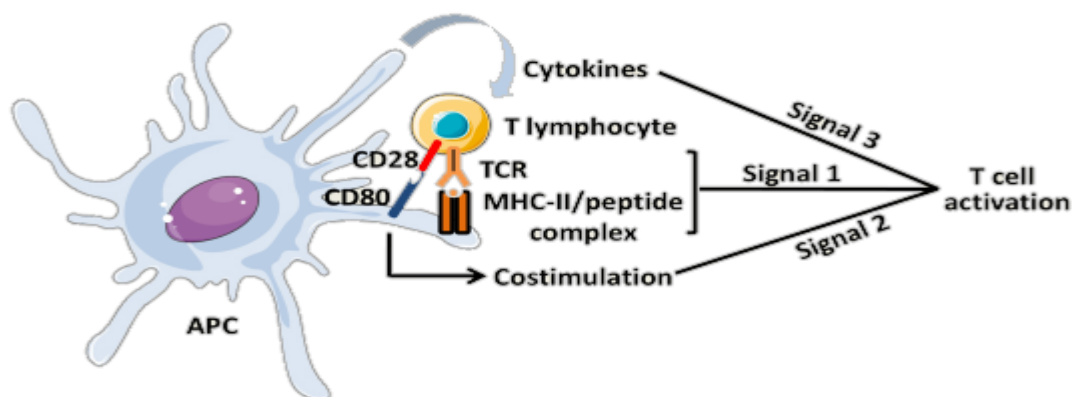
Tipo de TLR	Ligante Microbiano (PAMP)
TLR2*	Lipomanana (<i>Myobacterium</i>), Ácidos lipoteicoicos (bactérias gram-positivas), lipopeptídios di e tri-acilados
TLR3	RNAds (vírus)
TLR4	LPS (bactérias Gram-negativas)
TLR5	Flagelina (bactérias Gram-negativas)
TLR7	RNAss (vírus)
TLR8	RNAss (vírus)
TLR9	Oligonucleotídeos com motivos CpG (bactéria e vírus)

*em associação com TLR1 e TLR6

Na presença de ligantes de TLR2 e TLR4, por exemplo, as DCs passam a expressar diferentes moléculas que as capacitam a se tornarem APC profissionais. Uma das primeiras alterações envolve aumento na expressão tanto das moléculas do MHC de classe I e II, aumentando a probabilidade de apresentação de diferentes peptídeos antigênicos para as células T, quanto das moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), ambas consideradas moléculas co-estimuladoras (GONZALEZ; TABORDA; RUGELES, 2017; CHEN et al., 2018; GRABOWSKA et al., 2018; KALATHOOKUNNEL ANTONY; LIAN; WU, 2018; WANG; WU, 2018; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; COUTURE et al., 2019; PATENTE et al., 2019; SNYDER; AMIEL, 2019; VALENTINE; HOYER, 2019). Outro importante evento relacionado à maturação das DCs envolve a sua migração do local de infecção em direção às regiões que concentram células T na periferia, tais como os gânglios linfáticos e os tecidos linfoides associados à mucosa. Essa migração é direcionada pelas quimiocinas CCL19 e CCL21, produzidas nas zonas que concentram as células T, que se ligam ao CCR7 expresso nas DCs maduras (GRABOWSKA et al., 2018; WU et al., 2018; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; PATENTE et al., 2019; SNYDER; AMIEL, 2019). No caso dos gânglios linfáticos, a chegada das DCs na região paracortical, aumenta a chance dessas APCs realizarem sinapse imunológica com diferentes células T (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; JIN et al., 2012; GONZALEZ; TABORDA; RUGELES, 2017; CHEN et al., 2018; GRABOWSKA et al., 2018;

KALATHOOKUNNEL ANTONY; LIAN; WU, 2018; WANG; WU, 2018; COUTURE et al., 2019; PATENTE et al., 2019; SNYDER; AMIEL, 2019; VALENTINE; HOYER, 2019). Além de apresentar peptídeos, considerado como primeiro sinal, a completa ativação desses linfócitos T depende de um segundo sinal, antígeno inespecífico, que é mediado pela interação entre o CD28, expresso na superfície das células T em repouso, com as moléculas CD80 ou CD86, presentes na superfície de DCs maduras (Fig. 2). As vias de sinalização intracelulares disparadas após a interação MHC:peptídeo com TCR e das moléculas coestimulatórias garantem a sobrevivência, produção de citocinas e proliferação dos linfócitos T, sendo esse último evento dependente da interleucina (IL)-2 (Fig. 2) (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; JIN et al., 2012; TERRA et al., 2012; COUTURE et al., 2019; GLATZOVÁ; CEBECAUER, 2019). O tempo dessa sinapse imunológica pode ser aumentado através da ligação do CD40, da APC, ao CD154 (CD40L) expresso nas células T ativadas (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; JIN et al., 2012; TERRA et al., 2012; KALATHOOKUNNEL ANTONY; LIAN; WU, 2018; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Figura 2 - Apresentação de antígenos



Legenda: Apresentação de antígenos pela célula dendrítica, a mais importante APC, à célula T por meio do complexo peptídeo/MHC presente na APC, reconhecido pelo TCR existente nas células T e consequente ativação através de três sinais. O primeiro sinal é responsável pela ligação entre o complexo peptídeo/MHC com o TCR. O segundo sinal, conhecido como co-estímulo, decorre da interação entre os membros da família B7 (CD80 ou CD86), expressos nas APCs, com o CD28 das células T. Esses dois sinais são responsáveis também pela sobrevivência das células T. Por fim, o terceiro sinal, que irá determinar o fenótipo das células T, é mediado principalmente pela liberação de citocinas pelas APCs.

Fonte: Adaptado de COUTURE et al., 2019.

Finalmente, porém não menos importante, existe um terceiro sinal acionado pelas DCs profissionais que é responsável por induzir diferentes painéis de transcriptomas nas células T ativadas, tornando-as aptas a exercer várias funções biológicas envolvidas no combate a diferentes patógenos, fenômeno esse conhecido como diferenciação celular (JIN et al., 2012; COSMI et al., 2014; LIANG; PAN; YE, 2015b; GONZALEZ; TABORDA; RUGELES, 2017; BEUREL; LOWELL, 2018; CHEN et al., 2018; FLORES-SANTIBÁÑEZ et al., 2018).

Diferenciação das células T em fenótipos efetores

A diferenciação dos linfócitos T em células efetoras é principalmente dependente da secreção de diferentes citocinas pró-inflamatórias pelas DCs maduras, e é particularmente importante para as células T CD4⁺ cuja a função é regular a função

de todas as outras células do sistema imune.

A diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ no fenótipo Th1 (do inglês, *T helper 1*) é estritamente dependente da produção de IL-12 pelas DCs (Fig. 3). Nesses linfócitos, a IL-12 ativa o fator de transcrição T-bet (do inglês, *T-box transcription factor*), responsável por manter a expressão estável dos genes que codificam as duas citocinas de assinatura desse fenótipo celular, a IL-2 e o interferon (IFN)- γ . Elevados níveis de IL-2 e IFN- γ são produzidos durante a chamada resposta imune celular. O IFN- γ aumenta o poder microbicida dos fagócitos e das células NK (JIN et al., 2012; COSMI et al., 2014; LEFF-GELMAN et al., 2016; BEUREL; LOWELL, 2018; COUTURE et al., 2019). Adicionalmente, por auxiliar na ativação e diferenciação dos linfócitos T CD8⁺ em células citotóxicas (CTL, do inglês *cytotoxic T lymphocytes*), o fenótipo Th1 é fundamental no combate a microrganismos intracelulares obrigatórios.

Mais recentemente, estudos têm demonstrado que um novo subtipo de linfócito Th1, chamado células T *helper* folicular (T_{FH}1, do inglês *follicular helper*), que por expressar CXCR5 e produzir IFN- γ e IL-21 (CROTTY, 2011; JOGDAND; MOHANTY; DEVADAS, 2016), é fundamental na produção de IgG1 (*immunoglobulin G 1*) e IgG3 pelas células B foliculares (KEMENY, 2012; COSMI et al., 2014; MESQUITA JR et al., 2016; VINUESA et al., 2016; CROTTY, 2019).

As CTLs, também conhecidos como linfócitos Tc-1 (do inglês, *cytotoxic T cells 1*), além de serem capazes de eliminar células hospedeiras infectadas por patógenos intracitoplasmáticos através da liberação de granzimas e perforinas, também amplificam a resposta imune celular por produzir elevados níveis de IFN- γ e TNF- α (do inglês, *tumor necrosis factor alfa*), (Fig. 4) (GRAVANO; HOYER, 2013; KIM; SURESH, 2013; MITTRÜCKER; VISEKRUNA; HUBER, 2014; SUNG; RACANELLI; SHIN, 2014; LIANG; PAN; YE, 2015b; CHEN et al., 2018; FLORES-SANTIBÁÑEZ et al., 2018; KONJAR; VELDHOEN, 2019). Os fatores de transcrição associados à sua diferenciação no fenótipo Tc-1 são T-bet, Id2 (do inglês, *inhibitor of DNA-binding 2*), Blimp-1 (do inglês, *B lymphocyte-induced maturation protein-1*) e IRF4 (do inglês, *interferon regulatory factor 4*). Por outro lado, a geração de memória nesse fenótipo celular depende da expressão de BCL-6 (do inglês, *B-cell lymphoma 6 protein*), Eomes (do inglês, *eomesodermin*), Id3, TCF-7 (do inglês, *transcription factor 7*) e FOXO1 (do inglês, *forkhead box 1*) (SHRIKANT et al., 2010; KAECH; CUI, 2012; KIM; SURESH, 2013; MITTRÜCKER; VISEKRUNA; HUBER, 2014; CHEN et al., 2018).

Vale ressaltar que as células B foliculares são principalmente do subtipo B-2 cujos receptores de antígenos (BCRs, do inglês *B-cell receptors*) são direcionados contra proteínas. As interações destas células com os linfócitos T_{FH} permitem a ativação das células B naïves (IgD⁺IgM⁺CD27⁻CD38⁺) em células B de memória (IgD⁻IgM⁺CD27⁺CD38⁺) e memória ativada (IgD⁻IgM⁺CD27⁺CD38⁻) (WU; KIPLING; DUNN-WALTERS, 2011). Ademais, na dependência do subtipo de células T_{FH}, as células B se diferenciam em plasmócitos (IgD⁻IgM⁺CD27⁺CD38⁺⁺), secretores de anticorpos de diferentes classes, como por exemplo IgG1 e IgG3 na resposta imune humoral específica coordenada pelas células T_{FH}1 (CROTTY, 2019).

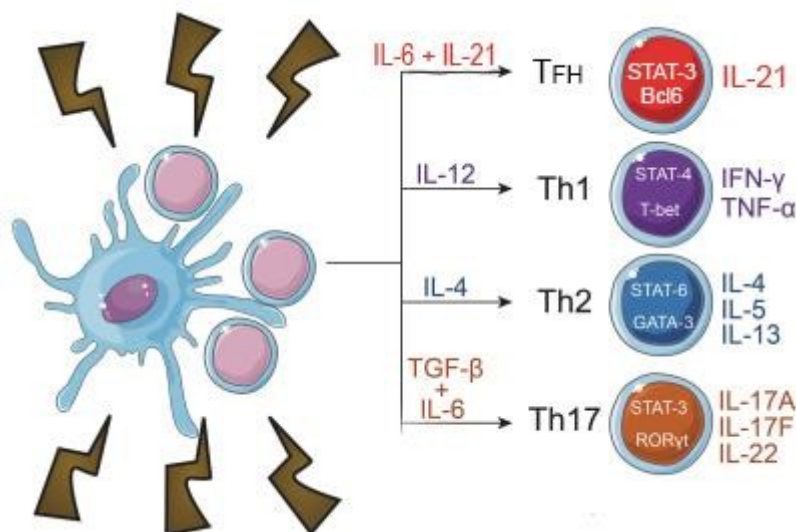
As IgG1 e IgG3 são excelentes anticorpos para eliminação de patógenos através da neutralização (mediada pelos domínios variáveis do anticorpo), aumento da fagocitose, por via direta ou indireta (via ativação do sistema complemento) e morte da célula-hospedeira mediada pelas células NK (MCKINSTRY; STRUTT; SWAIN, 2010; JIN et al., 2012; COSMI et al., 2014; LEFF-GELMAN et al., 2016; BEUREL; LOWELL, 2018; COUTURE et al., 2019).

Já na presença de níveis elevados de IL-4, os linfócitos T CD4⁺ se diferenciam no fenótipo Th2 através da indução de um programa de diferenciação envolvendo o fator de transcrição GATA-3 (do inglês *GATA binding protein 3*) (Fig. 3) (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010; JIN et al., 2012; COSMI et al., 2014). Esses linfócitos medeiam a clássica resposta imune humoral através da secreção de IL-4 e IL-13 permitindo assim a ativação dos linfócitos B produtores de imunoglobulina (Ig) E (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010), particularmente o subtipo celular T_{FH}2, que, dentro dos folículos linfoides secundários, produzem elevados níveis de IL-4 e IL-21 (KEMENY, 2012; COSMI et al., 2014; MESQUITA JR et al., 2016; VINUESA et al., 2016; CROTTY, 2019). Junto com mastócitos e eosinófilos, a resposta imune envolvendo os linfócitos Th2 e T_{FH}2 está envolvida no combate às infestações por helmintos (MAKANI; JEN; FINN, 2008; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; ZHU; YAMANE; PAUL, 2010; COSMI et al., 2014; LEFF-GELMAN et al., 2016; WANG; WU, 2018; COUTURE et al., 2019).

Apesar de auxiliarem o sistema imune, as células Th2 e T_{FH}2 estão envolvidas em respostas alérgicas (OYAMADA et al., 2021). Um novo fenótipo, Th2A, vem sendo observado em pacientes alérgicos (KOENIG et al., 2021). Esse fenótipo aumenta na exposição ao alérgeno e possui baixa capacidade proliferativa. Além da descoberta de Th2A, descobriu-se a presença de T_{FH}13 que produz IL-13 e junto de T_{FH}2, ativam

células B alérgeno-específicas produtoras de IgE (CHEN et al., 2021; KOENIG et al., 2021; OYAMADA et al., 2021).

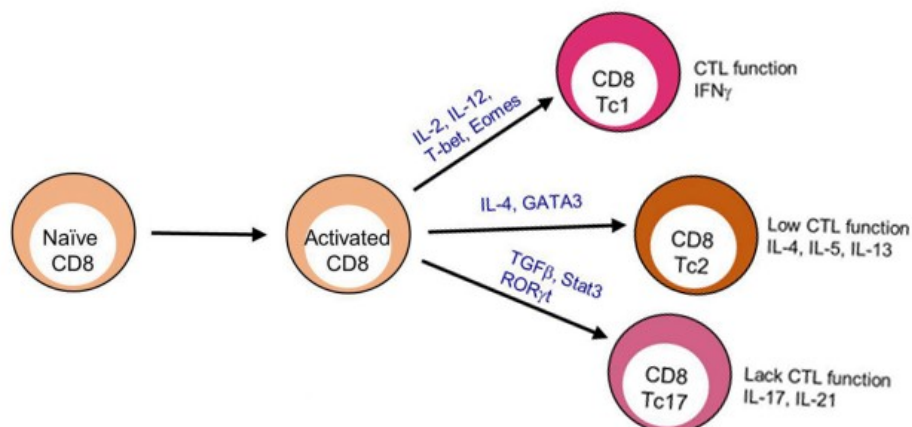
Figura 3 - Diferenciação de células T CD4⁺



Legenda: Célula dendrítica, na presença de diferentes citocinas, irá induzir a diferenciação de células T CD4⁺ em fenótipos efetores ou reguladores. As células T_{FH} são diferenciadas através da produção das citocinas IL-6 e IL-21 pela APC, são relacionadas ao fator de transcrição STAT-3 e Bcl6, produzindo mais IL-21, citocina que irá auxiliar as células B a produzirem anticorpos de maior afinidade. A IL-12, produzida pela célula dendrítica, é responsável pela diferenciação da célula T CD4⁺ em Th1, relacionada aos fatores de transcrição STAT-4 e T-bet que irá produzir as citocinas IFN-γ e TNF-α. O fenótipo Th2 é diferenciado pela produção de IL-4 pela APC, que induz a ativação dos fatores de transcrição STAT-6 e GATA-3 e a consequente produção de IL-4, IL-5 e IL-13. Finalmente, o TGF-β em associação com IL-6 produzidos pela célula dendrítica, diferenciam a célula T CD4⁺ em Th17 que ativa STAT-3 e RORγt e produz IL-17A, IL-17F e IL-22.

Fonte: Adaptado de PATENTE et al., 2019.

Figura 4 - Diferenciação de células T CD8⁺



Legenda: Células T CD8⁺ naïves podem ser ativadas e se diferenciar em fenótipos como o Tc1, através da produção de IL-2, IL-12 e ativação dos fatores de transcrição T-bet e Eomes. As células Tc-1 produzem grandes quantidades de IFN- γ . A diferenciação em Tc2 é dada pela IL-4 e indução de GATA-3. Essas células Tc-2 possuem uma baixa ação de citotoxicidade e, quando ativadas, secretam IL-4, IL-5 e IL-13. Por fim, para a diferenciação de Tc17, TGF- β , STAT-3 e ROR γ t são necessários. Após a diferenciação, a célula Tc17, que possui pobre função citotóxica, será capaz de produzir IL-17 e IL-21.

Fonte: Adaptado de VALENTINE and HOYER, 2019.

Por fim, a diferenciação do fenótipo Th17 pode ser induzido pelo TGF- β (do inglês, *transforming growth factor beta*) com IL-6, ou ainda com IL-21 (Fig. 3) (JIN et al., 2012; COSMI et al., 2014; BEUREL; LOWELL, 2018). Essas citocinas, induzem a expressão do fator de transcrição ROR γ T (do inglês, *retinoic acid-related orphan receptor gamma T*) (JIN et al., 2012; COSMI et al., 2014; BEUREL; LOWELL, 2018). De forma interessante, essas citocinas são responsáveis pela inibição de T-bet, contra-regulando assim o fenótipo Th1 (JIN et al., 2012; COSMI et al., 2014; BEUREL; LOWELL, 2018). O STAT3 (do inglês, *signal transducer and activator of transcription 3*) é outro fator de transcrição igualmente importante para a diferenciação do fenótipo Th17 e indução da síntese das citocinas IL-21, IL-22 e da IL-17A (IL-17), a citocina de assinatura das células Th17 (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; JIN et al., 2012; BEUREL; LOWELL, 2018; COUTURE et al., 2019). A estabilização desse fenótipo depende, no entanto, da IL-23 produzida pelas DCs (COUTURE et al., 2019). Esses linfócitos T CD4⁺ são responsáveis por coordenar a resposta imune contra bactérias extracelulares e fungos por induzir, de forma indireta, o recrutamento e ativação de

neutrófilos nos locais de infecção (COSMI et al., 2014; BEUREL; LOWELL, 2018; COUTURE et al., 2019). A migração orientada desses fagócitos é induzida pela quimiocina CXCL8 (do inglês, *C-X-C motif chemokine ligand 8*) produzida pelas células parênquimais e da imunidade inata no local de infecção quando ativadas pela IL-17 (BEUREL; LOWELL, 2018; COUTURE et al., 2019). À semelhança de outros fenótipos celulares, células $T_{FH}17$ no sangue periférico, conhecidos por produzir IL-21 e IL-17, são capazes de ajudar as células B-2 a produzir IgG e IgA de alta afinidade (MESQUITA JR et al., 2016; VINUESA et al., 2016; CROTTY, 2019). Homólogo às células Th17, os linfócitos Tc17 necessitam das mesmas citocinas e fatores de transcrição para diferenciação, além da necessidade de IL-23 para se estabilizar (Fig. 4) (SHRIKANT et al., 2010; KAECH; CUI, 2012; LIANG; PAN; YE, 2015b, 2015a; CHEN et al., 2018; FLORES-SANTIBÁÑEZ et al., 2018). A resposta imune exacerbada mediada pelas células Th17, através da produção de elevados níveis de IL-17 e IL-21, assim como expressão estável de STAT-3 e ROR- γ T, inibe a diferenciação das células T $CD4^+$ em fenótipos T reguladores envolvidos na homeostase imune (BEUREL; LOWELL, 2018; COUTURE et al., 2019).

Apesar do papel fundamental na vigilância imunológica contra diferentes patógenos, subtipos de células Th17 têm sido implicados em várias reações de hipersensibilidades, tal como doenças autoimunes (BARROS et al., 2017; FERREIRA et al., 2018). Na esclerose múltipla, doença autoimune desmielinizante do SNC, por exemplo, acúmulo de células Th17 capazes de produzir IFN- γ e GM-CSF no sangue periférico e líquido foi associado à gravidade da doença (KEBIR et al., 2009; RASOULI et al., 2015; FERREIRA et al., 2018). Existem ainda os fenótipos $T_{FH}17$, associado também a doenças autoimunes de fundo humoral, tais como lúpus eritematoso sistêmico (KIM; LEE; DIAMOND, 2018) e transtornos do espectro da neuromielite óptica (MONTEIRO et al., 2019), desordens de doenças inflamatórias do SNC de fundo autoimune envolvendo a produção de anticorpos, principalmente contra a aquaporina-4.

Além de sua associação com formas mais graves de doenças autoimunes, as células Th17 IFN- γ^+ GM-CSF $^+$ são também particularmente resistentes à inibição e controle imune mediados pelas células T reguladoras (RAMESH et al., 2014).

