



Universidade Federal do Estado
do Rio de Janeiro

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Instituto Biomédico



Programa de Pós-Graduação em Biologia
Molecular e Celular

**Impacto da gestação na frequência e função das células T
auxiliares foliculares circulantes: relação com hormônios
gestacionais e produção de anticorpos IgG**

Clarice Monteiro Rodrigues Santos

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

Rio de Janeiro

2016

Clarice Monteiro Rodrigues Santos

**Impacto da gestação na frequência e função das células T
auxiliares foliculares circulantes: relação com hormônios
gestacionais e produção de anticorpos IgG**

Defesa de dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

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

Rio de Janeiro

2016

Ficha Catalográfica:

Santos, Clarice Monteiro Rodrigues
Impacto da gestação na frequência e função das células T
auxiliares foliculares circulantes: relação com hormônios
gestacionais e produção de anticorpos IgG/ Clarice Monteiro
Rodrigues Santos – Rio de Janeiro, 2016

xiv 69f.: il.

Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) –
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

1. Gestação 2. Célula T folicular 3. Hormônios 4. Anticorpos

I. Título

Clarice Monteiro Rodrigues Santos

Impacto da gestação na frequência e função das células T auxiliares foliculares circulantes: relação com hormônios gestacionais e produção de anticorpos IgG

Defesa de dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Banca examinadora:

Dra. Joana Hygino da Silva Machado/UNIRIO

Dra. Joelma Freire de Mesquita, Departamento de Genética/UNIRIO

Dr. Regis Mariano de Andrade, Departamento de Clínica

Médica/UNIRIO

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Veronica e Tércio, por toda a presença, o carinho, o amor, a preocupação, o apoio e a influência na minha formação pessoal e profissional.

Agradeço à Deus, por ter me dado a dádiva da vida e da perseverança.

Agradeço ao meu noivo, Manoel do Carmo, pela compreensão nos momentos em que me tornei ausente ao me dedicar a este trabalho.

Agradeço à minha orientadora, Cleonice Alves de Melo Bento, pela paciência, pelo conhecimento transmitido, por acreditar em mim e por me proporcionar o prazer da convivência com uma pessoa e profissional tão maravilhosa e admirável.

Agradeço à equipe do LILiT - UNIRIO, por ter me mostrado os bons frutos de um ótimo trabalho em equipe.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação da UNIRIO, por me proporcionar esta caminhada de conhecimentos.

As agências de fomento CAPES, FAPERJ e CNPq, pelo apoio financeiro que, sem ele, não conseguiria concluir este trabalho.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Considerações gerais.....	1
1.2	Linfócitos T CD4 ⁺ e alguns fenótipos efetores e reguladores.....	2
1.2.1	Linfócitos Th1	2
1.2.2	Linfócitos Th2.....	3
1.2.3	Linfócitos Th17.....	3
1.2.4.	Linfócitos Th9 e Th22.....	4
1.2.5	Linfócitos T reguladores e o controle das reações inflamatórias	6
1.2.6	Linfócitos T auxiliares foliculares.....	7
1.3	Imunomodulação materna no ciclo gestatório	13
1.3.1	Eventos iniciais na concepção	13
1.3.2	Imunomodulação materna pelos hormônios gestacionais.....	14
1.3.3	Células T e a interface materno-fetal.....	17
2.	OBJETIVO.....	20
2.1	Geral	20
2.2	Específicos	20
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Pacientes.....	21
3.2	Obtenção e estimulação das células do sangue periférico <i>ex vivo</i>	21
3.3	Análise Fenotípica por Citometria de Fluxo	22
3.4	Dosagem de estrogênio e de progesterona	23
3.5	Dosagem de anticorpos IgG anti-CMV e anti-HBs	24
3.6	Análises estatísticas	25
4.	RESULTADOS.....	26
4.1	Impacto da gestação na frequência das células T _{FH} de memória coexpressando os marcadores PD-1 e ICOS.....	26
4.2	Impacto da gestação na frequência das células T _{FH} coexpressando os marcadores CXCR3 e PD-1	27
4.3	Impacto da gestação no perfil de citocinas secretado pelas células T _{FH} periféricas	29

4.4 Perfil de citocinas e a frequência de células T _{FH} CXCR3 ⁺ periféricas de acordo com a expressão de PD-1	32
4.5 Frequência de células T _{FH} CXCR3 ⁺ periféricas e a produção de anticorpos IgG	33
4.6 Correlação entre o perfil de citocinas de células T _{FH} CXCR3 ⁺ e a produção de anticorpos IgG anti-CMV e HBs	34
4.7 Níveis plasmáticos de hormônios gestacionais e a frequência das células T _{FH} CXCR3 ⁺ periféricas de acordo com a expressão de PD-1	34
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES	45
7. BIBLIOGRAFIA	46
8. ANEXOS	66
8.1 Anexo 01	66
8.2 Anexo 02	68

Lista de Figuras

Figura 1. Eventos envolvidos na diferenciação das principais células T CD4 ⁺ efectoras.....	5
Figura 2. As células T reguladoras e a homeostase imune.....	8
Figura 3. Geração de células B de memória e de plasmócitos dependentes das células T _{FH}	9
Figura 4. Auxílio das células T _{FH} às células B em diferentes fases da resposta imune humoral	12
Figura 5. Resumo da imunomodulação materna em decorrência dos hormônios gestacionais.....	16
Figura 6. Estratégia de confinamento das células T CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR5 ⁺ ICOS ⁺ PD-1 ⁺	26
Figura 7. Impacto da gestação na frequência das células T CD4 ⁺ CXCR5 ⁺ CD45RO ⁺ PD-1 ⁺ ICOS ⁺ periféricas.....	27
Figura 8. Estratégia de confinamento das células T CD4 ⁺ CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁺ PD1 ⁺	28
Figura 9. Impacto da gestação na frequência das células T CD4 ⁺ CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁺ PD-1 ⁺	29
Figura 10. Estratégia de confinamento das células T CD4 ⁺ CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁺ produtoras de citocinas.....	30
Figura 11. Avaliação do perfil de citocinas das células T CD4 ⁺ CXCR5 ⁺ periféricas, coexpressando ou não CXCR3.....	31

Figura 12. Correlação entre os níveis plasmáticos de IgG anti-CMV e anti-HBs com a frequência de células T CD4⁺CXCR5⁺CXCR3⁺ periféricas de acordo com a expressão de PD-1..... 33

Figura 13. Correlação entre os níveis plasmáticos de IgG anti-CMV e anti-HBs com a frequência de células T CD4⁺CXCR5⁺CXCR3⁺ periféricas secretoras de citocinas..... 35

Figura 14. Correlação entre os níveis plasmáticos de estrogênio e progesterona com a frequência de células T CD4⁺CXCR5⁺CXCR3⁺ periféricas de acordo com a expressão de PD-1..... 36

Lista de tabelas

Tabela 1. Correlação entre a produção de citocinas e a frequência de células T CD4 ⁺ CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁺ de acordo com a expressão de PD-1.....	32
--	----

Lista de abreviaturas

APC – célula apresentadora de antígeno
BATF – fator de transcrição de zíper de leucina
BCL-6 - do inglês, B-cell lymphoma 6
BLIMP-1– do inglês, B lymphocyte-induced maturation protein-1
CD – grupo de diferenciação
CMV - citomegalovírus
CTL – célula T citotóxica
CTLA-4 - antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
DC – célula dendrítica
E2 - estradiol-17 β
ELISA - do inglês, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Foxp3 - do inglês, X-linked Forkhead box P3
GATA - do inglês, globin transcription factor
GITR - receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoides
GM-CSF - fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
HBsAg – antígeno da superfície do vírus da hepatite B
hCG - gonadotrofina coriônica humana
HIV – vírus da imunodeficiência humana
HO-1 - heme oxigenase-1
HRP – do inglês, horseradish peroxidase
ICAM - molécula de adesão intercelular
ICOS – coestimulador induzível de célula T
ICOS L - ligante do coestimulador induzível de célula T
IDO - indoleamina 2,3-dioxigenase
IO – ionomicina
IFN - interferon
Ig - imunoglobulina
IL – interleucina
IL-2R - cadeia α do receptor de IL-2
IRF4 – fator 4 regulador de interferon
iTreg - Treg induzidas
LAG-3 – gene 3 de ativação linfocitária

LIF- fator inibidor de leucemia
LT- linfotoxina
mAbs - anticorpos monoclonais
MHC – complexo principal de histocompatibilidade
NK – célula assassina natural
nTreg - Treg naturais
PD-1 – receptor de morte programada 1
PD-L1 – ligante de PD-1
PGE2 - prostaglandina E2
PMA - acetato miristato de forbol
SAP – proteína associada ao SLAM
SFB – soro fetal bovino
SLAM – molécula de ativação da sinalização de linfócito
STAT – transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TCR - receptor de célula T
TFH – célula T helper folicular
TGF - fator transformador de crescimento
Th – célula T helper ou do tipo auxiliadora
TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF – fator de necrose tumoral
Treg – célula T regulatória
Tr1 - célula T regulatória do tipo 1
TSLPR - receptor de linfopoietina derivado do estroma tímico
uNK - células assassinas naturais uterinas
VCAM - molécula de adesão celular vascular

RESUMO

As células T auxiliares foliculares (T_{FH}) são um distinto subtipo de células T $CD4^+$, que regulam o desenvolvimento da imunidade humoral por promover a produção de plasmócitos produtores de anticorpos e células B de memória longa. Classicamente, células T_{FH} são identificadas pela alta expressão de CXCR5 associado a uma elevada produção de IL-21. Sabe-se que a gravidez favorece a resposta imune humoral, mas, até agora, estudos sobre o impacto dos eventos imunes associados a gestação na frequência e função das células T_{FH} estão faltando. Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar a frequência e o perfil de citocinas de diferentes subtipos de células T $CD4^+ CXCR5^+$ através de citometria de fluxo. Ademais, nós também investigamos uma possível relação entre este subtipo de célula T e os níveis periféricos de estrogênio, progesterona e IgG anti-CMV e anti-HBs. Em nosso estudo, a gestação favoreceu a expansão da população das células T $CD4^+ CD45RO^+ CXCR5^+ PD-1^+ ICOS^+$ e a frequência das células T $CD4^+ CXCR5^+$, coexpressando CXCR3 e PD-1, quando comparadas às não grávidas. Com o intuito de analisar a rede de citocinas, as amostras foram brevemente estimuladas com PMA e IO e, então submetidas à análise por citometria. Nós observamos que a produção de IL-21, IL-6, IL-17, IFN- γ e IL-10 foram correlacionadas positivamente com a frequência das células T $CD4^+ CXCR5^+ CXCR3^+$ em ambos os grupos estudados. Não obstante, a porcentagem destas células produtoras de IL-21, IL-10 ou IL-6 foi significativamente maior nas gestantes. Interessantemente, nós observamos uma correlação positiva entre a frequência das células T_{FH} e os níveis periféricos de estrogênio e de IgG anti-CMV. Nenhuma correlação foi observada com relação à progesterona. Já os títulos de IgG anti-HBs da superfície do vírus da hepatite B foram diretamente correlacionados com a frequência das células T $CD4^+ CXCR5^+ CXCR3^+ PD-1^+$. Ademais, enquanto a frequência de T_{FH} produtoras de IL-6 e de IL-21 foi positivamente relacionada com os níveis séricos de IgG anti-CMV, os títulos circulantes de IgG anti-HBs foram diretamente correlacionados com a presença de células T_{FH} produtoras de IL-21. Em resumo, nossos achados sugerem, mesmo que indiretamente, que a gestação, através da produção de estrogênio, favorece a expansão das células T_{FH} funcionais capazes de amplificar a produção de anticorpos. Embora este estudo seja preliminar, os dados descritos aqui são muito interessantes e apontam para a possibilidade de o estrogênio agir como um potente imunomodulador da resposta humoral.

ABSTRACT

Follicular helper T (TFH) cells are a distinct subset of CD4⁺ helper T cells that regulate the development of humoral immunity, by promoting antibody-producing plasma cells and long-lived memory B cells. Classically, Tfh cells are identified by high expression of CXCR5 associated with elevated IL-21 production. It is known that pregnancy favors humoral immune response, but, until now, studies about the impact of pregnancy-related events on the frequency and function of T_{FH} cells are lacking. In this context, the present study aimed to evaluate the frequency and cytokine profile of different TCD4⁺CXCR5⁺ subsets through flow cytometry. Further, we also analyzed a possible relationship between these T cell subsets and the peripheral levels of estrogen, progesterone, anti-HBs and anti-citomegalovirus IgG antibodies. In our study, the frequency of CD4⁺ CD45RO⁺ CXCR5⁺ PD-1⁺ ICOS⁺ T cells and CD4⁺ CXCR5⁺ T cells, co-expressing CXCR3 and PD-1, was significantly higher in pregnant women than non-PW. In order to analyse the cytokine network, the samples were briefly stimulated with PMA and ionomycin and, then submitted to cytometry. We observed that the production of IL-21, IL-6, IL-17, IFN- γ and IL-10 was positively related with the CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ T cells frequency in both studied groups. Nevertheless, the percentage of these cells producing IL-21, IL-10 or IL-6 was significantly higher in PW. Interestingly, we have observed a positive correlation between the frequency of this similar T_{FH} and the peripheral levels of estrogen and IgG anti-CMV. No correlation was observed with regard to progesterone. The anti-HBs IgG have a positive correlation only between the CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ PD-1⁺ frequency. Furthermore, while the frequency of IL-6- and IL-21-secreting T_{FH} cells was positively related with anti-CMV IgG levels, the anti-HBs IgG titers were directly correlated with IL-21-secreting T_{FH} cells. In summary, our findings suggest, even indirectly, that pregnancy, through estrogen production, favors T_{FH} cell expansion, and then, amplify the antibodies production. Although this study is preliminary, the data described here are very interesting and point to the possibility of estrogen as potent immunomodulator of humoral response.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

O sistema imunológico é formado por células e moléculas que atuam juntas a fim de identificar e eliminar ou confinar potenciais micro-organismos invasores causadores de doenças. A defesa contra esses micro-organismos é mediada por reações iniciais da imunidade inata e por respostas tardias da imunidade adaptativa.

Na hierarquia das funções imunes, os linfócitos T CD4⁺ ocupam uma posição de destaque por regular a função de todas as células da imunidade natural, tais como macrófagos e neutrófilos, bem como as outras células da imunidade adquirida, os linfócitos T CD8⁺ e as células B. Apesar da participação majoritária das células T CD4⁺ nas fases eferentes da resposta imune, a indução e o estabelecimento da resposta imune primária específica mediada por estes linfócitos são dependentes das células apresentadoras de antígeno (APC, do inglês *Antigen Presenting Cells*), particularmente das células dendríticas (DCs, do inglês *Dendritic Cells*) (Wan & Flavell, 2009).

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

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

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

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

1.2 Linfócitos T CD4⁺ e alguns fenótipos efetores e reguladores

1.2.1 Linfócitos Th1

Apesar de a biologia das células T CD4⁺ ser complexa, alguns aspectos funcionais dessa população referentes à definição de diferentes fenótipos são bem caracterizados. Nesse contexto, células T CD4⁺ definidas como auxiliares do tipo 1 (Th1, do inglês *T helper 1*) são conhecidas por produzirem interferon (IFN)- γ , IL-2 e linfotóxina (LT)- α . A principal citocina liberada pelas DCs responsável pela indução desse fenótipo é IL-12 (Manetti *et al.*, 1993), mas o IFN- γ também contribui para a diferenciação das células Th1 (Farrar *et al.*, 2002). A IL-12 e o IFN- γ , por induzirem a expressão do transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT, do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription*)-4, favorecem o estabelecimento do fenótipo Th1 através da elevação da expressão de T-bet, considerado o principal fator de transcrição envolvido na estabilidade das células Th1 (Farrar *et al.*, 2002). As células Th1 são caracterizadas pela expressão superficial de elevados níveis dos

receptores de quimiocinas CXCR3 e CCR5, permitindo o seu recrutamento para os sítios inflamatórios que produzem as quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 (ligantes do CXCR3); CCL2, CCL8 e CCL5 (ligantes do CCR5) (Antonelli *et al.*, 2014). Classicamente, as células Th1, através da produção de elevados níveis de IL-2 e IFN- γ , medeiam a resposta imune celular fundamental no combate a micro-organismos intracelulares obrigatórios ou facultativos por ativar fagócitos, células assassinas naturais (células NK, do inglês *natural killer*) e linfócitos T CD8⁺. Ademais, o IFN- γ também induz a produção de IgG1 e IgG3 pelos linfócitos B humanos (Mckinstry *et al.*, 2010) (Figura 1).

1.2.2 Linfócitos Th2

Em contrapartida, na presença de elevados níveis de IL-4, as DCs favorecem a diferenciação das células T CD4⁺ em células Th2 (Figura 1). Esse processo de comprometimento se dá pela capacidade da IL-4 induzir nas células T CD4⁺ a expressão de STAT-6 que, por sua vez, eleva a expressão de GATA (do inglês, *globin transcription factor*)-3. No núcleo, a proteína GATA-3 induz a transcrição de genes que codificam as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (Farrar *et al.*, 2002). Diferente das células Th1, as células Th2 humanas têm sido caracterizadas pela expressão dos receptores de quimiocinas CCR3, CCR4 e CCR8 que as direcionam para áreas ricas em certas quimiocinas, tais como CCL11, CCL26, CCL3, CCL5 e CCL1 (Cosmi *et al.*, 2001). As citocinas liberadas pelas células Th2, por induzirem as células B a produzirem IgE, têm sido implicadas na resposta imune protetora contra infestações por helmintos e na patogênese das reações de hipersensibilidade do tipo I (Manaki *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2010a; Zhu *et al.*, 2010b).

1.2.3 Linfócitos Th17

Mais recentemente, outro subtipo celular, o fenótipo Th17, foi descrito. A indução desse fenótipo em humanos depende das citocinas secretadas pelas DCs, IL-1 β e, principalmente, IL-23, em associação com o fator transformador de crescimento (TGF, do inglês *Transforming Growth Factor*)- β , que induzem o transativador RORC, envolvido em regular a expressão de diferentes genes

implicados na manutenção do fenótipo Th17 (Gutcher & Becher, 2007) (Figura 1). Os linfócitos Th17 classicamente sintetizam IL-17A (IL-17), IL-17F, IL-21 e IL-22 que têm como principal função induzir as células imunes e parenquimatosas a secretar IL-8, principal citocina/quimiocina envolvida no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção (Miossec, 2009; Annunziato *et al.*, 2012). As células Th17 também têm a habilidade de induzir as células B a produzirem IgM, IgG e IgA, mas não IgE (Annunziato *et al.*, 2007). Esse fenótipo tem sido amplamente implicado na resposta imune contra bactérias extracelulares e fungos (Annunziato, 2015; Szulc-Dąbrowska, 2015). No entanto, na ausência do TGF- β , associada à liberação persistente de IL-23 e IL-1 β , as DCs induzem um subtipo de células Th17 envolvidas na patogênese de muitas doenças crônicas, como as doenças autoimunes (Zhang, 2015). Na superfície celular, as células Th17 humanas expressam elevados níveis dos receptores de quimiocina CCR6 e CCR4, o que facilita esses linfócitos a migrarem para áreas inflamadas ricas nas quimiocinas CCL3, CCL5 e CCL20 (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Annunziato *et al.*, 2007).

1.2.4. Linfócitos Th9 e Th22

Inerente à complexa biologia das células T CD4⁺, outros subtipos menores têm sido descritos, mas com estudos mais limitados em modelos humanos, tais como as células Th9 e Th22. Estudos em modelos animais sugerem que as células Th9, produtoras de IL-9, podem participar da resposta protetora contra tumores e infecções parasitárias, como também podem estar envolvidas na patogênese de diversas doenças como alergia, colite e encefalomielite autoimune experimental (Kaplan, Hufford & Olson 2015). O papel dessas células no modelo humano ainda é pouco conhecido. Estudo mais recente demonstrou uma maior frequência dessas células na lâmina própria de pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn, duas patologias inflamatórias do intestino, quando comparado às amostras de indivíduos saudáveis (Gerlach *et al.*, 2014). Finalmente, apesar da IL-22 ter sido descrita originalmente como um produto secretado pelas células Th17, células T CD4⁺ capazes de produzir IL-22 na ausência de IL-17 (Th22) têm sido recentemente descritas em doenças autoimunes, tais como psoríase e esclerose múltipla (Skurkovich *et al.*, 2001; Jia & Wu, 2014; Rolla *et al.*, 2014; Wing *et al.*, 2016).

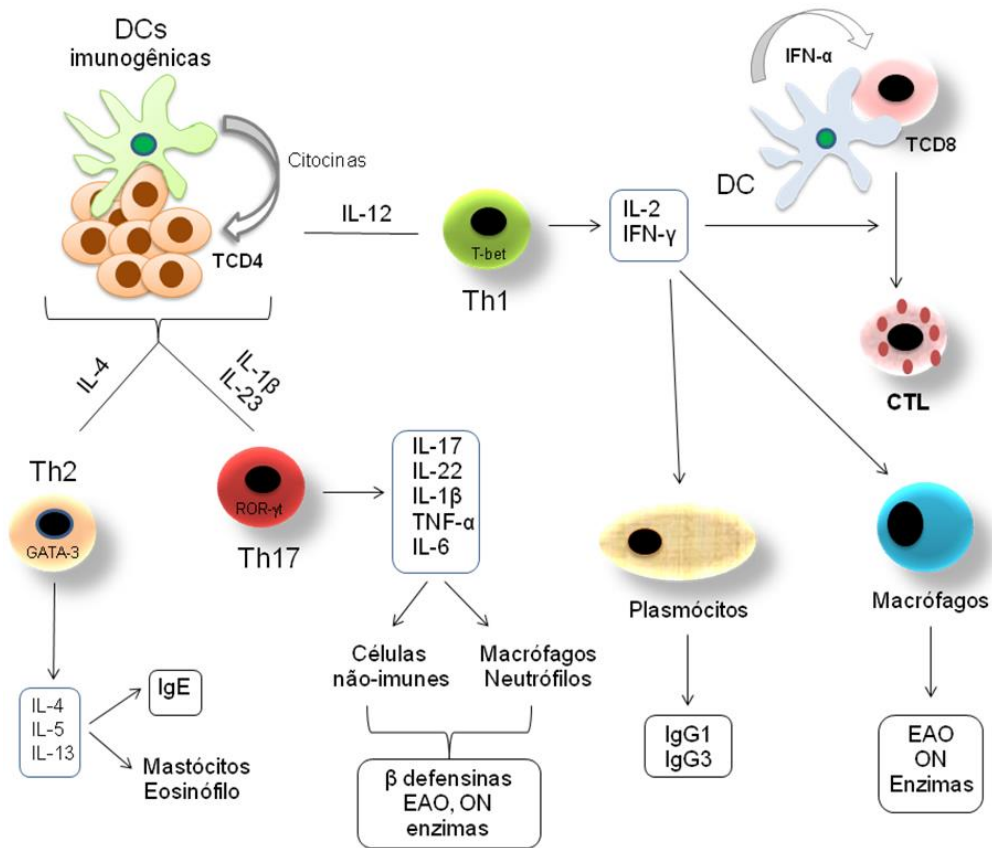


Figura 1. Eventos envolvidos na diferenciação das principais células T CD4⁺ efectoras. Durante o processo natural de ativação da resposta imune específica mediada pelas células T CD4⁺, as células dendríticas (DCs) profissionais (imunogênicas) apresentam diferentes peptídeos de proteínas antigênicas no contexto das moléculas do MHC de classe II. Durante essa sinapse imunológica, moléculas co-estimuladoras expressas na superfície das DCs, particularmente CD80 e CD86, interagem com o marcador CD28 expresso nas células T CD4⁺, permitindo, assim, a indução de diferentes vias de sinalização que culminam na proliferação e diferenciação desses linfócitos em diferentes fenótipos que produzem um conjunto polarizado de citocinas pró-inflamatórias. Nesse contexto, enquanto a diferenciação das células T CD4⁺ humanas no fenótipo Th1 depende, principalmente, da produção de IL-12 pelas DCs; a formação dos fenótipos Th2 e Th17 é principalmente garantida quando elevadas concentrações de IL-4 e IL-23, respectivamente, são liberadas por essa célula apresentadora de antígeno. A produção de IFN- γ pelas células Th1 regula diferentes eventos da resposta imune contra micro-organismos intracelulares obrigatórios e facultativos, tais como aumento do poder microbicida dos fagócitos [produção de espécies ativas do oxigênio (EAO), óxido nítrico (NO) e catepsinas (enzimas)] e produção de IgG1 e IgG3 pelas células B. Adicionalmente, a produção de IL-2 pelas células Th1 pode favorecer a diferenciação das células T CD8⁺ em linfócitos T citotóxicos, células que matam o alvo principalmente pela liberação de perforina e granzimas. Por outro lado, proteção contra helmintos é particularmente depende da produção das citocinas pelas células Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) que induzem a produção de IgE, favorece o recrutamento de eosinófilos para área de infestação assim como, com ajuda da IgE, favorece uma resposta inflamatória helmintocida executada pelos mastócitos e eosinófilos. Mais recentemente, citocinas secretadas pelas células Th17, tais como IL-17A (IL-17), IL-21 e IL-22, podem coordenar uma resposta lesiva contra bactérias extracelulares e fungos, por favorecer o recrutamento e ativação de monócitos e, principalmente, neutrófilos. Fonte: Monteiro, C. & Bento, C.A.M.

1.2.5 Linfócitos T reguladores e o controle das reações inflamatórias

Além dos fenótipos efetores das células T CD4⁺, outra subpopulação de células T CD4⁺ é fundamental no controle das respostas imunes, portanto, da homeostase imune: os linfócitos T reguladores.

Os linfócitos T CD4⁺ regulatórios (Treg) são centrais não apenas na manutenção da auto-tolerância imune, como também essenciais no controle das respostas inflamatórias contra patógenos, favorecendo o restabelecimento da homeostase (Pankratz *et al.*, 2016). Apesar de existirem diferentes subtipos de células Treg descritos na literatura, a maioria dos estudos são centrados na descrição fenotípica e funcional das células Tregs que expressam o marcador Foxp3 (do inglês, *X-linked Forkhead box P3*), um fator de transcrição essencial para seu desenvolvimento, manutenção e função (Vignali *et al.*, 2008) (Figura 2).

Ao decorrer de duas décadas, duas subpopulações de Treg têm sido descritas e analisadas: as Treg naturais (nTreg) e as Treg induzidas (iTreg). Enquanto as primeiras são geradas naturalmente no timo, as iTregs são induzidas na periferia após o encontro com o antígeno apresentado por APC tolerogênicas (Schumacher & Zenclussen, 2014). Para o desenvolvimento das nTregs é imprescindível o envolvimento de moléculas co-estimulatórias, como a expressão da cadeia α do receptor de IL-2 (IL-2R), conhecido como CD25; do receptor de linfopoietina derivado do estroma tímico (TSLPR, do inglês *thymic stromal-derived lymphopoietin receptor*), do CD154 (ou CD40L), do receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoides (GITR, do inglês *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*), do STAT5 e, finalmente, da ligação de CD28 com as moléculas CD80/CD86 expressas pelas APCs locais (Bettini & Vignali, 2010). Periféricamente, essas células são identificadas como sendo CD3⁺ CD4⁺ CD25^{+/high} ^mFoxp3⁺ que expressam níveis vestigiais do marcador CD127 (Sakaguchi *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2006). Outros marcadores que podem ser expressos são associados à capacidade funcional dessas células, tais como o CD39 e o antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4/CD152) (Fontenot *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2009). Uma vez na periferia, essas células migram para os sítios inflamatórios e suprime a ação de diversos linfócitos efetores, especialmente os linfócitos T auxiliares Th1, Th2, Th17 e T foliculares (Ohkura *et al.*, 2013). Os mecanismos pelos quais as células nTregs suprimem as respostas inflamatórias são variados e envolvem tanto a

inibição das células efetoras através de contato célula-célula, incluindo a via Fas/FasL e o complexo granzimas B/perforina, quanto a liberação de altos níveis de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 e TGF- β (Raimondi *et al.*, 2007; Jonuleit *et al.*, 2001; Roncarolo *et al.*, 2001).

Apesar de serem fenotipicamente idênticas, as clássicas iTregs distinguem-se das nTregs pela sua geração, destino celular e estabilidade funcional. O desenvolvimento das células iTregs Foxp3⁺ requer, em parte, estímulos via receptor de célula T (TCR, do inglês *T cell receptor*) e as citocinas IL-2 e TGF- β (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009).

Os linfócitos Tr-1 representam outra subpopulação que está envolvida na regulação da resposta imune e diferenciam-se pela secreção de IL-10 pelas DCs tolerogênicas que expressam a enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) (Mahnke & Enk, 2005; Penna, Giarratana & Amuchastegui, 2005) (Figura 2). Fenotipicamente, essas células T reguladoras em humanos são identificadas pela coexpressão de CD49b e do gene 3 de ativação linfocitária (LAG-3, do inglês *Lymphocyte-activation gene 3*) e pela produção de elevados níveis de IL-10, principalmente quando ativadas via TCR (Roncarolo *et al.*, 2001; Levings, Sangregorio & Sartirana, 2002; Gagliani *et al.*, 2013). A maioria desses linfócitos são T CD4⁺, mas já foram descritos como linfócitos T CD8⁺ Tr-1-símiles (Steinbrink *et al.*, 1999).

1.2.6 Linfócitos T auxiliares foliculares

Após as descobertas dos diferentes subtipos de linfócitos T auxiliares, como Th1, Th2, Th17 e Treg; outro importante subtipo, especializado em auxiliar os linfócitos B, foi descrito (Crotty, 2015). A existência dos linfócitos T auxiliares foliculares (T_{FH}, do inglês *T follicular helper*) foi primeiramente proposta por alguns pesquisadores em 2000 e 2001 (Schaerli *et al.*, 2000; Breitfeld *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001). Entretanto, só em 2009, quando o Bcl-6 (do inglês, *B-cell lymphoma 6*) foi identificado como o fator de transcrição único desse subtipo celular, os linfócitos T_{FH} foram aceitos como sendo uma nova linhagem de células T CD4⁺ (Johnston *et al.*, 2009; Nurieva *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009). Desde então, os linfócitos T_{FH} têm sido descritos como capazes de auxiliar os linfócitos B no desenvolvimento do centro

germinativo e na troca de classe de anticorpos (Johnston *et al.*, 2009; Nurieva *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009) (Figura 3).

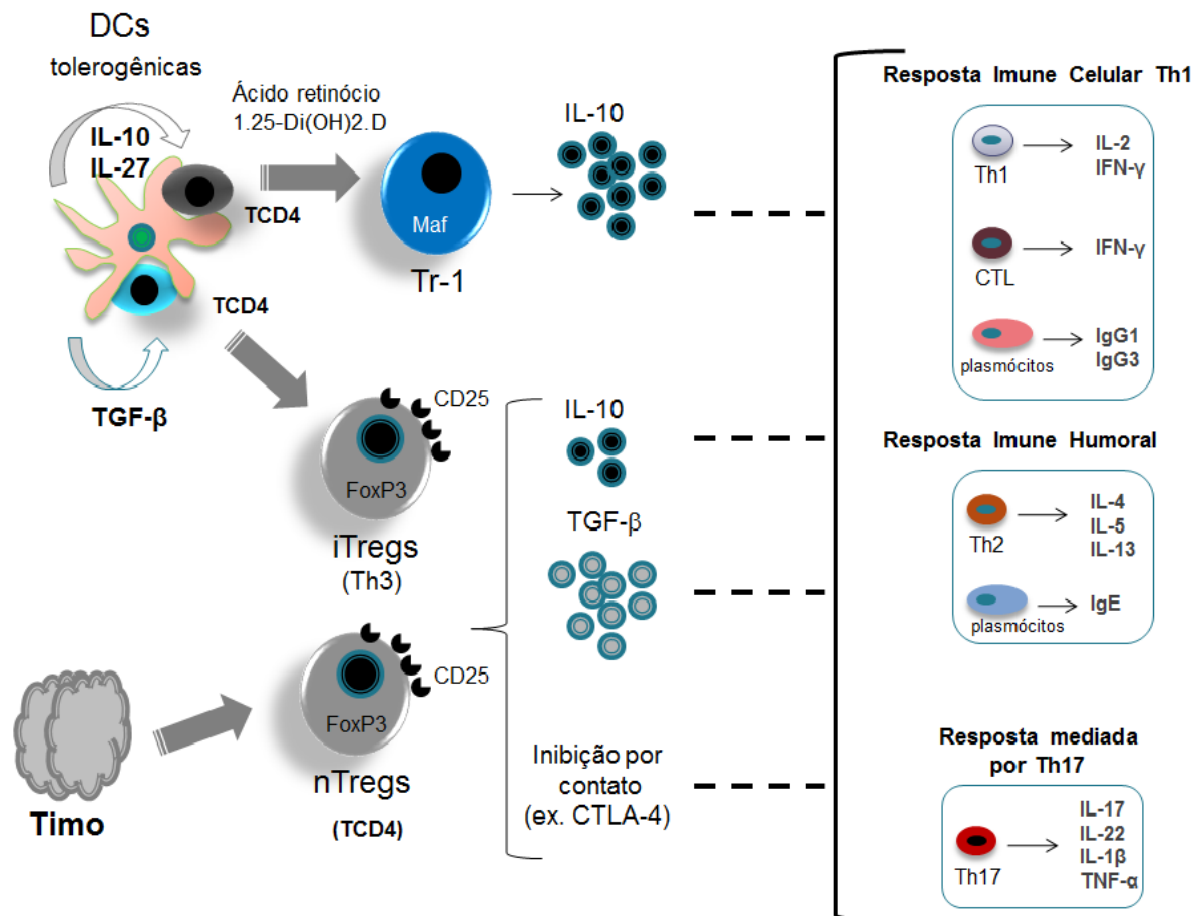
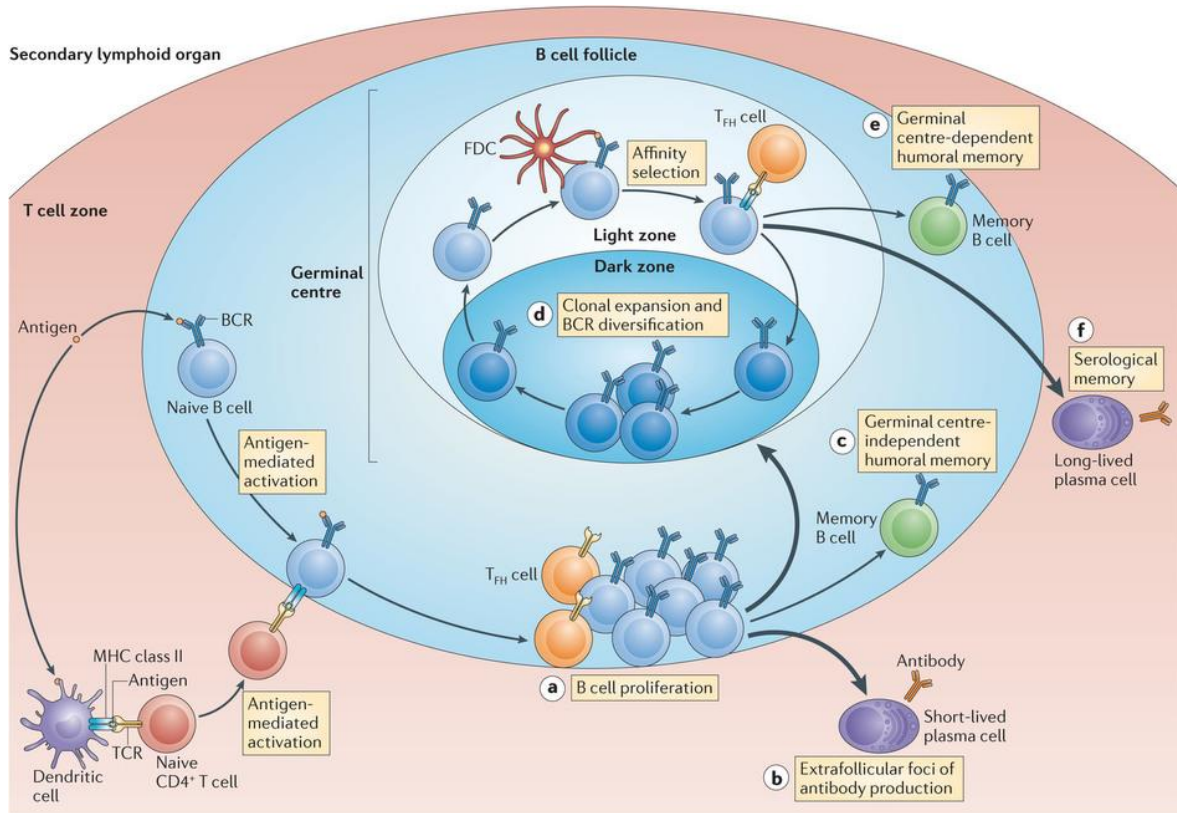


Figura 2. As células T reguladoras e a homeostase imune. Durante respostas imunes inflamatórias, a produção excessiva de citocinas pelas células Th1 e Th17 patogênicas tem sido atrelada à distúrbios na rede de regulação, principalmente executada pelos linfócitos T reguladores (Tregs). As células Tregs representa uma subpopulação de células T CD4⁺ relativamente heterogênea, sendo as células T CD4⁺ FoxP3⁺ CD25⁺ o subtipo mais estudado nas doenças autoimunes. Essas células podem ser tanto induzidas (iTregs) na periferia quando reconhecem os peptídeos específicos apresentados pelas células dendríticas (DCs) tolerogênicas, quanto geradas naturalmente no timo (nTregs). A terceira subpopulação é induzida por DCs tolerogênicas na presença do metabólito da vitamina D [1,25(OH)2D] ou do ácido retinóico. Essas células, conhecidas como células Tr-1, são negativas para o FoxP3 mas expressam elevados níveis do fator de transcrição Maf. Os mecanismos de ação executados pelas células para controlar reações inflamatórias são diversos e envolvem a inibição por contato com a célula alvo efetora (iTreg e nTregs) e/ou a liberação de citocinas anti-inflamatórias, particularmente IL-10 e TGF- β . Fonte: Monteiro, C. & Bento, C.A.M.

As células T_{FH} humanas localizadas nos órgãos linfoides secundários são caracterizadas pela alta expressão do fator de transcrição Bcl-6, do receptor de morte programada-1 (PD-1), do coestimulador induzível (ICOS, do inglês *inducible T-*

cell costimulator), do receptor de quimiocina CXCR5 e da produção de IL-21; e pela baixa expressão do receptor de quimiocina CCR7 (Onabajo *et al.*, 2013).



Nature Reviews | Immunology

Figura 3: Geração de células B de memória e de plasmócitos dependentes das células T_{FH}. Células B e células T ativadas migram para a borda do folículo de célula B e zona de célula T nos órgãos linfóides secundários, respectivamente, levando ao estabelecimento de uma interação das células T-B, permitindo que as células B recebam sinais auxiliares das células T CD4+. **a)** Células T e B ativadas migram para dentro do folículo, onde as células B iniciam a proliferação. **b)** Algumas células B diferenciam-se em plasmócitos de vida curta, que dão origem ao foco extrafolicular e **c)** algumas se desenvolvem em células B de memória independentes do centro germinativo. **d)** Alternativamente, as células B ativadas podem retornar ao folículo e promover uma rápida proliferação para compor o centro germinativo. Na zona escura do centro germinativo, a expansão clonal de celular B antígeno-específicas é acompanhada por pequenas alterações do receptor de célula B (BCR) através da hipermutação somática. As células B que saem do ciclo celular povoam a zona clara, aonde a seleção por afinidade é mediada através da interação com um imunocomplexo sobre as células dendríticas foliculares (FDC) e na presença de células T_{FH} antígeno-específicas. As células B do centro germinativo que passaram pelo processo de maturação de afinidade podem entrar novamente no ciclo do centro germinativo. **e)** Alternativamente, estas células B saem do centro germinativo como células B de memória **f)** ou como plasmócitos de vida longa, contribuindo para a memória sorológica. Fonte: Kurosaki, Kometani & Ise, 2015.

A diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ em linfócitos T_{FH} requer, principalmente, a indução do fator de transcrição Bcl-6, porém, outros fatores como IRF4 (do inglês, *interferon regulatory factor 4*), BATF (do inglês, *basic leucine zipper transcription factor*) e c-Maf também estão envolvidos na indução desse fenótipo (Onabajo *et al.*, 2013). Diversos estímulos vêm sendo descritos como importantes para a indução da expressão do Bcl-6, porém, as citocinas IL-6, IL-12 e IL-21 parecem ser as principais (Ma *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013a; Schmitt *et al.*, 2013). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que na ausência de IL-6, a diferenciação em linfócitos T_{FH} é comprometida (Eto *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2013b). A IL-6 pode ser secretada por DCs convencionais, DCs foliculares e por linfócitos B ativados (Tangy *et al.*, 2013). A IL-6 juntamente com a IL-12 ativa os STAT-1 e -3 que, juntos, induzem a expressão do Bcl-6 (Ma *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013a; Schmitt *et al.*, 2013). Já a IL-21 é capaz de ativar principalmente o STAT-3 e, de forma mais branda, o STAT-1; promovendo a expressão do Bcl-6 e também o aumento da expressão de c-Maf (Pallikkuth *et al.*, 2012). Além das citocinas IL-6, IL-12 e IL-21, a interação célula-célula é importante para a indução dos fatores de transcrição. A interação entre ICOS e seu ligante (ICOSL), presente nos linfócitos B, induz a produção de IL-21 pelas células T_{FH} (Paulos *et al.*, 2010; Bentebibel *et al.*, 2011) e é necessária para manter a expressão do Bcl-6 (Choi *et al.*, 2011). Uma vez expresso, o Bcl-6 reprime fatores de transcrição, como o Blimp-1 (do inglês, *B lymphocyte-induced maturation protein-1*), que induzem a diferenciação de outros fenótipos de linfócitos T CD4⁺, assim como regula a expressão de CXCR5, CCR7, PD-1 e ICOS (Choi *et al.*, 2011; Kroenke *et al.*, 2012).

Classicamente, a função dos linfócitos T_{FH} é de promover e sustentar a resposta imune humoral por auxiliar os linfócitos B nos folículos dos órgãos linfoides secundários (Figura 4). Portanto, a alta expressão do CXCR5 associada à baixa expressão do CCR7 permite que os linfócitos T CD4⁺ migrem, seguindo um gradiente de concentração formado pela quimiocina CXCL13, para os centros germinativos, que são estruturas localizadas nos órgãos linfoides secundários caracterizadas pela intensa proliferação e diferenciação de linfócitos B (Crotty, 2011).

Uma vez diferenciados, os linfócitos T_{FH} auxiliam na formação dos centros germinativos através de sinais necessários para a proliferação e sobrevivência dos linfócitos B (Tangy *et al.*, 2013; Crotty, 2011). Esses sinais são fornecidos, em nível

das células T_{FH} , pela expressão de moléculas de superfície, como ICOS e o ligante do CD40 (CD40L/CD154) (Ma & Deenick, 2014), e pela produção de IL-21 e IL-4 (Pallikkuth *et al.*, 2012). A IL-21 induz a expressão de Bcl-6 nos linfócitos B, permitindo a maturação dessas células e a sua diferenciação em plasmócitos secretores de anticorpos e em células B de memória (Pallikkuth, 2012; Crotty, 2011). A IL-4 promove a sobrevivência dos linfócitos B, prevenindo a apoptose (Crotty, 2011; Yusuf *et al.*, 2010). Os linfócitos T_{FH} também são importantes para os processos de hipermutação somática, maturação de afinidade e troca de classe de cadeia pesada do anticorpo (Tangy *et al.*, 2013; Crotty, 2011; Shulman *et al.*, 2013). Nesse sentido, com a ajuda de sinais cognitivos e solúveis provindos das células T_{FH} , outras classes de anticorpos além de IgM são produzidas, contendo nas regiões variáveis mutações pontuais que culminam com o aumento da afinidade de reconhecimento do anticorpo contra o antígeno. Conseqüentemente, quanto maior a afinidade, maior a capacidade dessa molécula em neutralizar antígenos.

A produção de anticorpos neutralizantes é necessária tanto para o desenvolvimento de uma imunidade protetora contra doenças infecciosas, como para o sucesso de diversas vacinas (Tangy *et al.*, 2013). Portanto, o estudo da biologia dessas células é fundamental, pois os resultados podem impactar no desenho de futuras estratégias de vacinas contra diferentes agentes infecciosos, assim como em sua modulação no contexto de doenças autoimunes mediadas por autoanticorpos. Entretanto, por questões éticas, acessá-las nos órgãos linfoides secundários é muito difícil. Felizmente, um estudo realizado por Locci e colaboradores (2013) identificou, em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*)-1, uma população de linfócitos T $CD4^+$ de memória no sangue periférico, com características semelhantes às células T_{FH} localizadas nos centros germinativos dos tecidos linfoides secundários. Neste estudo em questão, essa população foi caracterizada fenotipicamente como sendo $CD4^+ CXCR5^+ CXCR3^- PD-1^+$ e a frequência dessas células no sangue periférico foi diretamente relacionada à capacidade do paciente em produzir IgG neutralizantes contra diferentes isolados do HIV-1.

Alguns estudos mais recentes têm demonstrado que, de fato, uma vez diferenciadas em células T_{FH} e auxiliando as células B nos centros germinativos, as células T_{FH} podem sair do folículo secundário e (a) transitar pelos folículos vizinhos,

(Shulman *et al.*, 2013), ou (b) diminuir a expressão de Bcl-6 e passar a compor o pool de células T de memória circulantes (Kitano *et al.*, 2011; Shulman *et al.*, 2013). Fenotipicamente, essas células T_{FH} de memória circulantes têm sido identificadas como sendo CD45RO⁺ CXCR5⁺ (Bossaller *et al.*, 2006). Células T CD4⁺ CXCR5⁺ circulantes têm mostrado capacidade em auxiliar as células B, pelo menos em parte, por secretar grandes quantidades de IL-21 e IL-10 (Chevalier *et al.*, 2011; Morita *et al.*, 2011; Bentebibel *et al.*, 2013). Ademais, a expressão de ICOS e PD-1 (Simpson *et al.*, 2010; Tsai & Yu, 2014), associada à marcação com CCR6 e/ou CXCR3 (Morita *et al.*, 2011), tem ajudado a identificar as células T_{FH} periféricas mais funcionais.