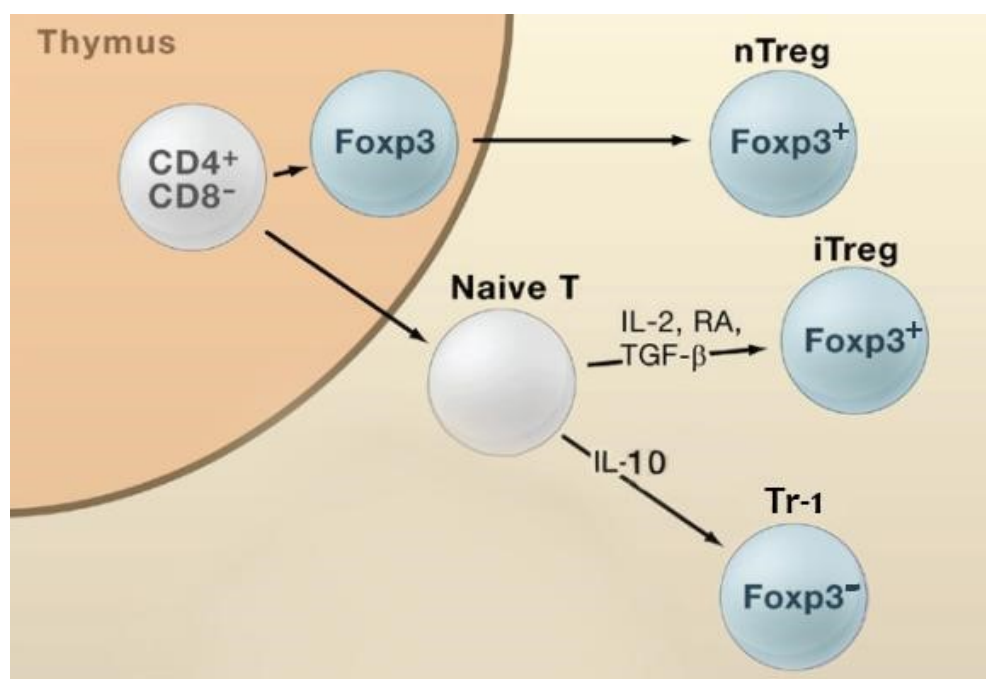
Homeostase do sistema imune: papel das células T reguladoras

Como todo sistema biológico, as respostas imunes devem ser reguladas, caso contrário, sua atuação, mesmo contra invasores indesejáveis, eleva o risco do desenvolvimento de doenças imunomediadas (COSANTINO; BAECHER-ALLAN; HAFLER, 2008). Como mencionado previamente, subtipos de células Th17 estão envolvidas na gênese de várias doenças autoimunes (ZAGHOUANI; HOEMAN; ADKINS, 2009). Por outro lado, citocinas secretadas pelas células Th2 são protagonistas nas reações alérgicas mediadas pela IgE (MCKINSTRY; STRUTT; SWAIN, 2010). Portanto, para evitar essas condições imunopatológicas, eventos imunes envolvidos em tolerância devem ser preservados, tal como a atuação dos linfócitos T reguladores (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008).

A grande maioria das células T reguladoras são do tipo CD4, e a diferenciação depende do contato com DCs tolerogênicas (tDCs), conhecidas em produzir elevados níveis de IL-10, IL-27, IL-35 e TGF- β (STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWEIG, 2003; MALDONADO; VON ANDRIAN, 2010; DOMOGALLA et al., 2017; TAKENAKA; QUINTANA, 2017). De forma geral, existem dois subtipos principais de células T reguladoras, as que expressam (Tregs), ou não (Tr-1) o fator de transcrição FoxP3 (do inglês *forkhead box P3*) (LI et al., 2010; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; DANIKOWSKI; JAYARAMAN; PRABHAKAR, 2017; SABBAGH et al., 2018; WANG; WU, 2018; CARI et al., 2019). As células Tregs podem ser ainda classificadas como sendo naturais (nTregs), geradas durante a maturação dos linfócitos T no timo (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; HU; LANCASTER; EHRLICH, 2015; DANIKOWSKI; JAYARAMAN; PRABHAKAR, 2017; SABBAGH et al., 2018; CARI et al., 2019), ou induzidas (iTreg) na periferia a partir de células T CD4⁺ maduras virgens (Fig. 5) (JIN et al., 2012; KANAMORI et al., 2016; DANIKOWSKI; JAYARAMAN; PRABHAKAR, 2017; SABBAGH et al., 2018). A combinação de citocina liberada pelas APC é fundamental para determinar o subtipo de células T reguladora que será induzido. Na presença de IL-2, produzida pelas células T, junto com o TGF- β , ou IL-10, liberados pelas tDCs, as células T CD4⁺ se diferenciam em Tregs (KANAMORI et al., 2016; SABBAGH et al., 2018). Por outro lado, a combinação de IL-10 mais IL-27, produzidos

pelas DCs, irá induzir a formação de células Tr-1 (MALDONADO; VON ANDRIAN, 2010; TAKENAKA; QUINTANA, 2017). Alguns nutrientes, tal como produto da vitamina A, o ácido retinóico, produzido pelas DCs CD103⁺ e outras, favorece a expansão e diferenciação de Tregs na periferia (MALDONADO; VON ANDRIAN, 2010; DOMOGALLA et al., 2017; TAKENAKA; QUINTANA, 2017). Os mecanismos pelos quais os diferentes subtipos de células T reguladoras exercem seus efeitos imunossupressores são variados, mas muitos desses envolvem a habilidade de produzir elevados níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β (DANIKOWSKI; JAYARAMAN; PRABHAKAR, 2017; SABBAGH et al., 2018; WANG; WU, 2018; CARI et al., 2019). Ademais, células B reguladoras produtoras de IL-10 (Br-1) ou TGF- β (Br-3) também contribuem no controle de reações de hipersensibilidade (MAURI; MENON, 2017).

Figura 5 - Diferenciação de células reguladoras



Legenda: As células T CD4⁺ que se diferenciam no timo e passam a expressar Foxp3⁺, são as Tregs naturais (nTreg). Células T CD4⁺ naïves, específicas para antígenos próprios ou externos, podem também se tornar células Treg FoxP3⁺ induzidas (iTregs) quando em contato com APC tolerogênica na presença de IL-2 e TGF- β ou Tr-1 FoxP3⁻ quando a APC secreta IL-10. O ácido retinóico (proveniente da vitamina A) favorece a expansão de células T reguladoras funcionais.

Fonte: Adaptado de SAKAGUCHI et al., 2008.

Diante do exposto, a saúde depende de um delicado equilíbrio entre a frequência de células imunes efetoras e reguladoras. Qualquer distúrbio na rede de citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias pode estar associado ao desenvolvimento e/ou prognóstico de doenças humanas, tal como cavernoma cerebral.

Malformações cavernosas cerebrais

Definição, patologia e diagnóstico

Malformações cavernosas cerebrais (CCMs), cavernomas, ou angiomas cavernosos, são lesões vasculares em que os vasos se tornam altamente dilatados e revestidos por uma única camada de células endoteliais, sem a presença de tecido elástico e músculo liso, além de possuírem baixo fluxo sanguíneo. Nas formas familiares, essas malformações não são exclusivas do SNC, estando presente em órgãos como tireoide e fígado (BATRA et al., 2009; LEBLANC et al., 2009; GROSS et al., 2011; MARANHA; ARAÚJO, 2018; STAPLETON; BARKER, 2018; CATON; SHENOY, 2021). Esses cavernomas são classificados como hamartoma, caracterizado pela proliferação de um tecido não neoplásico (BATRA et al., 2009; MARANHA; ARAÚJO, 2018).

Os CCMs são bem delimitados e possuem em torno de 1 a 5 cm. Não possuem parênquima ou artérias no interior da lesão, porém, é comum a ocorrência de trombose em diversos estágios, preenchendo as cavernas vasculares por conta do lento fluxo sanguíneo e, em torno de 3% dos casos, anomalias do desenvolvimento venoso (DVAs, do inglês *developmental venous anomalies*) são observadas (BATRA et al., 2009; LEBLANC et al., 2009; MARANHA; ARAÚJO, 2018; STAPLETON; BARKER, 2018; CATON; SHENOY, 2021).

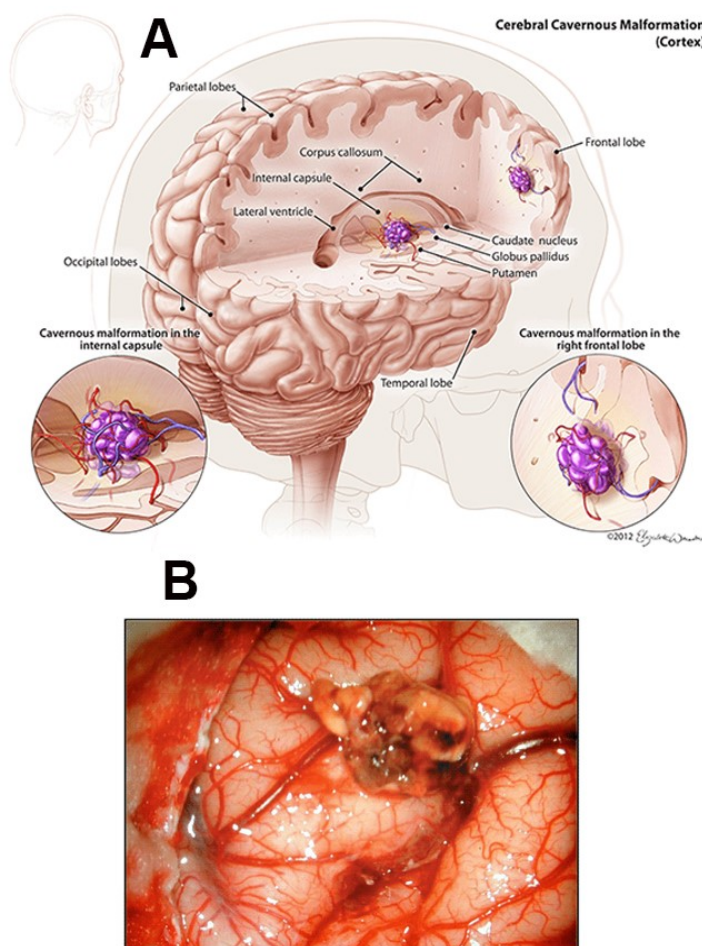
O desenvolvimento de CCMs vem sendo associados às DVAs, através de estudos que mostram uma relação entre o desenvolvimento de cavernomas provenientes de DVAs prévias, indicando o surgimento esporádico da doença. Além

disso, estudos têm demonstrado associações entre a idade como um fator de prevalência entre CCMs associados a DVAs. Apesar de tal fato ser demonstrado em alguns estudos, a relação causal ainda não foi esclarecida. Acredita-se que alterações hemodinâmicas, como aumento da pressão venosa que sobrecarrega a parede do vaso causando lesão, resulte em micro-hemorragias repetidas (que podem ser silenciosas por anos ou décadas) e trombose em regiões com DVAs, sendo um gatilho para o desenvolvimento de CCMs (BRINJIKJI et al., 2017; GOLDSTEIN; SOLOMON, 2017; STAPLETON; BARKER, 2018; GARCÍA-PÉREZ et al., 2019; ZAFAR et al., 2019).

Nos locais adjacentes aos CCMs, que possuem uma aparência semelhante a amora, é possível encontrar produtos de degradação do sangue, a hemossiderina, astrogliose reacional e calcificações (Fig. 6) (BATRA et al., 2009; MARANHA; ARAÚJO, 2018; STAPLETON; BARKER, 2018; CATON; SHENOY, 2021).

A barreira hematoencefálica (BHE) também se encontra parcialmente comprometida no local da lesão, facilitando a extravasamento dos eritrócitos e a deposição de hemossiderina, induzindo a inflamação local (BATRA et al., 2009; LEBLANC et al., 2009). Lesões com hemorragias recorrentes apresentam vesículas que revestem superfícies luminais das células endoteliais. Além disso, a associação do CCM com DVA, tende a ter mais hemorragia do que lesões isoladas (BATRA et al., 2009).

Figura 6 - Esquema e foto do cérebro, mostrando uma malformação cavernosa cerebral



Legenda: A – Esquema da malformação cavernosa cerebral; B – Foto tirada de uma malformação cavernosa cerebral.

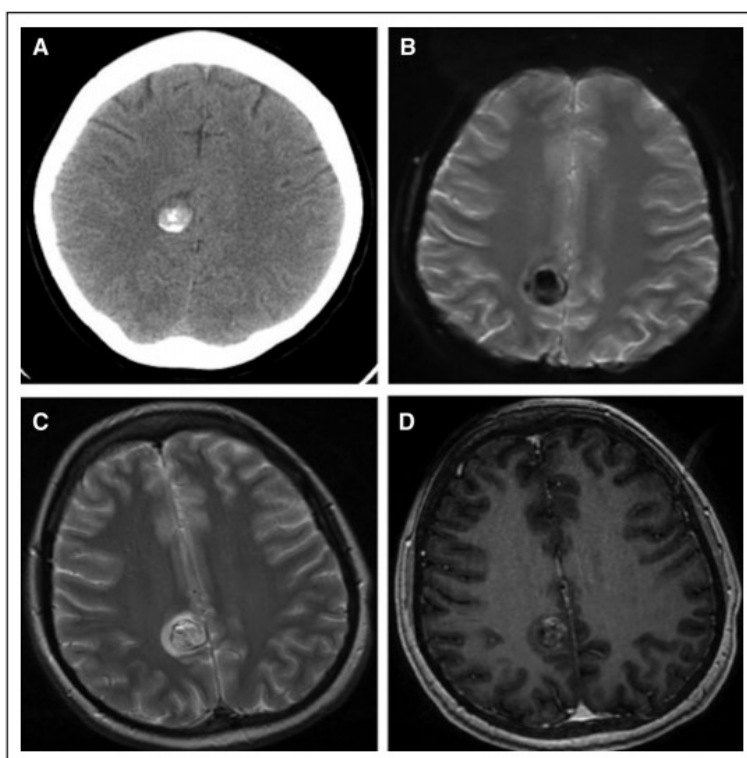
Nota: Na figura A, é possível notar a aparência específica dessa malformação, que lembra uma amora, devido aos vasos altamente dilatados e revestidos por uma única camada de células endoteliais, sem a presença de tecido elástico e músculo liso, além do baixo fluxo sanguíneo e falta de parênquima (Dartmouth-Hitchcock). Na figura B é possível ver um cavernoma cerebral em estágio pré-operatório, de forma que se nota a aparência semelhante a amora além de algumas características descritas na figura A.

Legenda: FARIA et al., 2004.

Os cavernomas podem ser observados através de imagens de ressonância magnética (RM), sendo o padrão ouro para o diagnóstico (Fig. 7). Nas imagens, as lesões se assemelham a “pipoca” por conta da coloração da hemossiderina (MARANHA; ARAÚJO, 2018; STAPLETON; BARKER, 2018; CATON; SHENOY, 2021). Tomografia computadorizada também ajuda no diagnóstico, principalmente

quando há presença de hemorragias, além de mostrarem calcificações ao redor da lesão, quando presentes (MARANHA; ARAÚJO, 2018; STAPLETON; BARKER, 2018; CATON; SHENOY, 2021). A angiografia não é muito utilizada devido ao fluxo lento de sangue pelos vasos, porém, quando associado a DVAs, o exame se mostra bastante eficiente, sendo o mais utilizado para a detecção dessa anomalia (CATON; SHENOY, 2021).

Figura 7 - Imagem de ressonância magnética de uma malformação cavernosa cerebral



Legenda: A a D – Imagens de ressonância magnética mostrando uma malformação cavernosa cerebral. Nota: Nas figuras A a D representa uma imagem de ressonância magnética do cérebro mostrando com exatidão o local da lesão. Nas figuras C a D mostra uma imagiologia ponderada a qual indica hemossiderina dentro do núcleo da lesão assim como uma anomalia venosa do desenvolvimento associada ao cavernoma.

Fonte: STAPLETON; BARKER, 2018.

Quando o cavernoma é diagnosticado, quer seja única ou múltiplas lesões, o médico deve fazer uma revisão do histórico do paciente para determinar se a forma é esporádica ou familiar, além de se procurar evidências hemorrágicas sintomáticas e déficits neurológicos (CATON; SHENOY, 2021).

Etiologia

Estudos estimam que aproximadamente 20% dos casos de CCMs são familiares (SIRVENTE et al., 2009; MARANHA; ARAÚJO, 2018; ZAFAR et al., 2019; ALIANÇA CAVERNOMA BRASIL, 2022), enquanto todos os outros são casos esporádicos da doença. Em relação aos casos hereditários, eles possuem um caráter autossômico dominante, normalmente se desenvolvem múltiplos cavernomas que tendem a crescer em número e tamanho conforme a idade do paciente. Mesmo nos casos de múltiplas lesões, os sintomas tendem a ser atribuídos a uma única lesão dominante (LEBLANC et al., 2009; SIRVENTE et al., 2009; GOLDSTEIN; SOLOMON, 2017; MARANHA; ARAÚJO, 2018; STAPLETON; BARKER, 2018; LOPEZ-RAMIREZ et al., 2019; MALINVERNO et al., 2019; ZAFAR et al., 2019; CATON; SHENOY, 2021; ALIANÇA CAVERNOMA BRASIL, 2022).

Existem três genes distintos cujas mutações têm sido relacionadas ao desenvolvimento dessas malformações: o *CCM1*, *CCM2* e *CCM3*. As três proteínas codificadas por esses genes formam um complexo trimérico, e cada uma dessas possui múltiplos domínios essenciais para ativar diferentes vias de sinalização que estão envolvidas em vários processos, tais como estabilização da organização do citoesqueleto, adesão célula-célula, migração e apoptose (Fig. 8) (LEBLANC et al., 2009; MARANHA; ARAÚJO, 2018; STAPLETON; BARKER, 2018; ZAFAR et al., 2019; CATON; SHENOY, 2021).

O *CCM1* codifica a proteína KRIT1 (do inglês *Krev interaction trapped 1*), e 50% dos casos familiares de CCM têm sido associados à mutação nesse gene (MALINVERNO et al., 2019; CATON; SHENOY, 2021; MEDLINEPLUS, 2022). A importância da KRIT1 nas junções célula-célula é enfatizada por sua associação com as proteínas juncionais, tais como as caderinas e subtipos de cateninas (GLADING et al., 2007; GOITRE et al., 2017). Por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos, essas funções da KRIT1 dependem da expressão *CCM2* (ZAWISTOWSKI et al., 2005; LEBLANC et al., 2009; GOLDSTEIN; SOLOMON, 2017; LISOWSKA et al., 2018). Ademais, estudos também mostram que, junto com FoxO1 e SOD2, KRIT1 limita o acúmulo de radicais livres derivados do oxigênio no citosol, prevenindo assim a apoptose celular em decorrência ao estresse oxidativo (GOITRE et al., 2010, 2014,

2017).

O *CCM2*, relacionado à Malcavernina, regula a formação e integridade do coração e dos vasos sanguíneos por estabilizar as junções das células endoteliais, sendo muitas dessas funções associadas à sua capacidade de estabilizar o próprio complexo trimérico (LEBLANC et al., 2009; SIRVENTE et al., 2009; GOLDSTEIN; SOLOMON, 2017; MARANHA; ARAÚJO, 2018; STAPLETON; BARKER, 2018; LOPEZ-RAMIREZ et al., 2019; MALINVERNO et al., 2019; ZAFAR et al., 2019; CATON; SHENOY, 2021).

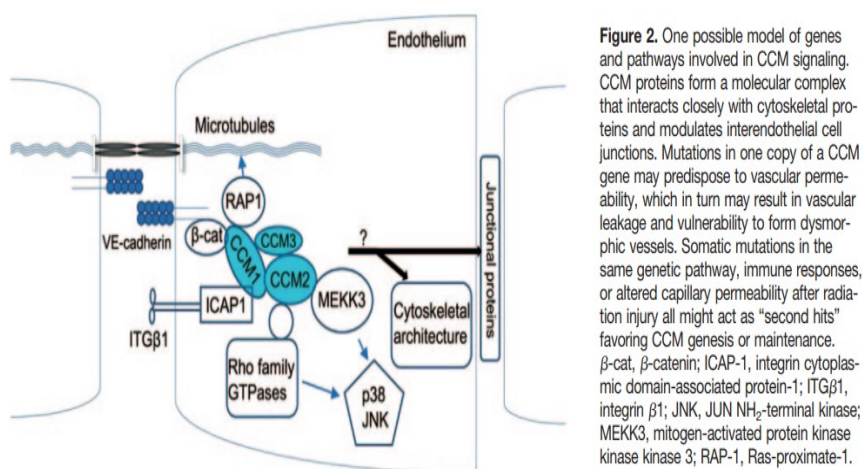
Por fim, estudos recentes têm demonstrado que o *CCM3*, que codifica a proteína PDCD10 (do inglês *programmed cell death protein 10*), regula os processos de maturação da rede vascular por estabilizar o receptor 2 para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2 do inglês *vascular endothelial growth factor receptor 2*), um dos peptídeos que atua como fator de crescimento relacionados à angiogênese (HE et al., 2010; LAUENBORG, 2010; UNIPROT, 2022). Adicionalmente, PDCD10, por aumentar a atividade da proteína cinase ativada por mitógenos e STK26 (do inglês, *serine/threonine kinase 26*, também conhecido como MST4) (MA et al., 2007; HE et al., 2010; MARDAKHEH; SELF; MARSHALL, 2016), tem sido implicada na via de sinalização KDR/VEGFR2 (do inglês, *kinase insert domain receptor*) envolvida no desenvolvimento cardiovascular, angiogênese, vasculogênese e hematopoiese (LEBLANC et al., 2009; SIRVENTE et al., 2009; GOLDSTEIN; SOLOMON, 2017; MARANHA; ARAÚJO, 2018; STAPLETON; BARKER, 2018; LOPEZ-RAMIREZ et al., 2019; MALINVERNO et al., 2019; ZAFAR et al., 2019; CATON; SHENOY, 2021). Apesar da mutação no gene *CCM1* ser a causa mais comum de cavernomas familiares, as formas mais graves da doença estão relacionadas a mutação no *CCM3*, sugerindo que a proteína PDCD10 esteja envolvida em outros eventos biológicos nas células endoteliais vasculares que não são compartilhados pelo *CCM1* ou *CCM2* (GOLDSTEIN; SOLOMON, 2017; LOPEZ-RAMIREZ et al., 2019).

Em relação aos casos esporádicos, eles provavelmente surgem de mutações em uma única célula decorrente de, por exemplo, radioterapia, e são normalmente caracterizados por uma única lesão (GOLDSTEIN; SOLOMON, 2017; STAPLETON; BARKER, 2018; GARCÍA-PÉREZ et al., 2019; LOPEZ-RAMIREZ et al., 2019; MALINVERNO et al., 2019; CATON; SHENOY, 2021).

A consequência mais crítica da mutação em um desses genes é, portanto, o aumento

da permeabilidade da junção endotelial devido à ativação exacerbada da via de sinalização envolvendo Notch1 (do inglês, *notch receptor 1*) e Rho quinase (ROCK). A comunicação intercelular também é prejudicada, o que correlaciona com as características histopatológicas das lesões, aonde existe uma falta de arquitetura madura na parede dos vasos e consequente aumento da permeabilidade da BHE (LEBLANC et al., 2009; SIRVENTE et al., 2009; KIM, 2016; ZAFAR et al., 2019; CATON; SHENOY, 2021). Como as proteínas CCM influenciam o RhoA ainda não foi totalmente elucidado, mas um mecanismo proposto seria o direcionamento de RhoA para degradação proteossômica induzida por CCM2 por ativar o fator 1 regulador da ubiquitina ligase E3 Smad (SMURF1) (CROSE et al., 2009). Portanto, bloqueio da via RhoA-ROCK é uma estratégia terapêutica potencial para o tratamento dos sintomas da CCM (LI; WHITEHEAD, 2010).

Figura 8 - Complexo proteico dos genes de CCMs



Nota: Ligação das proteínas dos genes do CCM formando um complexo proteico trimérico que interage com outras diversas proteínas citoesqueléticas, como RAP1 (*Ras-related 1*) e β-catenina, modulando junções celulares interendoteliais, através da regulação da ligação de caderinas e microtúbulos, impedindo a permeabilidade endotelial e mantendo a arquitetura do citoesqueleto. Mutações numa dessas cópias dos genes pode causar uma permeabilidade vascular, podendo resultar em hemorragia e formação de vasos dismórficos.

Fonte: LEBLANC et al., 2009.

CCM: Epidemiologia e sintomas

Na ressonância magnética, cavernomas são o segundo achado incidental

vascular mais comum, após os aneurismas, tendo uma prevalência de 1:625 pessoas neurologicamente assintomáticas, e o segundo tipo mais comum de malformações vasculares, ficando atrás apenas das DVAs (BATRA et al., 2009; GOLDSTEIN; SOLOMON, 2017; ZAFAR et al., 2019; CATON; SHENOY, 2021). Ocorre entre 0,4 a 0,8% da população em geral, com prevalência de 1:200 a 1:1000 indivíduos. A maioria dos casos são detectados na adolescência e adultos jovens, com uma média aos 37 anos (MARANHA; ARAÚJO, 2018; ZAFAR et al., 2019; CATON; SHENOY, 2021; ALIANÇA CAVERNOMA BRASIL, 2022; ORPHA.NET, 2022). Não há diferença entre gênero, porém, alguns artigos discutem sobre o prognóstico ser diferente entre homens e mulheres devido à influência hormonal, com alguns pesquisadores descrevendo pior desfecho da doença nas mulheres (BATRA et al., 2009; CATON; SHENOY, 2021).

As manifestações clínicas mais comuns do CCM são convulsões (em torno de 50%), hemorragia intracraniana (aproximadamente 25%) e déficit neurológico focal (FND do inglês *focal neurological deficit*), que nem sempre é associado a hemorragia recente (BATRA et al., 2009; MARANHA; ARAÚJO, 2018; CATON; SHENOY, 2021). Cefaleias podem ser também um dos sintomas nos pacientes com cavernomas (BATRA et al., 2009). As lesões supratentoriais, as mais comuns, geralmente cursam com convulsões e hemorragias possuindo um perfil clínico mais benigno, enquanto que ataxia, ou FND, são apresentações clínicas comuns de lesões infratentoriais (DAMMANN et al., 2016; GOLDSTEIN; SOLOMON, 2017; CATON; SHENOY, 2021).

A taxa anual de hemorragia é variável, variando de 0,08% a 2,8%, para o primeiro episódio, com aumento na porcentagem (3,8% a 30%) para crises hemorrágicas subsequentes, indicando que a hemorragia inicial é um fator de risco para recorrência desse evento. Em geral, nos pacientes com pior prognóstico, esses novos episódios hemorrágicos ocorrem num intervalo de 2 anos. Portanto, o intervalo de tempo em que o paciente fica livre de novas recaídas tem sido associado com formas benignas da doença. A gravidade das hemorragias depende da localização da lesão no cérebro (GROSS; DU, 2015; DAMMANN et al., 2016; TASLIMI et al., 2019; ZAFAR et al., 2019). Estudos indicam que pacientes com a forma familiar da doença têm maior risco de hemorragias recorrentes, possivelmente devido às múltiplas lesões (TASLIMI et al., 2019). Entretanto, nem sempre o tamanho e o número de lesões são associados ao risco de hemorragias. Nem a gravidez, tampouco o uso de

antiagregantes plaquetários/antitrombóticos, parecem aumentar o risco de uma crise hemorrágica. Outros estudos têm demonstrado, no entanto, que o local aumenta o risco de hemorragia, sendo as lesões profundas infratentoriais associadas com risco maior do que lesões supratentoriais (GROSS; DU, 2015; ZAFAR et al., 2019; CATON; SHENOY, 2021).

Nos CCMs, as taxas de convulsões também variam de acordo com o tipo e local da lesão (TASLIMI et al., 2019). Em alguns estudos, pacientes assintomáticos possuem um risco de 4% para o desenvolvimento de convulsões dentro de 5 anos, enquanto que pacientes sintomáticos, no qual a convulsão foi seu primeiro sintoma, apresentam uma taxa de 94% para novas convulsões no mesmo intervalo de tempo (GROSS; DU, 2015; ZAFAR et al., 2019). Acredita-se também que micro-hemorragias recorrentes podem desencadear convulsões nos pacientes (ZAFAR et al., 2019).

A maioria dos CCMs se localizam nas regiões supratentoriais (aproximadamente 70%) e infratentoriais (aproximadamente 25%), com apenas 5% dos casos tendo uma localização na medula espinhal (BATRA et al., 2009; GROSS et al., 2011; GROSS; DU, 2015; GOLDSTEIN; SOLOMON, 2017; MARANHA; ARAÚJO, 2018). Quanto às áreas específicas, cerca de 35% das lesões são encontradas no lobo frontal, 30% no tronco encefálico, 18% no lobo temporal e o restante se divide entre medula espinhal, tálamo e lobo occipital. Devido a variada localização, tamanho e a ocorrência ou não de hemorragias, os CCMs possuem repercussões neurológicas diversas com desfecho clínico variado (PORTER et al., 1999; MARANHA; ARAÚJO, 2018; CATON; SHENOY, 2021). Essa heterogeneidade da doença tem dificultado o desenvolvimento de uma terapia única e curativa para todos os pacientes (STAPLETON; BARKER, 2018; APRA et al., 2019; AWAD; POLSTER, 2019; CATON; SHENOY, 2021).

Tratamento

Existem hoje três tipos de tratamento para o CCM que são classificados em conservador, excisão cirúrgica e radioterapia. Para decidir qual deles será utilizado no paciente, uma discussão multidisciplinar é necessária, visto que o curso clínico da

doença é altamente variável e depende da localização (GROSS; DU, 2015; MARANHA; ARAÚJO, 2018; STAPLETON; BARKER, 2018; APRA et al., 2019; CATON; SHENOY, 2021).

O tratamento conservador é sempre a primeira escolha, visto que o paciente só será acompanhado para verificar os estágios da doença. Caso o indivíduo apresente sintomas, a excisão cirúrgica é a opção mais utilizada, enquanto que a radioterapia é uma opção quando o local da lesão é cirurgicamente inacessível (GROSS; DU, 2015; MARANHA; ARAÚJO, 2018; STAPLETON; BARKER, 2018; APRA et al., 2019; RINKEL et al., 2019; CATON; SHENOY, 2021).

Apesar da cirurgia ser o tratamento definitivo, existe uma morbidade pós-operatória que deve ser levada em conta, uma vez que pode ultrapassar os riscos inerentes à doença não tratada. Em casos como esse, o paciente, mesmo sintomático, será tratado de modo conservador, utilizando tratamento sintomático, tais como medicamentos para controlar as convulsões e dores de cabeça. Já em lesões supratentoriais, em regiões não eloquentes, a cirurgia pode ser utilizada de forma a ter aproximadamente 100% de sucesso, com poucas ou nenhuma complicação. Em caso de lesões únicas, a cirurgia se torna bem simples, porém, para lesões múltiplas, deve-se avaliar qual, ou quais, lesão(ões) pode(m) ser a(s) causadora(s) dos sintomas. Cirurgias em tronco encefálico costumam ser muito desafiadoras e perigosas, mas esse tipo de tratamento é muito utilizado para pacientes com hemorragias, déficits neurológicos focais ou algum caso prévio de epilepsia ligado ao cavernoma resistente a anticonvulsivantes (GROSS; DU, 2015; ZABRAMSKI et al., 2016; MARANHA; ARAÚJO, 2018; STAPLETON; BARKER, 2018; RINKEL et al., 2019; CATON; SHENOY, 2021).

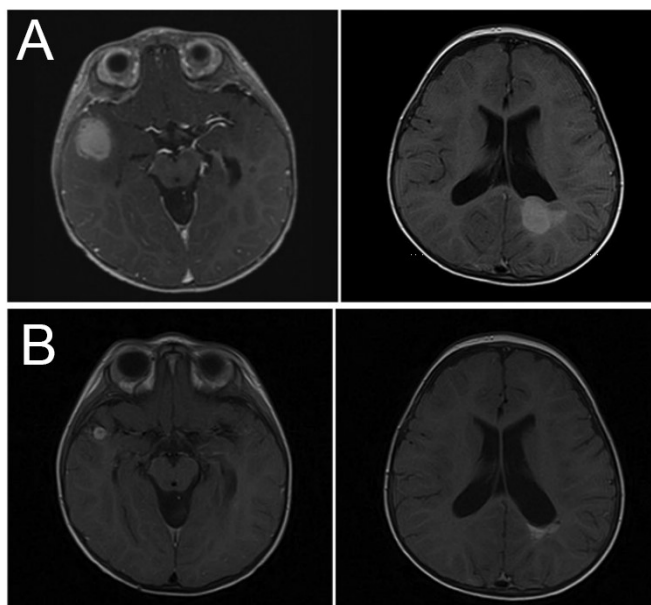
O objetivo da cirurgia, que deve ser realizada por um especialista, visa a retirada completa da lesão juntamente da área carregada com hemossiderina quando presente, visto que remanescentes da lesão podem ainda provocar hemorragias ou causar convulsões (MARANHA; ARAÚJO, 2018; STAPLETON; BARKER, 2018; CATON; SHENOY, 2021).

Na radioterapia utiliza-se normalmente a radiocirurgia estereotáxica, que é altamente precisa e direcionada, aplicando altas doses de radiação no local escolhido, porém, há inseguranças quanto a esse procedimento, pois há casos em que o tamanho da lesão pode não alterar ou mesmo aumentar. É indicada somente para

lesões sintomáticas de difícil acesso ou em casos de resistência ao anticonvulsivantes. Ademais, como citado anteriormente, a radiação está associada à alguns casos esporádicos de CCMs (GROSS; DU, 2015; ZABRAMSKI et al., 2016; MARANHA; ARAÚJO, 2018; STAPLETON; BARKER, 2018; RINKEL et al., 2019; CATON; SHENOY, 2021).

Diversos são os estudos para avaliar os melhores métodos de tratamento da doença e dos sintomas atrelados ao CCMs. Nesse caso, um medicamento chamado Fasudil, inibidor de Rho quinase, tem se mostrado promissor em diminuir os sintomas e a progressão da lesão (ZABRAMSKI et al., 2016; SHENKAR et al., 2017; APRA et al., 2019; AWAD; POLSTER, 2019; CATON; SHENOY, 2021). No modelo experimental da doença, o Fasudil foi mais eficaz que a sinvastatina (outro fármaco inibidor da ROCK), pois melhora a sobrevida dos camundongos e diminui o desenvolvimento de lesões maduras de CCM. Em estudos pré-clínicos com camundongos, outro inibidor da ROCK, o BA-1049, mostrou ser eficaz para redução da hemorragia, do crescimento e da maturação dos CCMs durante o tempo de acompanhamento de 3 a 4 meses (MCKERRACHER et al., 2019). Além desses, o propranolol vem sendo estudado como outra opção no manejo dos pacientes com CCMs (ALEXIOU; PRODROMOU, 2010; BERTI et al., 2014; REINHARD et al., 2016; ZABRAMSKI et al., 2016; APRA et al., 2019; AWAD; POLSTER, 2019). Ainda sem informação sobre os seus mecanismos de ação, acredita-se que o propranolol beneficie o paciente por sua ação vasoconstrictora, diminuição da produção do fator de crescimento endotelial e do fator de crescimento de fibroblastos, além de sua capacidade em suprimir a proliferação, migração e diferenciação de células endoteliais e da formação de tubulogênese nas células endoteliais do cérebro (Fig. 9) (ALEXIOU; PRODROMOU, 2010; BERTI et al., 2014; REINHARD et al., 2016; ZABRAMSKI et al., 2016; APRA et al., 2019; AWAD; POLSTER, 2019).

Figura 9 - Paciente tratado com propranolol por via oral



Legenda: A e B – Imagens de ressonância magnética do cérebro mostrando uma malformação cavernosa cerebral.

Nota: Na figura A, imagem de ressonância magnética antes do tratamento indicando duas lesões. Na figura B, 3 meses após o tratamento com o medicamento. É possível notar uma diminuição significativa da lesão do CCM.

Fonte: Adaptado de BERTI et al., 2014.

Apesar das novas opções terapêuticas, as bases moleculares que determinam melhor ou pior prognóstico dos CCMs ainda são obscuros, mas deve envolver elementos da resposta imune do paciente.

Papel do sistema imunológico na atividade clínica das CCMs

Diversos estudos vêm demonstrando um provável envolvimento do sistema imune na atividade clínica das lesões cavernosas cerebrais (BATRA et al., 2009; SHI et al., 2009, 2014, 2016; LI et al., 2019).

Um estudo feito em pacientes com hemorragias sintomáticas recentes ($\pm$ 30 dias) demonstrou níveis plasmáticos elevados de proteína C reativa (PCR) associados a baixas concentrações de IL-10 (LYNE et al., 2019). Ademais, polimorfismos no gene que codificam as citocinas IL-1 β e IL-6 foram associados a formas mais agressivas de CCMs (GIRARD et al., 2018a; LYNE et al., 2019). Adicionalmente, polimorfismos

gênicos associados a elevada expressão de CD14 de membrana (mCD14) e TLR-4 foram correlacionados com gravidade do CCM (GIRARD et al., 2018a; LYNE et al., 2019). O complexo mCD14/TLR4 forma um receptor de reconhecimento de padrões classicamente expresso em monócitos, que é responsável pelo reconhecimento de LPS, um padrão molecular associado a bactérias Gram-negativas (GNB). Após a formação do complexo LPS/CD14/TLR4, em associação com a proteína intracelular adaptadora MyD88, vias de sinalização são disparadas ativando o fator nuclear (NF)- κ B, promovendo a produção de citocinas pró-inflamatórias (ZANONI et al., 2011; CIESIELSKA; MATYJEK; KWIATKOWSKA, 2021). Curiosamente, em modelo experimental da doença, o LPS, ao ativar a sinalização TLR4-MEKK3-KLF2/4 nas células endoteliais, e induzir a produção de citocinas, acelerou a formação de CCM no cérebro desses animais (TANG et al., 2017).

Em pacientes, elevadas concentrações plasmáticas de IL-1 β , IL-2, IFN- γ , TNF- α e sROBO4 (*soluble roundabout 4*), associados a baixos valores de IL-6 e VEGF, indicam aumento na permeabilidade endotelial em decorrência de inflamação, causando hemorragia ou expansão lesional sintomática (GIRARD et al., 2018a, 2018b; LYNE et al., 2019). Valores elevados de MMP2 (*matrix metalloproteinase-2*) e ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) e baixos níveis de MMP9 também já foram associados à ocorrência de hemorragias e convulsão (GIRARD et al., 2018b).

A relação entre elevados níveis de sROBO4 com a doença envolve sua capacidade de inibir o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), proteína de sinalização que promove o crescimento de novos vasos sanguíneos (GIRARD et al., 2018b; LYNE et al., 2019). Além disso, níveis elevados de IL-1 β indicam ação recente de macrófagos, induzindo uma inflamação aguda. A IL-6 é uma citocina de ampla função no sistema imune, em altos níveis, essa citocina exerce efeitos pró-inflamatórios (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019). A relação entre baixos níveis plasmáticos de IL-6 com a atividade do CCM (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014), pode, na verdade, indicar amplo consumo dessa citocina por células imunes nos locais de lesão.

Apesar do TNF- α e IFN- γ serem citocinas produzidas tanto por células da imunidade inata quanto pelos linfócitos, particularmente as células Th1 (TAU; ROTHMAN, 1999; GOETZ; PLANAS; MACKENZIE, 2004; WATERS et al., 2018; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019), a presença de IL-2 indica uma provável

participação desses linfócitos T na fisiopatogenia do CCM. No compartimento da imunidade inata, o TNF- α e o IFN- γ estão associados ao aumento da função dos fagócitos e das células NK, enquanto a IL-2 favorece a resposta proliferativa das células T em resposta a estimulação antigênica pelas APC imunogênicas (TAU; ROTHMAN, 1999; GOETZ; PLANAS; MACKENZIE, 2004; WATERS et al., 2018; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019). Além de citocinas, as MMP produzidas pelas células imunes locais, por destruírem a matriz extracelular, devem estar envolvidas nas lesões do CCM. Valores elevados da metaloproteinase MMP2 têm sido associados a atividade inflamatória das lesões nos pacientes com CCM (FRANK; LISANTI, 2008). Finalmente, elevada expressão da molécula de adesão intercelular ICAM-1, muito implicada nas interações entre diferentes células imunes, tem sido detectada na superfície das células T dos pacientes (FRANK; LISANTI, 2008). Em resumo, os dados apontam que, provavelmente, eventos inflamatórios devem estar envolvidos em alterações estruturais importantes nas áreas dos cavernomas, sugerindo que substâncias imunogênicas possam atuar como importantes gatilhos para progressão da doença.

De fato, apesar do conhecimento à cerca dos genes envolvidos no cavernoma, as mutações nas proteínas KRIT1, Malcavernina e PDCD10 por si não são responsáveis pelo desenvolvimento da doença, indicando que são necessários gatilhos externos que devem ativar, mesmo que indiretamente, a via de RhoA-ROCK, tal como a disbiose intestinal.

Um elegante estudo realizado por Tang et al (2017) em um modelo murino de CCM demonstrou uma estreita relação entre a formação de lesão cerebral e infecção animal com *Bacteroides fragilis*, bactérias ricas em LPS pró-inflamatório. Este fenômeno foi reproduzido após a injeção de LPS e foi dependente da expressão de TLR4 em células endoteliais da área do CCM. Interessantemente, um microbioma intestinal permissivo, caracterizado pelo crescimento excessivo de espécies patogênicas de bactérias Gram negativas, foi associado à gravidade da CCM em humanos (VINUESA et al., 2016; TANG et al., 2017; COUTURE et al., 2019). Embora o estudo realizado por Tang et al. (2017) ter demonstrado que as lesões cavernosas induzidas por LPS foram independentes da presença de células imunes locais, sabe-se que macrófagos, células B e células T (CD4⁺ e CD8⁺) se acumulam nas regiões perivasculares das lesões em pacientes com CCM (TANG et al., 2017). Além disso,

imunocomplexos constituídos por IgG e produtos terminais de ativação do complemento também foram detectados nas lesões cavernosas em pacientes com CCM que vieram a óbito. Notavelmente, a análise da sequência das regiões determinantes de complementaridade 3 (CDR3, do inglês *complementarity-determining regions*) dos domínios variáveis dessas IgG revelou uma produção local de anticorpos contendo hipermutação somática (SHI et al., 2009), um evento genético classicamente dependente da cooperação de células T CD4⁺ (JIN et al., 2012; CROTTY, 2019).

Apesar de elevados números de células T (SHI et al., 2009), até o momento nenhum estudo realizou uma caracterização fenotípica e funcional destes linfócitos no sangue periférico desses pacientes, particularmente no contexto da expressão de TLR. Apesar de TLR serem classicamente expressos nas células da imunidade inata (KUMAR; YU, 2006; DERKOW et al., 2013; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019), elevada frequência de células T cronicamente ativadas e que expressam diferentes membros da família TLR tem sido correlacionada com a gravidade de doenças desmielinizantes do SNC de fundo autoimune, tais como esclerose múltipla (EM) (KABELITZ, 2007; MIRANDA-HERNANDEZ; BAXTER, 2013; FERREIRA et al., 2018) e desordens do complexo da neuromielite óptica (NMOSD, do inglês *neuromyelitis optic spectrum disorders*) (KABELITZ, 2007; BARROS et al., 2017; DIAS et al., 2019). A análise desses subtipos de células T no contexto dos CCMs precisa ser realizada, porque os dados podem demonstrar que, além de modular o *status* funcional das células da imunidade inata, a presença de PAMPs circulantes podem representar um importante fator de risco para desenvolvimento e gravidade das lesões cavernosas cerebrais por ativar, diretamente, subtipos de células T capazes de ajudar os linfócitos B a produzir anticorpos contra proteínas na área do CCM.

1. OBJETIVOS

1.1 Geral

Avaliar a frequência e o perfil de citocinas de células T CD4⁺ e T CD8⁺ circulantes capazes de expressar TLR2 e TLR4 em pacientes com CCM assintomáticos e sintomáticos. Além disso, analisaremos subconjuntos de células B.

1.1 Específicos

- a) Determinar a proporção de diferentes subtipos de células T CD4⁺ e T CD8⁺ efectoras que expressam TLR2 e TLR4 em pacientes com CCM;
- b) Verificar a resposta proliferativa, e produção de citocinas, em culturas de células T CD4⁺ e T CD8⁺ de pacientes com CCM em resposta à ativação via TCR/CD28 e aos ligantes de TLR2 e TLR4; e
- c) Avaliar a frequência de subconjuntos de células B circulantes em pacientes com CCM.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 Elevated proportion of TLR2- and TLR4-expressing Th17-like cells and activated memory B cells was associated with clinical activity of cerebral cavernous malformations

Artigo submetido e aceito para a publicação pela revista *Journal of Neuroinflammation* (Anexo).