Esses achados nos fornecem, portanto, ferramentas experimentais que possibilitam o estudo da biologia das células T_{FH} em diferentes contextos, como por exemplo, durante a gestação, aonde sabidamente a resposta imune humoral é favorecida (Robinson & Klein, 2012).

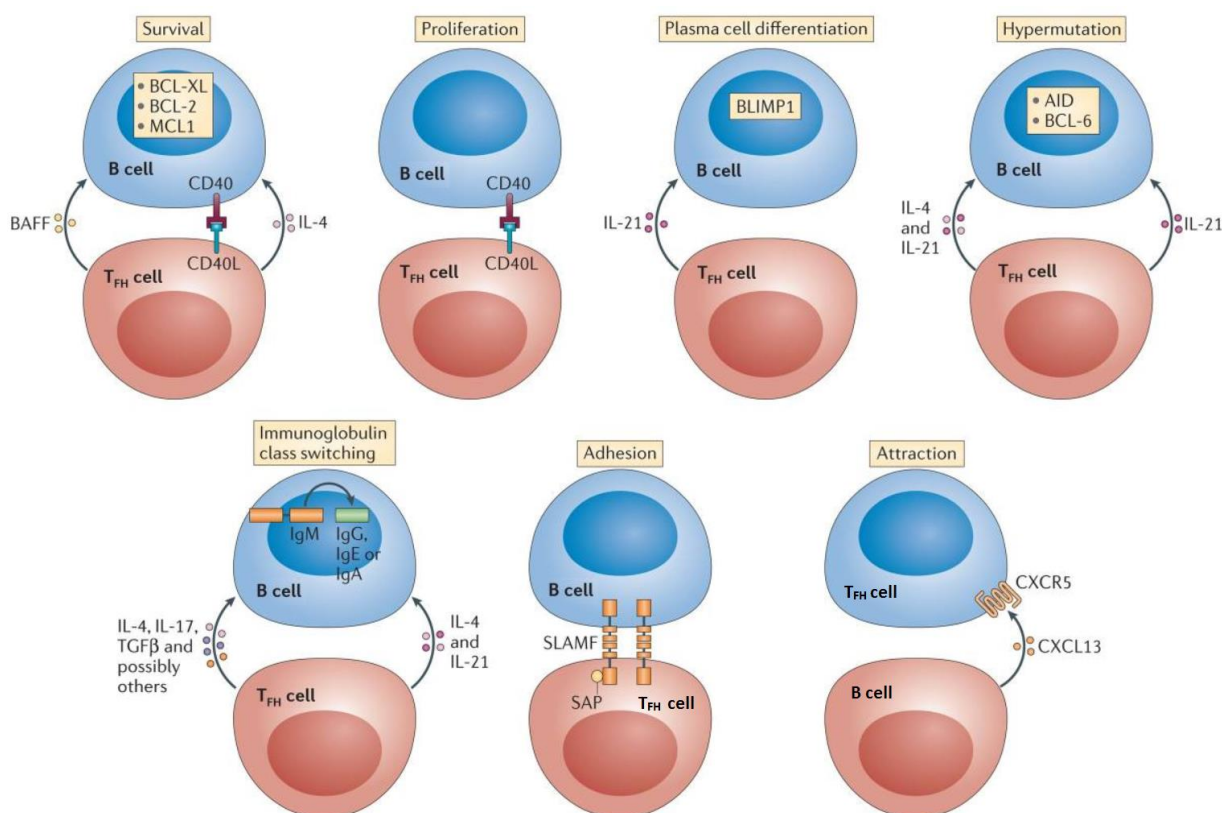


Figura 4: Auxílio das células T_{FH} às células B em diferentes fases da resposta imune humoral. Com o objetivo de simplificar, apenas alguns exemplos de fatores de transcrição, sinais cognitivos (moléculas de superfície) e solúveis (citocinas) importantes em cada processo da ativação das células B estão evidenciados na figura. Fonte: Adaptado de Crotty, 2015

1.3 Imunomodulação materna no ciclo gestatório

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

1.3.1 Eventos iniciais na concepção

A resposta imune materna aos antígenos paternos inicia-se quando antígenos presentes no líquido seminal entram em contato com o epitélio da mucosa cervical/vaginal (Moldenhauer *et al.*, 2009). Fatores solúveis contidos no sêmen induzem a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pelas células epiteliais do cérvix e do útero (Beaman *et al.*, 2011; Robertson *et al.*, 1996; Robertson, 2005; Robertson, 2007; Sharkey *et al.*, 2007), o que leva ao recrutamento de macrófagos (Jaiswal *et al.*, 2012), DCs, granulócitos (Robertson *et al.*, 1996) e linfócitos (Sharkey *et al.*, 2012.1) que acabam por acumular-se neste sítio anatômico por dias (Robertson *et al.*, 1996; Sharkey *et al.*, 2012).

No entanto, a indução e a manutenção das respostas inflamatórias maternas contra os antígenos seminais paternos são incompatíveis com a manutenção da fertilidade, já que o conceito expressa alguns alelos do complexo MHC de origem paterna (Trowsdale *et al.*, 2006), além da possível expressão de antígenos de histocompatibilidade menores relacionados ao cromossomo sexual (H-Y), no caso do conceito ser um menino (Bertrams *et al.*, 1971; Fernandez *et al.*, 1999; Hutter & Dohr, 1998; Martín-Villa *et al.*, 1996; Tafuri *et al.*, 1995; Thaler *et al.*, 1989; Zhou & Mellor, 1998). Logo, uma manobra para bloquear o avanço dessa resposta inflamatória é a presença, no líquido seminal, de agentes imunomoduladores, como a prostaglandina E2 (PGE2) e TGF- β (Robertson *et al.*, 2002; Kelly & Critchley, 1997).

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

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

1.3.2 Imunomodulação materna pelos hormônios gestacionais

Os hormônios gestacionais exercem diferentes efeitos sobre o sistema imune, possuindo ações pró-inflamatórias ou imunorreguladoras, dependendo da concentração (Cutolo *et al.*, 2004; Grossman, 1984) (Figura 5).

Durante a gravidez, a gonadotrofina coriônica humana (hCG) é inicialmente produzida pelo blastocisto, 6 a 8 dias após a fertilização (Bondule *et al.*, 1988; Lopata & Hay, 1989) e depois, pelo sinciciotrofoblasto (Hoshina *et al.*, 1985). Uma das funções do hCG é elevar a produção de progesterona (Chen *et al.*, 2011). Os níveis de hCG aumentam no primeiro trimestre de gravidez e diminuem para 10%

dos valores de pico durante o segundo e terceiro trimestres (Healy, 1987). É amplamente conhecido que a hCG tem propriedades imunomoduladoras, reduzindo, por exemplo, a proliferação e produção de citocinas inflamatórias pelas células T (Kaye & Jones, 1971; Adcock *et al.*, 1973; Han, 1974) e linfócitos B (Hammarström *et al.*, 1979) em resposta a diferentes estímulos. Estudos mais recentes têm sugerido que os efeitos supressores do hCG sobre os linfócitos efetores devem ser preferencialmente indiretos, através do favorecimento da expansão das células Treg (Bansal *et al.*, 2012).

Com relação ao estradiol-17 β (E2), o estrogênio mais potente, as concentrações séricas aumentam, em média, de 10 pM para 40 nM durante a gravidez (Hirano *et al.*, 2007). Dependendo da sua concentração, o E2 pode exercer um efeito pró-inflamatório ou anti-inflamatório (Straub, 2007; Van Vollenhoven & McGuire, 1994). Em níveis basais, o E2, induz a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β), inibe a produção e secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β), aumenta a migração de leucócitos para o local da inflamação (Straub, 2007), além de sua expansão clonal (Wong *et al.*, 2012).

Em nítido contraste, em níveis elevados - como na gravidez - o E2 inibe a resposta imunitária celular e diminui a expressão de vários marcadores de ativação (Hel *et al.*, 2010). Neste caso, o E2 inibe a produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β pelas células T, macrófagos e DCs (Hel *et al.*, 2010), e induz a produção de IL-10 e TGF- β , resultando em um efeito imunossupressor (Luo *et al.*, 2011; Zang *et al.*, 2002). Nesse microambiente, elevados níveis de estrogênio favorece a expansão das DCs que expressam a enzima IDO (Liu *et al.*, 2002; Uemura *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2004). De fato, a enzima IDO, por induzir uma depleção do aminoácido triptofano, é conhecida por inibir a produção de IL-12 e, conseqüentemente, a diferenciação das células T CD4⁺ (Steckel *et al.*, 2003). Sendo assim, as DCs IDO⁺ têm um papel importante na inibição da função das células T potencialmente embriotóxicas (Ito *et al.*, 2002). Além desses efeitos diretos, elevados níveis de E2 pode atenuar a migração de diferentes leucócitos por reduzir a expressão de moléculas de adesão, tais como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1, do inglês *Intercellular Adhesion Molecule 1* ou CD54), E-selectinas, e molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1, do inglês *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* ou CD106) no endotélio vascular da decídua (Hel *et al.*, 2010).

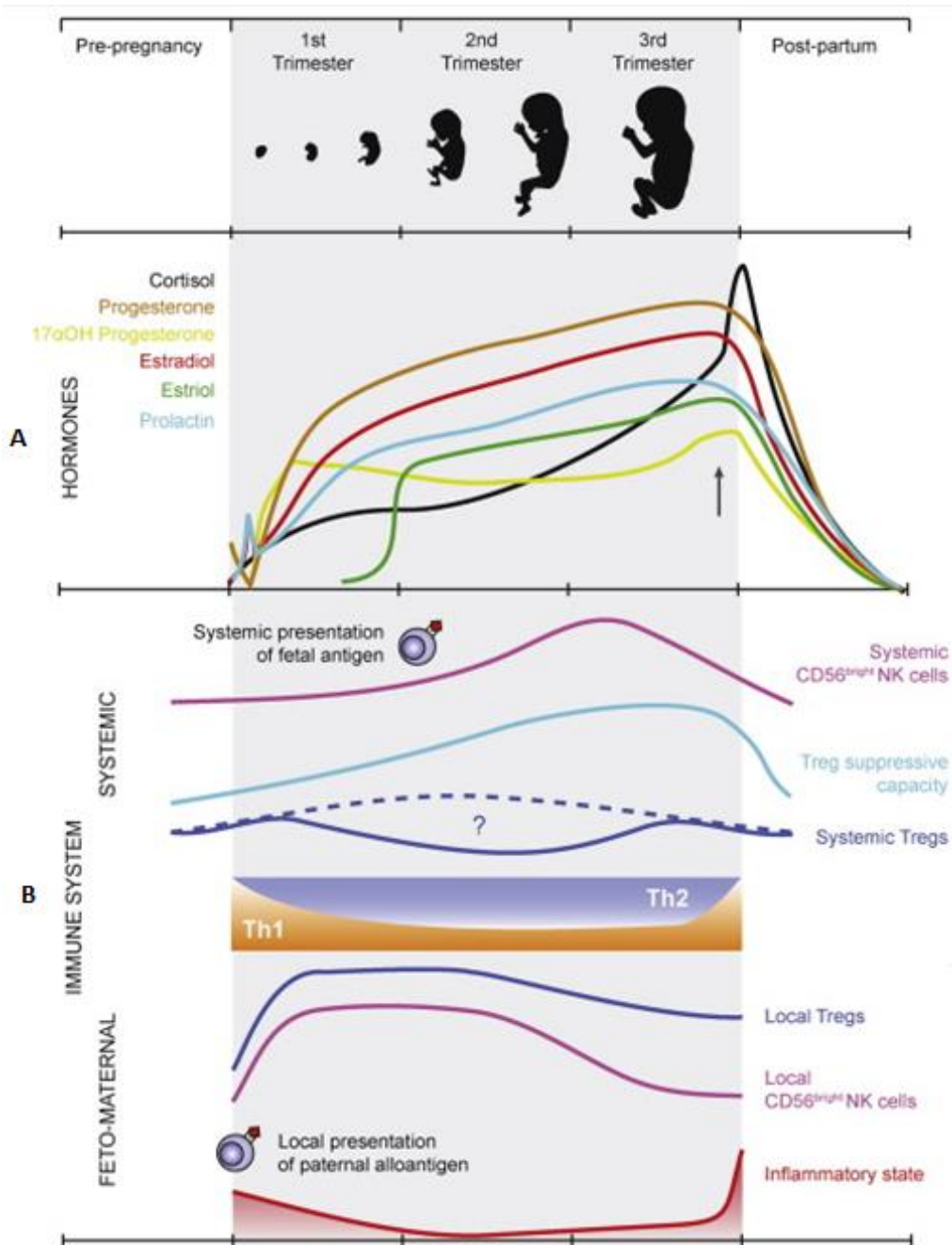


Figura 5: Resumo da imunomodulação materna em decorrência dos hormônios gestacionais.

Mudanças nas concentrações de hormônios levam a mudanças imunológicas durante a gestação. Durante os três trimestres da gestação, há uma alteração no equilíbrio das respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. No terceiro trimestre, respostas anti-inflamatórias são elevadas e respostas inflamatórias, reduzidas. **A)** Propriedades imunomodulatórias dos hormônios gestacionais estrogênio e progesterona que têm suas concentrações mais elevadas durante o terceiro trimestre da gestação. Dias antes que antecedem o parto, os níveis de marcadores reguladores começam a cair junto com os níveis de progesterona e estrogênio. Nesse momento, o resgate dos eventos inflamatórios maternos devem ajudar no preparo do útero para o parto. **B)** Alguns eventos imunológicos na interface materno-fetal e sistemicamente. Fonte: Patas *et al.*, 2013.

Por outro lado, em elevados níveis, o E2 também eleva a produção de anticorpos por linfócitos B de memória (Kanda & Tamaki, 1999), potencializando a resposta imune humoral na gestação.

Finalmente, a progesterona, que é naturalmente produzida no ovário e na placenta, eleva-se linearmente com o tempo de gestação (Stites & Siiteri, 1983). Os efeitos da progesterona sobre o sistema imune são classicamente imunossupressores (Szekeres-Bartho, 2009). A progesterona diminui a migração de células NK (Sentman *et al.*, 2004), linfócitos e macrófagos (Hel *et al.*, 2010), além de atenuar a capacidade proliferativa dos linfócitos no trato genital feminino (Whitelaw & Croy, 1996; Inoue, 1996). Ademais, esse hormônio inibe as atividades líticas e a produção de IFN- γ pelas células NK (Arruvito *et al.*, 2008) e pelas células T CD8⁺ citolíticas. Ao inibir a produção de IFN- γ , a progesterona reduz respostas típicas do fenótipo Th1, e, conseqüentemente, compromete a função microbicida exercida pelos macrófagos (Clemens *et al.*, 1979; Mannel *et al.*, 1990; Piccinni *et al.*, 1995; Hughes *et al.*, 2013). Por outro lado, em elevadas concentrações, as citocinas pró-inflamatórias podem regular negativamente a secreção de progesterona pelo trofoblasto da placenta e do corpo lúteo (Feinberg, 1994; Pedersen *et al.*, 1994; Best, 1995) podendo, assim, comprometer o desenvolvimento do conceito por favorecer a expansão de células T embriotóxicas.

1.3.3 Células T e a interface materno-fetal

Numerosas células imunes estão presentes no endométrio, e todas elas contribuem, à sua maneira, no estabelecimento da gravidez. No entanto, para evitar a rejeição do embrião, suas atividades devem ser controladas *in situ* por diferentes eventos humorais e hormonais. Na decídua do primeiro trimestre, a população de células imunes maternas é dominada por células assassinas naturais uterinas (uNK, do inglês *uterine Natural Killer*) não citotóxicas, imunomoduladoras e reguladoras do trofoblasto (King, 2000; Starkey *et al.*, 1988). Ademais, um abundante número de macrófagos maternos com um fenótipo alternativo, conhecidos como M2, tem sido associado ao sucesso da gestação (Gustafsson *et al.*, 2008). Apesar de representarem uma população minoritária no útero gravídico, as células T, sob a

influência dos hormônios gestacionais, desempenham uma função-chave na regulação da resposta imune na interface materno-fetal (Trundley & Moffett, 2004).

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

Na dinâmica das citocinas, acredita-se que citocinas inflamatórias são necessárias em várias fases da gravidez, em particular, durante o período inicial da implantação (Wilcznski, 2005). Neste período, as citocinas, tais como IL-1 e TNF- α , tornam o estabelecimento da gravidez possível, estimulando, por exemplo, a produção de fator inibidor de leucemia (LIF, do inglês *Leukemia Inhibitory Factor*) ou aumentando a angiogênese. No entanto, níveis excessivos dessas citocinas e do IFN- γ , produzidos pelas células Th1, são deletérios para o sucesso da gravidez (Kwak *et al.*, 2014).

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

Por outro lado, apesar de estudos em camundongos terem relatado o papel protetor da imunidade do tipo Th2 na gravidez (Piccinni *et al.*, 1998; Saito, 2000; Wegmann, 1993), em humanos, IL-4 e IL-5 não parecem ser críticas para o desenvolvimento bem sucedido da gestação (Saito, 2010). Entretanto, parece menos questionável o papel das citocinas anti-inflamatórias no sucesso da gestação (Guerin *et al.*, 2009). Acreditamos que os achados contraditórios sobre o envolvimento das citocinas típicas Th2 no sucesso da gestação em camundongos (Piccinni *et al.*, 1998; Saito, 2000; Wegmann, 1993) deva-se a capacidade de células

Th2 murinas de produzirem IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória produzida em grandes quantidades pelas células Treg humanas (Rubtsov, 2008).

Nesse sentido, as células Treg estão envolvidas na tolerância fetal e, a enzima heme oxigenase-1 (HO-1), uma molécula produzida diretamente na interface materno-fetal, parece estar envolvida na geração dessas células no útero gravídico (Sollwedell *et al.*, 2005). Ademais, o líquido seminal e os espermatozoides promovem a indução, a expansão e a atividade regulatória das células Treg (Robertson *et al.*, 2009; Guerin *et al.*, 2011; Balandya *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Teles *et al.*, 2013). Em humanos, diversos estudos mostram um aumento da frequência dessas células no sangue periférico durante o primeiro e o segundo trimestre da gestação (Heikinenn *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2013). Entretanto, no terceiro trimestre, os níveis de Treg começam a diminuir (Seol *et al.*, 2008).

Apesar dos efeitos predominantemente imunossupressores exercidos pelos hormônios da gestação, classicamente a produção de anticorpos pelas células B de memória é amplificado nas gestantes e esse fenômeno pode estar relacionado aos efeitos dos hormônios gestacionais em favorecer a expansão das células T_{FH} em detrimento de uma redução na fração de células T efetoras relacionados aos fenótipos Th1, Th2 e Th17. Entretanto, estudos sobre o impacto dos eventos relacionados à gestação na frequência e função das T_{FH} estão faltando. Esse tipo de estudo pode fornecer novas e valiosas informações sobre os mecanismos pelos quais a gestação modula a imunidade adaptativa materna. Além disso, pode impactar no desenho de futuras estratégias de vacinas contra diferentes agentes infecciosos, assim como em sua modulação no contexto de doenças autoimunes mediadas por autoanticorpos.

2. OBJETIVO

2.1 Geral

Avaliar o impacto da gestação na frequência e função das células T auxiliares foliculares (T_{FH}) circulantes e sua relação com a concentração de hormônios gestacionais e a produção de anticorpos IgG específicos contra citomegalovírus (CMV) e contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBs).

2.2 Específicos

- ✓ Determinar a frequência das células T_{FH} no sangue periférico de mulheres saudáveis, grávidas ou não.
- ✓ Estudar o impacto da gestação no perfil de citocinas produzido pelas células T_{FH} .
- ✓ Correlacionar a frequência das células T_{FH} com a produção de hormônios gestacionais.
- ✓ Correlacionar a frequência das células T_{FH} com a produção de anticorpos IgG contra CMV e HBs.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Para o estudo, 30 gestantes (20 a 33 anos de idade) saudáveis, no último trimestre da gestação, foram recrutadas do Instituto Fernandes Figueira (Fiocruz/RJ) e do Centro de Pesquisa em Imunologia Aplicada da Universidade da Califórnia (UC/Irvine). Como controle para os eventos imunes relacionados à gravidez, 30 mulheres não grávidas saudáveis (idade entre 20 a 32 anos) foram recrutadas na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) e na UC/Irvine. Para o nosso estudo, foram excluídas mulheres portadoras de doenças autoimunes e neoplasias, tabagistas, imunodeprimidas ou usuárias de substâncias ilícitas. Ademais, nenhuma paciente incluída em nosso estudo apresentava alguma indicação clínica ou sorológica de infecção por influenza, HCV, HBV e HIV-1/2.

No Brasil, o estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG/UNIRIO) (Anexo 01) e as amostras só foram colhidas após cada participante ter dado seu consentimento oral e por escrito, através da assinatura do consentimento livre e esclarecido (Anexo 02). Na UC/Irvine, as coletas das amostras seguiram as normas locais vigentes para a aprovação do estudo.

3.2 Obtenção e estimulação das células do sangue periférico *ex vivo*

Amostras de 10 mL de sangue periférico foram colhidas de todas as mulheres avaliadas neste estudo, através da utilização de agulhas e tubo estéreis contendo heparina (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NY). Alíquotas de 2 mL do sangue periférico total foram mantidas em placas de 24 poços de fundo chato, na ausência (poços controles) e na presença de acetato miristato de forbol (PMA; Sigma-Aldrich) a 20 ng/mL e Ionomicina (IO; Sigma-Aldrich) a 600 ng/mL (poços ativados). Para otimizar a marcação intracelular de citocinas, todas as amostras foram mantidas na presença de brefeldina A (10 µg/mL; Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas por 4 horas à 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Para a avaliação dos níveis

sistêmicos dos hormônios gestacionais (progesterona e estrogênio) e dos títulos de IgG (anti-CMV e anti-HBs), o volume restante de sangue colhido, 6 mL, foi submetido a centrifugação em 1500 rpm por 5 minutos e os plasmas foram congelados a -20°C até o momento de uso.

3.3 Análise Fenotípica por Citometria de Fluxo

Para identificar diferentes fenótipos de células T CD4⁺, as amostras, ativadas ou não, foram submetidas à citometria de fluxo após marcação com diferentes combinações de anticorpos monoclonais (mAbs) fluoresceínados (BioLegend, San Diego, CA, USA). Para tanto, 4 horas após incubação, 200 µL das amostras de sangue foram marcadas com mAbs anti-CD3-PE, anti-CD4-FITC/PECy7, anti-CD45RO-PE-Cy7, anti-CXCR3-PE/PECy7, anti-CXCR5-PECy7/PE/APC, anti-ICOS-PerCP e anti-PD1-APC, por 20 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz. Terminado o tempo de incubação, a suspensão celular foi submetida tanto à lise das hemácias quanto à fixação através da incubação do sangue total com solução de lise/fixação (eBioscience) por 10 minutos, sob proteção da luz. As células foram lavadas duas vezes com solução de PBS suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB) e permeabilizadas, utilizando a solução Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmigen, San Diego, CA) a 4°C por 20 minutos, sob proteção da luz. Para determinar a frequência de células produtoras de citocinas, as células foram lavadas (PBS com 1% SFB) e submetidas à marcação intracelular a 4°C por 20 minutos usando mAbs anti-IL-21-PE/APC, anti-IFN- γ -PE/APC, anti-IL-10-FITC/APC, anti-IL-17-PECy7, anti-IL-4-APC e anti-IL-6-PE. As células foram lavadas novamente com PBS suplementado com 1% de SFB e posteriormente submetidas à análise por citometria de fluxo. Para as nossas análises, 100.000 eventos foram adquiridos usando o citômetro Accuri C6 (Accuri™, Ann Arbor, MI, USA) ou FACS LRS II Fortessa (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) e os dados foram analisados através dos softwares Cflow (Accuri™, Ann Arbor, MI, USA) e ©FlowJo. Os linfócitos foram determinados através dos padrões de tamanho e granulosidade após a exclusão de células mortas e débris.