Journal of Neuroinflammation

Elevated proportion of TLR2- and TLR4-expressing Th17-like cells and activated memory B cells was associated with clinical activity of Cerebral Cavernous Malformations

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JNEU-D-21-00699R4	
Full Title:	Elevated proportion of TLR2- and TLR4-expressing Th17-like cells and activated memory B cells was associated with clinical activity of Cerebral Cavernous Malformations	
Article Type:	Research	
Funding Information:	This work was supported by the funds provided by the Brazilian Parliamentary Rare Diseases Initiative.	Msc Camilla Castro
Abstract:	Background: Recent evidences have suggested the involvement of toll-like receptor (TLR)-4 in the pathogenesis of cerebral cavernous malformations (CCM). Elevated frequency of TLR + T-cells has been associated with neurological inflammatory disorders. As T-cells and B-cells are found in CCM lesions, the objective of the present study was to evaluate the cytokine profile of T-cells expressing TLR2 and TLR4, as well as B-cell subsets, in asymptomatic (CCM Asympt) and symptomatic (CCM Sympt) patients. Methods : For our study, the cytokine profile from TLR2 + and TLR4 + T-cell and B-cell subsets in CCM Asympt and CCM Sympt patients was investigated using flow cytometry and ELISA. T-cells were stimulated in vitro with anti-CD3/anti-CD28 beads or TLR2 (Pam3C) and TLR4 (LPS) ligands. Results: CCM Symptc patients presented a higher frequency of TLR4 + (CD4 + and CD8 +) T-cells and greater density of TLR4 expression on these cells. With regard to the cytokine profile, the percentage of TLR2 + and TLR4 + Th17 cells was higher in CCM Sympt patients. In addition, an elevated proportion of TLR4 + Tc-1 cells, as well as Tc-17 and Th17.1 cells expressing TLR2 and TLR4, was observed in the symptomatic patients. By contrast, the percentage of TLR4 + IL-10 + CD4 + T cells was higher in the CCM Asympt group. Both Pam3C and LPS were more able to elevate the frequency of IL-6 + CD4 + T cells and Th17.1 cells in CCM Sympt cell cultures. Further, in comparison with asymptomatic patients, purified T-cells from the CCM Sympt group released higher levels of Th17-related cytokines in response to Pam3C and, mainly, LPS, as well as after activation via TCR/CD28. Concerning the B-cell subsets, a higher frequency of memory and memory activated B-cells was observed in CCM Sympt patients. Conclusions: Our findings reveal an increase in circulating Th17/Tc-17 cell subsets expressing functional TLR2 and, mainly, TLR4 molecules, associated with an increase in memory B-cell subsets in CCM patients with clinical activity of the disease.	
Corresponding Author:	Cleonice Bento Federal University of the State of Rio de Janeiro: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro BRAZIL	
Corresponding Author E-Mail:	cbento@unirio.br;cbento@pq.cnpq.br	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Federal University of the State of Rio de Janeiro: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Camilla Castro	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Camilla Castro	

	Hugo A. A. Oyamada
	Marcos Octávio S. D. Cafasso
	Lana M. Lopes
	Clarice Monteiro
	Priscila M. Sacramento
	Soniza Vieira Alves-Leon
	Gustavo da Fontoura Galvão
	Joana Hygino
	Jorge Paes Barreto Marcondes Souza
	Cleonice A.M. Bento
Order of Authors Secondary Information:	
Response to Reviewers:	Methods Clones of the antibodies used should be mentioned Dear reviewer, we have included the antibody clones used in the methodology Results Point 1. The 100% positivity for CD45 should be mentioned in the result section. e.g. P13L49-52: On the other hand, higher frequency of T cells expressing TLR2 and TLR4 was identified in the gate containing larger and more granular CD45+ cells in blood samples from CCM patients (Fig.S2A). Dear reviewer, thank you for the suggestion. We included this information to the original sentence. Editor's note: Please make these minor revisions. Point 2. P16 L2-5 In the text it is unclear if the authors mean double positive IL-17+IFNγ+ T cells. Please clarify in the text. ... "these TLR ligands significantly elevated the proportion of IL-17 and IFN--producing (CD4+ and CD8+) T cells in CCMA sympt and, mainly, CCMSympt patients (Fig. 2)." Dear reviewer, thank you for the suggestion. Change was made Discussion The CD14 independent activation of T cells by LPS in vitro is not enough to conclude that reduced level of sCD14 in symptomatic patients might lead back to an increased LPS/sCD14 uptake via T cells. This is an overinterpretation of the results: P20 L34-41 In addition, soluble CD14 (sCD14) can be involved in CCM-derived T cells responsiveness to LPS signaling in cells lacking membrane-bound CD14. Thus, the lower sCD14 levels in CCMSympt patients observed by some authors [33] may be explained by an uptake of LPS/sCD14 complex by TLR4+ T cells. Dear reviewer, thank you for the suggestion. Change was made
Additional Information:	
Question	Response
Is this study a clinical trial? A clinical trial is defined by the World Health Organisation as 'any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on	No

Elevated proportion of TLR2- and TLR4-expressing Th17-like cells and activated memory**B cells was associated with clinical activity of Cerebral Cavernous Malformations****TLR⁺Th17-like cells and memory B cells in CCM patients**

Camilla Castro^{a,b}, Hugo A. A. Oyamada^{a,b}, Marcos Octávio S. D. Cafasso^a, Lana M. Lopes^{a,b},
 Clarice Monteiro^{a,b}, Priscila M. Sacramento^{a,b}, Soniza Vieira Alves-Leon^{c,d}, Gustavo da Fontoura
 Galvão^e, Joana Hygino^{a,c}, Jorge Paes Barreto Marcondes de Souza^e, Cleonice A. M. Bento^{a,b,c}

From the ^aDepartment of Microbiology and Parasitology/ Federal University of the State of Rio
 de Janeiro; ^bPost-graduate Program in Microbiology/University of the State of Rio de Janeiro,
^cPost-graduate Program in Neurology and ^dTranslational Neuroscience Laboratory (LabNet)/
 University of the State of Rio de Janeiro; ^eDepartment of Neurology, Universidade Federal do Rio
 de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

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@unirio.br

List of abbreviations

CASH	cerebral cavernous angioma with symptomatic hemorrhage
CCM	Cerebral cavernous malformations
CCM _{Asympt}	Asymptomatic cerebral cavernous malformations
CCM _{Sympt}	Symptomatic cerebral cavernous malformations
CNS	Central Nervous System
DAMPs	danger-associated molecular patterns
EDSS	Expanded disability status scale
GD	gut dysbiosis
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GNB	Gram-negative bacteria
GPB	Gram-positive bacteria
IFN- γ	interferon gamma
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1 receptor
LPS	lipopolysaccharides
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mCD14	membrane CD14
MMP-2	matrix by matrix metalloproteinase-2
MS	multiple sclerosis
MyD88	myeloid differentiation primary response protein 88
NF- κ B,	nuclear factor- κ B
NMOSD	neuromyelitis optic spectrum disorders
PAMP	pathogen-associated molecular pattern

1	PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
2	sCD14	soluble CD14
3		
4	SI	stimulation indexes
5		
6	T _{FH}	follicular helper T
7		
8	TLR	toll-like receptor
9		
10	TNF	tumor necrosis factor
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		
36		
37		
38		
39		
40		
41		
42		
43		
44		
45		
46		
47		
48		
49		
50		
51		
52		
53		
54		
55		
56		
57		
58		
59		
60		
61		
62		
63		
64		
65		

Abstract

Background: Recent evidences have suggested the involvement of toll-like receptor (TLR)-4 in the pathogenesis of cerebral cavernous malformations (CCM). Elevated frequency of TLR⁺T-cells has been associated with neurological inflammatory disorders. As T-cells and B-cells are found in CCM lesions, the objective of the present study was to evaluate the cytokine profile of T-cells expressing TLR2 and TLR4, as well as B-cell subsets, in asymptomatic (CCM_{Asympt}) and symptomatic (CCM_{Sympt}) patients.

Methods: For our study, the cytokine profile from TLR2⁺ and TLR4⁺ T-cell and B-cell subsets in CCM_{Asympt} and CCM_{Sympt} patients was investigated using flow cytometry and ELISA. T-cells were stimulated *in vitro* with anti-CD3/anti-CD28 beads or TLR2 (Pam3C) and TLR4 (LPS) ligands.

Results: CCM_{Sympt} patients presented a higher frequency of TLR4⁺(CD4⁺ and CD8⁺) T-cells and greater density of TLR4 expression on these cells. With regard to the cytokine profile, the percentage of TLR2⁺ and TLR4⁺ Th17 cells was higher in CCM_{Sympt} patients. In addition, an elevated proportion of TLR4⁺Tc-1 cells, as well as Tc-17 and Th17.1 cells expressing TLR2 and TLR4, was observed in the symptomatic patients. By contrast, the percentage of TLR4⁺IL-10⁺CD4⁺ T cells was higher in the CCM_{Asympt} group. Both Pam3C and LPS were more able to elevate the frequency of IL-6⁺CD4⁺T cells and Th17.1 cells in CCM_{Sympt} cell cultures. Further, in comparison with asymptomatic patients, purified T-cells from the CCM_{Sympt} group released higher levels of Th17-related cytokines in response to Pam3C and, mainly, LPS, as well as after activation via TCR/CD28. Concerning the B-cell subsets, a higher frequency of memory and memory activated B-cells was observed in CCM_{Sympt} patients.

Conclusions: Our findings reveal an increase in circulating Th17/Tc-17 cell subsets expressing functional TLR2 and, mainly, TLR4 molecules, associated with an increase in memory B-cell subsets in CCM patients with clinical activity of the disease.

Keywords: cerebral cavernous malformations; T cells; Th17 cells, TLR; cytokines; B cells; LPS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Introduction

Cerebral cavernous malformations (CCM), or cavernous angiomas, are vascular lesions consisting mainly of clusters of grossly dilated brain capillaries presenting altered permeability due to the loss of tight junctions and muscular and elastic tissues, which predisposes patients to increased risk of hemorrhagic stroke, epilepsy and other neurological disorders [1]. CCMs are among the most common vascular malformations of the Central Nervous System (CNS) with an estimated prevalence ranging from 0.4 to 0.9%, mostly detected in adolescents and young adults [2,3]. Although the majority of CCM cases are sporadic, approximately 20% are inherited as an autosomal dominant trait and, different from sporadic cases, the inherited disease manifests with multiple lesions [1,4]. In both sporadic and familial cases, CCM results from a mutation at one of three CCM gene loci, CCM1/Krit1, CCM2/MGC4607, and CCM3/PDCD10. These genes encode components of a heterotrimeric intracellular adaptor protein complex, named CCM complex [2–5], that stabilizes the junctions of endothelial cells by inhibiting overactivation of the MEKK3-KLF2/4 signaling pathway [6,7]. Despite the knowledge of CCM complex involvement, the severity and natural course of the disease are highly variable, even in patients carrying the same genetic mutations [1–3], suggesting the existence of others genetic/epigenetic factors and/or environmental disease modifiers, some of which involving inflammatory mediators, that affect disease outcomes, probably by activating the MEKK-KLF2/4 pathway [8,9].

The risk of symptomatic CCM has been associated with elevated plasma levels of the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-2, interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α and lower concentrations of the anti-inflammatory cytokine IL-10 [10,11]. In addition, gene polymorphisms expected to increase the expression of membrane CD14 (mCD14) and toll-like receptor (TLR)-4 have been correlated with more severe CCM disease [10,11]. The

mCD14/TLR4 complex forms a pattern recognition receptor classically expressed on monocytes, which is responsible for the recognition of lipopolysaccharides (LPS), a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) from Gram-negative bacteria (GNB). Upon LPS engagement, the CD14/TLR4, in association with myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88), activates nuclear factor (NF)- κ B, promoting the production of pro-inflammatory cytokines [12,13]. Interestingly, in experimental model of the disease, LPS, by activating TLR4-MEKK3-KLF2/4 signaling in endothelial cells, accelerated CCM formation in the brain of those animals [14]. Although this study have demonstrated that LPS-induced brain CCM lesions did not depend on were a phenomenon independent of local immune cells, macrophages, B cells and (CD4⁺ and CD8⁺) T cells have been observed in perivascular regions of CCM lesions in patients [14]. Moreover, immunocomplexes consisting of IgG and terminal products of complement activation were also detected in CCM lesions [6]. Interestingly, analysis of the complementarity-determining regions 3 (CDR3) sequence of the variable domains of these IgG revealed a local Ig production containing somatic hypermutation into CDR3 regions [6], a genetic event classically dependent on CD4⁺ T cell help [7,15].

According to the pattern of secreted cytokines, human effector CD4⁺ T cells are divided into three major subsets, Th1 (IFN- γ ⁺), Th2 (IL-4⁺) and Th17 (IL-17⁺). Th1 cells not only favor macrophage activation by releasing IFN- γ , but also assist CD8⁺ T lymphocytes differentiation into cytotoxic cells able to kill target cells through the release of perforin and granzymes [16,17]. Concerning the cytokine pattern, activated CD8⁺ T cells can be named Tc-1 (IFN- γ ⁺) [18] or Tc-17 (IL-17⁺) [19]. The signature cytokines produced by Th2 (IL-4) and Th17 (IL-17) cells are implicated in inflammatory processes involving eosinophil and neutrophil activation, respectively [17,20,21]. With regard to adaptive humoral immune response, the production of IgG, IgA and IgE neutralizing antibodies classes by activated B cells, and the generation of memory B cells, are dependent on follicular helper T cells (T_{FH}), a CD4⁺ T cell phenotype

identified by the high expression of surface CXCR5 and production of the signature cytokine IL-21 [7,15]. Although these lymphocytes have been implicated in protection against different pathogens, some effector T cell subsets, mainly those expressing TLR2 and TLR4, are involved in the severity of neurological inflammatory disorders, such as neuromyelitis optic spectrum disorders (NMOSD) [22,23] and the multiple sclerosis (MS) [24,25], both autoimmune demyelinating diseases of the CNS. Despite high T cell numbers in CCM lesions, no study has yet been designed to analyze the cytokine profile of these lymphocytes, particularly among T cell subsets expressing TLRs. It is possible that PAMPs may adversely impact the outcome of CCM by favoring the activation of pathogenic TLR⁺ T cells. Therefore, in the present study, we aimed to evaluate the frequency and cytokine profile of circulating CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets expressing TLR2 and TLR4 in asymptomatic and symptomatic CCM patients. Also, we analyzed B cell subsets.

2. Methodology

Patients

This transversal study included 37 CCM patients, 14 asymptomatic [CCM_{Asympt}, mean age $\pm$ SD, 45 $\pm$ 13.1 years (7 familial/multifocal, 7 sporadic/solitary)] and 23 symptomatic [CCM_{Sympt}, mean age $\pm$ SD, 40 $\pm$ 13.6 years (3 familial/multifocal, 17 sporadic/solitary)] from the Federal University of Rio de Janeiro and Brazil Cavernoma Alliance. The majority of CCM patients were women (n= 25/37; 10 asymptomatic and 15 symptomatic). Developmental venous anomaly (DVA) was identified in 03 asymptomatic and 09 symptomatic patients. Among symptomatic patients, the clinical manifestations were lesional hemorrhages (87%, n=20) and seizure crisis (13%, n=03). We excluded patients who had undergone partial or complete CCM lesion resection or any prior brain irradiation. Except for two patients with epilepsy, who were using Oxcarbazepine (Trileptal) to control their seizure crisis, all other CCM patients recruited were not taking any medication. As the control group (Ctrl), 20 healthy individuals with normal brain Magnetic resonance imaging (MRI) images (10 women and 10 men) (mean age $\pm$ SD, 40.1 $\pm$ 11.7 years) were also recruited from Federal University of the State of Rio de Janeiro. Subjects with a history of autoimmune disease, neoplasms, smoking, or treatment with psychotropic drugs were excluded, as well as pregnant women. The Ethics Committee for Research on Human Subjects at the Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO, CAAE 69409617.9.0000.5258) approved the study and blood was collected only after written informed consent was obtained from each individual.

Flow cytometry

Mouse anti-human monoclonal antibodies (mAbs) directed against CD3-PerCpCy5.5 (OKT3 clone), CD4-SB600 (SK-3 clone), CD8-FITC (3B5 clone), CD14-APC (61D3 clone), CD16-PE (CB16 clone), CD62L-FITC (Dreg-56 clone), CD45-PE (2D1 clone), CD45RO-PE-

Cy7 (UCHL1 clone), TLR2-PE (TL2.1 clone), TLR4-PE (HTA125 clone), CD19-APC (HIB19 clone), CD27-FITC (CLB-27/1 clone), CD38-PE (HIT2 clone), IL-6-PE-Cy7 (MQ2-13A5 clone), IL-10-eFluor450 (JESE-9D7 clone), IL-17-Alexa Fluor 647 (N49-653 clone) and IFN- γ -Alexa Fluor780 (4S.B3 clone), and all isotype control antibodies were purchased from eBioscience (Thermo Fischer scientific, USA). To identify different cytokine-producing T cells subsets [Th1 (CD3⁺/CD4⁺ INF- γ ⁺), Tc-1 (CD3⁺/CD8⁺ INF- γ ⁺), Th17 (CD3⁺/CD4⁺ IL-17⁺), Th17.1 (CD3⁺/CD4⁺ INF- γ ⁺IL-17⁺), Tc-17 (CD3⁺/CD8⁺ IL-17⁺) and Treg-like cells (CD3⁺CD4⁺IL-10⁺], capable of expressing TLR2 or TLR4, as well as B cells (CD19, CD27, CD38 and IL-10), whole peripheral blood (1 mL) of CCM patients was cultured in a 24-well flat microtiter plate in the absence of stimulus or in the presence of TLR2 ligand [synthetic triacylated lipopeptide (Pam3Csk4 - 1 μ g/ml)] (InvivoGen, San Diego, CA, USA) or TLR4 agonist [LPS (100 ng/ml) from *Escherichia coli*] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)]. The TLR concentrations were established in studies conducted by Voo et al [26]. The cell cultures were kept for 24 h at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. For cytokine measurement optimization, brefeldin A (10 μ g/mL; Sigma-Aldrich) was added 4 h before cell staining with mAbs. Briefly, whole blood cells were incubated with various combinations of mAbs for surface markers (CD3, CD45R0, CD14, CD16, CD4, CD8, TLR2, TLR4, CXCR5, CD19, CD27 and CD38) for 30 minutes at room temperature in the dark, according to manufacturer's instructions. The cells were washed with PBS + 2%FBS, and then, the whole blood cells were lysed with Fix/Lyse solution (BD Pharmingen, San Diego, USA) for 10 minutes at room temperature followed by cell permeabilization, which was performed by incubating cells in Cytofix/Cytoperm solution (BD Pharmingen, San Diego,) at 4°C for 20 minutes. After washing, the mAbs for intracellular cytokine staining (IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ and IL-21) were added in different combinations and incubated for 30 minutes at 4°C. To prevent non-specific staining of cells expressing FcRs, FcR blocking reagent was used (Miltenyi Biotec, cat. 130.059.901). The cells were acquired on

Attune NxT flow cytometers (Thermo Fisher Corporation) 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 the acquisition of 100,000-300,000 events, lymphocytes were gated based on forward and side scatter properties after the exclusion of dead cells, using propidium iodide, and doublets.

T cell cultures, cell proliferation and cytokine production

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy subjects and CCM patients were separated by a Ficoll-Paque gradient, and then submitted to negative selection using magnetic columns to obtain T cells according to manufacturer's instructions (EasySep™, cat. 17951, StemCell Technology™, Vancouver, Canada). Briefly, 50 µL of a cocktail containing monoclonal antibodies directed against B cells, monocytes, dendritic cells and NK cells were added to a 15 mL tube containing approximately 5×10^7 PBMC/mL. After 5 minutes of incubation, 40 µL/mL of magnetic beads were added to the cell suspension. After rapidly mixing, the cell suspension was incubated at room temperature for 5 minutes. Subsequently, 4 mL of HBSS were added to the cell suspension and, the tube was placed on the magnet for 5 minutes. Finally, the supernatants were recovered. The purity of the CD3⁺ cells was >98 %, as measured by flow cytometry (data not shown). Enriched T cell cultures were then maintained with RPMI-1640 medium supplemented with 2 µM of L-glutamine (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), 10% fetal calf serum, 20 U/mL of penicillin, 20 µg/mL of streptomycin and 20mM of HEPES buffer. In some cultures, Pam3Csk4 (Pam3C, 1 µg/mL) or LPS (100 ng/mL) was added. As a positive control, some T cell cultures were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 beads (10 µL/mL). All cell cultures were kept for 48h at 37°C and 5% CO₂ before evaluation of T cell proliferation and cytokine release. This culture duration was established by our group from time-course T cell proliferation analyzes in response to LPS and Pam3C (data not shown).

The T cell proliferation was measured by [³H] thymidine incorporation added to cultures at 4 µCi/well 8 h prior to the conclusion of the 2-day incubation period. The cells were harvested in glass fibre 8 filters in an automatic cell harvester (Beckman Coulter L56500) and radioactive incorporation was measured using a liquid scintillation counter. The results were shown as stimulation indexes (SI), that is, the mean count per minute (cpm) of stimulated T cells was divided by the mean cpm of unstimulated T cells from the same patient group. An SI > 3 was considered a positive response.

The cytokine levels secreted by the T cells in the supernatants were quantified using OptEIA ELISA kits (BD, Pharmingen, San Diego, CA), according to manufacturer's instructions. Briefly, each ELISA was performed using pairs of antibodies against IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-10, IL-17A (IL-17), IL-21, GM-CSF and IFN-γ. The reaction was revealed with streptavidin-horseradish peroxidase, using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as substrate. Recombinant human cytokines, at concentrations ranging from 3.5–500 pg/mL, were used to construct standard curves. The plates were read by using MultiskanTM FC microplate photometer (Thermo Fischer Scientific).

Statistical analyzes

The statistical analysis was performed using Prism 8.0 software (GraphPad Software). All immunological evaluations were performed in triplicate for each individual and the intra-assay variability ranged from 9.3% to 17.1% (median value of 10.1%) as calculated by the software above. Comparisons between immune assays in cell cultures from the three different groups were performed with ANOVA followed by Tukey test for data with Gaussian distribution and by Kruskal-Wallis followed by Dunn's test for data without Gaussian distribution. The results were also corrected by Bonferroni. The nonparametric Mann-Whitney U test and the Student's t test were applied to determine whether the two groups were statistically different for

nonparametric and parametric variables, respectively. Significance in all experiments was $p < 0.05$.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Results

Activated effector CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing functional TLR2 and, mainly, TLR4 are expanded in symptomatic CCM patients.

For this study peripheral blood was collected from 37 CCM patients, 14 asymptomatic (CCM_{Asympt}, mean $\pm$ SD, 45 $\pm$ 13.1 years) and 23 symptomatic (CCM_{Sympt}, mean $\pm$ SD, 40 $\pm$ 13.6 years) (Table). For control group (Ctrl), blood samples were obtained from 20 healthy subjects. As expected [3], the majority of CCM patients was female and the Sporadic form of disease was dominant. Out of the 23 symptomatic patients, 3 (13%) presented with epilepsy and the other 20 (87%) presented with at least one episode of bleeding. Among the 3 patients with epilepsy, 2 were under pharmacological treatment with oxcarbazepine at the time of blood sampling (Table). Despite the use of therapy to control epileptic seizures, these two patients were not excluded because no difference was observed regarding immunological assays among them and the other symptomatic patients. Developmental venous anomaly (DVA) was identified in 03 asymptomatic and 09 symptomatic patients. The majority of patients and healthy subjects were Caucasians.

The main objective of this study was to evaluate the expression of TLR2 and TLR4 on (CD4⁺ and CD8⁺) T lymphocytes from CCM_{Asympt} and CCM_{Sympt} patients, as well as the cytokine profile of these T cell subsets. Taking into account the FSC versus SSC parameters (Fig. S1A), the frequency of (CD4⁺ and CD8⁺) T cells expressing TLR2 and TLR4 in the classical T cell gate was low and showed no difference between healthy subjects (control group) and CCM_{Asympt} or CCM_{Sympt} patients (Fig. S1B). Furthermore, these T cells were negative for IL-6, IL-17, IFN- γ and IL-10 cytokines (data not shown). On the other hand, higher frequency of T cells expressing TLR2 and TLR4 was identified in the gate containing larger and more granular CD45⁺ cells in blood samples from CCM patients (Fig.S2A). These T cells were negative for CD14 and CD16 markers, excluding the presence of monocytes and NK cells (Fig. S2). Moreover, taking into account the expression of CD62L and CD45RO (Fig. S2), the great majority of these larger

CCM-derived T cells exhibited central memory (CD45R0⁺CD62L⁺) and effector memory (CD45R0⁺CD62L⁻) phenotypes (Fig. S2B). Of note, these larger T cell subsets were almost absent in the control group, which made any additional immune analysis impossible (Fig. S1 and Fig. 1B). Among CCM patients, by using the gating strategy shown in Figure 1A, the proportion of TLR4⁺ (CD4⁺ and CD8⁺) T cells was found to be significantly higher in CCM_{Sympt} patients (Fig. 1B). A similar tendency was observed for TLR2⁺ CD4⁺ T cells (p=0.0684) and TLR2⁺ CD8⁺ T cells (p=0.0883) (Fig. 1B). Taking into account the mean fluorescence intensity (MFI), the expression of TLR4 molecules per cell was significantly higher on (CD4⁺ and CD8⁺) T cells from CCM_{Sympt} patients (Fig. 1C and 1D).

Concerning the cell phenotypes, even without stimulation, a higher frequency of TLR2⁺ and TLR4⁺ CD4⁺ T cells able to produce IL-6 (Fig. 1E) and IL-17 (Fig. 1F) was detected in the CCM_{Sympt} group. Similarly, CCM_{Sympt} patients also showed a significantly higher percentage of both IL-17⁺CD8⁺ T cells, positive for TLR2 and TLR4 (Fig. 1F), and IFN-γ⁺ TLR4⁺ CD8⁺ T cells (Fig. 1G) than CCM_{Asympt} patients. On the other hand, CCM_{Asympt} group had a higher percentage of IL-10⁺TLR4⁺CD4⁺ T cells (Fig. 1H). From combinatorial analyses of different cytokines, we observed that the frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, expressing TLR2 or TLR4, able to simultaneously produce IL-17 and IFN-γ was significantly higher in CCM_{Sympt} than in CCM_{Asympt} patients (Fig. 2A and 2B), with no difference for dual positive cells for IL-17 and IL-6 (Fig. S3A) or IFN-γ and IL-6 (Fig. S3B). Unfortunately, as previously demonstrated, the extremely low frequency of these T cells in samples from control group (healthy subjects) made any further analysis of the cytokine profile impossible.

To determine if these TLRs are functional, the T cell subsets were reanalyzed after the addition of Pam3C and LPS. In general, CD4⁺ T cells were more responsive to TLR agonists than CD8⁺ T cells (Fig 1E to H). Only in CD4⁺ T cell cultures Pam3C and LPS increased the frequency of IL-6⁺ cells, mainly among CCM_{Sympt} patients (Fig. 1E). Although neither Pam3C

nor LPS changed the percentage of TLR⁺ (CD4⁺ and CD8⁺) T cells able to produce IL-17 (Fig. 1 F) and IFN- γ (Fig. 1 G), these TLR ligands significantly elevated the proportion of IL-17⁺IFN γ ⁺ (CD4⁺ and CD8⁺) T cells in CCM_{Asympt} and, mainly, CCM_{Sympt} patients (Fig. 2). Finally, the proportion of IL-10⁺ TLR4⁺ CD4⁺ T cells was only up regulated by LPS in CCM_{Asympt} patients (Fig. 1H).

Purified CD4⁺ and CD8⁺ T cells from symptomatic CCM patients were more responsive to stimulation via TCR/CD28 complex and ligands for TLR2 and TLR4

In order to verify whether T cells are directly responsive to TLR2 and TLR4 ligands, T cells from CCM patients were purified and cultured for 48 h with Pam3C and LPS. As a positive control, the cells were stimulated with anti-CD3/anti-CD28-coated beads. Additionally, the same analysis was performed with T cell cultures from 20 healthy adult subjects. As demonstrated in figure 3A, no difference concerning T cell proliferation was observed between CCM patients (asymptomatic and symptomatic) and the control group in response to either CD3/CD28 mAbs or TLR ligands. With regard to cytokine release, T cell activation via TCR/CD28 complex induced higher production of IL-6, IL-17, GM-CSF and IL-21 in cell cultures from CCM_{Sympt} patients when compared with both CCM_{Asympt} patients and the control group (Fig. 3B). No difference was observed for TNF- α , IFN- γ and IL-10. Among TLRs, LPS was more potent than Pam3C in inducing the release of IL-6, TNF- α , IL-1 β , GM-CSF, IL-17 and IL-21 by T cells in the CCM_{Sympt} group than in the CCM_{Asympt} group (Fig. 3C). IFN- γ levels were also higher in LPS-stimulated T cell cultures from CCM_{Sympt} patients (Fig. 3C). Similar to flow cytometry result, the release of IL-10 was significantly higher in LPS-activated T cells from CCM_{Asympt} patients (Fig. 3C). The levels of those cytokines in the supernatants from the control group were almost undetectable (data not shown).

Elevated frequency of memory B cell subsets is observed in symptomatic CCM patients.

In addition to T cells, B cells and antibodies have been found in CCM lesions [6,27,28]. By using CD19, CD27 and CD38, we identified naïve ($CD19^+CD27^-CD38^+$), memory ($CD19^+CD27^+CD38^-$) and memory activated ($CD19^+CD27^+CD38^+$) B cells [29–31]. Taking into account the gate strategy shown in the figure 4A, a higher frequency of $CD19^+CD27^+CD38^-$, $CD19^+CD27^+CD38^+$ cells (Fig. 4B), and $CD19^+CD27^+CD38^+$ cells (Fig. 4C and 4D) was observed in CCM_{Sympt} patients as compared with control group and CCM_{Asympt} group. All these B cells were negative for IL-10 (Fig. A). No difference in the frequency of B cell subsets was observed between CCM_{Asympt} patients and control group (Fig. 4B and 4D).

Interestingly, even showing low frequency, the percentage of $CD19^+CD27^+CD38^+$ in larger and more granular cell gate was significantly higher in samples from CCM_{Sympt} than CCM_{Asympt} patients (Fig. 4E and 4F). In contrast, the proportion of these cells able to produce IL-10 was significantly higher in CCM_{Asympt} patients (Fig. 4G). Of note, these cells were negative for CD14, and very low frequency were positive for CD16 ($2.78\% \pm 1.96\%$) (Fig. S2A).

Discussion

CCMs are vascular lesions consisting mainly of clusters of brain capillaries that are grossly dilated and present altered permeability. This predisposes patients to greater risk of hemorrhagic stroke, epilepsy and various neurological deficiencies [1]. Despite the knowledge about the genes involved in the disease, severity and outcomes of CCM depends on the activation of MEKK3-KLF2/4 pathway by external triggers [32], such as inflammatory mediators. In CCM, elevated plasma levels of IL-1 β , IL-2, IFN- γ and TNF- α have been associated with disease activity [11, 33], probably by activating the MEKK3-KLF2/4 pathway [8, 9]. Interestingly, in murine model of CCM, the severity of the disease was associated with production of pro-inflammatory cytokines by endothelial cells simulated via CD14/TLR4 pathway by LPS [14]. Although the role of this PAMP in the experimental model of CCM did not depend on local immune cells, abundant innate and specific immune cells have been detected in the brain lesions in patients. Although resting T cells express very low TLR levels, these pattern receptors are strongly expressed in chronically-activated T cells associated with severity of multiple sclerosis (MS) and neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD), both autoimmune diseases of the CNS [22,24,34,35].

In the present study, CCM_{Sympt} patients (87% with lesional hemorrhage and 13 % with seizure crisis) had a higher frequency of (CD4⁺ and CD8⁺) T lymphocytes expressing TLR4 gated in a region containing larger and more granular cells than CCM_{Asympt} patients. This region was absent in the samples of the control group. Among the patients, the intensity of TLR4 molecule expression per (CD4⁺ and CD8⁺) T cell was also higher in symptomatic individuals. Corresponding with their activated state, these cells were positive for some pro-inflammatory cytokines, and CCM_{Sympt} patients presented a higher proportion of IL-6⁺CD4⁺ T cells, Th17-like cells and Tc-17-like cells IL-17 cells expressing TLR2 and TLR4 than CCM_{Asympt} patients. In addition, the symptomatic group had a higher proportion of TLR4⁺ Tc-1-like cells. Interestingly,

clinical activity of CCM was associated with an elevated percentage of dual IL-17⁺ and IFN- γ ⁺ (CD4⁺ and CD8⁺) T cells expressing TLR2 and TLR4. Further, the addition of Pam3C and LPS to the cell cultures increased, mainly in CCM_{Sympt} patients, the percentage of TLR2⁺ and TLR4⁺ CD4⁺ T cells capable of producing IL-6 and Th17.1 cells. Preliminary analysis did not show any significant correlation between the frequency of cytokine-producing TLR⁺ T cell subsets and brain lesion location (data not shown). Due to financial limitations, it was not possible to evaluate the expression of other TLRs in combination with different cytokines. In line with our findings, elevated frequency of TLR⁺ Th17 cell subsets has been associated with MS and NMOSD [24,26,37,36-38].

The relationship between increased frequency of Th17 cell subsets, which classically express CCR6, and CCM clinical activity is notable, since the entry of T cells in the CNS is facilitated by the choroid plexus, a region with weak blood-brain barrier and high expression of CCL20, natural ligand of CCR6 [24,39,40]. In CCM areas, the local production of IL-17 and IFN- γ by Th17.1 cells would activate other local (microglia) and migrant (monocytes and B cells) immune cells, as well as endothelial cells, which increase the tissue damage. If reproduced in a larger sample size, these findings would indicate the possible involvement of autoimmune components in CCM prognosis.

Besides the expansion of pathogenic Th17 cells, autoimmune diseases are classically associated with impaired production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by regulatory CD4⁺ T cells [41–45]. In fact, an inverse relationship between the quantity of iron accumulated in the CCM and IL-10 was reported after a symptomatic hemorrhage [10]. Similarly, in our study, lower percentages of IL-10⁺TLR4⁺CD4⁺ T cells were observed in CCM_{Sympt} patients. Among the TLR ligands, LPS, but not Pam3C, enhanced both the proportion of IL-10⁺TLR4⁺CD4⁺ T cells and IL-10 released by purified T cells only in asymptomatic patients.

It is known that LPS responsiveness is amplified by CD14, a molecule expressed on

monocyte surfaces [12,13]. Gene polymorphisms expected to increase the expression of both membrane CD14 (mCD14) and TLR-4 have been correlated with more severe CCM disease [10,11]. The mCD14/TLR4, when complexed to LPS, triggers intracellular signaling cascades that upregulate the production of pro-inflammatory cytokines [12,13]. In the present study, although TLR2⁺ and TLR4⁺ T cells from CCM patients were negative for CD14, these cells responded directly to Pam3C and LPS. Here, the release of IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-17, GM-CSF and IL-21 by purified T cells was significantly higher in CCM_{Sympt} than in CCM_{Asympt} patients. In MS patients, the release of IL-6, IFN- γ , IL-17 and GM-CSF by Pam3C-activated CD4⁺ T cells was directly associated with disease activity [24]. A similar clinical correlation was observed for IL-17 levels released by Pam3C-stimulated CD8⁺ T cell cultures from MS patients [40]. Rajaiah et al. (2015) demonstrated that while CD14 is essential for LPS-induced TLR4 activation of TRIF-mediated signaling in macrophages, this accessory molecule is not required for MyD88-mediated signaling via LPS/TLR4 complex, allowing MAPK and NF- κ B activation, and TNF- α and IL-6 production [46]. In addition, soluble CD14 (sCD14) can be involved in CCM-derived T cells responsiveness to LPS signaling in cells lacking membrane-bound CD14. Thus, the lower sCD14 levels in CCM_{Sympt} patients observed by some authors [33] may be explained by an uptake of LPS/sCD14 complex by TLR4⁺ T cells.

In light of the discussed above, clinical conditions associated with high circulating concentrations of LPS, as well as other PAMPs, can be triggering factors for disease activity. Interestingly, gut dysbiosis with overgrowth of GNB species has been associated with clinical activity of CCM [47-49]. Furthermore, endogenous TLR ligands, named danger-associated molecular patterns (DAMPs), could also contribute to the disease. Some of these DAMPs are metabolic products from the destruction of extracellular matrix by matrix metalloproteinase-2 (MMP2) produced by activated immunity cells in CCM lesions [50,51]. Other DAMPs, such as the intracellular protein HMGB, by activating immune cells through TLR2 and TLR4 [52,53],

could also contribute to CCM pathogenesis.

Besides TLR signaling, the cytokine profile of TCR/CD28-activated T cells from CCM patients in our study was also different as an expression of clinical activity. In this context, elevated production of IL-6, IL-17 and IL-21 by purified T cells from CCM_{Sympt} individuals was observed as compared with healthy subjects and asymptomatic patients. Concerning the cytokine profile by mitogen-activated T cells, no difference between CCM_{Asympt} and control group. These results are interesting, because pathogenic GM-CSF⁺Th17 cell subsets, by promoting recruitment and activation of peripheral dendritic cells and monocytes, are implicated in MS pathogenesis [54-56], and this phenotype can also contribute to the infiltration of these phagocytes into CCM areas. Furthermore, elevated release of IL-21 and IL-6 by CCM_{Sympt}-derived T cells in response to both TLR4 ligand and TCR/CD28 signaling should contribute to local IgG production.

In addition to IgG deposits, studies by Shi et al. demonstrated the presence of well-organized clusters of CD4⁺ T cells, B cells, and plasma cells, which are found in CCM lesions [6,28]. To date, it is known that somatically hypermutated IgG strictly depends on T_{FH} cells, a newly identified CD4⁺ T cell subset capable of producing IL-21 and IL-6 [39], both cytokines implicated in B cell activation, generation of memory B cells and long-lived plasma cells in lymph nodes [15,57]. The involvement of T_{FH} cells needs to be investigated, since the activation of T_{FH}/B cell axis could induce CCM lesions mediated by local complement activation and *in situ* IgG production, as described by Shi et al. [6].

With regard to B cell subsets, a higher proportion of memory (CD27⁺CD38⁻) and memory activated (CD27⁺CD38⁺ and CD27⁺CD38⁺⁺) B cells was detected in CCM_{Sympt} than in CCM_{Asympt} patients and healthy subjects. Notably, an expansion of the CD27⁺CD38⁺⁺ B cell subset was identified as a biomarker for relapse prediction in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (ANCA)-associated vasculitis (AAV) [29], humoral autoimmune diseases involving small to medium-sized blood vessels [1]. Therefore, there is a possibility of involvement of the CD38⁺⁺

B cell subset in CCM pathogenesis. Indeed, CCM_{Sympt} patients presented a higher proportion of memory B lymphocytes, among larger and granular cells, than CCM_{Asympt} patients. In contrast, the proportion of these cells able to produce IL-10 was significantly higher in CCM_{Asympt} patients.

Although our findings are interesting, this study has some limitations. First, this is a cross-sectional study with results based on cell cultures. A prospective study design could allow to drawn conclusions about the causality between the frequency of different T and B cell subsets and the risk of new clinical events among CCM patients. Moreover, the involvement of other TLRs and their ligands needs to be investigated.

Conclusions

In summary, our results reveal an expansion of effector TLR2⁺ and, mainly, TLR4⁺ T cells able to produce pro-inflammatory cytokines related to Th17 and Tc-17 phenotypes in symptomatic CCM patients, in association with a decrease in the frequency of IL-10-secreting TLR4⁺ T cells. A similar cytokine profile was observed in TCR/CD28-activated T cells from those patients. Furthermore, expansion of memory B cell subsets was also observed in patients with clinically active CCM.

Acknowledgements

Not applicable

Author Contributions

JM, SAL and GFG contributed by discussing hypothesis generation, patient monitoring and sample collection throughout the CCM cohort of the University Hospitals of the Federal University of Rio de Janeiro and Federal State University of Rio de Janeiro. CAMB and JM designed the study and wrote the paper. CC, HAAO, MOSDC, JH, CM, PMS and LML performed the experiments. CAMB and CC analyzed the data. Brazil Cavernous Alliance contributed with vital reagents. All authors participated in critical revision of the manuscript, provided important intellectual input and approved the final version. All authors read and approved the final manuscript.

Funding Sources

This work was supported by the funds provided by the Brazilian Parliamentary Rare Diseases Initiative.

Data Availability Statement:

All data generated or analyzed during this study are included in this article and its supplementary material. Further enquiries can be directed to the corresponding author.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Ethics Committee for Research on Human Subjects at the Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO) (CAAE:69409617.9.0000.5258) and blood samples were collected only after written informed consent was obtained from each individual.

Consent for publication

Not applicable

Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare

References

1. Maraire JN, Awad IA. Intracranial Cavernous Malformations: Lesion Behavior and Management Strategies. *Neurosurgery*. 1995;37(4).
2. Stapleton CJ, Barker FG. Cranial cavernous malformations natural history and treatment. *Stroke*. 2018;49(4):1029–35.
3. Snellings DA, Hong CC, Ren AA, Lopez-Ramirez MA, Girard R, Srinath A, et al. Cerebral Cavernous Malformation: From Mechanism to Therapy. *Circulation research* [Internet]. 2021;129(1):195–215. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34166073>
4. Caton MT, Shenoy VS. Cerebral Cavernous Malformations [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2021 [cited 2021 Jun 14]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30844171>
5. Zafar A, Quadri SA, Farooqui M, Ikram A, Robinson M, Hart BL, et al. Familial Cerebral Cavernous Malformations. *Stroke* [Internet]. 2019 May;50(5):1294–301. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/STROKEAHA.118.022314>
6. Shi C, Shenkar R, Du H, Duckworth E, Raja H, Batjer HH, et al. Immune Response in Human Cerebral Cavernous Malformations. *Stroke*. 2009;40(5):1659–65.
7. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* [Internet]. 2019 May;50(5):1132–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761319301918>

8. Yang J, Lin Y, Guo Z, Cheng J, Huang J, Deng L, et al. The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF- κ B activation. *Nature Immunology* [Internet]. 2001 Jul [cited 2021 Nov 16];2(7):620–4. Available from: http://www.nature.com/articles/ni0701_620
9. Huang Q, Yang J, Lin Y, Walker C, Cheng J, Liu ZG, et al. Differential regulation of interleukin 1 receptor and toll-like receptor signaling by MEKK3. *Nature Immunology*. 2004 Jan;5(1):98–103.
10. Lyne SB, Girard R, Koskimäki J, Zeineddine HA, Zhang D, Cao Y, et al. Biomarkers of cavernous angioma with symptomatic hemorrhage. *JCI Insight*. 2019;4(12):0–16.
11. Girard R, Zeineddine HA, Fam MD, Mayampurath A, Cao Y, Shi C, et al. Plasma Biomarkers of Inflammation Reflect Seizures and Hemorrhagic Activity of Cerebral Cavernous Malformations. *Translational Stroke Research*. 2018;
12. Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* [Internet]. 2021;78(4):1233–61. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y>
13. Zaroni I, Otsuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, et al. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like Receptor 4. *Cell*. 2011;147(4):868–80.
14. Tang AT, Choi JP, Kotzin JJ, Yang Y, Hong CC, Hobson N, et al. Endothelial TLR4 and the microbiome drive cerebral cavernous malformations. *Nature* [Internet]. 2017 May 10;545(7654):305–10. Available from:

[http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L616266405%0Ahttp://dx.doi.org/10.1038/nature22075)

[=L616266405%0Ahttp://dx.doi.org/10.1038/nature22075](http://dx.doi.org/10.1038/nature22075)

15. Vinuesa CG, Linterman MA, Yu D, MacLennan ICM. Follicular Helper T Cells. *Annual Review of Immunology*. 2016;34(1):335–68.
16. Couture A, Garnier A, Docagne F, Boyer O, Vivien D, Le-Mauff B, et al. HLA-Class II Artificial Antigen Presenting Cells in CD4+ T Cell-Based Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2019 May 17;10(MAY):1–11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01081/full>
17. Jin B, Sun T, Yu XH, Yang YX, Yeo AET. The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012;2012(Figure 1).
18. Dobrzanski MJ, Reome JB, Hollenbaugh JA, Dutton RW. Tc1 and Tc2 Effector Cell Therapy Elicit Long-Term Tumor Immunity by Contrasting Mechanisms That Result in Complementary Endogenous Type 1 Antitumor Responses. *The Journal of Immunology*. 2004 Feb 1;172(3):1380–90.
19. Liang Y, Pan HF, Ye DQ. Tc17 cells in immunity and systemic autoimmunity. *International Reviews of Immunology*. 2015 May 25;34(4):318–31.
20. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry Part A*. 2014.
21. Frank PG, Lisanti MP. ICAM-1: role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory*

Physiology [Internet]. 2008 Sep;295(3):H926–7. Available from:

<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00779.2008>

22. Barros PO, Dias ASO, Kasahara TM, Omelas AMM, Aguiar RS, Leon SA, et al. Expansion of IL-6+ Th17-like cells expressing TLRs correlates with microbial translocation and neurological disabilities in NMOSD patients. *Journal of Neuroimmunology* [Internet]. 2017 Jun;307:82–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.04.001>
23. Dias ASO, Sacramento PM, Lopes LM, Sales MC, Castro C, Araújo ACRA, et al. TLR-2 and TLR-4 agonists favor expansion of CD4+ T cell subsets implicated in the severity of neuromyelitis optica spectrum disorders. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* [Internet]. 2019 Sep;34(May):66–76. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.06.018>
24. Ferreira TB, Hygino J, Wing AC, Kasahara TM, Sacramento PM, Camargo S, et al. Different interleukin-17-secreting Toll-like receptor + T-cell subsets are associated with disease activity in multiple sclerosis. *Immunology*. 2018 Jun 1;154(2):239–52.
25. Miranda-Hernandez S, Baxter AG. Role of toll-like receptors in multiple sclerosis. *American journal of clinical and experimental immunology* [Internet]. 2013;2(1):75–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23885326> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3714200>

26. Voo KS, Bover L, Harline ML, Weng J, Sugimoto N, Liu Y-J. Targeting of Toll-like receptors inhibits CD4⁺ regulatory T cell function and activates lymphocytes in human PBMCs. *Journal of Immunology*. 2014;193(2):627–34.
27. Shi C, Shenkar R, Zeineddine HA, Girard R, Fam MD, Austin C, et al. B-Cell Depletion Reduces the Maturation of Cerebral Cavernous Malformations in Murine Models. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* [Internet]. 2016;11(2):369–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11481-016-9670-0>
28. Shi C, Shenkar R, Kinloch A, Henderson SG, Shaaya M, Chong AS, et al. Immune complex formation and in situ B-cell clonal expansion in human cerebral cavernous malformations [Internet]. Vol. 272, *Journal of Neuroimmunology*. Elsevier B.V.; 2014. 67–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.04.016>
29. von Borstel A, Land J, Abdulahad WH, Rutgers A, Stegeman CA, Diepstra A, et al. CD27⁺CD38^{hi} B Cell Frequency During Remission Predicts Relapsing Disease in Granulomatosis With Polyangiitis Patients. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(September):1–10.
30. Bergantini L, d'Alessandro M, Cameli P, Vietri L, Vagaggini C, Perrone A, et al. Effects of rituximab therapy on B cell differentiation and depletion. *Clinical Rheumatology*. 2020;39(5):1415–21.
31. Clavarino G, Delouche N, Vettier C, Laurin D, Pernollet M, Raskovalova T, et al. Novel strategy for phenotypic characterization of Human B lymphocytes