3.4 Dosagem de estrogênio e de progesterona

A dosagem de hormônios gestacionais foi realizada através do ensaio imunoenzimático ELISA (do inglês, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), a partir das amostras do plasma de mulheres participantes do estudo. A dosagem de estrogênio foi realizada com o uso do kit Abcam's *Estradiol E2 in vitro competitive* ELISA, de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Resumidamente, 25 µL das amostras de plasma foram adicionadas aos poços em uma placa de 96 poços de fundo chato contendo anticorpo IgG de coelho anti-estradiol acompanhada com o kit. Em seguida, foram adicionados 100 µL do estradiol conjugado com *horseradish peroxidase* (HRP) e 50 µL do reagente de coelho anti-estradiol. A placa foi coberta e incubada a temperatura ambiente por 90 minutos. Os poços foram lavados por cinco vezes com 300 µL de água destilada. Após a remoção do excesso de líquido, foram adicionados 100 µL do reagente TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) para posterior incubação a temperatura ambiente por 20 minutos, sob a proteção da luz. A reação foi revelada após a adição de uma solução de parada (ácido fosfórico à 1 M). Quanto maior a concentração de E2, maior é a absorbância, logo, menor é a transmitância (luz não desviada/dispersada). Sendo assim, a intensidade, que é inversamente proporcional à quantidade de estradiol E2 na amostra, foi medida a 450 nm de comprimento de onda. As concentrações de estrogênio nas amostras testes foram obtidas usando uma curva-padrão com reagentes fornecidos pelo fabricante.

Já a dosagem de progesterona foi realizada com o uso do kit Abcam's *Progesterone in vitro competitive* ELISA. Neste protocolo, 20 µL das amostras foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços do kit contendo anticorpo primário anti-progesterona. Além disso, foram adicionados 200 µL do conjugado progesterona-HRP. Após 1 hora de incubação a 3°C sob proteção da luz, todos os poços foram lavados por 3 vezes com solução de lavagem (exclusiva do kit). Após a remoção total de líquido na placa, foram adicionados 100 µL da solução do substrato TMB. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente no escuro, a reação foi revelada após da adição de 100 µL da solução de parada (ácido fosfórico à 1 M). A intensidade é inversamente proporcional à quantidade de progesterona nas amostras e as placas foram lidas a 450 nm de comprimento de onda. As

concentrações de progesterona nas amostras testes foram obtidas usando uma curva-padrão com reagentes fornecidos pelo fabricante.

3.5 Dosagem de anticorpos IgG anti-CMV e anti-HBs

A dosagem plasmática de anticorpos IgG anti-CMV foi realizada através do kit Abcam's anti-Cytomegalovirus (CMV) IgG Human *in vitro* ELISA, de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Resumidamente, 100 μ L das amostras foram adicionados aos poços de uma placa de 96 poços de fundo chato previamente sensibilizados com antígenos do CMV e submetidos à incubação por 60 minutos a 37°C em câmara úmida. Depois da incubação, os poços foram lavados 4 vezes com 300 μ L de solução de lavagem. Em seguida, 100 μ L do anticorpo anti-IgG humano conjugado com HRP foram adicionados aos poços e incubados por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Os poços foram lavados 4 vezes com 300 μ L de solução de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 μ l de solução de substrato TMB e submetidos à incubação por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Por fim, 100 μ L da solução de parada foram adicionadas. A densidade da coloração amarela é diretamente proporcional a quantidade de IgG anti-CMV nas amostras. A leitura foi feita por densidade ótica a 405 nm por 60 minutos e as concentrações de IgG anti-CMV nas amostras testes foram obtidas usando uma curva-padrão com reagentes fornecidos pelo fabricante.

Já a dosagem de anticorpos IgG anti-HBs foi realizada através do kit BIOLISA anti-HBs da Bioclin, de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Para a detecção de anticorpos, foram adicionados 50 μ L das amostras em uma microplaca revestida com HBs recombinante. Além disso, foram acrescentados 50 μ L do anticorpo anti-IgG humano ligado a peroxidase. Após 1 hora de incubação a 37°C sob proteção da luz, foram feitos 8 ciclos de lavagens com 350 μ L de solução de lavagem (exclusiva do kit). Após a remoção total de líquido na placa, foram adicionados 100 μ L da solução de substrato TMB. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente ao abrigo da luz, foram adicionados 100 μ L de solução de parada (ácido sulfúrico a 1M). As placas foram lidas a 450 nm de absorbância por até 30 minutos. As concentrações de IgG anti-HBs nas amostras testes foram obtidas usando uma curva-padrão com reagentes fornecidos pelo fabricante.

3.6 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa de gráfico GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad software). O teste paramétrico t de Student e o teste não paramétrico de Mann-Whitney U foram utilizados para determinar se dois grupos eram estatisticamente diferentes para cada variável dada. A correlação de Pearson foi utilizada para avaliar a correlação entre diferentes eventos imunológicos estudados. A significância em todos os experimentos foi definida como $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Impacto da gestação na frequência das células T_{FH} de memória coexpressando os marcadores PD-1 e ICOS

A frequência das células T_{FH} de memória circulantes ($CD4^+ CDR45RO^+ CXCR5^+$) foi avaliada em gestantes e não gestantes, de acordo com a expressão dos marcadores superficiais ICOS e PD-1 (Figura 6). Inicialmente, como demonstrado na figura 7A, a frequência de células T $CD4^+ CDR45RO^+ CXCR5^+$ foi significativamente superior nas amostras obtidas das gestantes saudáveis no último trimestre. Ademais, apesar de representarem uma fração minoritária, a frequência dessas células capazes de coexpressarem PD-1 e ICOS foi maior nas gestantes (Figuras 7B e 7C).

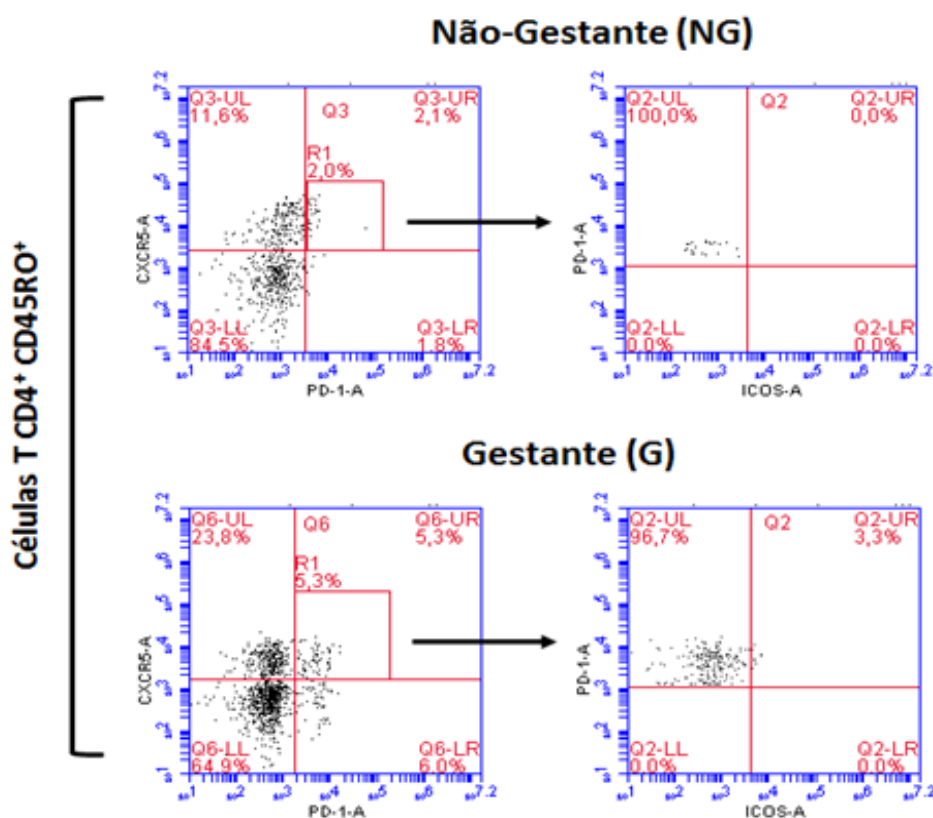


Figura 6: Estratégia de confinamento das células T $CD4^+ CD45RO^+ CXCR5^+ ICOS^+ PD-1^+$. Dotplots representativos das estratégias de confinamento para a identificação de células T $CD4^+ CD45RO^+ CXCR5^+$ de acordo com a expressão de ICOS e PD-1 em diferentes combinações, usando o software FlowJo.

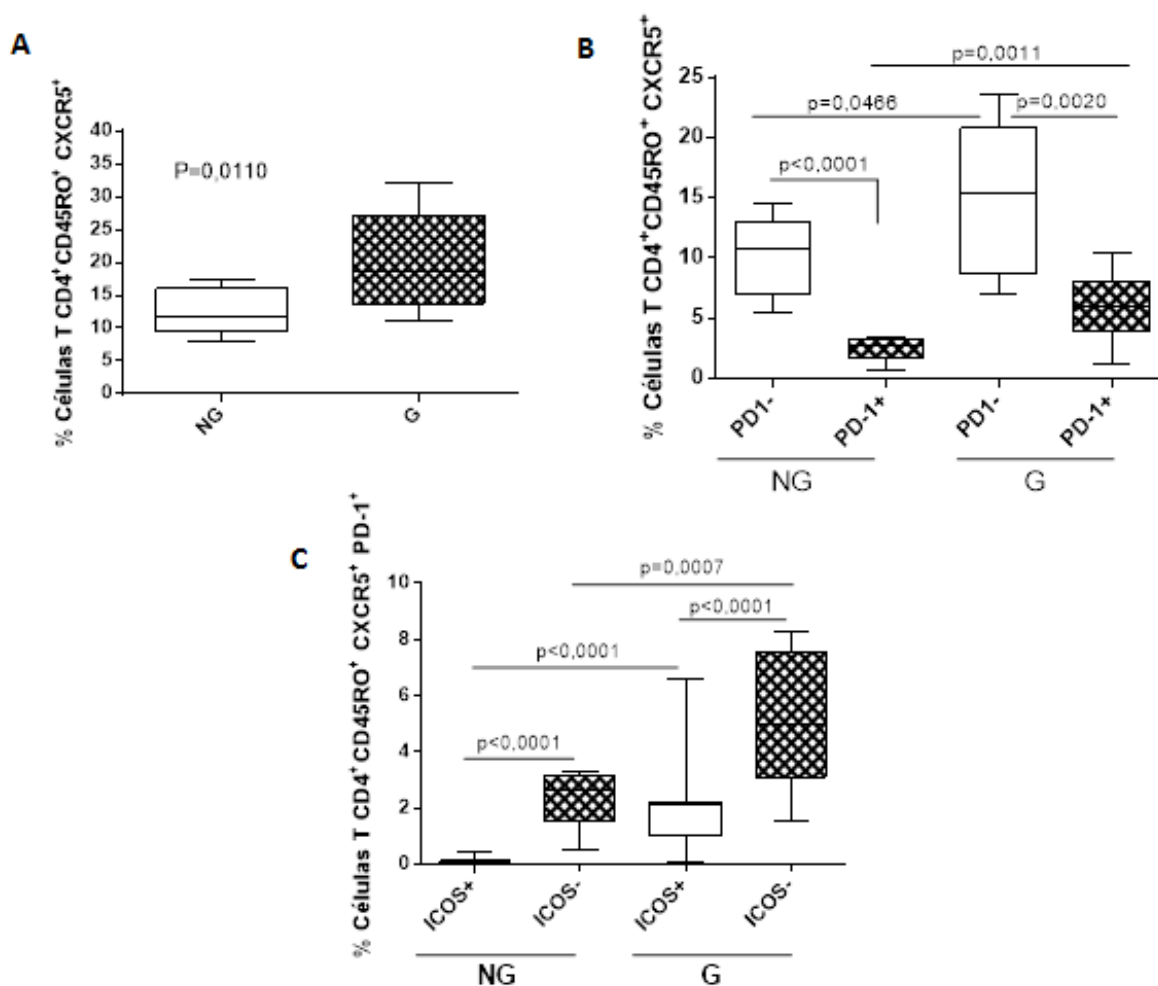


Figura 7: Impacto da gestação na frequência das células T CD4⁺ CXCR5⁺ CD45RO⁺ PD-1⁺ ICOS⁺ periféricas. Amostras de sangue periférico de mulheres saudáveis grávidas (G [n=10]) ou não (NG [n=10]), foram submetidas à marcação superficial com os mAbs contra os marcadores CD4, CXCR5, CD45RO, ICOS e PD-1. A frequência das células T_{FH} foi avaliada através do citômetro de fluxo FACS LSRFortessa. As frequências médias de cada subpopulação (A-C) foram comparadas entre os dois grupos estudados e intra-grupo e os valores de *p* estão indicados na figura.

4.2 Impacto da gestação na frequência das células T_{FH} coexpressando os marcadores CXCR3 e PD-1

Em nosso presente estudo, seguindo as estratégias de confinamento (Figura 8) baseadas no trabalho de Locci e colaboradores (2013), a gestação favoreceu a expansão de células T CD4⁺ CXCR5⁺ coexpressando, ou não, o marcador CXCR3 (Figura 9A). Por outro lado, uma redução na frequência das células T CD4⁺ CXCR5⁻ CXCR3⁺ foi documentada nas gestantes (Figura 9A). Nenhuma diferença

significativa na frequência das células T CD4⁺ CXCR5⁻ CXCR3⁻ foi encontrada entre os grupos estudados (Figura 9A).

Em seguida, nós avaliamos o padrão de expressão do marcador PD-1 nas células T CD4⁺ de acordo com a expressão de CXCR5 e CXCR3 (Figura 9B). Em nosso estudo, a expressão de PD-1 foi particularmente observada nas células T CD4⁺ que coexpressavam CXCR5 e CXCR3, em ambos os grupos. Ademais, a gravidez aumentou significativamente a frequência dessas células T. Quanto aos demais subtipos de células T CD4⁺, a expressão de PD-1 foi inferior e sem diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 9B).

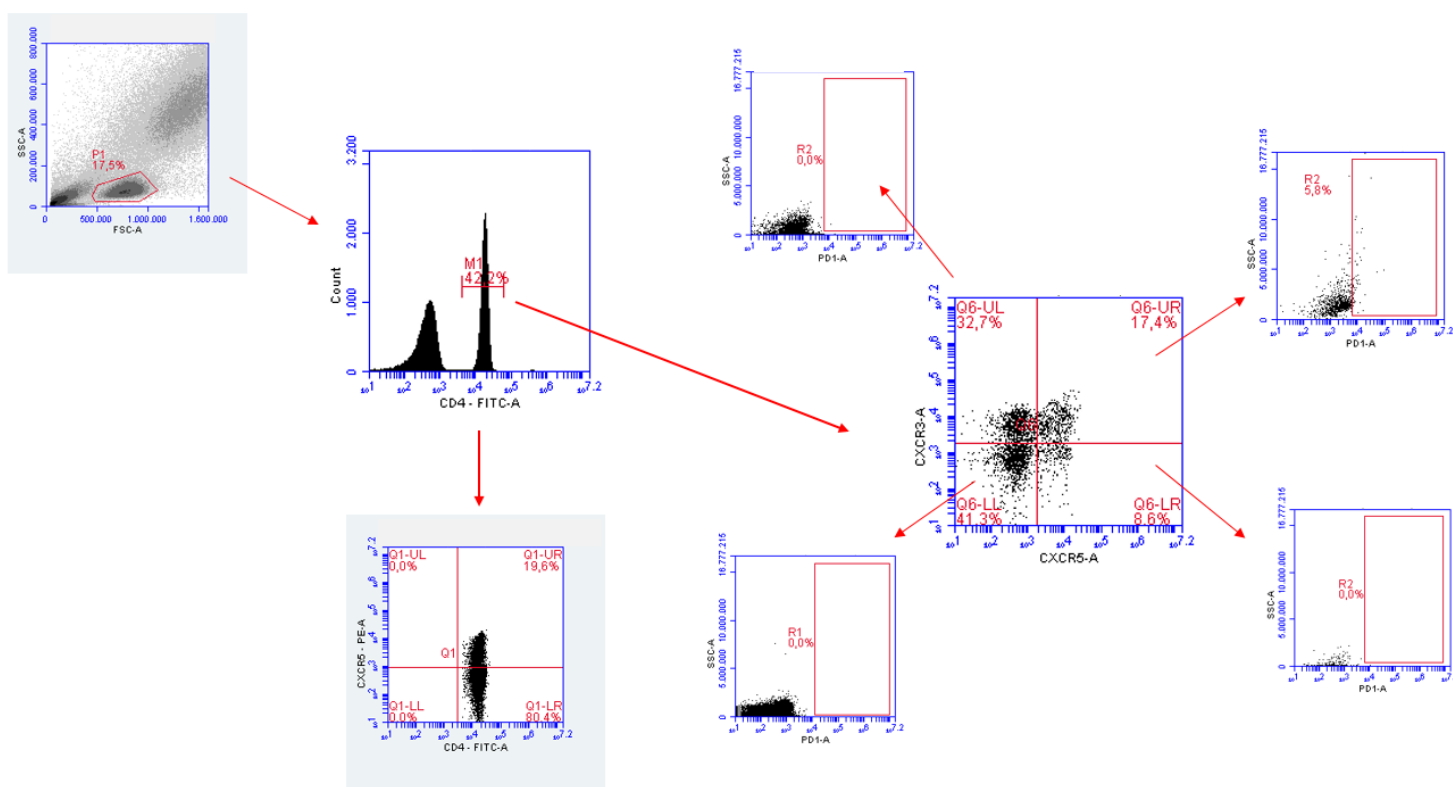


Figura 8. Estratégia de confinamento das células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ PD-1⁺. Dot plots representativos mostrando a identificação das células T CD4⁺ de acordo com a expressão de CXCR3, CXCR5 e PD-1 em diferentes combinações, usando o software CFlow.

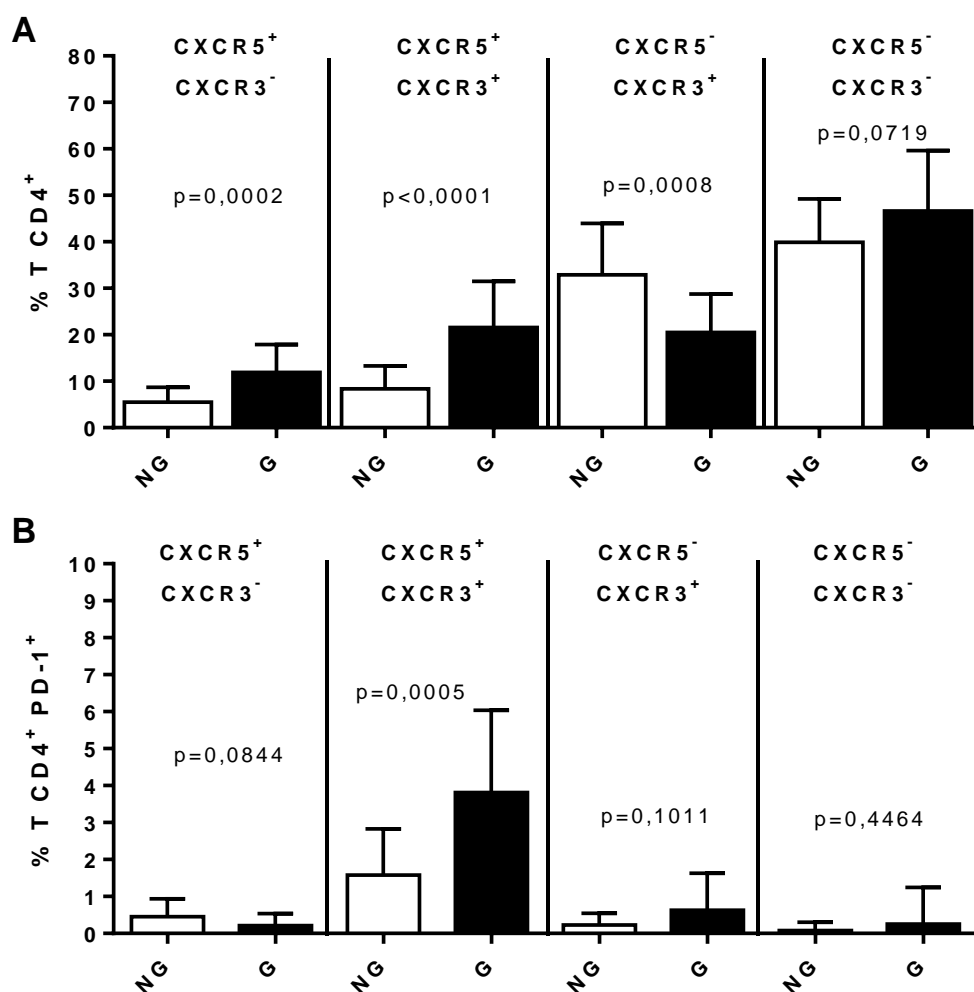


Figura 9: Impacto da gestação na frequência das células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ PD-1⁺. Amostras de sangue periférico de mulheres saudáveis grávidas (G [n=19]) ou não (NG [n=19]) foram submetidas à marcação superficial com mAbs contra os marcadores CD4, CXCR5, CXCR3 e PD-1. A avaliação da frequência das células T_{FH} foi feita através do citômetro de fluxo Accuri C6. Os resultados estão representados como média ± desvio-padrão e os valores de *p* estão presentes na figura.

4.3 Impacto da gestação no perfil de citocinas secretado pelas células T_{FH} periféricas

A capacidade das células T_{FH} em favorecer a resposta imune humoral de alta eficiência depende não apenas de interações cognitivas entre esses linfócitos com as células B, como também da liberação de determinadas citocinas (Vinuesa *et al.*, 2016). Diante disso, nosso próximo passo foi avaliar a capacidade das células TCD4⁺ CXCR5⁺ coexpressando, ou não, CXCR3 em expressar diferentes citocinas

(IFN- γ , IL-6, IL-4 IL-17, IL-21 e IL-10). A figura 10 mostra as estratégias utilizadas pelo nosso grupo para identificar a produção das citocinas por estes subtipos celulares.

Como pode ser observada na figura 11 (A-F), a produção de todas essas citocinas foi principalmente confinada nas células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ em ambos os grupos estudados. Além disso, a frequência dessas células positivas para IL-6, IL-21 e IL-10, estimuladas ou não, foi significativamente superior nas gestantes (Figuras 11 A, B e E). Nenhum resultado significativo foi observado com relação à frequência dessas células produtoras de IL-4, IL-17 e IFN- γ entre os dois grupos estudados (Figuras 11 C, D e F).