- from precursors to effector cells by flow cytometry. PLoS ONE. 2016;11(9):1–16.
32. Stockton RA, Shenkar R, Awad IA, Ginsberg MH. Cerebral cavernous malformations proteins inhibit Rho kinase to stabilize vascular integrity. *Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(4):881–96.
 33. Girard R, Zeineddine HA, Koskimäki J, Fam MD, Cao Y, Shi C, et al. Plasma biomarkers of inflammation and angiogenesis predict cerebral cavernous malformation symptomatic hemorrhage or lesional growth short communication. *Circulation Research*. 2018;122(12):1716–21.
 34. Cantorna MT, Waddell A. The vitamin D receptor turns off chronically activated T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014;1317(1):70–5.
 35. Cope AP. Studies of T-cell activation in chronic inflammation. *Arthritis research*. 2002;4:S197–211.
 36. van Langelaar J, van der Vuurst De Vries RM, Janssen M, Wierenga-Wolf AF, Spilt IM, Siepmann TA, et al. T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: Perspectives for early intervention. Vol. 141, *Brain*. Oxford University Press; 2018. p. 1334–49.
 37. Sales MC, Kasahara TM, Sacramento PM, Rossi ÁD, Cafasso MOSD, Oyamada HAA, et al. Selective serotonin reuptake inhibitor attenuates the hyperresponsiveness of TLR2⁺ and TLR4⁺ Th17/Tc17-like cells in multiple sclerosis patients with major depression. Vol. 162, *Immunology*. 2021. 290–305.
 38. Wing AC, Hygino J, Ferreira TB, Kasahara TM, Barros PO, Sacramento PM, et al. Interleukin-17- and interleukin-22-secreting myelin-specific CD4⁺ T cells

- resistant to corticoids are related with active brain lesions in multiple sclerosis patients. *Immunology* [Internet]. 2016 Feb;147(2):212–20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/imm.12552>
39. Teixeira B, Bittencourt VCB, Ferreira TB, Kasahara TM, Barros PO, Alvarenga R, et al. Low sensitivity to glucocorticoid inhibition of in vitro Th17-related cytokine production in multiple sclerosis patients is related to elevated plasma lipopolysaccharide levels. *Clinical Immunology* [Internet]. 2013;148(2):209–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2013.05.012>
40. Mony JT, Khorooshi R, Owens T. Chemokine receptor expression by inflammatory T cells in EAE. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014;8(JULY):1–9.
41. Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nature Immunology* [Internet]. 2018;19(7):665–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-018-0120-4>
42. Zhang X, Olsen N, Zheng SG. The progress and prospect of regulatory T cells in autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity* [Internet]. 2020;111(April):102461. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102461>
43. Danikowski KM, Jayaraman S, Prabhakar BS. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. *Journal of Neuroinflammation* [Internet]. 2017 Dec 9;14(1):117. Available from: <http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-017-0892-8>

44. Tian G, Li JL, Wang DG, Zhou D. Targeting IL-10 in Auto-immune Diseases. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2014;70(1):37–49.
45. Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. The family of IL-10-secreting CD4 + T cells [Internet]. 1st ed. Vol. 105, *Advances in Immunology*. Elsevier Inc.; 2010. 99–130. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2776\(10\)05004-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2776(10)05004-2)
46. Rajaiah R, Perkins DJ, Ireland DDC, Vogel SN, Kagan JC. CD14 dependence of TLR4 endocytosis and TRIF signaling displays ligand specificity and is dissociable in endotoxin tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(27):8391–6.
47. Awad IA, Polster SP. Cavernous angiomas: deconstructing a neurosurgical disease. *Journal of Neurosurgery* [Internet]. 2019 Jul;131(1):1–13. Available from: <https://thejns.org/view/journals/j-neurosurg/131/1/article-p1.xml>
48. Tang AT, Sullivan KR, Hong CC, Goddard LM, Mahadevan A, Ren A, et al. Distinct cellular roles for PDCD10 define a gut-brain axis in cerebral cavernous malformation. *Science Translational Medicine* [Internet]. 2019 Nov 27;11(520). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aaw3521>
49. Bibbò S, Dore MP, Cammarota G. Response to: Comment on “gut microbiota as a driver of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease.” *Mediators of Inflammation*. 2018;2018.
50. Frevert CW, Felgenhauer J, Wygrecka M, Nastase M v., Schaefer L. Danger-Associated Molecular Patterns Derived From the Extracellular Matrix Provide Temporal Control of Innate Immunity. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2018;66(4):213–27.

51. Roh JS, Sohn DH. Origin and List of DAMPS. Immune Network [Internet]. 2018;18(4):1–14. Available from: <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e27>
52. Zindel J, Kubes P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease [Internet]. 2020 Jan 24 [cited 2021 Nov 16];15(1):493–518. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847>
53. Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. Shock. 2006 Aug;26(2):174–9.
54. Restorick SM, Durant L, Kalra S, Hassan-Smith G, Rathbone E, Douglas MR, et al. CCR6+ Th cells in the cerebrospinal fluid of persons with multiple sclerosis are dominated by pathogenic non-classic Th1 cells and GM-CSF-only-secreting Th cells. Brain, Behavior, and Immunity [Internet]. 2017;64:71–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2017.03.008>
55. Aram J, Francis A, Tanasescu R, Constantinescu CS. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a therapeutic target in multiple sclerosis. Neurology and Therapy [Internet]. 2019;8(1):45–57. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40120-018-0120-1>
56. Rasouli J, Ciric B, Imitola J, Gonnella P, Hwang D, Mahajan K, et al. Expression of GM-CSF in T Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Suppressed by IFN- β Therapy. The Journal of Immunology. 2015;194(11):5085–93.

57. Schmitt N, Bentebibel SE, Ueno H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. Trends in Immunology [Internet]. 2014;35(9):436–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2014.06.002>

Figure legends

Figure 1. The frequency of cytokine-producing TLR2⁺ and TLR4⁺ T cells from CCM patients. In (B), the mean proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells positive for TLR2 and TLR4, as well as (D) MFI of TLR2 and TLR4 for these cells, was determined by cytometry following representative dot-plots and histograms shown in panels A and C after acquisition of 200,000 to 300,000 events in samples obtained from asymptomatic (CCM_{Asympt}, n=14) and symptomatic (CCM_{Sympt}, n=23) CCM patients. The mean percentage of these cells positive for IL-6 (E), IL-17 (F), IFN- γ (G), and IL-10 (H) was determined by flow cytometry (panel A) in the absence of stimuli (none) or 24h after activation with Pam3Csk4 (Pam3C, 1 μ g/mL) or LPS (100 η g/mL). Data are shown as mean $\pm$ SD of seven independent experiments with 5 to 6 samples per experiment. Significance was calculated by comparing different cell culture conditions from CCM_{Asympt} and CCM_{Sympt} groups, and the *p* values are shown in the figure (B and D, Ordinary ANOVA test and Turkey test; E to H, Kruskal-Wallis test and Dunn's test).

Figure 2. An expansion of IL-17⁺IFN- γ ⁺ T cells positive for TLR2 and TLR4 was observed in symptomatic CCM patients. Taking into account the representative dot-plots shown in panel (A), the mean frequency of dual IL-17 and IFN- γ -secreting CD4⁺ and CD8⁺ T cells positive for TLR2 and TLR4, before and after Pam3Csk4 (Pam3C, 1 μ g/mL) or LPS (100 η g/mL) addition, was determined by cytometry after acquisition of 200,000 to 300,000 events in samples obtained from asymptomatic (CCM_{Asympt}, n=14) and symptomatic (CCM_{Sympt}, n=23) CCM patients. Data are shown as mean $\pm$ SD of seven independent experiments with 5 to 6 samples per experiment. Significance was calculated by comparing different cell culture conditions from CCM_{Asympt} and CCM_{Sympt} groups, and the *p* values are shown in the figure (Kruskal-Wallis test and Dunn's test).

Figure 3. T cells from symptomatic CCM patients were more responsive to TLR ligands

and TCR/CD28 activation. T cell cultures ($1 \times 10^6/\text{mL}$) from healthy subjects (Ctrl, $n=20$) and CCM_{Asympt} ($n=10$) and CCM_{Sympt} ($n=10$) patients were maintained in the presence of anti-CD3/anti-CD28 beads ($10 \mu\text{L}/\text{mL}$) or with ligands for TLR2 (Pam3C, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$) and TLR4 (LPS, $100 \text{ ng}/\text{mL}$). After 48h, the (A) T cell proliferation was determined by [^3H]TdR up take, and the cytokine release after activation via TCR/CD28 (B) or TLR ligands (C) was evaluated by ELISA. Data are shown as mean $\pm$ SD of ten independent experiments with 4 samples per experiment. Significance was calculated by comparing different cell culture conditions from Ctrl, CCM_{Asympt} and CCM_{Sympt} patients (IL-21 and GM-CSF, Kruskal-Wallis test and Dunn's test; IL-17, IL-6, IFN- γ , IL-10, IL-1 β and TNF- α , ordinary ANOVA test and Turkey test).

Figure 4. The B cell subsets in CCM patients. Following the gate strategy and representative dot-plots and histograms shown in panels (A) and (C) we determined the mean frequency of different B cell subsets in healthy subjects (Control, Ctrl, $n=20$) and patients [CCM_{Asympt} ($n=14$) and CCM_{Sympt} ($n=23$)] by using a combination of monoclonal antibodies anti-CD19, anti-CD27, anti-CD38 and anti-IL-10. A similar analysis was performed among larger and more granular B cells in CCM patients (E-G). Data are shown as mean $\pm$ SD of 5 independent experiments with 4 to 7 samples per experiment. Significance was calculated by comparing different cell culture conditions from CCM_{Asympt} and CCM_{Sympt} groups (B and D, Kruskal-Wallis and Dunn's test; D to F, Student's t test)

Supplementary figures

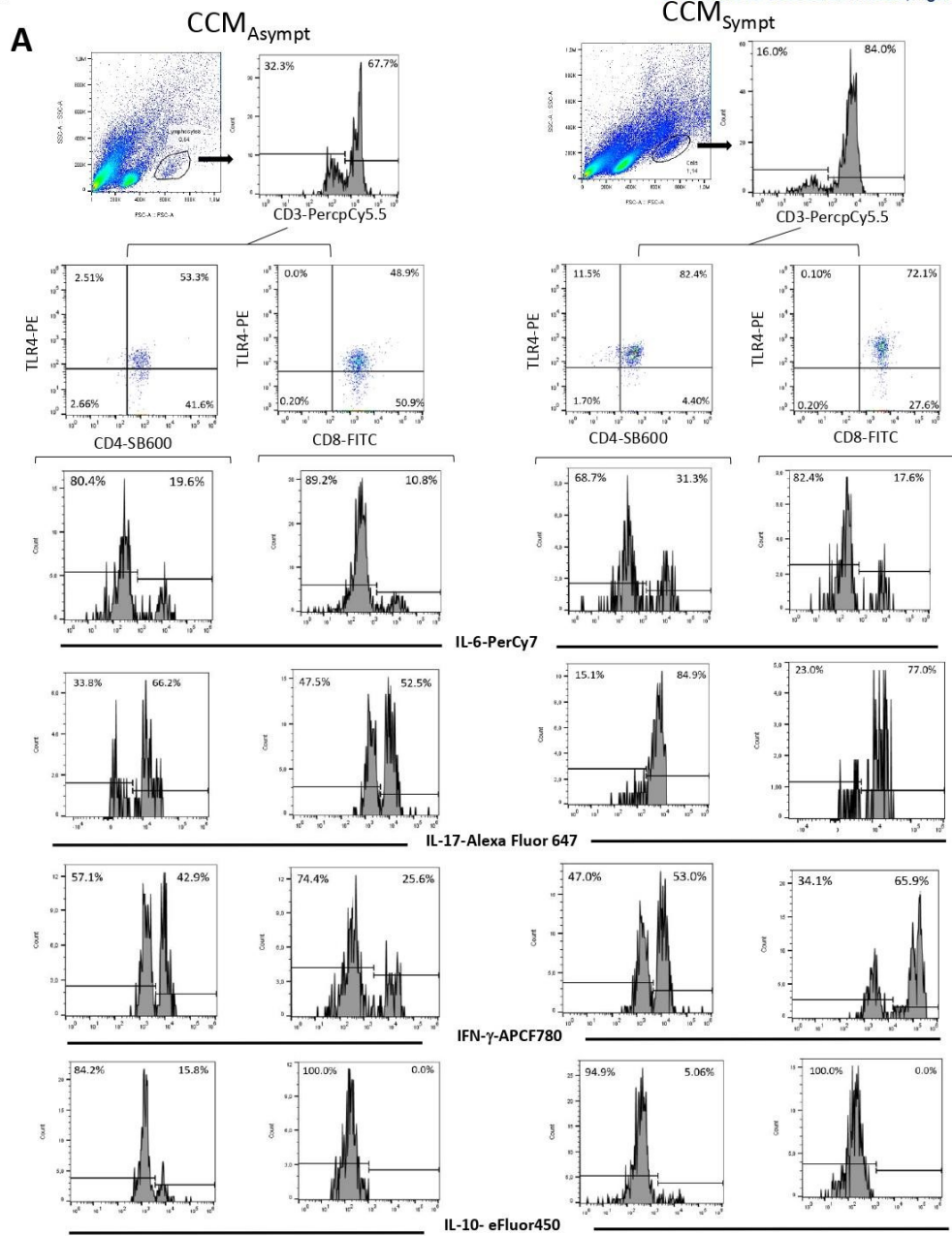
Figure S1. Percentage of TLR4⁺ T cells in healthy subjects ($n=20$) and asymptomatic ($n=14$) and symptomatic ($n=23$) CCM patients. In B, the mean percentage of TLR-4⁺ (CD4⁺ and CD8⁺) T cells from each experimental group was determined and significance calculated by comparing different experimental groups (Kruskal-Wallis test and Dunn's test).

Figure S2. Phenotypic characterization of T cells, expressing TLR, and B cells gated on larger and more granular cells from CCM patients. In (A), the gating strategy and identification of different larger and more granular lymphocytes according to the expression of CD3, CD19, CD14, CD16 and CD45RO markers. In (B), the mean percentage of naïve (CD45RO⁺CD62L⁺), central memory (CM, CD45RO⁺CD62L⁺), effector memory (EM, CD45RO⁺CD62L⁻) and terminally differentiated effector memory (TEMRA, CD45RO⁺CD62L⁻) T cells from CCM patients was determined and significance calculated by comparing the proportion of different T cell phenotypes according CD45RO and CD62L expression (Kruskal-Wallis test and Dunn's test).

Figure S3. The frequency of IL-17⁺IL-6⁺ and IL-6⁺IFN- γ ⁺ T cells expressing TLR2 and TLR4 in CCM patients. The mean frequency of dual (A) IL-17 and IL-6- or (B) IL-17 and IFN- γ -secreting (CD4⁺ and CD8⁺) T cells positive for TLR2 and TLR4 from asymptomatic (CCM_{Asympt}, n=14) and symptomatic (CCM_{Sympt}, n=23) patients was determined before and after Pam3Csk4 (Pam3C, 1 μ g/mL) or LPS (100 ng/mL) addition. Data are shown as mean $\pm$ SD of seven independent experiments with 5 to 6 samples per experiment. Significance was calculated by comparing different cell culture conditions from CCM_{Asympt} and CCM_{Sympt} groups, and the *p* values are > 0.05 (Kruskal-Wallis test and Dunn's test).

Figure 1A

[Click here to access/download;Figure;Fig 1A.pptx](#) 



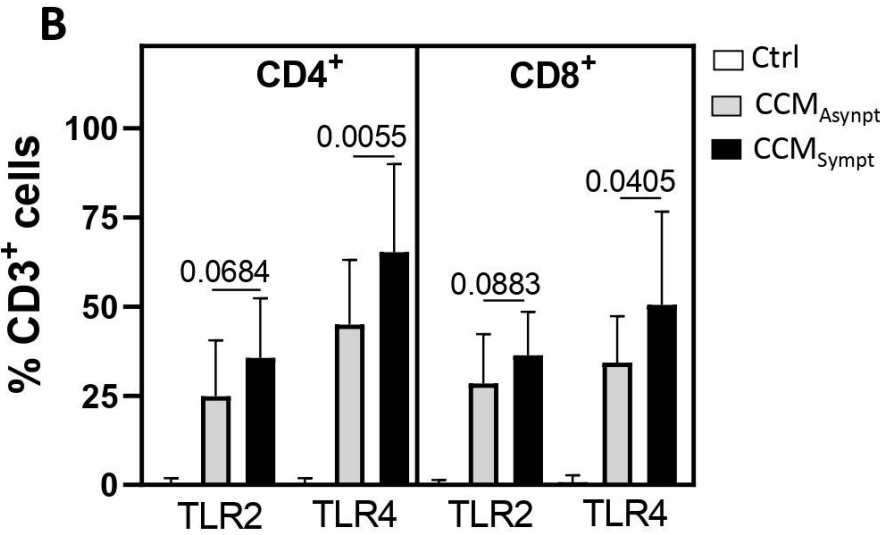


Fig. 1B

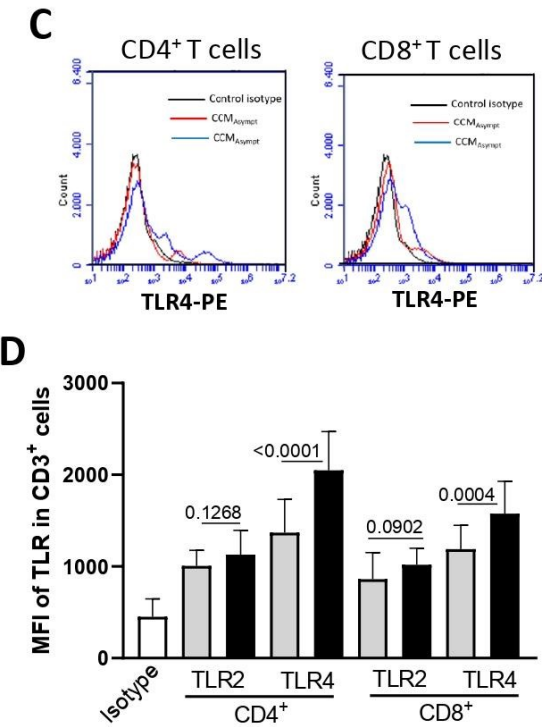


Fig. 1C and 1D

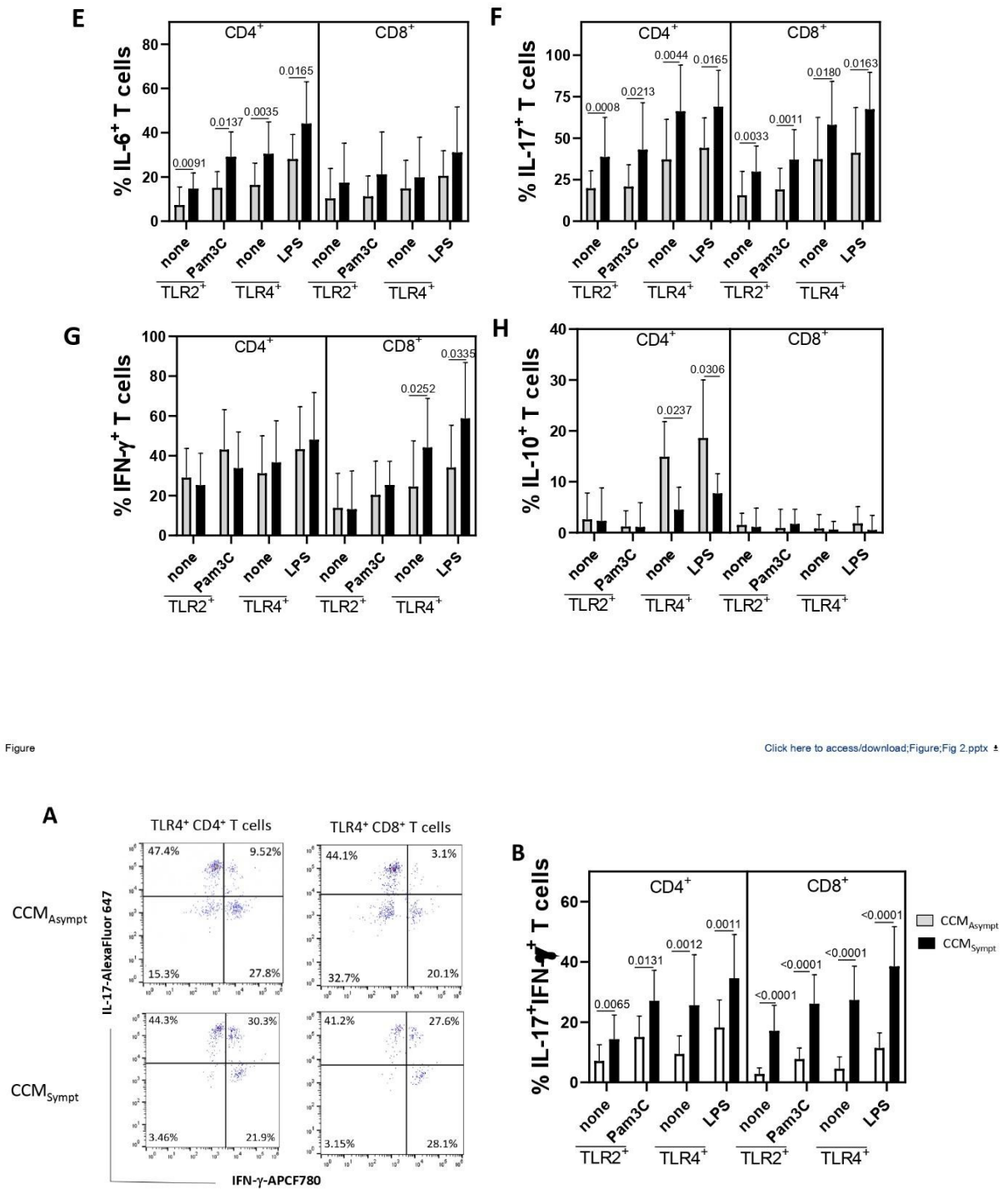


Fig. 2

Figure

[Click here to access/download;Figure;Fig 3.pptx](#)

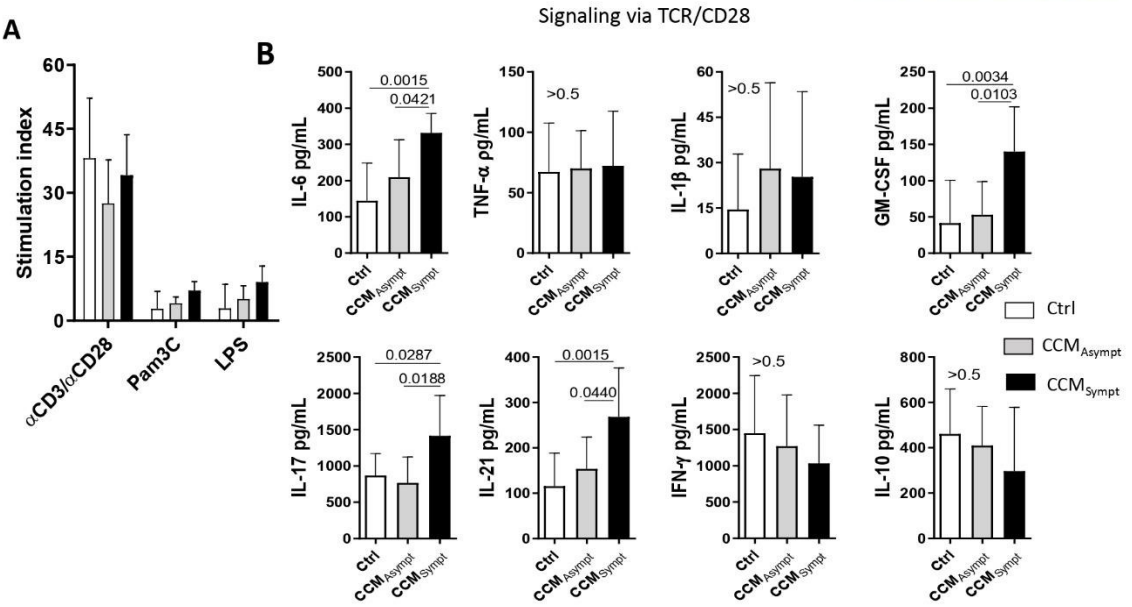


Fig. 3

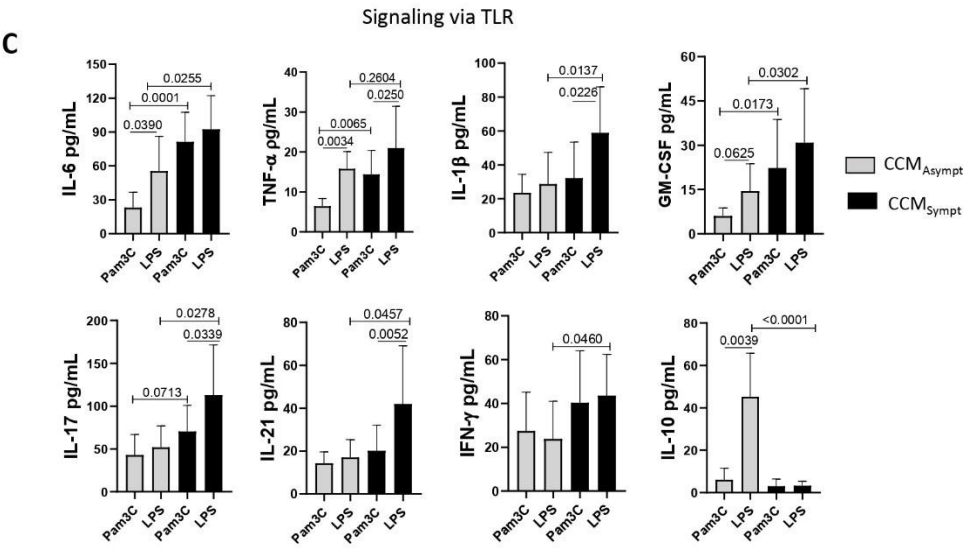


Fig. 3

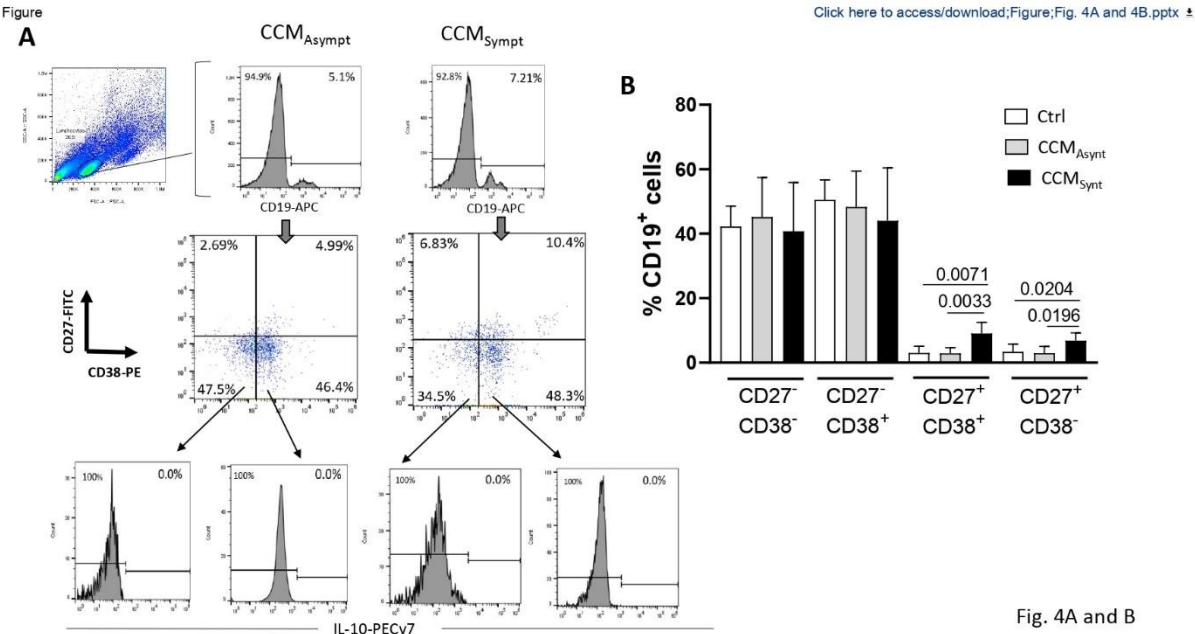


Fig. 4A and B

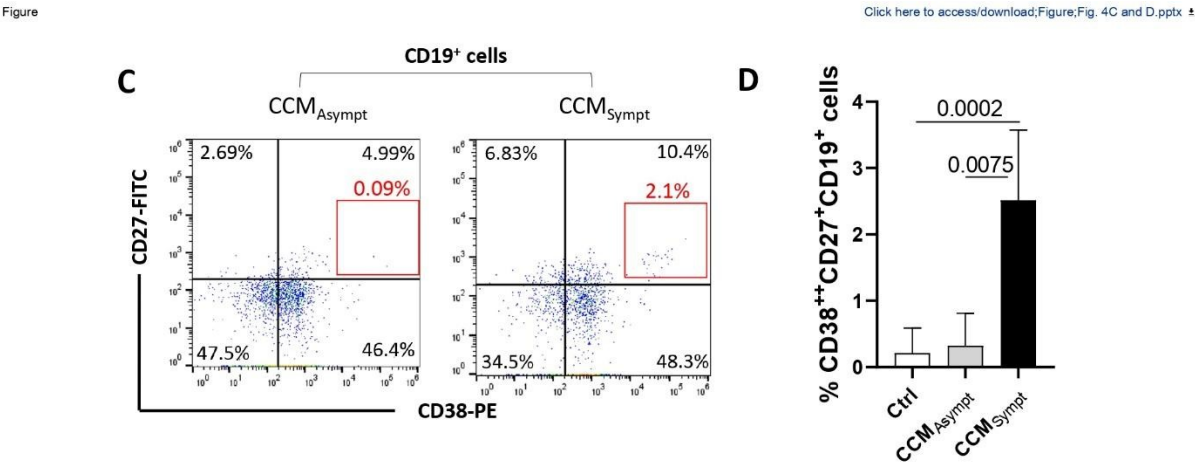
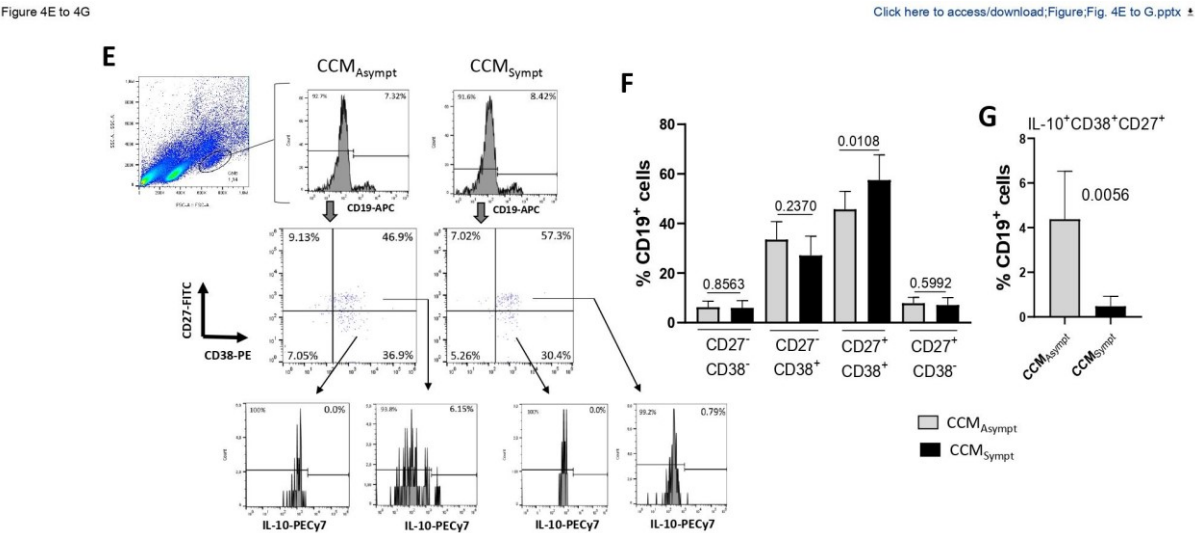


Fig. 4C and 4D





Figure

[Click here to access/download;Figure;Fig. S3.pptx](#)

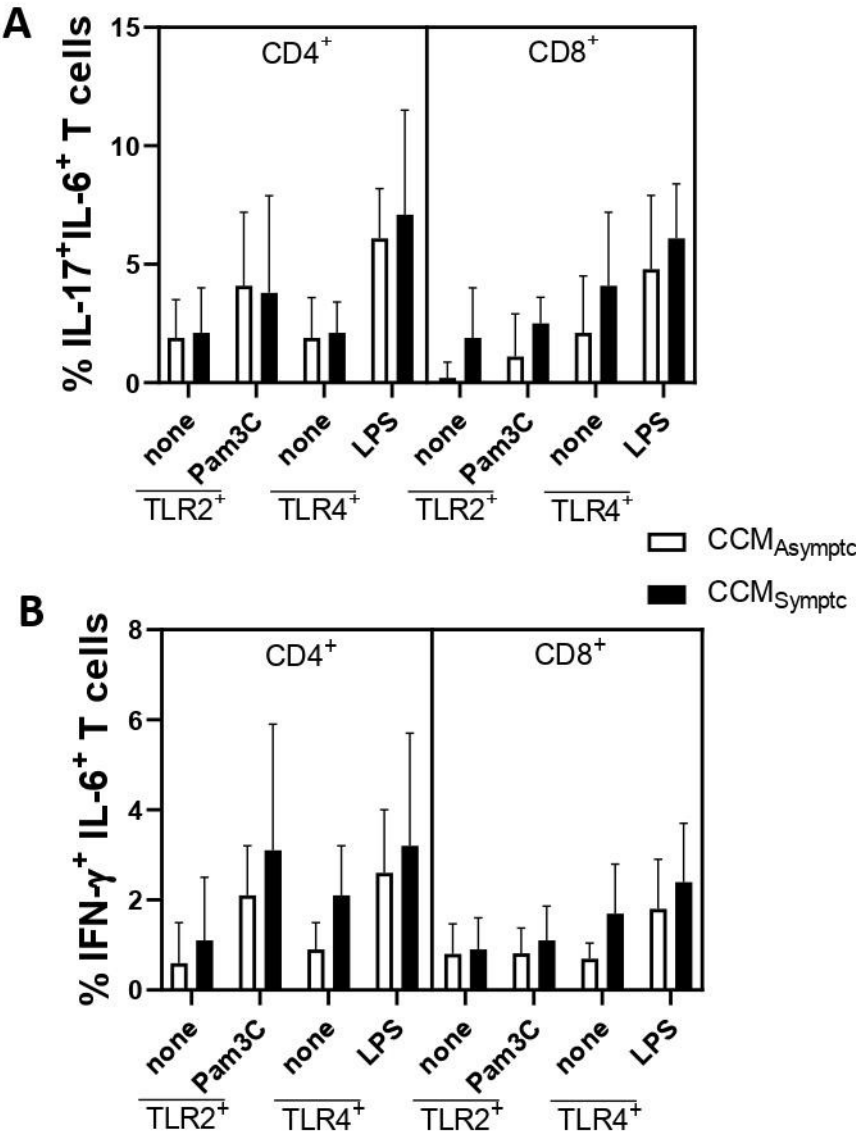


Fig. S3

Table

[Click here to access/download;Table;table 1 cavemoma.docx](#) ***Table 1: Features and demographic of CCM patients and healthy subjects.**

	CCM patients			Health non-
Characteristics	Symptomatic	Asymptomatic		CCM subjects
	Bleeding	Epilepsy		
Sample size, N (%)	20 (55%)	3 (8%) ¹	14 (37%)	20
Age, years (mean)	44	38	48	40.1
Female, N (%)	12 (60%)	3 (100%)	10 (71%)	10 (50%)
Sporadic, N (%)	17 (85%)	3 (100%)	7 (50%)	NA ³
Familiar, N (%)	3 (15%)	0	7 (50%)	NA
DVA, N (%) ²	8 (40%)	1 (33%)	3 (21%)	NA
Ethnicity				
Caucasian. N (%)	18 (88%)	2 (66%)	9 (66%)	14 (70%)
African-Brazilian, N (%)	2 (12%)	1 (34%)	5 (34%)	6 (30%)

¹Two from three patients with epilepsy were using Oxcarbazepine (Trileptal) to control seizure crises. The subjects, patients and healthy individuals recruited, were not taking any medication at the time of blood sampling. ²Developmental venous anomaly. ³Not applicable.

CONCLUSÕES

- a) Apesar da frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ clássicas que expressam TLR2 e TLR4 ter sido baixa e sem diferença significativa entre os diferentes grupos estudados, a porcentagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ maiores e mais granulosas foi maior no grupo com CCM, principalmente e entre os pacientes sintomáticos;
- b) Entre os pacientes, a proporção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ capazes de expressar TLR2 e TLR4, assim como a densidade de expressão desses receptores de padrão, foi associada a atividade clínica da doença, definida aqui como a ocorrência de hemorragias intracranianas ou epilepsia;
- c) Atividade da doença cerebral foi associada a uma expansão de células T CD4⁺ e T CD8⁺ efectoras circulantes que expressam TLR2 e, principalmente, TLR4 funcionais e que sintetizam citocinas pró-inflamatórias relacionadas aos fenótipos celulares Th1 e Th17. Adicionalmente, a porcentagem destas células capazes de produzir simultaneamente IL-17 e IFN- γ foi associada a pior prognóstico do CCM;
- d) Em culturas, células T de pacientes sintomáticos foram mais responsivas a ativação policlonal via TCR/CD28 e aos agonistas de TLR2 (Pam3c) e TLR4 (LPS) produzindo maiores níveis citocinas pró-inflamatórias relacionadas aos fenótipos celulares Th1 e Th17;
- e) No compartimento das células B, atividade clínica do CCM foi associada a expansão de subtipos de células B de memória;
- f) Em pacientes assintomáticos, a frequência de células T e células B produtoras de IL-10 foi maior do que pacientes sintomáticos, indicando um provável mecanismo endógeno de regulação imune, o que pode contribuir com melhor prognóstico da doença;
- g) Em resumo, nossos achados, apesar de preliminares, identificaram indícios de um envolvimento das células T, que expressam TLR2 e TLR4, e de células B

circulantes nas formas ativas dos cavernomas cerebrais. Acreditamos que eventos adversos, como disbiose intestinal associada a maior translocação microbiana, possam contribuir para a ocorrência de novas recaídas clínicas por favorecer a expansão de linfócitos T TLR⁺ efetores em detrimento a danos no compartimento de linfócitos reguladores produtores de IL-10. Esses dados precisam ser avaliados em um número maior de pacientes, pois essas informações podem ajudar no desenho de novas ferramentas imunomoduladoras em favor do paciente com CCM.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Inc., 2019.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.
- ALEXIOU, G. A.; PRODROMOU, N. Dandy-walker malformation in crouzon syndrome. **Journal of Child Neurology**, v. 25, n. 5, p. 653, 2010.
- ALIANÇA CAVERNOMA BRASIL. **Os Cavernomas Cerebrais**. Disponível em: <<https://cavernoma.org.br/cavernoma-cerebral/sobre-cavernoma/os-cavernomas-cerebrais>>. Acesso em: 19 jan. 2022.
- APRA, C. et al. Could propranolol be beneficial in adult cerebral cavernous malformations? **Neurosurgical Review**, v. 42, n. 2, p. 403–408, 4 jun. 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10143-018-01074-0>>.
- AWAD, I. A.; POLSTER, S. P. Cavernous angiomas: deconstructing a neurosurgical disease. **Journal of Neurosurgery**, v. 131, n. 1, p. 1–13, jul. 2019. Disponível em: <<https://thejns.org/view/journals/j-neurosurg/131/1/article-p1.xml>>.
- BARROS, P. O. et al. Expansion of IL-6+ Th17-like cells expressing TLRs correlates with microbial translocation and neurological disabilities in NMOSD patients. **Journal of Neuroimmunology**, v. 307, p. 82–90, jun. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.04.001>>.
- BATRA, S. et al. Cavernous malformations: Natural history, diagnosis and treatment. **Nature Reviews Neurology**, v. 5, n. 12, p. 659–670, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2009.177>>.
- BERTI, I. et al. Propranolol for cerebral cavernous angiomatosis: A magic bullet. **Clinical Pediatrics**, v. 53, n. 2, p. 189–190, 2014.
- BEUREL, E.; LOWELL, J. A. **Th17 cells in depression** *Brain, Behavior, and Immunity*, 2018. .
- BRINJIKJI, W. et al. Prevalence of cerebral cavernous malformations associated with developmental venous anomalies increases with age. **Child's Nervous System**, v. 33, n. 9, p. 1539–1543, 2017.
- CARAMALHO, I. et al. Regulatory T Cells Selectively Express Toll-like Receptors and Are Activated by Lipopolysaccharide. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 4, p. 403–411, 17 fev. 2003. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/197/4/403/8426/Regulatory-T-Cells-Selectively-Express-Tolllike>>.

CARI, L. et al. Context-Dependent Effect of Glucocorticoids on the Proliferation, Differentiation, and Apoptosis of Regulatory T Cells: A Review of the Empirical Evidence and Clinical Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1142, 6 mar. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/5/1142>>.

CATON, M. T.; SHENOY, V. S. **Cerebral Cavernous Malformations**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2021.

CHEN, J. S. et al. Flow cytometric identification of T 13 cells in mouse and human. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 147, n. 2, p. 470–483, fev. 2021.

CHEN, Y. et al. **Transcriptional and Epigenetic Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation** *Frontiers in immunology*, 2018. .

CHOQUET, H. et al. Polymorphisms in inflammatory and immune response genes associated with cerebral cavernous malformation type 1 severity. **Cerebrovascular Diseases**, 2014.

CIESIELSKA, A.; MATYJEK, M.; KWIATKOWSKA, K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 4, p. 1233–1261, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y>>.

CONG, J.; WEI, H. Natural Killer Cells in the Lungs. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. June, p. 1–13, 25 jun. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01416/full>>.

COSANTINO, C. M.; BAECHER-ALLAN, C. M.; HAFLE, D. A. **Human regulatory T cells and autoimmunity** *European Journal of Immunology*, 2008. .

COSMI, L. et al. **T helper cells plasticity in inflammation** *Cytometry Part A*, 2014. .

COUTURE, A. et al. HLA-Class II Artificial Antigen Presenting Cells in CD4+ T Cell-Based Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, p. 1–11, 17 maio 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01081/full>>.

CROSE, L. E. S. et al. Cerebral Cavernous Malformation 2 Protein Promotes Smad Ubiquitin Regulatory Factor 1-mediated RhoA Degradation in Endothelial Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 20, p. 13301–13305, 15 maio 2009. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.C900009200>>.

CROTTY, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). **Annual review of immunology**, v. 29, n. 1, p. 621–63, 23 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21314428>>.

CROTTY, S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. **Immunity**, v. 50, n. 5, p. 1132–1148, maio 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761319301918>>.

DAMMANN, P. et al. Solitary Sporadic Cerebral Cavernous Malformations: Risk Factors of First or Recurrent Symptomatic Hemorrhage and Associated Functional Impairment. **World Neurosurgery**, v. 91, n. Ccm, p. 73–80, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wneu.2016.03.080>>.

DANIKOWSKI, K. M.; JAYARAMAN, S.; PRABHAKAR, B. S. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 117, 9 dez. 2017. Disponível em: <<http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-017-0892-8>>.

DE SOUZA, J. M. et al. Susceptibility-Weighted Imaging for the Evaluation of Patients with Familial Cerebral Cavernous Malformations: A Comparison with T2-Weighted Fast Spin-Echo and Gradient-Echo Sequences. **American Journal of Neuroradiology**, v. 29, n. 1, p. 154–158, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ajnr.org/lookup/doi/10.3174/ajnr.A0748>>.

DELGADO-RIZO, V. et al. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. FEB, p. 1–20, 6 fev. 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00081/full>>.

DERKOW, K. et al. Multiple Sclerosis: Modulation of Toll-Like Receptor (TLR) Expression by Interferon- β Includes Upregulation of TLR7 in Plasmacytoid Dendritic Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e70626, 12 ago. 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0070626>>.

DIAS, A. S. O. et al. TLR-2 and TLR-4 agonists favor expansion of CD4⁺ T cell subsets implicated in the severity of neuromyelitis optica spectrum disorders. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 34, n. May, p. 66–76, set. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.06.018>>.

DODD, R. L.; STEINBERG, G. K. Cerebral Cavernous Malformations: Viewpoint—Surgery. In: **Principles and Practice of Stereotactic Radiosurgery**. New York, NY: Springer New York, 2015. p. 637–648.

DOMOGALLA, M. P. et al. Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. DEC, p. 1–14, 11 dez. 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01764/full>>.

FERREIRA, T. B. et al. Different interleukin-17-secreting Toll-like receptor + T-cell subsets are associated with disease activity in multiple sclerosis. **Immunology**, v. 154, n. 2, p. 239–252, 1 jun. 2018.