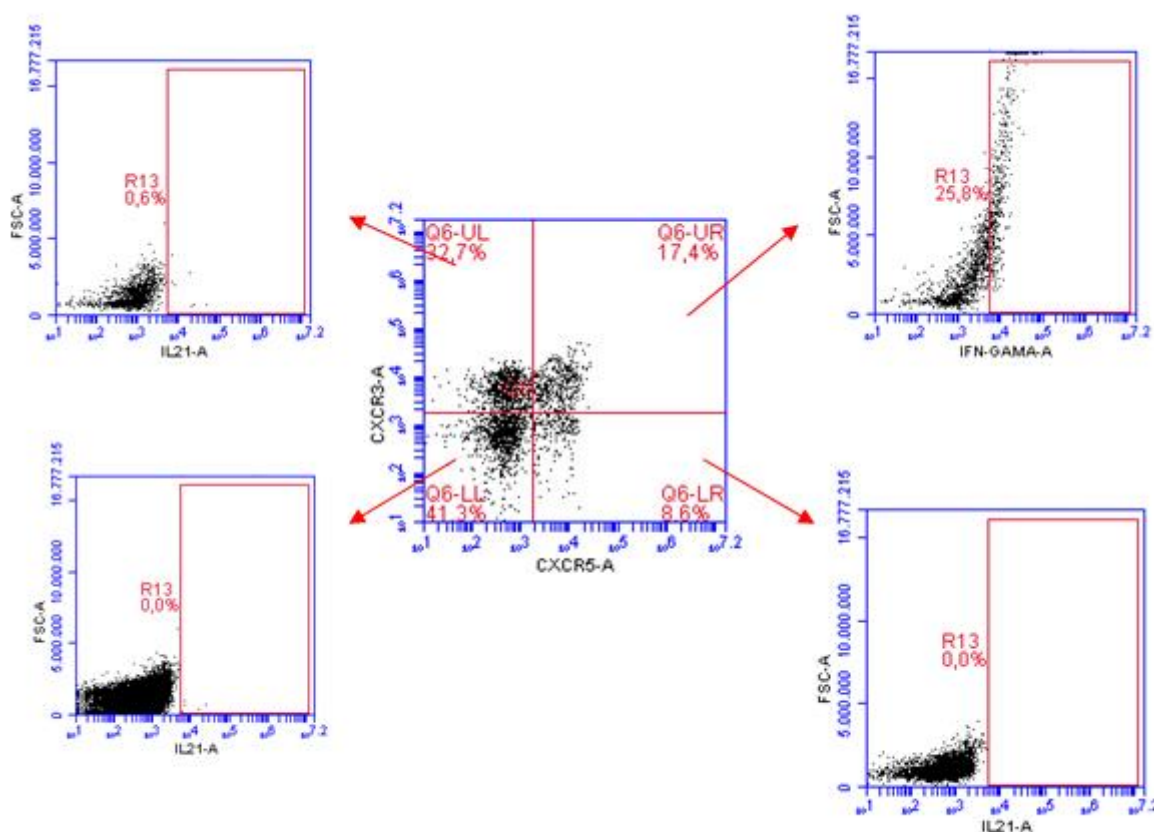


Figura 10: Estratégia de confinamento das células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ produtoras de citocinas. Dot plots representativos mostrando a identificação das células T CD4⁺ produtoras de citocina (usando IL-21 e IFN- γ como exemplo), de acordo com a expressão de CXCR3 e CXCR5; através do software CFlow.

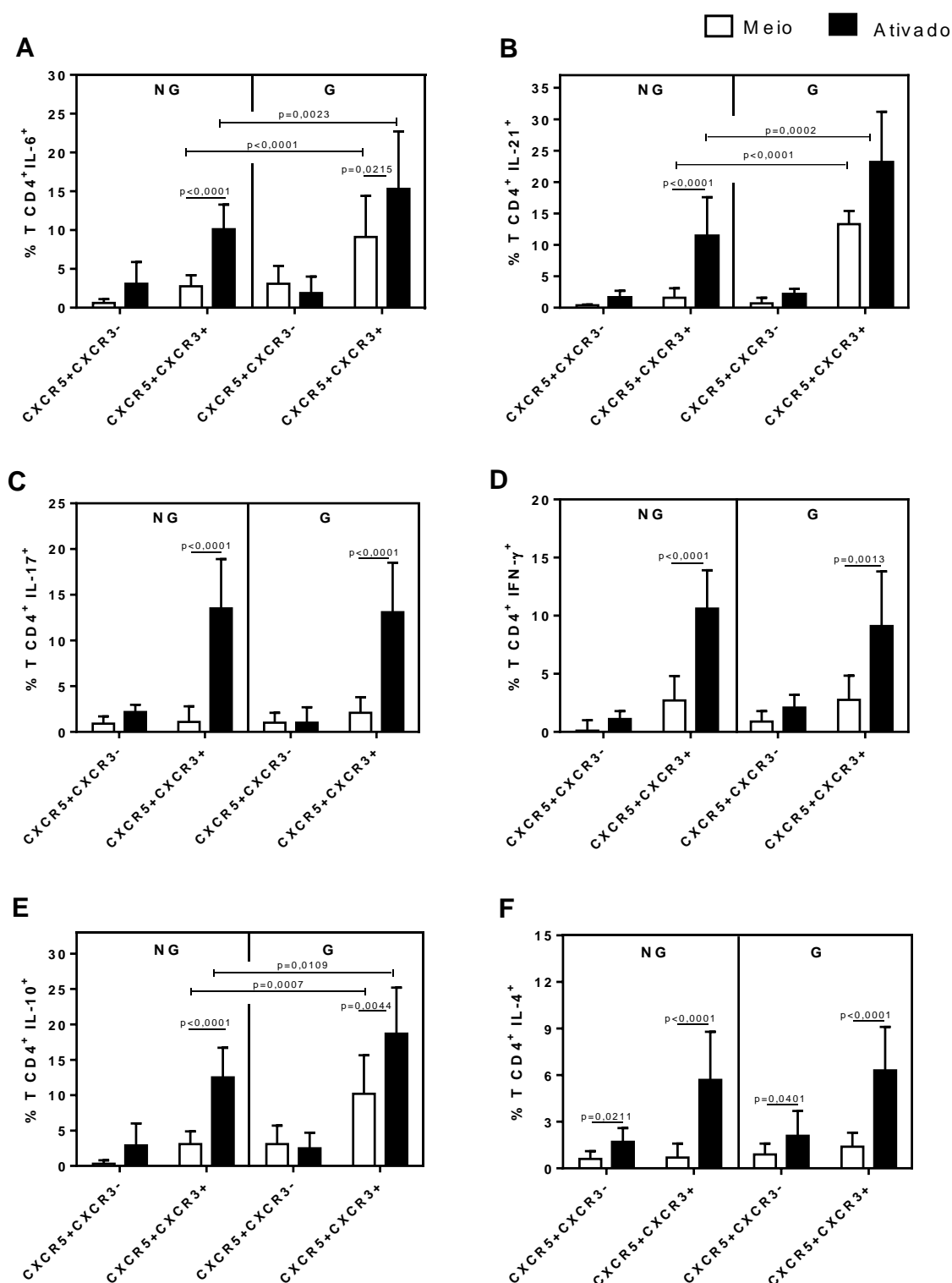


Figura 11: Avaliação do perfil de citocinas das células T CD4⁺ CXCR5⁺ periféricas coexpressando, ou não, CXCR3. Amostras de sangue periférico de gestantes (G [n=15]) e de mulheres não grávidas (NG [n=15]) foram incubadas por 4 horas na ausência (meio) e na presença de PMA e IO (ativado). As células T CD4⁺ foram submetidas à marcação de superfície (CXCR5 e CXCR3) e intracelular para identificar a expressão de IL-6, IL-4, IL-10, IL-17, IL-21 e IFN-γ. A frequência das células T_{FH} foi feita através do citômetro de fluxo Accuri C6. Os resultados estão representados como média ± desvio-padrão e os valores de *p* estão presentes na figura.

4.4 Perfil de citocinas e a frequência de células T_{FH} CXCR3⁺ periféricas de acordo com a expressão de PD-1

Nosso próximo passo foi investigar se haveria alguma correlação entre a frequência de células T CD4⁺ totais produtoras das citocinas IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-21 ou IFN- γ com a porcentagem de células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ de acordo com a expressão de PD-1. Como pode ser observado na Tabela 1, houve uma correlação positiva apenas entre a frequência de células T CD4⁺ produtoras de IL-6, IL-10, IL-17, IL-21 ou IFN- γ com a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺. Por outro lado, não houve nenhuma correlação em se tratando de células T CD4⁺ produtoras de IL-4 com a frequência de linfócitos T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺.

Tabela 1. Correlação entre a produção de citocinas e a frequência de células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ de acordo com a expressão de PD-1

	% CD4 ⁺ CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁺		% CD4 ⁺ CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁺ PD-1 ⁺	
	Correlação (r)	Valor de p	Correlação (r)	Valor de p
% T CD4 ⁺				
<i>IL-6</i>	0,7346	<0,0001	0,2690	0,1663
<i>IL-21</i>	0,5608	0,0019	0,2834	0,1439
<i>IL-4</i>	0,3656	0,2989	0,4052	0,2454
<i>IFN-γ</i>	0,5279	0,0007	0,3142	0,0547
<i>IL-17</i>	0,4940	0,0075	0,1328	0,5071
<i>IL-10</i>	0,5631	0,0018	0,3178	0,0994

A tabela mostra a correlação entre a frequência de células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ de acordo com a expressão de PD-1, com a porcentagem de células T CD4⁺ totais produtoras de diferentes citocinas. Amostras de todas as mulheres do estudo foram incluídas nesta análise. A correlação de Pearson foi aplicada e os valores de p estão indicados na tabela. Os valores de p significativos estão destacados em negrito.

4.5 Frequência de células T_{FH} CXCR3⁺ periféricas e a produção de anticorpos IgG

Para analisar, mesmo que de forma indireta, a relação entre a frequência das células T CD4⁺ CXCR3⁺ CXCR5⁺ e das células T CD4⁺ CXCR3⁺ CXCR5⁺ PD-1⁺ com a produção de anticorpos, os plasmas das mulheres - grávidas ou não - foram submetidas à dosagem de IgG anti-CMV e anti-HBs. É importante informar que nenhuma das amostras testadas tinha IgM para CMV e para diferentes antígenos do vírus HBV. Em contraste, >75% das mulheres estudadas tinham IgG positiva para CMV e em torno de 86% para HBs.

Nossos resultados demonstraram uma correlação direta significativa entre a frequência de ambos os grupos celulares estudados e a concentração de IgG anti-CMV (Figura 12A). Entretanto, com relação aos títulos de anticorpos IgG anti-HBs (Figura 12B), observamos uma correlação positiva significativa somente entre a frequência das células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ PD-1⁺.

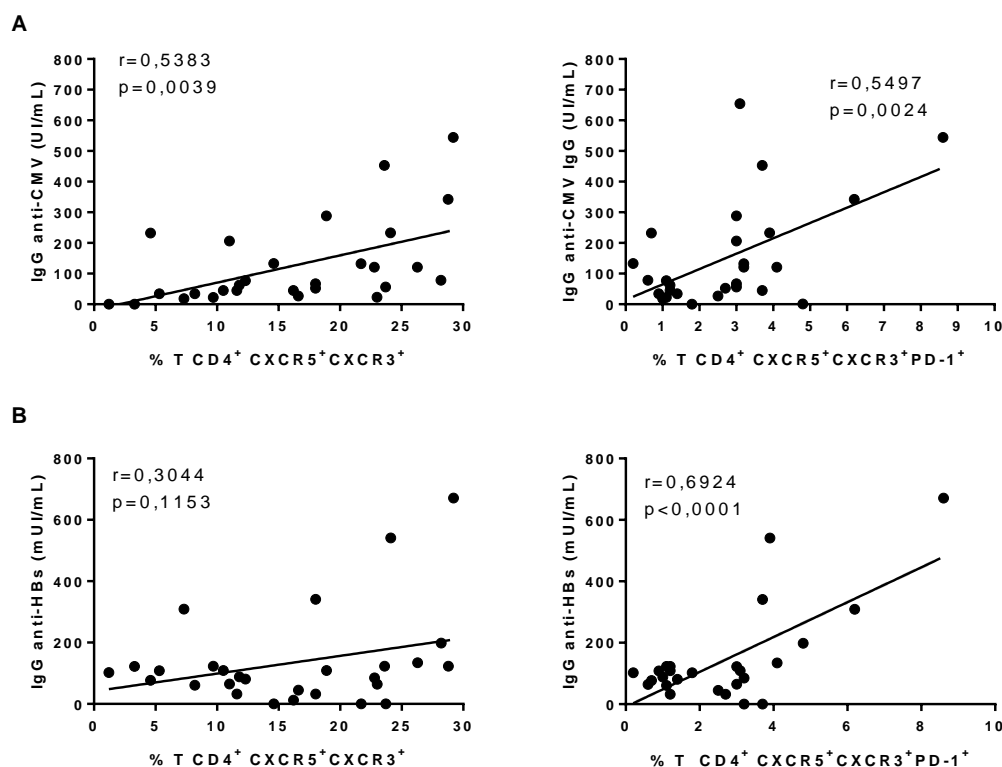


Figura 12: Correlação entre os níveis plasmáticos de IgG anti-CMV e anti-HBs com a frequência de células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ periféricas, de acordo com a expressão de PD-1. O plasma obtido de cada mulher, grávida (n=14) ou não (n=14), foi submetido à técnica ELISA para quantificação de IgG anti-CMV e de IgG anti-HBs. As variáveis foram submetidas a análise do coeficiente de correlação de Pearson e os valores de p estão indicados nas figuras.

4.6 Correlação entre o perfil de citocinas de células T_{FH} CXCR3⁺ e a produção de anticorpos IgG anti-CMV e HBs

A capacidade de as células T_{FH} produtoras de diferentes citocinas em se correlacionar com os níveis séricos de IgG anti-CMV e HBs foi investigada. Nossos resultados demonstraram correlações significativamente positivas entre os níveis séricos de CMV e a frequência das células T CD4⁺ CXCR3⁺ CXCR5⁺ produtoras das citocinas IL-6 e IL-21 (Figura 13A). Em contraste, apenas a frequência dessas células capazes de produzir IL-21 foi positivamente correlacionada aos títulos de IgG anti-HBs (Figura 13B).

4.7 Níveis plasmáticos de hormônios gestacionais e a frequência das células T_{FH} CXCR3⁺ periféricas de acordo com a expressão de PD-1

Com o intuito de avaliar se havia uma correlação entre a frequência de células T_{FH} periféricas com a concentração sistêmica de hormônios gestacionais, amostras de plasmas foram obtidas e submetidas à dosagem de estrogênio e progesterona. Como esperado, os níveis circulantes de estrogênio (2.77 ± 1.99 ng/mL x 13.23 ± 5.2 ng/mL, $p < 0.0001$) e de progesterona (3.19 ± 2.68 ng/mL x 101.7 ± 95.6 ng/mL, $p < 0.0001$) foram maiores em gestantes, quando comparado às mulheres não grávidas. De modo interessante, os níveis plasmáticos de estrogênio foram correlacionados positivamente com a frequência de células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ e de células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ PD-1⁺ (Figura 14A). Todavia, nenhuma correlação significativa foi observada com relação aos níveis de progesterona e a porcentagem dessas células (Figura 14B).

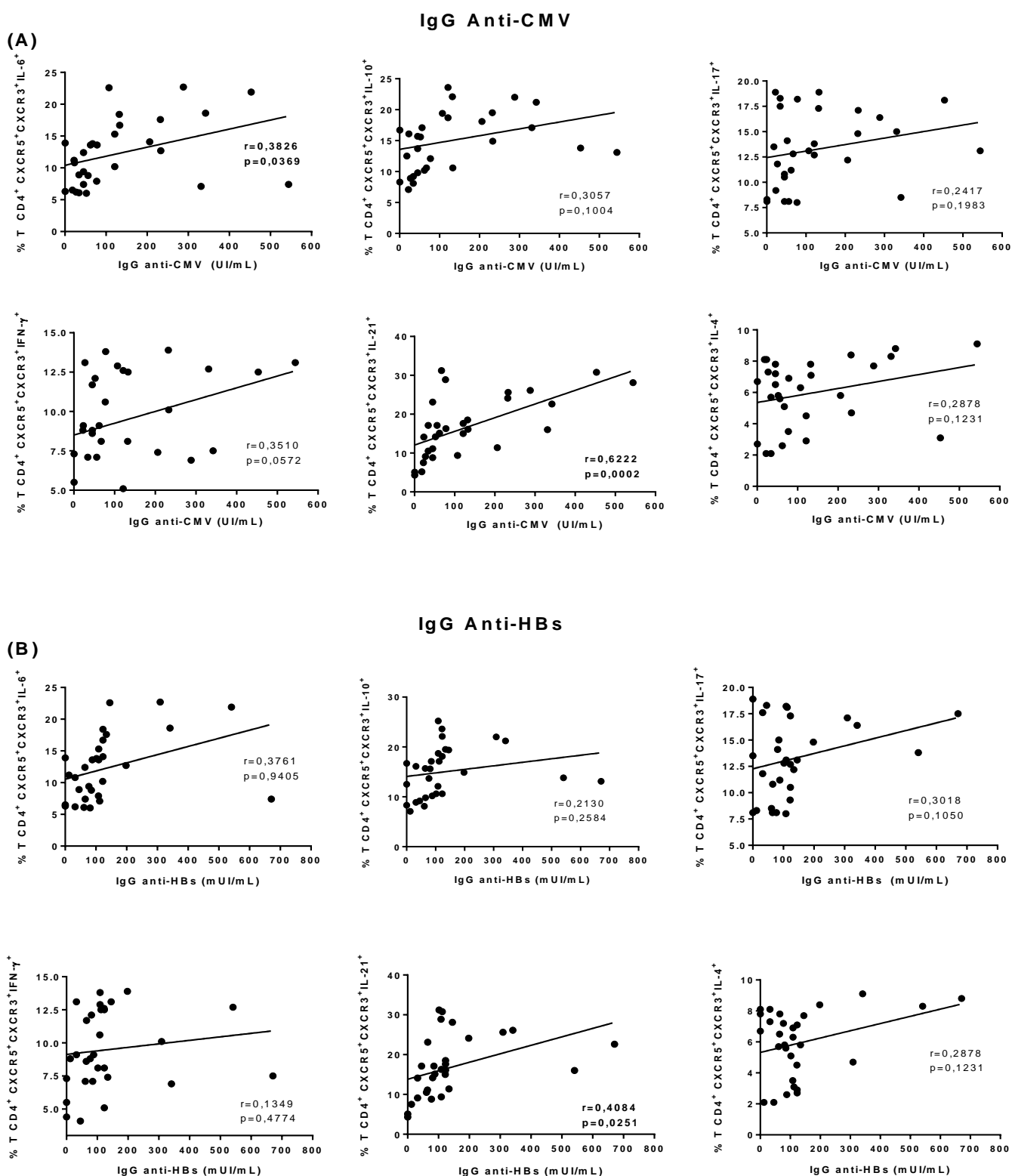


Figura 13: Correlação entre os níveis plasmáticos de IgG anti-CMV e anti-HBs com a frequência de células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ periféricas secretoras de citocinas. O plasma obtido de cada mulher, grávida (n=15) ou não (n=15), foi submetido à técnica ELISA para quantificação de IgG anti-CMV e de IgG anti-HBs. As variáveis foram submetidas à análise do coeficiente de correlação de Pearson e os valores de p estão indicados nas figuras.

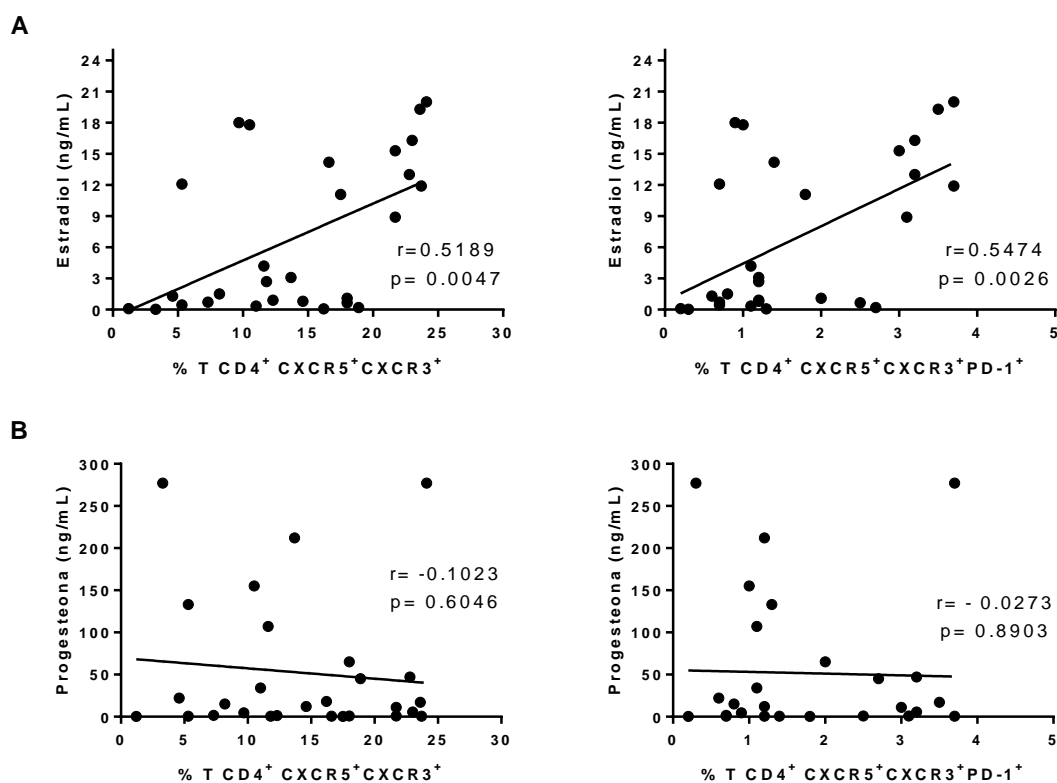


Figura 14: Correlação entre os níveis plasmáticos de estrogênio e progesterona com a frequência de células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ periféricas, de acordo com a expressão de PD-1. Amostras do plasma de mulheres (n=28) grávidas e não grávidas saudáveis foram submetidas à técnica de ELISA para a quantificação *in vivo* dos níveis de estrogênio e progesterona. Em seguida, foram comparados com a frequência de células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ e de células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ PD-1⁺. As variáveis foram submetidas à análise do coeficiente de correlação de Pearson e os valores de p estão indicados nas figuras.

5. DISCUSSÃO

Funcionalmente, os linfócitos T CD4⁺ são as células mais importantes do sistema imunológico, uma vez que regulam a função de todas as células da imunidade natural, bem como das células da imunidade adquirida. Dada a necessidade em coordenar diferentes eventos relacionados à proteção contra diversos patógenos e controlar complexas reações de hipersensibilidade, as células T CD4⁺ tem uma biologia funcional complexa e ainda não totalmente esclarecida. Apesar da diferenciação dessas células em diferentes fenótipos efetores depender principalmente da ação de diferentes citocinas presentes no microambiente durante a ativação da imunidade específica (Tangy *et al.*, 2013), várias evidências também apontam para a influência de diferentes hormônios no fenótipo final da resposta imune mediada pelas células T CD4⁺ (Procaccini *et al.*, 2015; Song & Shi, 2014). Enquanto a gravidez é um fenômeno conhecido em modular negativamente a resposta imune celular materna, um incremento na produção de anticorpos por células B de memória tem sido descrita nas gestantes (Kanda & Tamaki, 1999; Muzzio *et al.*, 2013). Nesse sentido, alguns estudos têm demonstrado que o estrogênio, um dos principais hormônios envolvidos no sucesso da gestação, pode amplificar diretamente a resposta imune humoral (Fu *et al.*, 2011; Grimaldi *et al.*, 2002; Kanda & Tamaki, 1999; Muzzio *et al.*, 2013). Os achados apresentados aqui, apesar de preliminares, sugerem que esse fenômeno possa estar atrelado à capacidade do estrogênio em favorecer a expansão das células T_{FH}. Até aonde temos conhecimento, essa correlação ainda não havia sido sugerida na literatura.

Apesar do melhor entendimento a respeito da caracterização fenotípica das células T_{FH} ser um evento recente, funcionalmente, essas células estão envolvidas na resposta humoral de alta eficiência, por regular positivamente vários eventos em nível das células B dos centros germinativos (Qi *et al.*, 2014). Nos órgãos linfoides secundários, as células T_{FH} humanas são identificadas através da alta expressão de Bcl-6, PD-1, ICOS, CXCR5 e pela produção de IL-21, associada à baixa expressão de CCR7 (Onabajo *et al.*, 2013). Diversos estudos têm mostrado a presença de células T_{FH} circulantes, que compartilham uma capacidade funcional semelhante às células T_{FH} dos folículos linfoides secundários. No entanto, em contraste com as células T_{FH} do centro germinativo, a expressão de Bcl-6 é ausente nas células T_{FH} de memória periféricas, sugerindo que o Bcl-6 é dispensável para sua manutenção

(Schimitt *et al.*, 2014). Em nosso estudo, apesar de não termos analisado a expressão intracelular de Bcl-6, nós observamos uma maior frequência de células T CD4⁺ CD45RO⁺ CXCR5⁺, expressando ou não o marcador PD-1, nas amostras de sangue periférico de gestantes. De forma interessante, a porcentagem de células T CD4⁺ CD45RO⁺ negativas para CXCR5 expressando PD-1 também foi superior nas gestantes (dados não mostrados). De fato, alguns estudos têm demonstrado uma maior frequência de células T PD-1⁺ associada a aceitação do feto e sucesso na gestação (Wang *et al.*, 2016). O papel da molécula PD-1 na gestação deve estar relacionado à sua capacidade em inibir várias funções efetoras das células T ativadas quando interage com um dos seus dois ligantes, PD-L1 ou PD-L2 (Jin *et al.*, 2011). A expressão dessa molécula tem sido relacionada, portanto, a indução de tolerância imune, um fenômeno sabidamente importante no contexto da gestação. Na resposta imune humoral, sabe-se que a expressão de PD-1 sobre as células T_{FH} age como um modulador negativo desses linfócitos, funcionando como um mecanismo de regulação intrínseco na produção de anticorpos (Cubas, 2013).

Alguns estudos mostram que menos de 1% das células T_{FH} de memória circulantes de indivíduos saudáveis expressam ICOS (Kim *et al.*, 2001; Locci *et al.*, 2013; Bentebibel *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2009; Sallusto *et al.*, 1998). Enquanto PD-1 é importante na regulação negativa da atividade das células T_{FH} no centro germinativo, a expressão de ICOS é essencial para a geração dessas células (Cubas, 2013). Em nosso estudo, frequências muito reduzidas de células T CD4⁺ CD45RO⁺ CXCR5⁺ PD-1⁺ expressando ICOS foram, de fato, identificadas em nossas amostras, mas a porcentagem desse subtipo de célula T_{FH} foi significativamente maior nas amostras de sangue periférico das gestantes ($0,09 \pm 0,11 \times 2,1 \pm 1,8$; $p < 0,0001$). Como um aumento na frequência de células T_{FH} circulantes ICOS⁺ parece estar relacionado com o desenvolvimento de melhores anticorpos (Tsai & Yu, 2014), acreditamos que o incremento na frequência desse subtipo de T_{FH} em gestantes deva refletir numa resposta imune humoral mais eficiente nessas mulheres. Para testar essa hipótese, futuros estudos baseados em co-cultura de células T CD4⁺ CXCR5⁺ PD-1⁺, coexpressando ou não ICOS⁺, com linfócitos B serão conduzidos pela nossa equipe.

Estudo recente conduzido por Locci e colaboradores (2013) identificou as células T_{FH} com melhor capacidade funcional como sendo CXCR3 negativas. Em nosso estudo, a gestação aumentou a frequência de células T CD4⁺ CXCR5⁺

expressando ou não o marcador CXCR3, e, diferente do estudo conduzido por Locci e colaboradores (2013), a expressão do marcador PD-1 foi particularmente restrito às células TCD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺. Alguns pontos importantes diferenciam os dois estudos. Em primeiro lugar, o trabalho de Locci e colaboradores teve como objetivo realizar uma identificação das células T_{FH} circulantes em indivíduos saudáveis e em pacientes cronicamente infectados pelo HIV-1, o vírus causador da síndrome da imunodeficiência adquirida. Portanto, apesar de não ter sido mencionado pelos autores, acreditamos que nos grupos estudados por Locci e colaboradores não incluíam gestantes. Ademais, esses autores não deixaram claro a razão entre mulheres e homens nos grupos estudados. Portanto, não é possível realizar aqui, de forma mais acurada, um paralelo entre os estudos com relação a todos os marcadores avaliados. Certamente, nós pretendemos avaliar a capacidade *in vitro* das células T CD4⁺ CXCR5⁺, que expressam ou não CXCR3, em auxiliar a produção de anticorpos pelas células B.

Classicamente, as células T_{FH} modulam várias funções das células B nos folículos secundários através da liberação de citocinas, tais como IL-21 e IL-6 (Qi *et al.*, 2014). A IL-21 é um importante regulador da resposta imune humoral, por modular a proliferação das células B e a troca de cadeia pesada do anticorpo (Li *et al.*, 2013). Nesse sentido, nós resolvemos caracterizar o perfil de citocinas produzido pelas células T CD4⁺ CXCR5⁺ que expressavam, ou não, o marcador CXCR3 através de uma rápida ativação com PMA e ionomicina (dois potentes estimuladores da síntese de diferentes citocinas). Para tanto, avaliamos a frequência de células T_{FH} produtoras não apenas de IL-21 e IL-6, como também de IL-4, IL-17, IFN- γ e IL-10. Infelizmente, por limitações técnicas, não foi possível realizar uma dupla-marcação de citocinas nas células analisadas. Nossos resultados demonstraram que a produção de todas as citocinas dosadas foi principalmente concentrada nas células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺, independente do grupo estudado (gestantes e não gestantes). Adicionalmente nós também observamos uma maior frequência dessas células capazes de produzir IL-21, IL-6 ou IL-10 nas amostras das gestantes. Esse resultado é diferente do que foi observado no estudo por Locci e colaboradores (2013) em que a produção de citocinas foi principalmente observada no compartimento das células T_{FH} CXCR3⁻. Como previamente mencionado, o nosso estudo e a equipe de Locci e

colaboradores estudaram populações diferentes, incapacitando uma comparação entre os dados.

Um achado interessante foi que a frequência de células T_{FH} não estimuladas obtidas de gestantes produziram níveis superiores de IL-21, IL-6 e IL-10 quando comparado ao grupo controle. Apesar de não termos uma explicação para tal evento, esse pode indicar a presença de células T $CD4^+$ efetoras no compartimento das células T periféricas em gestantes que são mantidas sob estimulação da imunidade humoral devido a maior colaboração com as células B de memória.

Ainda no contexto do perfil de citocina, apesar de termos observado uma maior frequência de células $TCD4^+ CXCR5^+ CXCR3^+$ produtoras de IL-10 nas gestantes, a frequência dessas células T_{FH} capazes de sintetizar citocinas ditas potencialmente embriotóxicas, tais como IL-17 e IFN- γ , não foi diferente entre os dois grupos estudados. Na verdade, células Th1 e Th17 são classicamente identificadas não apenas pela produção de IFN- γ e IL-17, respectivamente, como também pelo padrão de diferentes receptores de quimiocinas. Enquanto as células Th1 são $CXCR3^+ CCR6^-$, as células Th17 humanas são $CXCR3^- CCR6^+$. Ademais, existem ainda células Th1 capazes de produzir IL-17 (Geginat *et al.*, 2014). Nós acreditamos na possibilidade de que as células $TCD4^+CXCR5^+$ que produzam IL-17 e IFN- γ representem células Th1 e/ou Th17 destinadas prioritariamente a fornecer ajuda às células B em áreas distantes dos órgãos linfoides secundários, isto é, nos sítios de inflamação.

Um trabalho conduzido por Morita e colaboradores (2011) sugeriu que, em humanos e camundongos, as células T $CD4^+ CXCR5^+$ periféricas são compostas por três sub-grupos efetores: tipo Th1, Th2 e Th17 (Morita *et al.*, 2011). Além disso, estas células, exceto o subtipo Th1 $CXCR5^+$, seriam capazes de promover a secreção de anticorpos por células B virgens (King e Mohrs, 2009; Reinhardt *et al.*, 2009;. Zaretsky *et al.*, 2009; Reinhardt *et al.*, 2009; Banchereau *et al.*, 1994). Logo no início de nosso estudo nós observamos uma redução na frequência de células T $CD4^+ CXCR3^+ CXCR5^-$ nas amostras de sangue periférico de gestantes, isto é, de células Th1 incapazes de entrar em folículos linfoides. Nós iremos retornar as nossas análises por citometria de fluxo para verificar se há diferença na frequência de células Th1 e Th17, negativas para CXCR5, entre mulheres grávidas ou não. Acreditamos que, talvez, fazendo essa reanálise, uma diferença significativa na

produção de IFN- γ e IL-17 entre os dois grupos experimentais possa ser observada. Ademais, como o nível de produção de cada citocina pode diferenciar, iremos também determinar a intensidade média de fluorescência de todas as citocinas produzidas por cada subpopulação de células T CD4⁺ em ambos os grupos estudados. O objetivo é determinar se há diferença não apenas na frequência como também no nível de produção dessas glicoproteínas no contexto da gestação.

Com relação à expressão de PD-1, nós observamos que a produção de IL-6, IL-10, IL-17, IL-21 e IFN- γ pelas células T CD4⁺ totais foi positivamente correlacionada à frequência de células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺. Apesar deste resultado diferenciar dos achados obtidos no estudo de Locci e colaboradores (2013), ele pode ser explicado pela expressão diferencial de PD-1, visto que elevados níveis dessas moléculas pode identificar uma célula como disfuncional/anérgicas (Morou *et al.*, 2014). De modo interessante, uma robusta expressão de PD-1 foi detectada nas células T de gestantes (Sayama *et al.*, 2013). Como previamente informado, nós iremos reanalisar os nossos dados para determinar o nível de fluorescência média de PD-1 nas células T CD4⁺ das mulheres grávidas ou não.

A função efetora das células T_{FH} depende, além da produção de citocinas, da expressão de moléculas coestimulatórias, tal como CD40L. A interação entre o CD40L com o CD40 expresso nas células B é fundamental para indução de troca de cadeia pesada de anticorpos (Banchereau *et al.*, 1994). Com a aquisição de um novo citômetro multicolor capaz de analisar até 13 parâmetros prevista para final desse ano, as nossas futuras análises fenotípicas serão mais amplas dada a possibilidade de se adicionar diferentes anticorpos monoclonais para analisar até 11 marcadores por célula, incluindo a expressão do CD40L.

Em nosso estudo a gestação claramente favoreceu a expansão de células T_{FH} produtoras de citocinas mais envolvidas em respostas humorais (IL-21 e IL-6) e reguladoras (IL-10), exatamente os fenótipos que biologicamente devem ser mais favorecidos na gestação, que é caracterizada pela produção de elevados níveis de progesterona e estrogênio. Nesse sentido, tanto a progesterona quando o estrogênio executam funções imunomoduladoras importantes na tolerância materna ao feto (Fu *et al.*, 2011; Grimaldi *et al.*, 2002). No presente estudo, os níveis plasmáticos de estrogênio foram correlacionados positivamente com a frequência de células T CD4⁺ CXCR5⁺CXCR3⁺ e de células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ PD-1⁺. Quanto à

progesterona, nenhuma correlação significativa foi observada com essas células. Sabendo que o estrogênio amplifica diretamente a capacidade funcional das células B de memória (Fu *et al.*, 2011; Grimaldi *et al.*, 2002), nossos achados, apesar de preliminares, sugerem outro mecanismo pelo qual o estrogênio favoreça a resposta imune humoral: a expansão das células T_{FH} circulantes. Apesar de não termos informações quanto à frequência dessas populações e as oscilações nos níveis de estrogênio em diferentes momentos da gestação, o último trimestre foi escolhido por se tratar da fase gestacional aonde temos os picos de progesterona e estrogênio. No entanto, se possível, nós pretendemos expandir essas análises em amostras de sangue obtidas de mulheres grávidas nos diferentes momentos da gestação, do primeiro ao último trimestre.

Os linfócitos T_{FH} são conhecidos por auxiliar na formação dos centros germinativos, nos processos de hipermutação somática, maturação de afinidade e troca de classe dos linfócitos B através da ligação de moléculas coestimuladoras e da produção de IL-21 (Crotty, 2011; Tangye *et al.*, 2013; Shulman *et al.*, 2013). Nesse sentido, sob ajuda de sinais cognitivos e solúveis provindos das células T_{FH}, outras classes de anticorpos além de IgM são produzidas, contendo nas regiões variáveis, mutações pontuais que culminam com o aumento da afinidade de reconhecimento dos anticorpos contra os antígenos. Conseqüentemente, quanto maior a afinidade, maior a capacidade dessa molécula em neutralizar antígenos. A produção de anticorpos neutralizantes é necessária tanto para o desenvolvimento de uma imunidade protetora contra doenças infecciosas como para o sucesso de diversas vacinas que dependem da produção de anticorpos de alta eficácia (Tangy *et al.*, 2013). Diante do exposto, nosso próximo objetivo foi determinar se haveria alguma correlação entre a porcentagem de células T_{FH} e os níveis plasmáticos de IgG anti-CMV e anti-HBs. Sabendo que o CMV causa uma infecção viral latente na maioria da população adulta jovem (Enders *et al.*, 2012; Cannon *et al.*, 2010; Lopo *et al.*, 2011; Vilibic-Cavlek *et al.*, 2011; Adjei *et al.*, 2008), nossos resultados mostraram uma correlação direta e significativa entre a frequência de células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ e de células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ PD-1⁺ com a concentração plasmática de IgG anti-CMV.

Em se tratando do vírus da hepatite B (HBV), que é de distribuição mundial e a presença de anticorpos neutralizantes específicos contra esse vírus através da vacinação é de extrema importância para o controle da infecção (Tita & Silverman,

2016), particularmente no contexto da gestação, evitando assim o risco de transmissão vertical do vírus. Nosso estudo mostrou uma correlação positiva significativa entre os títulos de IgG anti-HBs com a frequência de células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ PD-1⁺. O motivo pelo qual não observamos nenhuma correlação entre os títulos de IgG anti-HBs e a porcentagem das células T CXCR5⁺ CXCR3⁺ totais, ainda não está claro para o nosso grupo, mas pode estar relacionada a diferentes formas com que o sistema imune materno é estimulado, sendo por diferentes antígenos liberados eventualmente pelas células cronicamente infectadas pelo CMV, enquanto no outro modelo (HBs), haveria uma estimulação mais aguda antigênica restrita. Ademais, a ausência de correlação entre as células T CXCR5⁺ CXCR3⁺ com os títulos de IgG anti-HBs pode ser o reflexo de uma variação temporal pós-vacinação. Sabidamente as gestantes acompanhadas no serviço público de saúde no Brasil não tem o calendário de vacinação para HBV em dia, fazendo com que todas recebam o esquema completo ainda durante a gestação. Nesse sentido, a última dose é aplicada no final do segundo trimestre, aproximadamente 1 mês antes de nossas análises terem sido conduzidas, e isso pode impactar na frequência de células T_{FH} estudadas com capacidade diferenciada na produção de determinadas citocinas.

No presente estudo, quando avaliamos o perfil de citocinas produzidos por essas células e os títulos dos anticorpos, nós observamos uma correlação direta entre a frequência das células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ produtoras de IL-6 e IL-21 e os níveis de IgG anti-CMV. Com relação à produção de anticorpos IgG anti-HBs, houve uma correlação positiva apenas com a frequência das células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ IL-21⁺. Estudo publicado por Bentebibel e colaboradores (2013) demonstrou também uma correlação positiva entre a frequência de células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ ICOS⁺ com a produção de anticorpos específicos contra Influenza. Essas células em cultura foram capazes de induzir a diferenciação de células B influenza-específicas em células de memória e em plasmócitos secretores de anticorpos. Ademais, semelhante aos nossos achados, essas células T_{FH} foram capazes de produzir IL-2, IL-10, IL-21 e IFN- γ quando estimuladas *in vitro* com o antígeno do vírus influenza, a hemaglutinina. Entretanto, diferente do nosso estudo, esse grupo não determinou qualquer correlação entre a produção *in vitro* dessas citocinas com os níveis plasmáticos de anticorpos contra o vírus influenza. Por outro lado, estudo feito por Morita e colaboradores (2011), demonstrou que as células T

CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ eram, dentre as T CD4⁺ CXCR5⁺, as piores em auxiliar os linfócitos B virgens. Entretanto, Bentebibel e colaboradores (2013) demonstraram que as células T CD4⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺ são capazes de induzir *in vitro* a diferenciação das células B de memória em plasmócitos secretores de anticorpos através da secreção de IL-21 e IL-10. Coletivamente, nosso estudo aponta claramente para uma estreita relação entre a capacidade das células T_{FH} em colaborar com as células B e o perfil de citocinas produzidas por esses linfócitos T durante essa sinapse imunológica. Adicionalmente, esse fenômeno parece ser potencializado pela gestação devido a produção de elevados níveis de estrogênio.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A gestação favorece a expansão de células T auxiliares foliculares (T_{FH}) circulantes capazes de expressar, ou não, o marcador CXCR3, e eficientes em produzir IL-21, IL-6 e IL-10, citocinas implicadas na resposta imune humoral.
- ✓ A frequência de células T_{FH} CXCR3⁺ circulantes foi diretamente relacionada aos níveis sistêmicos de estrogênio.
- ✓ Os níveis de anticorpos anti-CMV foram diretamente correlacionados com a frequência de células T_{FH} CXCR3⁺, capazes de expressar PD-1⁺ e de produzir IL-6 e IL-21.
- ✓ Os níveis de anticorpos anti-HBs foram diretamente correlacionados com a frequência de células T_{FH} CXCR3⁺ PD-1⁺ capazes de produzir IL-21.

Coletivamente, nossos resultados sugerem que a gestação favorece a expansão de células T_{FH} periféricas com provável habilidade em auxiliar as células B na produção de anticorpos IgG e sinaliza em direção ao estrogênio como sendo um potente mediador desse evento. Esses dados, apesar de preliminares, fornecem novas pistas de como a gestação pode modular a resposta imune humoral materna, podendo impactar no desenho de futuras estratégias objetivando tanto aprimorar as vacinas contra diferentes agentes infecciosos, assim como em sua modulação funcional no contexto de doenças autoimunes mediadas por autoanticorpos.

7. BIBLIOGRAFIA

Acosta-Rodriguez, E.V.; Rivino, L.; Geginat, J.; Jarrossay, D.; Gattorno, M.; Lanzavecchia, A.; Sallusto, F.; Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigen specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*, 8:639–646.

Adcock, E.W.; Teasdale, F.; August, C.S.; Cox, S.; Meschia, G.; Battaglia, F.C.; Naughton, M.A. (1973). Human Chorionic Gonadotropin: Its Possible Role in Maternal Lymphocyte Suppression. *Science*, 181(4102):845–7.

Adjei, A.A.; Armah, H.B.; Gbagbo, F.; Boamah, I.; Adu-Gyamfi, C.; Asare, I. (2008). Seroprevalence of HHV-8, CMV, and EBV among the general population in Ghana, West Africa. *BMC Infect Dis.*,8:111.

Akdis, M.; Palomares, O.; van de Veen, W.; van Spunter, M.; Akdis, C. A. (2012). TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J Allergy Clin Immunol.*, 129(6):1438-49

Annunziato, F.; Cosmi, L.; Liotta, F.; Maggi, E.; Romagnani, S. (2012). Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends Immunol*, 33: 505–512

Annunziato, F.; Cosmi, L.; Santarlasci, V.; Maggi, L.; Liotta, F.; Mazzinghi, B.; Parente, E.; Filì, L.; Ferri, S.; Frosali, F.; Giudici, F.; Romagnani, P.; Parronchi, P.; Tonelli, F.; Maggi, E.; Romagnani, S. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.*, 204(8): 1849-1861.

Annunziato, F.; Cosmi, L.; Santarlasci, V.; Maggi, L.; Liotta, F.; Mazzinghi, B.; Parente, E.; Filì, L.; Ferri, S.; Frosali, F.; Giudici, F.; Romagnani, P.; Parronchi, P.; Tonelli, F.; Maggi, E.; Romagnani, S. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*, 204:1849–1861.

Annunziato, F.; Romagnani, C.; Romagnani, S. (2015). The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J Allergy Clin Immunol.*, 135(3):626-35.

Antonelli, A.; Ferrari, S.M.; Giuggioli, D.; Ferrannini, E.; Ferri, C.; Fallahi, P. (2014). Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.*,13(3):272-80.

Arruvito, L.; Giulianelli, S.; Flores, A.C.; Paladino, N.; Barboza, M.; Lanari, C.; Fainboim, L. (2008). NK cells expressing a progesterone receptor are susceptible to progesterone-induced apoptosis. *Journal of immunology*,180(8):5746–53.

Balandya, E.; Wieland-Alter, W.; Sanders, K.; Lahey, T. (2012). Human seminal plasma fosters CD4(+) regulatory T-cell phenotype and transforming growth factor- β 1 expression. *Am J Reprod Immunol.*, 68:322–330.

Banchereau, J.; Bazan, F.; Blanchard, D.; Briere, F.; Galizzi, J.P.; van Kooten, C.; Liu, Y.J.; Rousset, F.; Saeland, S. (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annual review of immunology*, 12:881–922.

Bansal, A.S.; Bora, S.A.; Saso, S.; Smith, J.R.; Johnson, M.R.; Thum, M.Y. (2012). Mechanism of human chorionic gonadotrophin-mediated immunomodulation in pregnancy. *Expert Rev Clin Immunol.* ,8(8):747-53.

Beaman, K.; Jaiswal, M.; Lewis, C.; Ntrivalas, E.; Gilman-Sachs, A.; Kwak-Kim, J. (2011). In pregnancy: active maternal immunity is induced by capacitated sperm. *Fertility and Sterility*, 96(3):S94–S95.

Bentebibel, S.E.; Schmitt, N.; Banchereau, J.; Ueno, H. (2011). Human tonsil B-cell lymphoma 6 (BCL6)-expressing CD4+ T-cell subset specialized for B-cell help outside germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 108(33):E488-97.

Bentebibel, S.E.; Lopez, S.; Obermoser, G.; Schmitt, N.; Mueller, C.; Harrod, C.; Flano, E.; Mejias, A.; Albrecht, R.A.; Blankenship, D.; Xu, H.; Pascual, V.; Banchereau, J.; Garcia-Sastre, A.; Palucka, A.K.; Ramilo, O.; Ueno, H. (2013). Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci Transl Med.*, 5(176):176ra32.

Bertrams, J.; Kuwert, E.; Lohmeyer, H.H. (1971). The specificity of leukocyte antibodies in histocompatibility testing of serum from prima- and multiparas. *Bibliotheca haematologica*, 37:98–106.

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

Bettini, M.L.; Vignali, D.A. (2010). Development of thymically derived natural regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci.*, 1183:1-12.

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

Breitfeld, D.; Ohl, L.; Kremmer, E.; Ellwart, J.; Sallusto, F.; Lipp, M.; Förster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J. Exp. Med.* 192, 1545–1552.

Bonduelle, M.L.; Dodd, R.; Liebaers, I.; Van Steirteghem, A.; Williamson, R.; Akhurst, R. (1988). Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from triprounucleate zygotes. *Human reproduction*, 3(7):909–14.

Bonecchi, R.; Bianchi, G.; Bordignon, P.P.; D'Ambrosio, D.; Lang, R.; Borsatti, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Gray, P.A.; Mantovani, A.; Sinigaglia, F. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med*, 187: 129–134.

Bossaller, L.; Burger, J.; Draeger, R.; Grimbacher, B.; Knoth, R.; Plebani, A.; Durandy, A.; Baumann, U.; Schlesier, M; Welcher, A. A.; Peter, H. H. , Warnatz, K. (2006). ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. *J Immunol*. 177(7):4927-32.

Breitfeld, D.; Ohl, L.; Kremmer, E.; Ellwart, J.; Sallusto, F.; Lipp, M.; Forster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *The Journal of experimental medicine*. 192(11): 1545–1552.

Cannon, M.J.; Schmid, D.S.; Hyde, T.B. (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol.*,20(4):202–13.

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

Chevalier, N.; Jarrossay, D.; Ho, E.; Avery, D.T.; Ma, C.S.; Yu, D.; Sallusto, F.; Tangye, S.G.; Mackay, C.R. (2011). CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. *J Immunol.*, 186(10):5556-68.

Choi, Y. S.; Eto, D.; Yang, J. A.; Lao, C.; Crotty, S. (2013b). Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation. *Journal of Immunology*,190(7): 3049-3053.

Choi, Y. S.; Kageyama, R.; Eto, D.; Escobar, T.C.; Johnston, R. J.; Monticelli, L.; Lao, C.; Crotty, S. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity*, 34(6): 932-946.

Choi, Y. S.; Yang, J. A.; Crotty, S (2013a). Dynamic regulation of Bcl6 in follicular helper CD4 T (TFH) cells. *Current Opinion in Immunology*, 25(3): 366-372.

- Clemens, L.E.; Siiteri, P.K.; Stites, D.P. (1979). Mechanism of immunosuppression of progesterone on maternal lymphocyte activation during pregnancy. *Journal of immunology. American Association of Immunologists*,122(5):1978–85.
- Cosmi, L.; Annunziato, F.; Maggi, E.; Romagnani, S.; Manetti, R. (2001). Chemoattractant receptors expressed on type 2 T cells and their role in disease. *Int Arch Allergy Immunol.*, 125(4):273-9.
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Ann. Rev. Immunol.*, 29: 621-663.
- Crotty, S. (2015). A brief history of T cell help to B cells. *Nat Rev Immunol.*, 15(3):185-9.
- Cubas, R. A.; Mudd, J. C.; Savoye, A. L.; Perreau, M.; Grevenynghe, J.; Metcalf, T.; Connick, E.; Meditz, A.; Freeman, G. J.; Abesada-Terk, G.; Jacobson, J. M.; Brooks, A. D.; Crotty, S.; Estes, J. D.; Pantaleo, G.; Lederman, M. M.; Haddad, E. K. (2013). Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nature Medicine*,19(4): 494-499.
- Curotto de Lafaille, M.A., Lafaille, J.J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.*, 30:626–635.
- Cutolo, M.; Sulli, A.; Capellino, S.; Villaggio, B.; Montagna, P.; Seriolo, B.; Straub, R. H. (2004). Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus*, 13(9):635–8.
- De Mestre, A.; Noronha, L.; Wagner, B.; Antczak, D. F. (2010). Split immunological tolerance to trophoblast. *The International Journal of Developmental Biology*, 54(2-3): 445-55.
- Denison F.C; Grant, V.E.; Calder, A.A.; Kelly, R.W. (1999) Seminal plasma components stimulate interleukin-8 and interleukin-10 release. *Mol Hum Reprod.*, 5(3):220-6.
- Dustin, M.L; Tseng, S.Y.; Varma, R.; Campi, G. (2006). T-cell-dendritic cell immunological synapses. *Cur Opin Immunol*,18:512-16.
- Enders, G.; Daiminger, A.; Lindemann, L.; Knotek, F.; Bäder, U.; Exler, S.; Enders, M. (2012). Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in pregnant women, bone marrow donors and adolescents in Germany, 1996-2010. *Med Microbiol Immunol.*, 201(3):303–9.

Eto, D.; Lao, C.; Ditoro, D.; Barnett, B.; Escobar, T. C.; Kageyama, R.; Yusuf, I.; Crotty, S. (2011). IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (TFH) differentiation. *PlosOne*, 6(3): 17739.

Farrar, J.D.; Asnagli, H.; Murphy, K.M. (2002) T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J Clin Invest*, 109: 431–435

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

Fernandez, N.; Cooper, J.; Sprinks, M.; AbdElrahman, M.; Fiszer, D.; Kurpisz, M.; Dealtry, G. (1999) A critical review of the role of the major histocompatibility complex in fertilization, preimplantation development and feto-maternal interactions. *Human reproduction update*, 5(3):234–48.

Fontenot, J. D.; Rasmussen, J.P.; Williams, L. M.; Dooley, J.L.; Farr, A.G.; Rudensky, A.Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*, 22(3):329-41

Fu, Y.; Li, L.; Liu, X.; Ma, C.; Zhang, J.; Jiao, Y.; You, L.; Chen, Z.J.; Zhao, Y. (2011). Estrogen promotes B cell activation in vitro through down-regulating CD80 molecule expression. *Gynecol Endocrinol.*, 27(8):593-6.

Fuchs, T.; Hammarström, L.; Smith, C.I.; Brundin, J. (1981). In vitro induction of human suppressor T cells by a chorionic gonadotropin preparation. *Journal of reproductive immunology*, 3(2):75–84.

Gagliani, N.; Magnani, C.F.; Huber, S.; Gianolini, M.E.; Pala, M.; Licona-limon, P.; Guo, B.; Herbert, D.R.; Bulfone, A.; Trentini, F.; Di Serio, C.; Bacchetta, R.; Andreani, M.; Brockmann, L.; Gregori, S.; Flavell, R.A.; Roncarolo, M.C. (2013) Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med.*, 19(6):739-46.

Geginat, J.; Paroni, M.; Maglie, S.; Alfen, J.S.; Kastirr, I.; Gruarin, P.; De Simone, M.; Pagani, M.; Abrignani, S. (2014). Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front Immunol.*, 5:630.

Gerlach, K.; Hwang, Y.; Nikolaev, A.; Atreya, R.; Dornhoff, H.; Steiner, S.; Lehr, H. A.; Wirtz, S.; Vieth, M.; Waisman, A.; Rosenbauer, F.; McKenzie, A. N.; Weigmann, B.; Neurath, M. F. (2014). TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Nat.Immunol.*, v. 15, n. 7, p. 676-686.

Gray, G. E.; McIntyre, J. A. (2007). HIV and pregnancy. *BMJ*,334(7600): 950-3.

Grimaldi, C.M.; Cleary, J.; Dagtas, A.S.; Moussai, D.; Diamond, B. (2002). Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J Clin Invest.*,109(12):1625-33.

Grohmann, U.; Fallarino, F.; Bianchi, R.; Belladonna, M. L.; Vacca, C.; Orabona, C.; Uyttenhove, C.; Fioretti, M. C.; Puccetti, P. (2001). IL-6 inhibits the tolerogenic function of CD8 alpha+ dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of Immunology*, 167(2): 708-14.

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

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

Guerin, L.R.; Moldenhauer, L.M.; Prins, J.R.; Bromfield, J.J.; Hayball, J.D.; Robertson, S.A. (2011). Seminal fluid regulates accumulation of FOXP3+regulatory T cells in the preimplantation mouse uterus through expanding the FOXP3+cell pool and CCL19-mediated recruitment. *Biol Reprod.*, 85:397-408.

Gustafsson, C.; Mjösberg, J.; Matussek, A., Geffers, R.; Matthiesen, L.; Berg, G.; Sharma, S.; Buer, J.; Ernerudh, J. (2008). Gene expression profiling of human decidual macrophages: evidence for immunosuppressive phenotype. *Public Library of Science*, 3(4):e2078.

Gutcher, I.; Becher, B. (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J. Clin. Invest.*, 117: 1119-27.

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

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

He, J.; Tsai, L.M.; Leong, Y.A.; Hu, X.; Ma, C.S.; Chevalier, N.; Sun, X.; Vandenberg, K.; Rockman, S.; Ding, Y.; Zhu, L.; Wei, W.; Wang, C.; Karnowski, A.; Belz, G.T.; Ghali, J.R.; Cook, M.C.; Riminton, D.S.; Veillette, A.; Schwartzberg, P.L.; Mackay, F.; Brink, R.; Tangye, S.G.; Vinuesa, C.G.; Mackay, C.R.; Li, Z.; Yu, D. (2013). Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5⁺ CD4⁺ T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity*, 39(4):770-81.

Healy, D.L.; Okamoto, S.; Morrow, L.; Thomas, A.; Jones, M.; McLachlan, V.; Besanko, M.; Martinez, F.; Rogers, P.A. (1987). Contributions of in vitro fertilization to knowledge of the reproductive endocrinology of the menstrual cycle. *Baillière's clinical endocrinology and metabolism*, 1(1):133–52.

Heikkinen, J.; Möttönen, M.; Alanen, A.; Lassila, O. (2004). Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol.*, 136:373-378.

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

Henrickson, S.E.; von Adrian, U.H. (2007). Single-cell dynamics of T-cell priming. *Cur Opin Immunol*, 19: 249-58.

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

Hoshina, M.; Boothby, M.; Hussa, R.; Pattillo, R.; Camel, H.M.; Boime, I. (1985). Linkage of human chorionic gonadotrophin and placental lactogen biosynthesis to trophoblast differentiation and tumorigenesis. *Placenta*,6(2):163–72.

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

Hunt, J.S.; Langat, D.I. (2009). HLA-G: A human pregnancy-related immunomodulator. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(4): 462-469.

Hutter, H.; Dohr, G. (1998). HLA expression on immature and mature human germ cells. *Journal of Reproductive Immunology*, 38(2):101–22.

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

Ito, A.; Buenafe, A.C.; Matejuk, A.; Zamora, A.; Silverman, M.; Dwyer, J.; *et al.* (2002). Estrogen inhibits systemic T cell expression of TNF-alpha and recruitment of TNF-alpha(+) T cells and macrophages into the CNS of mice developing experimental encephalomyelitis. *Clin Immunol*, 102:275–282.

Jaiswal, M.K.; Mallers, T.M.; Larsen, B.; Kwak-Kim, J.; Chaouat, G.; Gilman-Sachs, A.; Beaman, K. D. (2012). V-ATPase upregulation during early pregnancy: a possible link to establishment of an inflammatory response during preimplantation period of pregnancy. *Reproduction*,143(5):713–25.

Jasper, M. J.; Tremellen, K. P.; Robertson, S. A. (2007). Reduced expression of IL-6 and IL-1 α mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. *J. Reprod. Immunol.*, 73: 74–84.

Jia, L.; Wu, C. (2014). The biology and functions of Th22 cells. *Adv Exp Med Biol.*, 841:209-30.

Jin, H.T.; Ahmed, R.; Okazaki, T. (2011). Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol.*,350:17-37.

Johnston, R.J.; Poholek, A.C.; DiToro, D.; Yusuf, I.; Eto, D.; Barnett, B.; Dent, A.L.; Craft, J.; Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*, 325(5943):1006–1010.

Jonuleit, H.; Schmitt, E.; Stassen, M.; Tuettenberg, A.; Knop, J.; Enk, A.H. (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+) CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med.*, 193:1285–1294.

Kanda, N.; Tamaki, K. (1999). Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *The Journal of allergy and clinical immunology*,103(2 Pt 1):282–8.

Kaplan, M.H.; Hufford, M.M.; Olson, M.R. (2015). The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol.*, 15(5):295-307.

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

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

Kim, C.H.; Rott, L.S.; Clark-Lewis, I.; Campbell, D.J.; Wu, L.; Butcher, E.C. (2001). Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *The Journal of experimental medicine*, 193:1373–1381.

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

King, I.L.; Mohrs, M. (2009). IL-4-producing CD4+ T cells in reactive lymph nodes during helminth infection are T follicular helper cells. *The Journal of experimental medicine*, 206:1001–1007.

Kitano, M.; Moriyama, S.; Ando, Y.; Hikida, M.; Mori, Y.; Kurosaki, T.; Okada, T.(2011). Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity.*, 34(6):961-72

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

Korn, T.; Bettelli, E.; Oukka, M.; Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*, 27:485–517.

Kroenke, M.A.; Eto, D.; Locci, M.; Cho, M.; Davidson, T.; Hadda, E.K.; Crotty, S. (2012). Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation. *Journal of Immunology*, 188(8): 3734-3744.

Tomohiro Kurosaki, T.; Kometani, K.; Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nat Rev Immunol.*, 15(3):149-59.

Kwak-Kim, J.; Bao, S.; Lee, S.K.; Kim, J.W.; Gilman-Sachs, A.(2014). Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors, and stress. *Am J Reprod Immunol.*, 72(2):129-40.

Levings, M. K.; Sangregorio, R.; Sartirana, C. (2002). Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med.*, 196: 1335–46.

Li, Q.; Liu, Z.; Dang, E.; Jin, L.; He, Z.; Yang, L.; *et al.*(2013). Follicular helper T Cells (Tfh) and IL-21 involvement in the pathogenesis of bullous pemphigoid. *PLoS One*, 8 (7): e68145.

Lindqvist, M.; Van Lunzen, J.; Soghoian, D. Z.; Kuhl, B. D.; Ranasinghe, S.; Kranias, G.; Flanders, M. D.; Cutler, S.; Yudanin, N.; Muller, M. I.; Davis, I.; Farber, D.;Hartjen, P.; Haag, F.; Alter, G.; Wiesch, J. S.; Streeck, H. (2012). Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(9): 3271-3280.

Liu, C.; Wang, X.; Sun, X. (2013). Assessment of sperm antigen specific T regulatory cells in women with recurrent miscarriage. *Early Human Dev.*,89:95-100

Liu, H.Y; Buenafe, A.C.; Matejuk, A.; Ito, A.; Zamora, A.; Dwyer, J.; Vandebark, A.A.; Offner, H. (2002). Estrogen inhibition of EAE involves effects on dendritic cell function. *Journal of Neuroscience Research*, 70(2):238–48.

Liu, W.; Putnam, A.L.; Xu-Yu, Z.; Szot, G.L.; Lee, M.R.; Zhu, S.; Gottlieb, P.A.; Kapranov, P.; Gingeras, T.R.; Fazekas de St Groth, B.; Clayberger, C.; Soper, D.M.; Ziegler, S.F.; Bluestone, J.A. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med.*, 203(7):1701-11.

Locci, M.; Havenar-Daughton, C.; Landais, E.; Wu, J.; Kroenke, M.A.; Arlehamn, C.L.; Su, L.F.; Cubas, R.; Davis, M.M.; Sette, A.; Haddad, E.K.; International AIDS Vaccine Initiative Protocol C Principal Investigators; Poignard, P.; Crotty, S. (2013). Human circulating PD1⁺CXCR3⁻CXCR5⁺ memory TFH cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity*, 39: 758-769.

Locci, M.; Havenar-Daughton, C.; Landais, E.; Wu, J.; Kroenke, M. A.; Arlehamn, C. L.; Su, L. F.; Cubas, R.; Davis, M. M.; Sette, A.; Haddad, E. K., Poignard, P.; Crotty, S. (2013). Human circulating PD1⁺CXCR3⁻CXCR5⁺ memory TFH cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity*, 39 (4): 758-769.

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

Lopo, S.; Vinagre, E.; Palminha, P.; Paixao, M.T.; Nogueira, P.; Freitas, M.G. (2011). Seroprevalence to cytomegalovirus in the Portuguese population, 2002-2003. *Euro Surveill.*, 16(25).

Luo, C.Y.; Wang, L.; Sun, C.; Li, D.J. (2011). Estrogen enhances the functions of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. *Cellular & molecular immunology*, 8(1):50-8.

Ma, C.S.; Suryani, S.; Avery, D.T.; Chan, A.; Nanan, R.; Santner-Nanan, B.; Deenick, E.K.; Tangye, S.G. (2009). Early commitment of naive human CD4(+) T cells to the T follicular helper (T(FH)) cell lineage is induced by IL-12. *Immunology and cell biology*, 87:590-600.

Ma, C.S.; Avery, D.T.; Chan, A.; Batten, M.; Bustamante, J.; Boisson-Dupuis, S.; Arkwright, P.D.; Kreins, A.Y.; Averbuch, D.; Engelhard, D.; Magdorf, K.; Kilic, S.S.; Minegishi, Y.; Nonoyama, S.; French, M.A.; Choo, S.; Smart, J.M.; Peake, J.; Wong, M.; Gray, P.; Cook, M.C.; Fulcher, D.A.; Casanova, J.L.; Deenick, E.K.; Tangye, S.G. (2012). Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells. *Blood*, 119(17):3997-4008.

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

Mahnke, K.; Enk, A. H. (2005). Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? *Curr Top Microbiol Immunol.*, v. 293, p. 133–150.

Makani, S. S.; Jen, K. Y.; Finn, P. W. (2008) New Costimulatory Families: Signaling Lymphocytic Activation Molecule in Adaptive Allergic Responses. *Cur. Mol. Med.*, 8:359-364.

Manetti, R.; Parronchi, P.; Giudizi, M.G.; Piccinni, MP.P; Maggi, E.; Trinchieri, G.; Romagnani, S. (1993) Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 IL-12) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med*, 177: 1199–1204.

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

Martín-Villa, J.M.; Luque, I.; Martínez-Quiles, N.; Corell, A.; Regueiro, J.R.; Timón, M.; Arnaiz-Villena, A. (1996). Diploid expression of human leukocyte antigen class I and class II molecules on spermatozoa and their cyclic inverse correlation with inhibin concentration. *Biology of reproduction*, 55(3):620–9.

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

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

Miossec, P. (2009) IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microb. Infect.*, 11:625-630.

Moir, S.; Fauci, A. S. (2009). B cells in HIV infection and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(4): 235-245.

Moldenhauer, L.M.; Diener, K.R.; Thring, D.M.; Brown, M.P.; Hayball, J.D.; Robertson, S. A. (2009) Cross-presentation of male seminal fluid antigens elicits T cell activation to initiate the female immune response to pregnancy. *Journal of immunology*, 182(12):8080–93.

Morita, R.; Schmitt, N.; Bentebibel, S. E.; Ranganathan, R.; Bourdery, L.; Zurawski, G.; Foucat, E.; Dullaers, M.; Oh, S.; Sabzghabaei, N.; Lavecchio, E.M.; Punaro, M.; Pascual, V.; Banchereau, J.; Ueno, H. (2011). Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*, 34(1):108-21.

Morou, A.; Palmer, B.E.; Kaufmann, D. E. (2014). Distinctive features of CD4+ T cell dysfunction in chronic viral infections. *Curr Opin HIV AIDS*, 9(5):446-51.

Munn, D.H.; Shafizadeh, E.; Attwood, J.T.; Bondarev, I.; Pashine, A.; Mellor, A.L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med.*, 189(9):1363-72.

Munoz-Cruz, S.; Togno-Pierce, C.; Morales-Montor, J. (2011) Non-reproductive effects of sex steroids: their immunoregulatory role. *Curr. Top. Med. Chem.* 11(13):1714–1727.

Muzzio, D.; Zenclussen, A.C.; Jensen, F. (2013). The role of B cells in pregnancy: the good and the bad. *Am J Reprod Immunol.*,69(4):408-12.

Naugler, W.E.; Karin, M. (2008). The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med.*, 14(3):109-19.

Nurieva, R.I.; Chung, Y.; Martinez, G.J.; Yang, X.O.; Tanaka, S.; Matskevitch, T.D.; Wang, Y.H.; Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325(5943):1001–1005.

Ohkura, N.; Kitagawa, Y.; Sakaguchi, S. (2013). Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity.*, 38:414–423.

Onabajo, O. O.; George, J.; Lewis, M.G; Mattapallil, J.J. (2013). Rhesus Macaque lymph node PD1^{hi}CD4⁺ T cells express high levels of CXCR5 and IL-21 and display a CCR7^{lo}ICOS⁺Bcl6⁺ T-follicular helper (TFH) cell phenotype. *PlosOne*, 8: e59758.

Pallikkuth, S.; Parmigiani, A.; Pahwa, S. (2012). The role of interleukin-21 in HIV infection. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 23(4-5): 173-180.

Pankratz, S.; Ruck, T.; Meuth, S. G.; Wiendl, H. (2016). CD4⁺HLA-G⁺ regulatory T cells: Molecular signature and pathophysiological relevance. *Hum Immunol.* S0198-8859(16)00025-2.

Pasare, C.; Medzhitov, R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, 299(5609): 1033–6.

Patas, K.; Engler, J.B.; Friese, M.A.; Gold, S.M. (2013). Pregnancy and multiple sclerosis: fetomaternal immune cross talk and its implications for disease activity. *J Reprod Immunol.*, 97(1):140-6.

Paulos, C.M.; Carpenito, C.; Plesa, G.; Suhoski, M.M.; Varela-Rohena, A.; Golovina, T.N.; Carroll, R.G.; Riley, J.L.; June, C.H. (2010). The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human T(H)17 cells. *Sci Transl Med.*, 2(55):55ra78.

Pedersen, A.; Taylor, B.; Payne, A.; Abdelrahim, M.; Francis, G.(1994). Macrophage conditioned media affects steroid hormone production by placental cultures. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 24(6):548–54.

Penna, G.; Giarratana, N.; Amuchastegui, S. (2005). Manipulating dendritic cells to induce regulatory T cells. *Microbes Infect*, v. 7, p. 1033–1039.

Perreau, M.; Savoye, A. L.; Crignis, E.; Corpataux, J. M.; Cubas, R.; Haddad, E. K.; Leval, L.; Graziosi, C.; Pantaleo, G. (2013). Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(1):143-156.

Piccinni, M.P.; Beloni, L.; Livi, C.; Maggi, E.; Scarselli, G.; Romagnani, S. (1998). Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nature medicine*, 4(9):1020–4.

Piccinni, M.P.; Giudizi, M.G.; Biagiotti, R.; Beloni, L.; Giannarini, L.; Sampognaro, S.; *et al.* (1995) Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *Journal of immunology*,155(1):128–33.

Pongcharoen, S.; Supalap, K. (2009). Interleukin-17 Increased Progesterone Secretion by JEG-3 Human Choriocarcinoma Cells. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 61(4):261-4

Procaccini, C.; Pucino, V.; Mantzoros, C.S.; Matarese, G. (2015). Leptin in autoimmune diseases. *Metabolism*, 64(1):92-104.

Qi, H.; Cannons, J.L.; Klauschen, F.; Schwartzberg, P.L.; Germain, R.N.(2008). SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature*, 455(7214):764-9.

Qi, H.; Chen, X.; Chu, C.; Liu, D.; Ma, W.; Wang, Y.; Wu, L.; Yan, H.; Yan, J. (2014). Tfh cell differentiation and their function in promoting B-cell responses. *Adv Exp Med Biol.*,841:153-80.

Raghupathy, R. (1997). Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology Today*, 18(10):478–82.

Raimondi, G.; Turner, M.S.; Thomson, A.W.; Morel, P.A. (2007). Naturally occurring regulatory T cells: recent insights in health and disease. *Crit Rev Immunol.*, 27:61–95.

Rao, S.; Tsai, L.M.; Lee, S.K.; He, Y.; Sutcliffe, E.L.; Srivastava, M.; Linterman, M.; Zheng, L.; Simpson, N.; Ellyard, J.I.; Parish, I.A.; Ma, C.S.; Li, Q.J.; Parish,

C.R.; Mackay, C.R.; Vinuesa, C.G. (2009). The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity*, 31, 457–468.

Reinhardt, R.L.; Liang, H.E.; Locksley, R.M. (2009). Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nature immunology*, 10(4): 385–393.

Robertson, S. A.; Mau, V.J.; Tremellen, K.P.; Seamark, R.F. (1996). Role of high molecular weight seminal vesicle proteins in eliciting the uterine inflammatory response to semen in mice. *Journal of reproduction and fertility*, 107(2):265–77.

Robertson, S. A.; Ingman, W. V.; O'Leary, S.; Sharkey, D. J.; Tremellen, K. P. (2002). Transforming growth factor beta-a mediator of immune deviation in seminal plasma. *Journal of reproductive immunology*, 57(1-2):109–28.

Robertson, S.A. (2005). Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell and tissue research*, 322(1):43–52.

Robertson, S.A. (2007). Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *Journal of animal science*, 85(13):e36–44.

Robertson, S.A. ; Guerin, L.R. ; Moldenhauer, L.M. ; Hayball, J.D. (2009). Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy - the contribution of seminal fluid. *Journal of reproductive immunology*, 83(1-2):109–16.

Robertson, S.A.; Guerin, L.R.; Bromfield, J.J.; Branson, K.M.; Ahlström, A.C.; Care, A.S. (2009). Seminal fluid drives expansion of the CD4+CD25+ T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. *Biology of reproduction*, 80(5):1036–45.

Robinson, D.P.; Klein, S.L.. (2012). Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Horm Behav.*, 62(3): 263–271.

Rolla, S.; Bardina, V.; De Mercanti, S.; Quaglino, P.; De Palma, R.; Gned, D.; Brusa, D.; Durelli, L.; Novelli, F.; Clerico, M. (2014). Th22 cells are expanded in multiple sclerosis and are resistant to IFN- β . *J Leukoc Biol.* 96, 1155-64.

Romagnani, S.(1994) Lymphokine production by human T cells in human disease states. *Annu Rev Immunol*, 12: 227–257.

Romano, M.; Sironi, M.; Toniatti, C.; Polentarutti, N.; Fruscella, P.; Ghezzi, P.; Faggioni, R.; Luini, W.; van Hinsbergh, V.; Sozzani, S.; *et al.* (1997). Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*, 6: 315–325.

Roncarolo, M.G.; Gregori, S.; Battaglia, M.; Bacchetta, R.; Fleischhauer, K.; Levings, M.K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev.*, 212:28–50.

Rubtsov, Y.P.; Rasmussen, J.P.; Chi, E.Y.; Fontenot, J.; Castelli, L.; Ye, X.; Treuting, P.; Siewe, L.; Roers, A.; Henderson, W.R. Jr.; Muller, W.; Rudensky, A.Y. (2008). Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*, 28(4):546-58.

Rutz, S.; Eidenschenk, C.; Ouyang, W. (2013). IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunol Rev*, 252:116–132

Saito, S. (2000). Cytokine network at the feto-maternal interface. *Journal of Reproductive Immunology*, 47(2):87–103.

Saito, S.; Nakashima, A.; Shima, T.; Ito, M. (2010). Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *American journal of reproductive immunology*, 63(6):601–10.

Sakaguchi, T.; Brand, S.; Reinecker, H.C. (2001). Mucosal barrier and immune mediators. *Curr Opin Gastroenterol.*, 17(6):573-7.

Sallusto, F.; Lenig, D.; Mackay, C.R.; Lanzavecchia, A. (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 187:875–883.

Sayama, S.; Nagamatsu, T.; Schust, D.J.; Itaoka, N.; Ichikawa, M.; Kawana, K.; Yamashita, T.; Kozuma, S.; Fujii, T. (2013). Human decidual macrophages suppress IFN- γ production by T cells through costimulatory B7-H1:PD-1 signaling in early pregnancy. *J Reprod Immunol.*, 100(2):109-17.

Schaerli, P.; Willmann, K.; Lang, A.B.; Lipp, M.; Loetscher, P.; Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J. Exp. Med.* 192, 1553–1562.

Schmitt, N.; Bustamante, J.; Bourdery, L.; Bentebibel, S.E.; Boisson-Dupuis, S.; Hamlin, F.; Tran, M.V.; Blankenship, D.; Pascual, V.; Savino, D.A.; Banchereau, J.; Casanova, J.L.; Ueno, H. (2013). IL-12 receptor β 1 deficiency alters in vivo T follicular helper cell response in humans. *Blood*, 121(17):3375-85.

Schmitt, N.; Bentebibel, S.E.; Ueno, H. (2014). Phenotype and Functions of Memory Tfh cells in Human Blood. *Trends Immunol.*, 35(9): 436–442.

Schumacher, A., Zenclussen, A. C. (2014). Effects of heme oxygenase-1 on innate and adaptive immune responses promoting pregnancy success and allograft tolerance. *Front Pharmacol.*,6;5:288.

Sentman, C.L.; Meadows, S.K.; Wira, C.R.; Eriksson, M. (2004). Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone. *Journal of immunology*,173(11):6760–6.

Seol, H.; Oh, M.; Lim, J.; Jung, N.; Yoon, S.; Kim, H. (2008). The role of CD4+CD25bright regulatory T cells in the maintenance of pregnancy, premature rupture of membranes, and labor. *Yonsei Med J.*, 49:366.

Sharkey, D.J.; Macpherson, A.M.; Tremellen, K.P.; Mottershead, D.G.; Gilchrist, R.B.; Robertson, S.A. (2012b). TGF- β mediates proinflammatory seminal fluid signaling in human cervical epithelial cells. *Journal of immunology*, 189(2):1024–35

Sharkey, D.J.; Macpherson, A.M.; Tremellen, K.P.; Robertson, S.A. (2007). Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Molecular Human Reproduction*, 13 (7):491-501.

Sharkey, D.J.; Tremellen, K.P.; Jasper, M.J.; Gemzell-Danielsson, K.; Robertson, S.A. (2012a). Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus. *Journal of immunology*, 188(5):2445–54.

Shulman, Z.; Gitlin, A. D.; Targ, S.; Jankovic, M.; Pasqual, G.; Nussenzweig, M. C.; Victora, G. D. (2013) T follicular helper cell dynamics in germinal centers. *Science*, 341(6146): 673-677.

Simpson, N.; Gatenby, P.A.; Wilson, A.; Malik, S.; Fulcher, D. A.; Tangye, S. G.; Manku, H.; Vyse, T. J.; Roncador, G.; Huttley, G. A.; Goodnow, C.C.; Vinuesa, C. G.; Cook, M. C.(2010).Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*,62(1):234-44.

Skurkovich, S.; Boiko, A.; Beliava, I.; *et al.* (2001). Randomized study of antibodies to IFN-gamma and TNFalpha in secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler.*, 7:277–284.

Sollwedel, A.; Bertoja, A.Z.; Zenclussen, M.L.; Gerlof, K.; Lisewski, U.; Wafula, P.; Sawitzki, B.; Woiciechowsky, C.; Volk, H.D.; Zenclussen, A.C. (2005). Protection from abortion by heme oxygenase-1 up-regulation is associated with increased levels of Bag-1 and neuropilin-1 at the fetal-maternal interface. *J Immunol.*, 15;175(8):4875-85.

Song, D.; Shi, Y. (2014). Immune system modifications and fetomaternal immune tolerance. *Chin. Med. J.*, 127(17):3171-80.

Starkey, P.M.; Sargent, I.L.; Redman, C.W. (1988). Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunology*, 65(1):129–34.

Steckel, N.K.; Kuhn, U.; Beelen, D.W.; Elmaagacli, A.H. (2003). Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation and in pregnant women: association with the induction of allogeneic immune tolerance? *Scand J Immunol*, 57:185–191.

Steinbrink, K.; Jonuleit, H.; Müller, G.; Schuler, G.; Knop, J.; Enk, A. H. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanomaantigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood*, v. 93, p. 1634–1642.

Stites, D.P.; Siiteri, P.K. (1983). Steroids as immunosuppressants in pregnancy. *Immunological reviews*, 75:117–38.

Straub, R.H. (2007). The complex role of estrogens in inflammation. *Endocrine reviews*, 28(5):521–74.

Szekeres-Bartho, J.(2009). Progesterone-mediated immunomodulation in pregnancy: its relevance to leukocyte immunotherapy of recurrent miscarriage. *Immunotherapy*, 1(5):873-82.

Szulc-Dąbrowska, L.; Gieryńska, M.; Depczynska, D.; Schollenberger, A.; Toka, F.N. (2015). Th17 lymphocytes in bacterial infections. *Postepy Hig Med Dosw*, 69:398-417.

Tafari, A.; Alferink, J.; Möller, P.; Hämmerling, G.J.; Arnold, B. (1995). T Cell Awareness of Paternal Alloantigens During Pregnancy. *Science*, 270(5236):630–3.

Taglauer, E. S.; Adams Waldorf, K. M.; Petroff, M. G. (2010). The hidden maternal-fetal interface: events involving the lymphoid organs in maternal-fetal tolerance. *The International Journal of Developmental Biology*, 54(2-3): 421-430.

Tangye, S. G.; Ma, C. S.; Brink, R.; Deenick, E. K. (2013) The good, the bad and the ugly – TFH cells in human health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 13(6):412-426.

Teles, A.; Schumacher, A.; Kühnle, M.; Linzke, N.; Thuere, C.; Reichardt, P.; Tadokoro, C.E.; Hammerling, G.J.; Zenclussen, A.C. (2013). Control of uterine microenvironment by Foxp3+ cells facilitates embryoimplantation. *Front Immunol.*, 4:158.

Thaler, C.J. (1989). Immunological Role for Seminal Plasma in Insemination and Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 21(3-4):147–50.

Tita, A.T.; Silverman, N.S. (2016). Hepatitis B in pregnancy screening, treatment, and prevention of vertical transmission. *Am J Obstet Gynecol.*, 214(1):6-14.

Tremellen, K.; Seamark, R.F.; Robertson, S.A. (1998). Seminal transforming growth factor beta1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus. *Biol. Reprod.*, 58(5):1217-25.

Trowsdale, J.; Betz, A.G. (2006). Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nature immunology*, 7(3):241–6.

Trundley, A.; Moffett, A. (2004). Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens*, 63(1):1–12.

Tsai, L.M.; Yu, D. (2014). Follicular helper T-cell memory: establishing new frontiers during antibody response. *Immunol Cell Biol.*, 92(1):57-63.

Uemura, Y.; Liu, T-Y; Narita, Y.; Suzuki, M.; Matsushita, S. (2008). 17 Beta-estradiol (E2) plus tumor necrosis factor-alpha induces a distorted maturation of human monocyte-derived dendritic cells and promotes their capacity to initiate T-helper 2 responses. *Human immunology*, 69(3):149–57.

Van Vollenhoven, R.F.; McGuire, J.L. (1994). Estrogen, progesterone, and testosterone: Can they be used to treat autoimmune diseases? *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 61(4):276–84.

Verboogen, D.R.; Dingjan, I.; Revelo, N.H.; Visser, L.J.; Ter Beest, M.; van den Bogaart, G. (2016). The dendritic cell side of the immunological synapse. *Biomol Concepts*, 7(1):17-28

Vignali, D.A.; Collison, L.W.; Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.*, 8:523–532.

Vilibic-Cavlek, T.; Ljubin-Sternak, S.; Ban, M.; Kolaric, B.; Sviben, M.; Mlinaric-Galinovic, G. (2011). Seroprevalence of TORCH infections in women of childbearing age in Croatia. *J Matern Fetal Neonatal Med.*,24(2): 280–3.

Vinuesa, C.G.; Linterman, M.A.; Yu, D.; MacLennan, IC. (2016). Follicular Helper T Cells. *Annu Rev Immunol.*, v.34.

von Wolff, M.; Thaler, C. J.; Strowitzki, T.; Broome, J.; Stolz, W.; Tabibzadeh, S. (2000). Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. *Mol. Hum. Reprod.*, 6:627–634.

Wan, Y.Y.; Flavell, R. A. (2009). How diverse – CD4 effector T cells and their functions. *Journal of Molecular Cell Biology*, 1(1):20-36.

Wang, W.; Hao, C.; Qu, Q.; Wang, X.; Qiu, L.; Lin, Q. (2010). The deregulation of regulatory T cells on interleukin-17-producing T helper cells in patients with unexplained early recurrent miscarriage. *Human Reproduction*, 25(10):2591–6.

Wang, S.; Zhu, X.; Xu, Y.; Zhang, D.; Li, Y.; Tao, Y.; Piao, H.; Li, D.; Du, M. (2016). Programmed cell death-1 (PD-1) and T-cell immunoglobulin mucin-3 (Tim-3) regulate CD4+ T cells to induce Type 2 helper T cell (Th2) bias at the maternal-fetal interface. *Hum Reprod.*, pii:dew019

Wegmann, T.G.; Lin, H.; Guilbert, L.; Mosmann, T.R. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology today*, 14(7):353–6.

Whitelaw, P.F.; Croy, B.A. (1996). Granulated lymphocytes of pregnancy. *Placenta*, 17(8):533–43.

Wilczyński, J. R. (2005). Th1/Th2 cytokines balance--yin and yang of reproductive immunology. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 122(2):136–43.

Wing, A.C.; Hygino, J.; Ferreira, T.B.; Kasahara, T.M.; Barros, P.O.; Sacramento, P.M.; Andrade, R.M.; Camargo, S.; Rueda, F.; Alves-Leon, S.V.; Vasconcelos, C.C.; Alvarenga, R.; Bento, C.A. (2016). 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*, 147(2):212-20.

Wong, C. K.; So, W.Y.; Law, S.K.; Leung, F.P.; Yau, K.L.; Yao, X.; Huang, Y.; Li, X.; Tsang, S.Y. (2012). Estrogen controls embryonic stem cell proliferation via store-operated calcium entry and the nuclear factor of activated T-cells (NFAT). *Journal of cellular physiology*, 227(6):2519–30.

Xiao, B.G.; Liu, X.; Link, H. (2004). Antigen-specific T cell functions are suppressed over the estrogen-dendritic cell-indoleamine 2,3-dioxygenase axis. *Steroids*, 69(10):653–9.

Xiong, Y.; Yuan, Z.; He, L. (2013). Effects of estrogen on CD4+CD25+ regulatory T cell in peripheral blood during pregnancy. *Asian Pac J Trop Med*, 6:748-752.

Yusuf, I.; Kageyama, R.; Monticelli, L.; Johnston, R. J.; Ditoro, D.; Hansen, K.; Barnett, B.; Crotty, S. (2010). Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *Journal of Immunology*, 185(1):190-202.

Zang, Y.C.; Halder, J.B.; Hong, J.; Rivera, V.M.; Zhang, J.Z. (2002). Regulatory effects of estriol on T cell migration and cytokine profile: inhibition of transcription factor NF- κ B. *Journal of Neuroimmunology*, 124(1-2):106–14.

Zaretsky, A.G.; Taylor, J.J.; King, I.L.; Marshall, F.A.; Mohrs, M.; Pearce, E. J. (2009). T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *The Journal of experimental medicine*, 206(5): 991–999.

Zhang, X.; Tao, Y.; Chopra, M.; Dujmovic-Basuroski, I.; Jin, J.; Tang, Y.; Drulovic, J.; Markovic-Plese, S. (2015). IL-11 Induces Th17 Cell Responses in Patients with Early Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *J Immunol.*,194(11):5139-49.

Zhou, M.; Mellor, A.L. (1998). Expanded cohorts of maternal CD8+ T-cells specific for paternal MHC class I accumulate during pregnancy. *Journal of reproductive immunology*, 40(1):47–62.

Zhou, Q.; Yan, J.; Putheti, P.; Wu, Y.; Sun, X.; Toxavidis, V.; Tigges, J.; Kassam, N.; Enjyoji, K.; Robson, S. C.; Storm, T. B.; Gao, W. (2009). Isolated CD39 Expression on CD4+ T Cells Denotes both Regulatory and Memory Populations. *Am J Transplant.*, 9(10): 2303–2311.

Zhu, C.; Lindler, K.M.; Owens, A.W.; Daws, L.C.; Blakely, R.D.; Hewlett, W.A. (2010a) Interleukin-1 Receptor Activation by Systemic Lipopolysaccharide Induces Behavioral Despair Linked to MAPK Regulation of CNS Serotonin Transporters. *Neuropsychopharmacology*, 35: 2510–2520.

Zhu, J.; Yamane, H.; Paul, W. E. (2010b) Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Ann. Rev. Immunol.*, 28: 445-489.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 01

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
GAFFREE E
GUINLE/HUGG/UNIRIO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMPACTO DA TERAPIA ANTI-RETROVIRAL NA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS TFH EM GESTANTES INFECTADAS PELO HIV-1.

Pesquisador: Cleonice Alves de Melo Bento

Área Temática:

Versão:

CAAE: 30286514.4.0000.5258

Instituição Proponente: Hospital Universitário Gaffree e Guinle/HUGG/UNIRIO

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 666.631

Data da Relatoria: 29/05/2014

Apresentação do Projeto:

Estudo longitudinal, sobre 2 grupos de pacientes infectadas pelo HIV-1, sendo o primeiro grupo constituído por 20 gestantes do Instituto Fernandes Figueira sem outras comorbidades e não usuárias de drogas ilícitas, e o segundo grupo de pacientes não gestantes e oriundas do Hospital Gaffree e Guinle, onde serão quantificadas as células THf no sangue periférico dessas pacientes, antes e 4-6 meses a exposição ao TARV.

Objetivo da Pesquisa:

- 1- Determinar a frequência de células THF no sangue periférico de gestantes infectadas pelo HIV-1 antes e depois da TARV;
- 2- Avaliar a capacidade das células THF em ajudar as células B a produzirem in vitro IgG contra antígenos do HIV-1 antes e depois da TARV;
- 3- Correlacionar a frequência das células THF com a rede de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias produzida por culturas de células Th1/Th17 e Treg maternas em resposta ao vírus HIV-1 antes e depois da TARV;
- 4- Correlacionar a frequência de células THF com a contagem de células T CD4+ periféricas e da carga viral plasmática antes e depois da TARV;

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775

Bairro: Tijuca

CEP: 22.270-004

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)1264-5317

Fax: (21)1264-5177

E-mail: hugg@unirio.br;cephugg@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
GAFFREE E
GUINLE/HUGG/UNIRIO



Continuação do Parecer: 666.631

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não há pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 29 de Maio de 2014

Assinado por:
Pedro Eder Portari Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775

Bairro: Tijuca

CEP: 22.270-004

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)1264-5317

Fax: (21)1264-5177

E-mail: hugg@unirio.br;cephugg@gmail.com

8.2 Anexo 02



SERVIÇO DE OBSTETRÍCIA - CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Impacto da terapia antirretroviral na frequência de células T_{FH} em gestantes infectadas pelo HIV-1”

Pesquisador principal: Dr^a. Cleonice Alves de Melo Bento

Obstetra responsável: Dr. Vander Guimarães, Médico Obstetra do IFF

Telefones: +55 21 2531-7906 – 2554 1740

EXPLICAÇÃO PARA A PACIENTE SOBRE A PROPOSTA DO ESTUDO

1 - Objetivos do estudo

O objetivo desse projeto será avaliar a frequência das células T_{HF} , importantes células T $CD4^+$ envolvidas na produção de anticorpos protetores contra o vírus da AIDS.

2- Procedimentos

Para o nosso estudo, iremos colher duas amostras do seu sangue periférico no volume de 20 mL cada coleta. A primeira coleta (20 mL) será realizada pela enfermeira antes do médico iniciar o tratamento contra o vírus HIV-1 e a segunda será feita no último trimestre da gestação. Nenhuma coleta de sangue a mais será necessária. Toda a coleta do material biológico será conduzida com material adequado e estéril. Seu sangue não será usado nem para estudos genéticos nem tampouco com propósito comercial, e apenas os pesquisadores irão ter acesso a este material.

3- Riscos e Desconfortos

O procedimento usado para colher o seu sangue é o mesmo utilizado nos exames de rotina. Portanto, este não lhe trará qualquer risco ou desconforto adicionais.

4- Benefícios

Os resultados de nossos estudos não irão beneficiar diretamente nem você nem o seu filho. Eles irão nos ajudar a compreender como as drogas contra o HIV-1 podem melhorar a função das células $TCD4^+$ envolvidas em induzir a produção de anticorpos protetores contra o vírus. Esse conhecimento

possivelmente ajudará no desenvolvimento futuro de novas estratégias terapêuticas contra o HIV em gestantes, como por exemplo, a construção de futuras vacinas contra o HIV-1. Entretanto, nós não podemos lhe dar nenhuma garantia que você será beneficiada por participar dessa pesquisa.

5- Alternativa de participação

A sua participação nesse estudo é voluntária. Você pode desistir a qualquer momento. Mesmo desistindo, você continuará recebendo do nosso serviço o melhor acompanhamento e tratamento disponível.

6- Custos e compensações

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

7- Confidencialidade

Todas as informações referentes a você, assim como todos os resultados obtidos serão mantidas sob sigilo. Seu nome não será revelado, exceto para o grupo envolvido na pesquisa. Nenhuma publicação científica irá identificar você ou seu filho.

8- Questões e problemas

Caso você tenha qualquer questão ou problema com relação a este estudo, favor contactar o Dr. Vander, obstetra responsável do grupo de pesquisa, ou a Dr^a. Cleonice Bento, coordenadora do projeto.

9- Consentimento

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

Assinatura da Paciente: _____

Número do prontuário: _____

Eu certifico que expliquei a proposta do estudo a paciente, e parece que ela entendeu os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios do estudo.

Assinatura do pesquisador: _____

Testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Data: _____