FLORES-SANTIBÁÑEZ, F. et al. In vitro-generated Tc17 cells present a memory phenotype and serve as a reservoir of Tc1 cells in vivo. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. FEB, p. 1–12, 2018.

FRANK, P. G.; LISANTI, M. P. ICAM-1: role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 295, n. 3, p. H926–H927, set. 2008. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00779.2008>>.

GARCÍA-PÉREZ, D. et al. De Novo Cavernous Malformation Associated with a Pre-existing Developmental Venous Anomaly. **Clinical Neuroradiology**, p. 4–7, 31 maio 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00062-019-00801-4>>.

GIRARD, R. et al. Plasma Biomarkers of Inflammation Reflect Seizures and Hemorrhagic Activity of Cerebral Cavernous Malformations. **Translational Stroke Research**, 2018a.

GIRARD, R. et al. Plasma biomarkers of inflammation and angiogenesis predict cerebral cavernous malformation symptomatic hemorrhage or lesional growth short communication. **Circulation Research**, v. 122, n. 12, p. 1716–1721, 2018b.

GLADING, A. et al. KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell-cell junctions. **Journal of Cell Biology**, v. 179, n. 2, p. 247–254, 2007.

GLATZOVÁ, D.; CEBECAUER, M. **Dual role of CD4 in peripheral T lymphocytes** **Frontiers in Immunology**, 2019. .

GOETZ, F. W.; PLANAS, J. v; MACKENZIE, S. Tumor necrosis factors. **Developmental and comparative immunology**, v. 28, n. 5, p. 487–97, 3 maio 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15062645>>.

GOITRE, L. et al. KRIT1 Regulates the Homeostasis of Intracellular Reactive Oxygen Species. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. e11786, 26 jul. 2010. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0011786>>.

GOITRE, L. et al. KRIT1 loss of function causes a ROS-dependent upregulation of c-Jun. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 68, p. 134–147, mar. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.020>>.

GOITRE, L. et al. Up-regulation of NADPH oxidase-mediated redox signaling contributes to the loss of barrier function in KRIT1 deficient endothelium. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08373-4>>.

GOLDSTEIN, H. E.; SOLOMON, R. A. Epidemiology of cavernous malformations. In: **Cavernous malformations**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2017. 143p. 241–247.

GONZALEZ, S. M.; TABORDA, N. A.; RUGELES, M. T. **Role of different subpopulations of CD8+ T cells during HIV exposure and infection** **Frontiers in Immunology**, 2017. .

GRABOWSKA, J. et al. CD169+ Macrophages Capture and Dendritic Cells Instruct: The Interplay of the Gatekeeper and the General of the Immune System. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. OCT, p. 1–14, 26 out. 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02472/full>>.

GRAVANO, D. M.; HOYER, K. K. **Promotion and prevention of autoimmune disease by CD8+ T cells** *Journal of Autoimmunity* Elsevier Ltd, , 2013. . Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2013.06.004>>.

GROSS, B. A. et al. The natural history of intracranial cavernous malformations. **Neurosurgical Focus**, v. 30, n. 6, p. E24, jun. 2011. Disponível em: <<https://thejns.org/view/journals/neurosurg-focus/30/6/2011.3.focus1165.xml>>.

GROSS, B. A.; DU, R. Cerebral cavernous malformations: natural history and clinical management. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 15, n. 7, p. 771–777, 3 jul. 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737175.2015.1055323>>.

HE, Y. et al. Stabilization of VEGFR2 Signaling by Cerebral Cavernous Malformation 3 Is Critical for Vascular Development. **Science Signaling**, v. 3, n. 116, 6 abr. 2010.

HERWALD, H.; EGESTEN, A. On PAMPs and DAMPs. **Journal of Innate Immunity**, v. 8, n. 5, p. 427–428, 2016. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/448437>>.

HU, Z.; LANCASTER, J. N.; EHRLICH, L. I. R. **The contribution of chemokines and migration to the induction of central tolerance in the thymus** *Frontiers in Immunology*, 2015. .

JIN, B. et al. The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, n. Figure 1, 2012.

JOGDAND, G. M.; MOHANTY, S.; DEVADAS, S. Regulators of Tfh Cell Differentiation. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. NOV, 23 nov. 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00520/full>>.

KABELITZ, D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 1, p. 39–45, fev. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791506002391>>.

KAECH, S. M.; CUI, W. **Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation** *Nature Reviews Immunology*, 2012. .

KALATHOOKUNNEL ANTONY, A.; LIAN, Z.; WU, H. T Cells in Adipose Tissue in Aging. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. December, p. 2945, 12 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02945/full>>.

KANAMORI, M. et al. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 11, p. 803–811, nov. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2016.08.012>>.

KEBIR, H. et al. Preferential recruitment of interferon- γ -expressing T_H 17 cells in multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 66, n. 3, p. 390–402, set. 2009.

KEMENY, D. The role of the T follicular helper cells in allergic disease. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 9, n. 5, p. 386–389, 20 set. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2012.31>>.

KIM, C. H. Control of Innate and Adaptive Lymphocytes by the RAR-Retinoic Acid Axis. **Immune Network**, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2018. Disponível em: <<https://immunenet.org/DOIx.php?id=10.4110/in.2018.18.e1>>.

KIM, E. H.; SURESH, M. **Role of PI3K/Akt signaling in memory CD8 T cell differentiation** **Frontiers in Immunology**, 2013. .

KIM, J. Introduction to cerebral cavernous malformation: a brief review. **BMB Reports**, v. 49, n. 5, p. 255–262, 31 maio 2016. Disponível em: <<http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=E1MBB7&py=2016&vnc=v49n5&sp=255>>.

KIM, S. J.; LEE, K.; DIAMOND, B. Follicular helper T cells in systemic lupus erythematosus. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. AUG, p. 1–8, 2018.

KOENIG, J. F. et al. Memory Generation and Re-Activation in Food Allergy. **ImmunoTargets and Therapy**, v. Volume 10, p. 171–184, jun. 2021.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, 25 mar. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3399>>.

KONJAR, Š.; VELDHOFEN, M. Dynamic Metabolic State of Tissue Resident CD8 T Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. July, p. 1–10, 17 jul. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01683/full>>.

KORNEEV, K. v et al. **TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis** **Cytokine** Elsevier Ltd, , 2017. . Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2016.01.021>>.

KRZEWSKI, K.; COLIGAN, J. E. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. NOV, p. 1–16, 2012. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00335/abstract>>.

KUMAR, A.; YU, F. S. Toll-like receptors and corneal innate immunity. **Curr Mol Med**, 2006.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. **International Reviews of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 16–34, 14 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08830185.2010.529976>>.

LAUENBORG, B. Programmed Cell Death 10 (PCDC10) cerebral cavernous malformation (CCM3) enhances proliferation and protects malignant T cells from apoptosis. **Apmis**, v. 118, n. 10, p. 719–728, 2010.

LEBLANC, G. G. et al. Biology of vascular malformations of the brain. **Stroke**, v. 40, n. 12, p. 694–702, 2009.

LEFF-GELMAN, P. et al. **The Immune System and the Role of Inflammation in Perinatal Depression** **Neuroscience Bulletin**, 2016. .

LI, D. Y.; WHITEHEAD, K. J. Evaluating strategies for the treatment of cerebral cavernous malformations. **Stroke**, v. 41, n. 10 SUPPL. 1, p. 92–95, 2010.

LI, J. et al. Low fluid shear stress conditions contribute to activation of cerebral cavernous malformation signalling pathways. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.07.013>>.

LI, Y. et al. Altered expression of CD4+CD25+ regulatory T cells and its 5-HT1a receptor in patients with major depression disorder. **Journal of Affective Disorders**, 2010.

LIANG, Y.; PAN, H. F.; YE, D. Q. **IL-17A-producing CD8+T cells as therapeutic targets in autoimmunity** **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, 2015a. .

LIANG, Y.; PAN, H. F.; YE, D. Q. Tc17 cells in immunity and systemic autoimmunity. **International Reviews of Immunology**, v. 34, n. 4, p. 318–331, 25 maio 2015b.

LISOWSKA, J. et al. The CCM1–CCM2 complex controls complementary functions of ROCK1 and ROCK2 that are required for endothelial integrity. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 15, p. jcs216093, 1 ago. 2018. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.216093>>.

LOPEZ-RAMIREZ, M. A. et al. Cerebral cavernous malformations form an anticoagulant vascular domain in humans and mice. **Blood**, v. 133, n. 3, p. 193–204, 2019.

LYNE, S. B. et al. Biomarkers of cavernous angioma with symptomatic hemorrhage. **JCI Insight**, v. 4, n. 12, p. 0–16, 2019.

MA, X. et al. PDCD10 Interacts with Ste20-related Kinase MST4 to Promote Cell Growth and Transformation via Modulation of the ERK Pathway. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 6, p. 1965–1978, jun. 2007.

MAHLA, R. S. Sweeten PAMPs: role of sugar complexed PAMPs in innate immunity and vaccine biology. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. SEP, p. 1–16, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00248/abstract>>.

MAKANI, S.; JEN, K.; FINN, P. New Costimulatory Families: Signaling Lymphocytic Activation Molecule in Adaptive Allergic Responses. **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 5, p. 359–364, 1 ago. 2008. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1566-5240&volume=8&issue=5&spage=359>>.

MALDONADO, R. A.; VON ANDRIAN, U. H. How Tolerogenic Dendritic Cells Induce Regulatory T Cells. In: **Advances in Immunology**. [s.l.: s.n.]108p. 111–165.

MALINVERNO, M. et al. Endothelial cell clonal expansion in the development of cerebral cavernous malformations. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10707-x>>.

MARAIRE, J. N.; AWAD, I. A. Intracranial Cavernous Malformations: Lesion Behavior and Management Strategies. **Neurosurgery**, v. 37, n. 4, 1995.

MARANHA, L. A.; ARAÚJO, J. C. Cavernomas de Sistema Nervoso Central. **JBNC - JORNAL BRASILEIRO DE NEUROCIRURGIA**, v. 23, n. 4, p. 316–322, 29 mar. 2018. Disponível em: <<http://jbnc.emnuvens.com.br/jbnc/article/view/1221>>.

MARDAKHEH, F. K.; SELF, A.; MARSHALL, C. J. RHO binding to FAM65A regulates Golgi reorientation during cell migration. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 24, p. 4466–4479, 15 dez. 2016. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.198614>>.

MASI, A. et al. The Immune System, Cytokines, and Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 194–204, 25 abr. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12264-017-0103-8>>.

MAURI, C.; MENON, M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 772–779, 1 mar. 2017.

MCKERRACHER, L. et al. A Brain-Targeted Orally Available ROCK2 Inhibitor Benefits Mild and Aggressive Cavernous Angioma Disease. **Translational Stroke Research**, 2019.

MCKINSTY, K. K.; STRUTT, T. M.; SWAIN, S. L. The potential of CD4 T-cell memory. **Immunology**, v. 130, n. 1, p. 1–9, maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20331470>>.

MEDLINEPLUS. **KRIT1 gene**. Disponível em: <<https://medlineplus.gov/genetics/gene/krit1/>>. Acesso em: 19 jan. 2022.

MESQUITA JR, D. et al. Follicular helper T cell in immunity and autoimmunity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 5, p. 1–11, 19 abr. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2016000500302&lng=en&tlng=en>.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

MILLS, K. H. G. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 12, p. 807–822, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3095>>.

MIRANDA-HERNANDEZ, S.; BAXTER, A. G. Role of toll-like receptors in multiple sclerosis. **American journal of clinical and experimental immunology**, v. 2, n. 1, p. 75–93, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23885326>%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3714200>.

MITTRÜCKER, H. W.; VISEKRUNA, A.; HUBER, M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 62, n. 6, p. 449–458, 2014.

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, p. 12–18, maio 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165572818305502>>.

ORPHA.NET. **Familial cerebral cavernous malformation**. Disponível em: <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=221061&lng=EN>. Acesso em: 19 jan. 2022.

OSORIO, F.; REIS E SOUSA, C. **Myeloid C-type Lectin Receptors in Pathogen Recognition and Host Defense** Immunity, 2011. .

OYAMADA, H. A. A. et al. Major Depressive Disorder Enhances Th2 and Th17 Cytokines in Patients Suffering from Allergic Rhinitis and Asthma. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 182, n. 12, p. 1155–1168, 1 dez. 2021.

PATENTE, T. A. et al. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JAN, p. 1–18, 21 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.03176/full>>.

PORTER, R. W. et al. Cavernous malformations of the brain stem: experience with one hundred patients. **Skull Base Surgery**, v. 9, n. SUPPL. 1, p. 25, 1999.

QUINN, M. T.; DELEO, F. R. **Neutrophil Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2014. v. 1124

RAJASEKARAN, S.; ANURADHA, R.; BETHUNAICKAN, R. **TLR Specific Immune Responses against Helminth Infections** *Journal of Parasitology Research* Hindawi, , 2017. .

RAMESH, R. et al. Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 1, p. 89–104, 13 jan. 2014.

RANJAN, P. et al. Cytoplasmic nucleic acid sensors in antiviral immunity. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, n. 8, p. 359–368, ago. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491409001166>>.

RASOULI, J. et al. Expression of GM-CSF in T Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Suppressed by IFN- β Therapy. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 11, p. 5085–5093, 1 jun. 2015. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1403243>>.

REINHARD, M. et al. Propranolol stops progressive multiple cerebral cavernoma in an adult patient. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 367, p. 15–17, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2016.04.053>>.

RIBATTI, D. Historical overview on the morphological characterization of large granular lymphocytes/natural killer cells. **Immunology Letters**, v. 190, n. July, p. 58–63, out. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.014>>.

RIERA ROMO, M.; PÉREZ-MARTÍNEZ, D.; CASTILLO FERRER, C. Innate immunity in vertebrates: an overview. **Immunology**, v. 148, n. 2, p. 125–139, jun. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/imm.12597>>.

RINKEL, L. A. et al. Radiosurgical, neurosurgical, or no intervention for cerebral cavernous malformations: A decision analysis. **International Journal of Stroke**, v. 0, n. 0, p. 1–7, 2019.

SABBAGH, P. et al. The significance role of regulatory T cells in the persistence of infections by intracellular bacteria. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 62, n. April, p. 270–274, ago. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.05.001>>.

SANTAMARIA, J. et al. Antigen-presenting cells and T-lymphocytes homing to the thymus shape T cell development. **Immunology Letters**, v. 204, p. 9–15, dez. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.10.003>>.

SHENKAR, R. et al. RhoA kinase inhibition with fasudil versus simvastatin in murine models of cerebral cavernous malformations. **Stroke**, 2017.

SHI, C. et al. Immune Response in Human Cerebral Cavernous Malformations. **Stroke**, v. 40, n. 5, p. 1659–1665, 2009.

SHI, C. et al. **Immune complex formation and in situ B-cell clonal expansion in human cerebral cavernous malformations**. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. v. 272
SHI, C. et al. B-Cell Depletion Reduces the Maturation of Cerebral Cavernous Malformations in Murine Models. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 369–377, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11481-016-9670-0>>.

SHRIKANT, P. A. et al. **Regulating functional cell fates in CD8 T cells***Immunologic Research*, 2010. .

SIRVENTE, J. et al. Frequency and phenotypes of cutaneous vascular malformations in a consecutive series of 417 patients with familial cerebral cavernous malformations. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, n. 9, p. 1066–1072, set. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-3083.2009.03263.x>>.

SNYDER, J. P.; AMIEL, E. Regulation of Dendritic Cell Immune Function and Metabolism by Cellular Nutrient Sensor Mammalian Target of Rapamycin (mTOR). **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JAN, p. 1–9, 14 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.03145/full>>.

SPASOVA, D. S.; SURH, C. D. **Blowing on embers: Commensal microbiota and our immune system***Frontiers in Immunology*, 2014. .

STAPLETON, C. J.; BARKER, F. G. Cranial cavernous malformations natural history and treatment. **Stroke**, v. 49, n. 4, p. 1029–1035, 2018.

STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. TOLEROGENIC DENDRITIC CELLS. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 685–711, abr. 2003. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040>>.

SUNG, P. S.; RACANELLI, V.; SHIN, E. C. **CD8+ T-cell responses in acute hepatitis C virus infection***Frontiers in Immunology*, 2014. .

TAKENAKA, M. C.; QUINTANA, F. J. **Tolerogenic dendritic cells***Seminars in Immunopathology*, 2017. .

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 10, p. a016295–a016295, 1 out. 2014. Disponível em: <<http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a016295>>.

TANG, A. T. et al. Endothelial TLR4 and the microbiome drive cerebral cavernous malformations. **Nature**, v. 545, n. 7654, p. 305–310, 10 maio 2017. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L616266405%0Ahttp://dx.doi.org/10.1038/nature22075>>.

TASLIMI, S. et al. Hemorrhage, Seizures, and Dynamic Changes of Familial versus Nonfamilial Cavernous Malformation: Systematic Review and Meta-analysis. **World Neurosurgery**, v. 126, p. 241–246, jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.02.115>>.

TAU, G.; ROTHMAN, P. Biologic functions of the IFN-gamma receptors. **Allergy**, v. 54, n. 12, p. 1233–1251, dez. 1999. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1034/j.1398-9995.1999.00099.x>>.

TERRA, R. et al. Efeito do exercício no sistema imune: resposta, adaptação e sinalização celular. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 18, n. 3, p. 208–214, 2012.

UNIPROT. **VGFR2_HUMAN**. Disponível em:
<<https://www.uniprot.org/uniprot/P35968>>. Acesso em: 19 jan. 2022.

VALENTINE, K. M.; HOYER, K. K. CXCR5+ CD8 T Cells: Protective or Pathogenic? **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. June, p. 1–10, 2019.

VIGNALI, D. A. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. **How regulatory T cells work** *Nature Reviews Immunology*, 2008. .

VINUESA, C. G. et al. Follicular Helper T Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 34, n. 1, p. 335–368, 2016.

WANG, Q.; WU, H. T Cells in Adipose Tissue: Critical Players in Immunometabolism. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. October, p. 2509, 30 out. 2018. Disponível em:
<<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02509/full>>.

WATERS, R. S. et al. The effects of interleukin-2 on immune response regulation. **Mathematical Medicine and Biology: A Journal of the IMA**, v. 35, n. 1, p. 79–119, 14 mar. 2018. Disponível em:
<<https://academic.oup.com/imammb/article/35/1/79/3038032>>.

WU, H. et al. Molecular Control of Follicular Helper T cell Development and Differentiation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. OCT, p. 1–11, 25 out. 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02470/full>>.

WU, Y.-C. B.; KIPLING, D.; DUNN-WALTERS, D. K. The Relationship between CD27 Negative and Positive B Cell Populations in Human Peripheral Blood. **Frontiers in Immunology**, v. 2, 2011.

YANAI, H. et al. Regulation of the cytosolic DNA-sensing system in innate immunity: a current view. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 1, p. 17–22, fev. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791509000077>>.

ZABRAMSKI, J. M. et al. Propranolol Treatment of Cavernous Malformations with Symptomatic Hemorrhage. **World Neurosurgery**, v. 88, p. 631–639, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wneu.2015.11.003>>.

ZAFAR, A. et al. Familial Cerebral Cavernous Malformations. **Stroke**, v. 50, n. 5, p. 1294–1301, maio 2019. Disponível em:
<<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/STROKEAHA.118.022314>>.

ZAGHOUBANI, H.; HOEMAN, C. M.; ADKINS, B. **Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells** *Trends in Immunology*, 2009. .

ZANONI, I. et al. CD14 Controls the LPS-Induced Endocytosis of Toll-like Receptor 4. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 868–880, nov. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411012219>>.

ZAWISTOWSKI, J. S. et al. CCM1 and CCM2 protein interactions in cell signaling: implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 17, p. 2521–2531, 1 set. 2005. Disponível em: <<http://academic.oup.com/hmg/article/14/17/2521/569254/CCM1-and-CCM2-protein-interactions-in-cell>>.

ZHANG, E.; LU, M. **Toll-like receptor (TLR)-mediated innate immune responses in the control of hepatitis B virus (HBV) infection** *Medical Microbiology and Immunology*, 2015. .

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. **Annual Review of Immunology**, 2010.

ANEXO - Carta de aceite do artigo submetido

19/01/2022 23:57

Gmail - Fwd: Decision has been reached on your submission to Journal of Neuroinflammation - JNEU-D-21-00699R4 - [EMI...



Camilla de Castro <camilla.decastro@gmail.com>

Fwd: Decision has been reached on your submission to Journal of Neuroinflammation - JNEU-D-21-00699R4 - [EMID:254aa67ff80a5bdf]

2 mensagens

cbento_ <cbento@unirio.br>

12 de janeiro de 2022 09:44

Para: JÓRGE MARCONDES <jormarcondes@gmail.com>, Gustavo Galvao <gdafontoura@gmail.com>, Soniza Vieira Alves Leon <sonizavieiraalvesleon@gmail.com>, "Profa. Dra. Soniza Leon" <soniza.leon@unirio.br>, Joana Hygino <joana_hygino@hotmail.com>, Camilla de Castro <camilla.decastro@gmail.com>, Hugo Akirito Oyamada <akirito@hotmail.com>, Lana Lopes <lanna.mg@gmail.com>, Marcos Octávio <mosdc01@gmail.com>, Clarice Monteiro <clamrodrigues@gmail.com>, Priscila Sacramento <priscila.m.sacramento@hotmail.com>

JNEU-D-21-00699R4

Elevated proportion of TLR2- and TLR4-expressing Th17-like cells and activated memory B cells was associated with clinical activity of Cerebral Cavernous Malformations
Camilla Castro; Hugo A. A. Oyamada; Marcos Octávio S. D. Cafasso; Lana M. Lopes; Clarice Monteiro; Priscila M. Sacramento; Soniza Vieira Alves-Leon; Gustavo da Fontoura Galvão; Joana Hygino; Jorge Paes Barreto Marcondes Souza; Cleonice A.M. Bento
Journal of Neuroinflammation

Dear Dr Bento,

I am pleased to inform you that your manuscript "Elevated proportion of TLR2- and TLR4-expressing Th17-like cells and activated memory B cells was associated with clinical activity of Cerebral Cavernous Malformations" (JNEU-D-21-00699R4) has been accepted for publication in Journal of Neuroinflammation.

Before publication, our production team will check the format of your manuscript to ensure that it conforms to the standards of the journal. They will be in touch shortly to request any necessary changes, or to confirm that none are needed.

Articles in this journal may be held for a short period of time prior to publication.
If you have any concerns please contact the journal.

Any final comments from our reviewers or editors can be found, below.
Please quote your manuscript number, JNEU-D-21-00699R4, when inquiring about this submission.

We look forward to publishing your manuscript and I do hope you will consider Journal of Neuroinflammation again in the future.

Best wishes,

Journal of Neuroinflammation
<https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/>

Comments:
