Giovana Toledo Alonso

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DAS CÉLULAS T FOLICULARES
DO CENTRO GERMINATIVO E CIRCULANTES**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

São Paulo

2020

Giovana Toledo Alonso

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DAS CÉLULAS T FOLICULARES
DO CENTRO GERMINATIVO E CIRCULANTES**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

São Paulo

2020

A454I

Alonso, Giovana Toledo

Caracterização do perfil das células T foliculares do centro germinativo e circulantes / Giovana Toledo Alonso. -- São Paulo, 2020.
xvi, 70 f.

Tese (Doutorado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Characterization of follicular t cells profile of the germinal center and circulating.*

1. Linfócitos T CD4-positivos. 2. Centro germinativo. 3. Linfócitos B. 4. Tonsila palatina.

NLM – WH 200

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Giovana Toledo Alonso

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DAS CÉLULAS T FOLICULARES DO
CENTRO GERMINATIVO E CIRCULANTES**

Presidente da banca: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Wilma Carvalho Neves Forte

Profa. Dra. Eliana Blini Marengo

Profa. Dra. Luciana Cavaleiro Marti

Membros suplentes:

Prof. Dr. João Carlos de Campos Guerra

Prof. Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos

Aprovada em: 14/02/2020.

Dedicatória

À Deus.

Aos meus amados pais, Hélio e Sônia. Obrigada pela vida, por me ensinarem a caminhar e assim poder seguir meus próprios passos. Por todo amor e constante incentivo, por todo apoio nas alegrias e nos momentos mais difíceis como nos últimos dois anos.

Especialmente ao meu marido e companheiro, Alexandre, meu eterno agradecimento, por compreender todos os meus momentos, incentivando, financiando e participando, por tudo que fez e faz para nossa família. Obrigada por aceitar a loucura de passar um período em Bethesda para meu estágio no NIH. Seu valioso e incansável apoio foi essencial para realização deste trabalho.

Aos meus filhos, Cecília e Miguel; fica difícil dizer o quanto vocês foram importantes nesta jornada, agradeço todas as demonstrações de carinho, pelo amor incondicional que sempre me estimularam nos momentos mais difíceis e também pelo esforço para entenderem o que é pesquisa.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo, agradeço por me aceitar em seu grupo, pela confiança, apoio e amizade. Por ter acreditado neste trabalho, e ter me ajudado a realizar um sonho. Minha admiração e eterna gratidão.

À Dra. Anna Carla Krepel Goldberg, pelas sugestões e participação no exame de qualificação. Agradeço por todos os momentos presentes em nossas reuniões semanais. Sempre vou carregar na memória todas as palavras usadas durante o exame de qualificação. Foi mais do que um aprendizado científico.

À Dra. Cristina Kokron, pelas sugestões e participação no exame de qualificação.

À Dra. Eliana Blini Marengo, anjo que apareceu na minha vida, por tudo que colaborou e se fez presente nesta tese. Só você sabe o quanto eu estava mal quando você apareceu, muito agradecida pelas sugestões.

À Profa. Dra. Wilma Carvalho Neves Forte, agradeço todas doces palavras de apoio e conforto em um momento tão difícil. Tem coisas na vida que não se explica, mas sua participação neste trabalho foi essencial. Gratidão pela sua presença.

Ao Dr. Denilson Fomin e as enfermeiras Valderez e Daniela muito obrigada pela colaboração na doação das amostras de sangue e tonsila.

Ao grupo do Dr. Rizzo, especialmente Ana Eduarda, Claudia, Deise, Sheyla pelo apoio e incentivo desde os primeiros momentos dentro do laboratório.

Ao grupo da Dra. Karina ("Kilc's"), pelos momentos de apoio, mesmo que por curto período no time, todos tiveram seus motivos para sair: Bianca, Marina, Priscila, Santiago e Régis.

Ao Dr. Richard Koup (NIH) gratidão por me aceitar em seu time e por ter compartilhado tanto conhecimento. Vocês são demais.

Ao Dr. Constantinos Petrovas e equipe (NIH). Foi enriquecedor passar um tempo com vocês em um ambiente tão acolhedor.

Ao Dr. Thiago Aloia por toda ajuda com as análises nos ensaios de microscopia confocal.

À amiga Deise Fialho, todo meu carinho e agradecimento. Obrigada pelas conversas e almoços nos dias alegres e tristes.

À amiga Fernanda Rocha de Souza mesmo sendo de outro grupo você foi essencial na trajetória e desfecho deste trabalho.

À amiga, conselheira, terapeuta Thais Marques. Foi fundamental sua presença no final desta caminhada. Gratidão.

Ao pessoal da biblioteca do IEP, Edna e Sheila muito agradecida por toda colaboração.

Ao pessoal da secretaria da Pós-Graduação do IEP, especialmente a você “Laudi” e Jaciele muito agradecida por tantas colaborações e palavras de apoio.

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro (processo 26651125826) para a realização deste estudo. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“If we knew what it was we were doing, it would not be called research,
would it?”*

(Albert Einstein)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiii
Resumo	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Estrutura das células T foliculares.....	3
1.1.1 Fator de transcrição Bcl-6.....	3
1.1.2 Receptor da quimiocina CXCR5.....	3
1.1.3 Molécula coestimulatória	5
1.1.4 Molécula Imunorregulatória PD-1	5
1.1.5 Molécula CD40L	6
1.1.6 Órgãos linfoides.....	6
1.2 Funcionalidade das células T foliculares	14
1.2.1 Mecanismos e circulação das células T foliculares	16
1.2.2 Doenças e células T foliculares	17
1.3 Justificativa e hipótese.....	18
1.4 Objetivos.....	19
2 MÉTODOS	20
2.1 Doadores	20
2.2 Obtenção das células mononucleares a partir de sangue periférico	20
2.3 Obtenção das células a partir das tonsilas palatinas.....	22
2.4 Descongelamento das células mononucleares do sangue periférico e das células oriundas das tonsilas palatinas.....	23
2.5 Imunofenotipagem das células	24
2.5.1 Preparação de microesferas (<i>Beads</i>) para ajuste da voltagem do citômetro de fluxo BD L SRFortessa™	26
2.5.2 Estratégia de análises para a população das células T foliculares.....	27

2.5.3 Estratégia de análises para a população das células B	31
2.6 Protocolo para imunofluorescência	33
2.7 Análises estatísticas	35
3 RESULTADOS	36
3.1 Dados dos pacientes	36
3.2 Imunofluorescência de tonsilas palatinas de indivíduos saudáveis: análise de distribuição das células CD4 ⁺ CXCR5 ⁺	37
3.3 Avaliação das células T foliculares no sangue e tonsilas palatinas	38
3.4 Avaliação das populações das células B no sangue e tonsilas	44
4 DISCUSSÃO	51
5 CONCLUSÕES	60
6 REFERÊNCIAS	61
Abstract	
Apêndice	

Lista de figuras

Figura 1. Linha do tempo em que são descritos os principais achados em relação às interações entre as células T e B	2
Figura 2. Vias de diferenciação	15
Figura 3. Estratégia para análises das células T nas tonsilas	28
Figura 4. Análise dos marcadores presentes nas células CXCR5+CD4+em tonsilas	29
Figura 5. Estratégia para análises das células T no sangue.....	30
Figura 6. Análises dos marcadores presentes nas células CXCR5+CD4+ no sangue	31
Figura 7. Estratégia para análises das células B nas tonsilas	32
Figura 8. Estratégia para análises das células B no sangue	33
Figura 9. Microscopia confocal	37
Figura 10. Frequência de células CD4+ que expressam CXCR5+	38
Figura 11. Frequência das células CD4+CXCR5+ que expressam Bcl-6	39
Figura 12. Frequência de células CD4+CXCR5+ que expressam receptor da interleucina 21	40
Figura 13. Frequência de células CD4+CXCR5+ que expressam o marcador CD40L.....	41
Figura 14. Frequência de células CD4+CXCR5+ que expressam o marcador PD-1.....	42
Figura 15. Frequência de células CD4+CXCR5+ que expressam o marcador de molécula coestimulatória induzível de células T	43
Figura 16. Frequência de células CD19+ no sangue e tonsilas.....	45
Figura 17. Frequência de células CD19+ que expressam os marcadores IgD+CD38+ no sangue e tonsilas.....	46
Figura 18. Frequência de células CD19+ que expressam os marcadores IgD-CD38+ no sangue e tonsilas.....	46
Figura 19. Frequência de células CD19+ que expressam o marcador IgD+CD38- no sangue e tonsilas.....	47
Figura 20. Frequência de células CD19+que expressam o marcador IgD-CD38- no sangue e tonsilas.....	48

Lista de tabelas

Tabela 1. Pannel de anticorpos.....	24
Tabela 2. Compilação de dados dos marcadores analisado.....	43
Tabela 3. Marcadores Bcl-6, IL21R, CD40L, PD-1 e ICOS encontrados no sangue e tonsilas palatinas de doadores saudáveis	44
Tabela 4. Compilação de dados dos marcadores para células B no sangue e tonsilas.....	48
Tabela 5. Marcadores das subpopulações das células B encontrados no sangue e tonsilas	49
Tabela 6. Representação da expressão de todos marcadores para as células T _{FH} e células B de todos doadores do estudo.....	50

Lista de abreviaturas

APC	Células apresentadoras de antígenos (<i>Antigen-Presenting Cells</i>)
Bcl-6	Proteína do linfoma 6 de células B
BCR	Receptor de células B (<i>B-cell receptor</i>)
Blimp	<i>B lymphocyte induced maturation protein</i>
CG	Centro Germinativo
DCs	Células Dendríticas (<i>Dendritic Cells</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DZ	Zona escura (<i>Dark zone</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMO	<i>Fluorescence minus one</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
HBBS	Solução tampão salina Hank's (<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
ICOS	Molécula coestimulatória induzível de células T
ICV	Imunodeficiência comum variável
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LC	Células de Langerhans (<i>Langerhans cells</i>)
LZ	Zona clara (<i>Light zone</i>)
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (<i>Major histocompatibility complex</i>)
MZ	Zona do manto
NS	Não significativo
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>)
PBS	Tampão fosfato salina

SD	Desvio padrão (<i>Standard deviation</i>)
SGPP	Sistema Gerenciador de Projeto de Pesquisa
SLE	Lúpus Eritematoso Sistêmico (<i>Systemic Lupus Erythematosus</i>)
SSC	<i>Side Scatter</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de células T (<i>T-cell receptor</i>)
T _{FH}	Célula T folicular
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor Neccrosis Factor</i>)

Resumo

Introdução: As células T foliculares representam uma subpopulação de linfócitos T que possuem a função de auxiliar as células B na produção de anticorpos de alta afinidade através da hipermutação somática e troca de classe. As células T foliculares são encontradas principalmente nos centros germinativos, mas também descritas no sangue, e são chamadas de células T foliculares circulantes. O papel das células T foliculares em doenças infecciosas e autoimunes é essencial para esclarecer uma resposta imune eficaz. Além disso, considerando a recente descrição de que células T foliculares encontradas na circulação podem refletir o *status* dos centros germinativos, é possível considerar que a análise dessa população celular, bem como de subpopulações celulares na periferia, permite o fornecimento de dados importantes, sobre o estado imunológico geral de um indivíduo em qualquer tipo de doença na qual a obtenção de biópsias dos órgãos linfoides secundários é difícil ou nula. **Objetivos:** Foi investigado o perfil das células T foliculares presentes nos órgãos linfoides secundários a partir de análises das tonsilas palatinas, bem como a presença e comparação quantitativa e fenotípica dessas populações no sangue. Em paralelo, avaliou-se as subpopulações de linfócitos B, principais células que interagem com as células T foliculares. **Métodos:** Foram realizadas a caracterização e quantificação de populações de células T foliculares nas tonsilas palatinas e também as circulantes no sangue de doadores “saudáveis” (sem relatos de doenças durante a anamnese) seguidas da comparação dessas populações em ambos os compartimentos. **Resultados:** os resultados confirmam a presença dos marcadores para células T foliculares nos órgãos linfoides secundários, um perfil muito parecido com o observado no sangue (periferia). Para os marcadores das subpopulações das células B (IgD⁺CD38⁺- centro germinativo, IgD⁻CD38⁻-memória, IgD⁻CD38⁺-plasmoblastos, IgD⁺CD38⁻-naive) também parecem apresentar perfis muito parecidos nos dois ambientes estudados em amostras de doadores saudáveis, com frequência alta para as células de memória e *naive*, e com frequência baixa para centro germinativo e plasmoblastos. **Conclusões:** Este trabalho demonstra que, embora em quantidades diferentes, parece haver os mesmos marcadores nas populações do sangue e nos órgãos linfoides secundários. Com o avanço das

pesquisas, chegaremos ao modelo de estudo que poderemos usar para qualquer tipo de doença onde a biópsia de órgãos linfoides secundários não está indicada.

Descritores: Linfócitos T CD4-Positivos; Centro Germinativo; Linfócitos B; Tonsila palatina

1 INTRODUÇÃO

Em 1968, Mitchell & Miller⁽¹⁾ publicaram um artigo que demonstrou pela primeira vez as células T do timo interagindo com as células B da medula óssea para produção de anticorpos. Pode-se dizer que este foi um artigo histórico.

Na linha do tempo da cooperação das células T com as células B, após 26 anos foram descritos os marcadores CD40-CD40L,⁽²⁾ essenciais para células T colaborarem com as células B. Esta interação de CD40 expresso pelas células B com seu ligante (CD40L), apresentado pelas células T ativadas é essencial nesta ligação.⁽³⁾ Além de apresentar CD40L, as células T ativadas também secretam citocinas, que servem para ativar a proliferação de células B e para formação do centro germinativo (CG).⁽⁴⁾

Foi então que no ano 2000, quase 30 anos depois da primeira demonstração da cooperação das células T com as células B, dois grupos distintos de pesquisadores descreveram a existência de uma subpopulação de células T diferentes das células T clássicas que poderiam colaborar com as células B de forma mais específica. Um grupo na Alemanha ⁽⁵⁾ e outro na Suíça,⁽⁶⁾ publicaram curiosamente na mesma revista, a existência da subpopulação de células T que foram chamadas de células T foliculares (T_{FH}) encontradas nos centros germinativos dentro dos órgãos linfoides secundários.^(5,6)

No mesmo período, foi descrita a secreção da interleucina (IL) 21 pelos linfócitos T_{FH} ,⁽⁷⁻⁹⁾ que funcionalmente é uma citocina que atua tanto em células T_{FH} quanto em B, e que tem como principal função a produção de imunoglobulinas (Ig).⁽¹⁰⁾ Na espécie humana, a IL-21 é a citocina mais potente, atuando na proliferação de células B e na diferenciação destas em plasmócitos e sua maturação promove a secreção de imunoglobulinas, e quando sua atividade é concomitante com a estimulação da molécula de superfície CD40 das células B, pode induzir a troca de classe de imunoglobulinas com a produção de IgG e IgA.⁽¹⁰⁾

Contudo, as células T_{FH} somente apresentaram citações mais relevantes a partir do ano 2009, quando foi publicado o fator de transcrição proteína do linfoma 6 de células B (Bcl-6)⁽¹¹⁾ característico das células T_{FH} , estabelecendo que as

mesmas, diferente das células T convencionais, promovem ajuda especializada para as células B na produção de anticorpos de alta afinidade.

Atualmente, existem poucos estudos especificamente voltados para o fenótipo dos linfócitos T. A recente descrição de que células T_{FH} circulantes encontradas na circulação refletem o *status* dos centros germinativos e da periferia, indica que a avaliação destas populações nos doadores saudáveis de tonsilas palatinas pode trazer informações importantes sobre o fenótipo característico destes marcadores. Assim, a identificação e quantificação das células T_{FH} circulantes e dos centros germinativos são de grande interesse neste trabalho.

Na figura 1, a linha do tempo⁽¹²⁾ resume os principais achados em relação às interações entre as células T e B, destacando-se a descoberta das T_{FH} .

Fonte: Crotty S. A brief history of T cell help to B cells. Nat Rev Immunol. 2015;15(3):185–9.⁽¹²⁾

Figura 1. Linha do tempo em que são descritos os principais achados em relação às interações entre as células T e B

1.1 Estrutura das células T foliculares

1.1.1 Fator de transcrição Bcl-6

O fator de transcrição Bcl-6 determina as células T_{FH} . O Bcl-6 é uma proteína do linfoma 6 de células B e é codificada pelo gene Bcl-6, essencial para formação do CG e maturação por afinidade de anticorpos. Possui diferentes mecanismos de ação e forma complexos para reprimir a expressão transcricional de diferentes subconjuntos de genes alvo. Também nas células B do CG, o Bcl-6 reprime genes que atuam na diferenciação, controle do ciclo celular, apoptose e inflamação.^(13,14)

Além disso, o fator de transcrição Bcl-6 regula a auto-expressão transcricional e indiretamente a expressão de alguns genes importantes para reações do CG.⁽¹³⁾ Ainda uma função importante, é permitir que as células B do CG proliferem rapidamente em resposta a antígenos dependentes de células T. Este fator de transcrição também é necessário para o estabelecimento da memória imunológica para as células T e B. Nas células T_{FH} o fator de transcrição Bcl-6 promove a expressão dos genes relacionados a estas células, além de inibir a diferenciação para Th1, Th2, Th17.⁽¹⁵⁾

Em células humanas, a superexpressão de Bcl-6 leva à regulação positiva dos marcadores de superfície associados às células T_{FH} , incluindo CXCR5, Molécula coestimulatória induzível de células T (ICOS) e PD-1.⁽¹⁶⁾ A atividade de Bcl-6 é antagonizada por outro fator de transcrição: *B-lymphocyte-induced maturation protein* (Blimp).⁽¹⁷⁾ Embora não esteja totalmente claro como ocorre o controle do balanço entre esses dois fatores, sabe-se que células T_{FH} expressam altos níveis de Bcl-6 e baixos níveis de Blimp-1.

1.1.2 Receptor da quimiocina CXCR5

As células T_{FH} são caracterizadas pela presença do receptor da quimiocina CXCR5. O subgrupo de células T $CD4^+$ descritos nos órgãos linfoides secundários mostrou que, ao expressar o receptor de quimiocina CXCR5, essas células

apresentavam uma melhor capacidade para induzir a produção de imunoglobulinas em células B, quando comparadas com as células T CD4⁺ *in vitro*.^(5,6,16,18)

Portanto, o receptor de quimiocina CXC tipo 5 ou CD185, receptor 1 do linfoma de Burkitt, é um receptor de sete membranas acoplado à proteína G para a quimiocina CXCL13, pertencente à família de receptores de quimiocinas CXC permitindo às células T migrarem para as zonas de células B do linfonodo. Nos seres humanos a proteína CXC-R5 é codificada pelo CXCR5.⁽¹⁹⁾

Estudos dos órgãos linfoides secundários mostraram que células TCD4⁺CXCR5⁺ representavam grande parte dos linfócitos T que estavam localizados nos centros germinativos (CGs)⁽⁴⁻⁶⁾ ou mais especificamente que essas células T foliculares compreendiam um subgrupo especializado com propriedade de se colocarem com células B nos órgãos linfoides secundários, e assim fornecer sinais especializados.⁽¹⁸⁾

Classicamente, foi descrito que as células T_{FH} TCD4⁺ CXCR5 são encontradas apenas nos CGs (CG T_{FH}), porém linfócitos TCD4⁺CXCR5^{int} presentes no sangue podem estar relacionados à população de linfócitos T_{FH} dos órgãos linfoides secundários. Contudo, existem importantes diferenças entre células T_{FH} circulantes e as GCT_{FH}: as células GC T_{FH} exibem elevada capacidade de auxiliar linfócitos B, enquanto os linfócitos T_{FH} circulantes, não. O padrão de expressão gênica das duas populações é distinto, os linfócitos T_{FH} circulantes expressam níveis menores de Bcl-6 quando comparados às GC T_{FH}.

Entretanto, em geral, as células T_{FH} do sangue também expressam Bcl-6 e apresentam características fenotípicas e funcionais semelhantes às GC T_{FH},⁽²⁰⁾ embora tenham expressão reduzida de ICOS e PD-1, marcadores característicos das células T_{FH} que serão abordados no decorrer do texto.⁽¹⁶⁾

Estudos recentes mostraram que as células no sangue com fenótipo CXCR5⁺CD4⁺ T apresentam propriedades de células de memória e que compartilham fenótipo de células T foliculares, porém sem o fator de transcrição Bcl-6.⁽²¹⁾

A expressão de CXCR5 também é característica em células B maduras, porém em maiores quantidades nas células T_{FH} assim como a expressão de ICOS⁽²²⁾ e PD-1 (molécula imunorregulatória)⁽²³⁾ marcadores característicos das células T_{FH}.

1.1.3 Molécula coestimulatória

A expressão de CXCR5 em células T CD4⁺ foi associada com a expressão de ICOS. A molécula ICOS é essencial para coestimulação, desenvolvimento e diferenciação terminal dos linfócitos B de memória. Pertence à família do CD28 de moléculas coestimulatórias que estão presentes em células T ativadas. Forma homodímeros e desempenha importante papel na sinalização célula-célula, respostas imunes e regulação da proliferação celular.⁽²⁴⁾ Também foi demonstrado que pacientes com deficiência em ICOS têm formação prejudicada dos centros germinativos, redução do número de linfócitos T de memória CXCR5⁺CD45RO⁺ e ausência de linfócitos GC T_{FH} CXCR5⁺CD57⁺.⁽²⁵⁾ Além de resultar na desregulação das células B gerando a autoimunidade.⁽²⁶⁾ O ligante é expresso constitutivamente em células B e seu bloqueio da interação ICOS/B7RP-1 inibe a produção de anticorpos dependentes de células T e a formação do CG. Este mecanismo ainda não foi totalmente esclarecido e apenas dados experimentais em camundongos refletem estes resultados.^(22,25,27)

1.1.4 Molécula Imunorregulatória PD-1

Para as células T_{FH}, a molécula imunorregulatória PD-1, é um importante marcador em nossos painéis, uma vez que é uma proteína de morte celular programada também conhecida como CD279, receptor de superfície celular importante na regulação negativa no sistema imune, suprimindo a atividade das células T na reação inflamatória. A molécula PD-1 também pode suprimir a atividade inflamatória das células T, evitando doenças autoimunes, no entanto, podendo também impedir o sistema imunológico de matar células cancerígenas.^(28,29) Outra característica da molécula PD-1, é ser um receptor de superfície celular e pertencer a superfamília das imunoglobulinas, sendo expresso nas células T, células B e macrófagos.⁽³⁰⁾

1.1.5 Molécula CD40L

Nas subpopulações de células T_{FH} esta molécula é particularmente essencial. Molécula CD40L ou CD154 está presente principalmente na superfície das células T ativadas, ligando-se às moléculas CD40 e participando das respostas imunes e inflamatórias. Faz parte da família de moléculas de fator de necrose tumoral (TNF – *Tumor Necrosis Factor*), colabora na maturação e na função das células B, facilitando a comunicação entre elas. A falta da molécula CD40L pode interromper a formação do CG e, desta forma, impedir a maturação por afinidade de anticorpos.⁽³¹⁾

1.1.6 Órgãos linfoides

Os órgãos linfoides têm várias organizações estruturais diferentes relacionadas às suas funções específicas e são nestas estruturas que ocorrem as respostas imunes. O timo e a medula óssea são órgãos linfoides primários e os linfonodos, o baço, as placas de Peyer e as tonsilas são exemplos de órgãos linfoides secundários.

O tipo de célula mais comum nos órgãos linfoides é o linfócito. Este é formado a partir de células-tronco na medula óssea e, em seguida, circula no sangue seguindo para os tecidos linfoides. As células T_{FH} encontram-se principalmente nos órgãos linfoides secundários.

1.1.1.1 Linfonodos

São pequenas e complexas estruturas organizadas que fazem parte do sistema imune, divididos em compartimentos estruturais e celulares. Os linfonodos contêm linfócitos e células apresentadoras de antígenos (APC – *Antigen-Presenting Cells*). Estão estrategicamente bem localizados, de modo a facilitar a captura dos antígenos.^(32,33)

Os linfonodos são estruturalmente divididos em diferentes áreas. O córtex é a camada externa e contém principalmente linfócitos B. As áreas paracorticais, contêm principalmente células T e também células dendríticas (DCs – *Dendritic Cells*), e é neste compartimento que acontece a apresentação de antígenos para as células T. É

através das células apresentadores de antígenos, mais precisamente uma DC, que os antígenos são levados aos linfonodos drenantes através dos vasos linfáticos aferentes.⁽³⁴⁾ Assim, os linfócitos que não encontraram antígenos nos linfonodos receberão sinais quimiotáticos que induzirão a saída dos linfonodos através dos vasos linfáticos eferentes. Os sinais de saída do linfonodo serão dirigidos pela via de sinalização expressa nas células B e T.

Por outro lado, a área da medula contém poucos linfócitos em relação à quantidade de plasmócitos e macrófagos. As células B proliferam e se diferenciam em plasmócitos nos folículos das células B mais conhecido como os centros germinativos, que são regiões de células com rápida proliferação. Este é o local em que as células B com anticorpos de alta afinidade são selecionadas, e os anticorpos de baixa afinidade morrem e são fagocitados pelos macrófagos dando início à resposta imune humoral.^(32,34,35)

1.1.1.1.1 Linfócitos T CD4⁺

Células T CD4 ou linfócitos T CD4 na resposta imune adaptativa podem reconhecer os antígenos que são próprios ou não do organismo. Embora morfologicamente monótonos, os linfócitos estão cada vez mais subdivididos em populações de origem e funções diversas. Se umas das primeiras subdivisões foi entre células T e células B, cada uma delas é ainda mais subdividida: linfócitos T CD4⁺, os quais ainda podem ser separados, ao menos funcionalmente em: Th0, Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 além de Treg e células T *helper* foliculares ou T_{FH}.⁽³⁶⁻⁴⁵⁾

A distinção entre estas diversas subpopulações é feita por marcadores de superfície, ou, frequentemente apenas por características funcionais. Na última situação, torna-se muito mais difícil a caracterização precisa das interações envolvidas em uma determinada resposta. Desta forma, identificar os marcadores de superfície celular de linfócitos, capazes de distinguir subpopulações funcionais é sempre relevante.

A diferenciação das células T CD4 *naive* em linhagens de células efectoras direciona as respostas imunes adaptativas. Então, linfócitos T CD4 *naive* proliferam de acordo com a estimulação antigênica e são diferenciados de acordo com o perfil das citocinas e fatores de transcrição em diferentes subtipos.

Brevemente, os linfócitos Th0 em repouso podem evoluir para uma resposta Th1 ou Th2, e são as citocinas que direcionam para a resposta de sua respectiva via inibindo a resposta que não foi direcionada, ou seja, se a resposta imune via Th1 foi ativada, a via Th2 é inibida. Portanto, a resposta de Th1 gera mecanismos eficientes na eliminação de patógenos intracelulares e é o fator de transcrição T-bet que dirige a diferenciação de linfócitos T em Th1. As células Th2 seguem para o desenvolvimento da resposta humoral, e consequentemente com a produção de imunoglobulinas contra os patógenos extracelulares, e é essencial na defesa contra helmintos. O fator de transcrição envolvido nesta resposta é o fator GATA3.

Nas doenças autoimunes ou nas doenças inflamatórias crônicas, Th17 desempenha um papel reconhecido, a diferenciação de linfócitos T em Th17 é realizado pelo fator de transcrição ROR γ t, podendo ainda se diferenciar em Treg alterando o resultado final da resposta.

Por outro lado, células Th9 foram descritas contra parasitas intestinais e nos processos alérgicos, mas ainda muito pouco descrito em doenças humanas e as células Th22 encontradas em amostras de pele, além também das células Treg descritas pela expressão do fator de transcrição *Forkhead box P3* (FOXP3).

Finalizando os subgrupos das subpopulações das células T CD4 descritos atualmente na literatura, temos as células T foliculares. Subgrupo das células T, localizadas nos folículos, essenciais para geração de anticorpos de alta afinidade e células B de memória que são o foco deste estudo.^(5,6,18,46)

1.1.1.1.2 Linfócitos B

Células B ou linfócitos B assim chamados, amadurecem na medula óssea ou fígado fetal e atingem a maturidade nos órgãos periféricos. Na medula óssea dos adultos, as células B passam por vários estágios e nestas fases adquirem sua especificidade antigênica. No estágio imaturo, as células B saem da medula óssea e completam seu desenvolvimento até o estágio maduro na periferia. Nesta fase as células B podem expressam IgM junto com IgD em sua superfície.

A presença da imunoglobulina IgD na membrana de linfócitos B é sinalizada quando estão maduros e migram da medula óssea para os tecidos linfoides periféricos.

A imunoglobulina IgM também pode ser encontrada na membrana dos linfócitos B durante o desenvolvimento, funcionam como receptor e é secretada antes da maturação dos linfócitos B.⁽⁴⁷⁾

Na medula óssea acontece o desenvolvimento das células B na ausência de qualquer antígeno externo, assim este estágio é chamado de desenvolvimento de células B independente de antígeno. Nos órgãos linfoides secundários, as células B amadurecem e recirculam repetidas vezes para as áreas das células B do baço e gânglios linfáticos, esperando para serem ativadas como consequência do reconhecimento de antígeno.

Nos linfonodos, as células B estão concentradas no córtex dos folículos primários e entram em contato com as DCs. Diferente das células T, as células B podem reconhecer o antígeno na sua própria forma.

A imunoglobulina de superfície que também é um receptor das células B pode apresentar o antígeno em locais intracelulares, sendo processado e devolvido à superfície das células B como peptídeo.

As células B precisam de dois sinais para se tornarem ativadas: um sinal é dado pela ligação cruzada da imunoglobulina, que a leva à ativação de vias de sinalização intracelular permitindo a interação das células T com o mesmo antígeno e assim a liberação do segundo sinal através da molécula CD40.

A interação entre as células T e células B acontece da mesma forma que as células T interagem com as DCs, dos quais são chamadas de APC. Uma particularidade das células B, é que apresentam muitas moléculas coestimulatórias como encontradas nas DCs: B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) e CD40. As células T e as células B em contato formam uma via de sinalização. Esta interação acontece entre os folículos primários e as áreas de células T dos órgãos linfoides secundários. As células B ativadas diferenciam-se em plasmócitos e começam imediatamente a secretar anticorpos de baixa afinidade ou entram em um folículo para formar um CG.⁽⁴⁸⁾ Todos os linfócitos B produzem o mesmo anticorpo para o antígeno do qual foi estimulado para se diferenciar.

Células B podem ser ativadas diretamente por alguns antígenos específicos, sem a ajuda das células T. Desta forma, as células B podem interagir com estes antígenos rapidamente, porém a mudança de certos isótipos e a hipermutação somática depende da interação entre células B ativadas pelos antígenos e as células T *helper*. As células B são ativas como APCs e expressam peptídeos junto com complexo principal de histocompatibilidade (MHC – *major histocompatibility complex*) de classe II em sua superfície. Estes peptídeos como já descrito têm origem do antígeno processado e internalizado após ligação com as células B.⁽⁴⁹⁾

Assim, as células T são capazes de fornecer ajuda para as células B e estas células poderão se diferenciar em células plasmáticas ou células de memória. Distúrbios nos mecanismos que medeiam a interação entre células T e B poderiam justificar a redução da concentração de imunoglobulinas séricas IgG e IgA e a diminuição da frequência de linfócitos B de memória. Desta forma, as células B precisam do auxílio de sinais das células T para proliferação, ativação e diferenciação, porém as interações celulares ainda não estão totalmente respondidas.⁽⁵⁰⁾

As células B quando ativadas por antígenos, envolvem-se com as células T específicas para o mesmo antígeno.⁽⁵¹⁾ Então, células B podem se tornar plasmoblastos de vida curta ou passar para o folículo para formar o CG,⁽⁴⁾ os mecanismos responsáveis para entender qual será o destino ainda são pouco descritos.

Alguns estudos sugerem que o mecanismo é definido pela afinidade do antígeno ao BCR, ou talvez sinais coestimulatórios recebidos das células T ou ainda todos os fatores juntos.⁽⁵²⁻⁵⁴⁾

A migração das células B ativadas para diferentes ambientes, seguida pela diferenciação em plasmócitos ou células do CG, é definida com expressão diferencial de receptores de quimiocinas. Plasmoblastos de vida curta diminuem a expressão de CXCR5 e regulam a expressão de CXCR4,⁽⁵⁵⁾ enquanto que a expressão das células B no CG mantem a expressão de CXCR5 e diminui a expressão de EB12^(56,57) fazendo com que se movam lentamente em direção ao folículo originando um CG. No decorrer da resposta imune, as células plasmáticas extrafoliculares morrem em poucos dias, e então as células B de memória de vida longa e os plasmócitos no CG começam a se diferenciar.⁽⁵⁸⁾ Uma característica da memória humoral de longo prazo é o sucesso das vacinas.⁽⁵⁹⁾

Ainda para os linfócitos B (CD19), relatos na literatura, descrevem os clássicos marcadores, como CD21, CD27, CD38. Estes marcadores não são exclusivos das células B, os linfócitos T também os expressam.⁽⁶⁰⁻⁶²⁾ De acordo com a expressão do marcador, esta célula estará sinalizada se madura ou não como o que acontece com o marcador CD21 expresso pelas células B maduras⁽⁶³⁾ e quando ocorre ausência de expressão do CD21, este se torna um marcador para células B imaturas.^(64,65)

Por outro lado, o marcador CD27 sinaliza as células circulantes de memória geradas independentes do CG^(66,67) e quando não expresso, este marcador é classificado como células B *naïve*.⁽⁶⁸⁾

Já, o marcador CD38 encontrado em vários tipos de células e tecidos, fornece sinais de diferenciação e crescimento para células linfóides e mielóides. Na maioria das vezes, está presente em células pré-B e células B do CG e plasmócitos secretores de imunoglobulinas.^(69,70)

1.1.1.2 Tonsilas

As tonsilas palatinas, também chamadas de amígdalas, são duas pequenas estruturas arredondadas localizados no interior da garganta onde são frequentemente expostos a patógenos invasores e antígenos estranhos. Podem ser encontrados entre todos os mamíferos, exceto roedores, e seu número, morfologia e localização diferem entre as espécies. Também estão incluídas as tonsilas nasofaríngeas (adenóides) e as tonsilas tubárias.^(71,72)

As tonsilas palatinas participam do processo respiratório e deglutição, são importantes para a defesa imunológica do ser humano na mucosa da boca e garganta.⁽⁷³⁾ As tonsilas palatinas são mais ativas entre três e dez anos de idade. São parcialmente encapsuladas, diferente dos linfonodos ou do baço, e formam uma barreira contra a área da superfície externa.⁽⁷⁴⁾ Os vasos sanguíneos servem como o local de entrada dos linfócitos. As tonsilas palatinas estão repletas de células chegando ao número de até 1×10^9 células linfóides, das quais as células B estão em maior número, seguindo pelas células T CD3⁺, que são em grande parte células T *helper* CD4⁺.

A idade parece influenciar a composição celular dentro da tonsila palatina, pois a porcentagem de células T CD4⁺ aumenta com a idade, até o indivíduo atingir a idade média de 35 anos, quanto as células B CD19⁺ e as células T CD8⁺ se tornam menos frequentes.⁽⁷⁵⁾

Curiosamente, a infiltração linfóide em tonsilas palatinas começa logo na 14^a a 16^a semana de desenvolvimento.⁽⁷³⁾ E particularmente, os folículos primários já estão presentes na 16^a semana de gestação, e folículos linfóides secundários com CG aparecem logo após o nascimento.^(76,77)

As tonsilas palatinas contêm numerosos folículos linfóides secundários com CG que se formam a partir de folículos primários em torno de seis dias após a estimulação antigênica. O folículo é tipicamente dividido em três áreas por sua aparência após a coloração com hematoxilina e eosina (H&E): a zona escura (DZ – *Dark zone*) e a zona clara (LZ – *Light zone*) que constituem o CG e depois a zona do manto (MZ),⁽⁷⁸⁾ cada uma com sua própria composição celular.

Estas áreas são funcionalmente diferentes, mas todas contribuem para o desenvolvimento de células B de memória e células plasmáticas. Vários tipos de células, tais como células B que são células precursoras dos centroblastos podem ser encontradas na DZ. Já as células B maduras, células T e células dendríticas, podem ser encontradas no MZ em torno do CG do folículo.

A área extrafolicular também é repleta de diferentes tipos de células T, com uma proporção de células T CD4 para CD8 muito alta, macrófagos e vênulas endoteliais altas, através das quais as células B e T migram do sangue para o tecido.⁽⁷⁹⁾ Além das células de Langerhans (LC – *Langerhans cells*) localizadas no epitélio, cinco tipos diferentes de DC foram recentemente identificados com base em diferentes métodos e marcadores. Todas importantes para a respostas imune humoral secundária.⁽⁸⁰⁻⁸²⁾

1.1.1.2.1 Centros germinativos

As células T_{FH} estão localizadas principalmente nas áreas chamadas de CGs, descritas por Walter Flemming, encontradas nos órgãos linfóides secundários. Recebeu este nome devido ao local possível da geração de linfócitos, mais tarde foi

descrita a real origem dos linfócitos na medula óssea e não nos centros germinativos, mas o termo CG foi mantido. Contudo, é o local de maior concentração de células B e são necessárias para a resposta imune humoral contra antígenos. Mais especificamente, é nos CGs onde são produzidos os anticorpos com maior afinidade e onde acontecem as trocas de classe das imunoglobulinas resultando em um maior número de respostas.

O CG⁽⁴⁾ é dividido em DZ e LZ, a DZ está localizada perto da área das células T, onde há células B divididas em centroblastos que expressam CXCR4 e CXCR5, e centrócitos encontrados na zona clara que é a região menos populosa e expressam apenas CXCR5.

Estudos com imagens mostraram que as células B movem-se da DZ para LZ e, acredita-se que as células T_{FH} são as células que controlam a volta para a DZ. Também a expansão clonal na LZ, acontece de acordo com a quantidade de antígenos apresentados.⁽⁸³⁾

A geração das células B de memória é essencial para gerar uma resposta imune, o encontro de células B específicas do antígeno com células T na borda entre T e B é a primeira etapa para ativar a proliferação das células B e iniciar a indução do CG.

Células T_{FH} apresentam um papel pouco reconhecido na modulação da resposta imune em quantidades significativas no sangue humano (T_{FH} circulantes) e órgãos linfoides secundários (T_{FH} nos centros germinativos).⁽⁷⁸⁾ Para tanto, é crucial o potencial que as células T_{FH} têm na ativação dos linfócitos B que acontece nos centros germinativos.

Nos centros germinativos, as células dendríticas desenvolvem um sinal coestimulatório essencial para as células T no desenvolvimento e ativação de linfócitos B.^(84,85) É neste local, que os linfócitos B passam pelos processos de troca de classe das imunoglobulinas, maturação da afinidade, diferenciação em plasmócitos e a geração de células de memória.^(85,86)

Após ativação das células B nos centros germinativos, as células T foliculares vão para periferia. Nesta passagem, estas células exibem níveis mais baixos do fator de transcrição Bcl-6 em comparação com as células T_{FH} do CG. As células no

sangue T CXCR5⁺CD4⁺ são chamadas T_{FH} circulantes ou T_{FH} memória ou ainda T_{FH} do sangue periférico.⁽⁸⁷⁾

É descrito na literatura que diferentemente das células T foliculares nos centros germinativos, as células de memória no sangue expressam ICOS e o marcador Ki 67 e expressam pouca ou nenhuma proteína Bcl-6, indicando que o fator de transcrição Bcl-6 pode não ser essencial para a manutenção das células T foliculares. Uma explicação proposta para as diferenças é o distinto estado de ativação destas populações celulares.⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾

1.2 Funcionalidade das células T foliculares

As interações entre as células e moléculas envolvidas no contexto do reconhecimento e funções das células T_{FH} com as células B, e a diferenciação celular envolvendo estas células nos ajudam entender melhor a população de células T_{FH}.

Embora todas as células possam migrar para regiões foliculares, as células T_{FH} preferencialmente ficam nesta região e expressam continuamente o receptor da quimiocina CXCR5. Estas células têm a capacidade de secretar Th1, Th2 ou Th17⁽⁹⁰⁾ e produzem grandes quantidades de IL21. Assim são estas as células alvo em nosso estudo.

A figura 2 ilustra o esquema das diferentes vias de diferenciação com os respectivos fatores de transcrição.

Vias de diferenciação

Esquema de diferentes vias de diferenciação das subpopulações das células T CD4 *naive* que proliferam de acordo com a estimulação antigênica e são diferenciados pelos fatores de transcrição em diferentes subtipos de acordo com o perfil das citocinas produzidas.

Fonte: Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 2011;29:621-63.⁽⁹⁰⁾

Figura 2. Vias de diferenciação

Conforme o esquema na figura 2, o principal tipo de APC envolvida no processo para início das respostas às células T são as DCs. Estas células têm a capacidade de apresentar micro-organismos e antígenos aos linfócitos, além de fornecerem sinais para estimulação da proliferação e diferenciação dos mesmos.

A função mais explorada ao longo dos anos e apoiada amplamente pelos grupos de pesquisa é o seu papel como APCs para os linfócitos T. Além de moléculas codificadas pelo MHC, estas células expressam na superfície, moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 e CD86) necessárias para sinalização e ativação dos linfócitos T. Desta forma, a natureza de qualquer resposta imune específica é influenciada pela interação das APCs com os linfócitos.⁽⁹¹⁾ São considerados APCs profissionais, os macrófagos, linfócitos B e as DCs, sendo estas as principais APCs porque são as únicas células capazes de estimular linfócitos “*naive*” ou virgens.⁽⁹²⁾

A interação de DC com as células T pode resultar em Th1, Th2, Th17, Treg das células T CD4⁺ efectoras ou tipos de células T reguladoras. Dependendo do tipo de patógeno e do tecido onde o encontro ocorreu, as DCs secretam citocinas específicas para auxiliar as respostas das células T e B.

Cada tipo de célula tem seu papel e característica única e a decisão depende da combinação de quimiocinas e citocinas em seu microambiente.⁽⁹³⁾

Por exemplo, as células T *naïve* adquirem um fenótipo Th1 na presença de IFN- γ e IL-12 derivadas de DC ativadas.⁽⁹⁴⁾ São caracterizadas por uma grande produção de IFN- γ que ativa macrófagos, bem como a resposta imune contra patógenos intracelulares.⁽⁹⁵⁾

1.2.1 Mecanismos e circulação das células T foliculares

O reconhecimento de antígenos estranhos e a vigilância do sistema imune são defesas contra a invasão de patógenos. A evolução permitiu uma diversidade de receptores de antígenos e linfócitos com propriedades para migrar e realizar a vigilância imunológica.

Descrito por Gowas e Knight⁽⁹⁶⁾ há mais de 4 décadas, os linfócitos circulam e recirculam entre o sangue e tecido. Esta circulação não é aleatória e sim guiada por mecanismos que direcionam o local correto nos tecidos.

Após apresentação dos antígenos pelas APCs, linfócitos exercem um papel central no acesso aos subgrupos especializados de linfócitos, influenciando ao tipo de natureza da resposta imunológica e inflamatória.

Mais tarde, foi descrito que todos estes processos de “*homing*” são regulados por moléculas de adesão em conjunto com quimiocinas, permitindo a circulação dos linfócitos entre os compartimentos específicos do sistema imune.⁽⁹⁷⁾ No nosso estudo, olhamos as células T_{FH} caracterizadas pela presença do receptor da quimiocina CXCR5.

A interação das células T_{FH} com as células B acontecem nos órgãos linfoides secundários dentro do CG mais especificamente na LZ. O movimento celular é realizado por interações fracas e de vida curta, nas áreas de células T e B dos tecidos linfoides.⁽⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾ Nesta fase as células são capazes de migrar em uma ou mais etapas diferentes durante o desenvolvimento e diferenciação.

A migração para DZ é um processo essencial para proliferação, amadurecimento e troca de classe. Contudo, a desregulação deste sistema e a migração desregulada pode desencadear a invasão de células tumorais e metástase. Os padrões de migração são específicos ao tipo celular e são adquiridos durante a diferenciação.

Assim, a migração dos linfócitos é direcionada à mudança de forma e os linfócitos usam mecanismos independentes que permitem o trânsito celular mais fácil entre os compartimentos de tecido com estruturas diferentes. A saída dos linfócitos da DZ ocorre por meio de várias interações.⁽¹⁰¹⁾

Uma vez no tecido, os linfócitos se envolvem em gradientes quimioatraentes, direcionando sua migração para o microambiente correto. O momento de saída de um determinado linfócito é determinado pela combinação única de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas em superfície celular. Células B mutadas podem voltar para LZ e reiniciar todo o processo. Não se sabe quando será a decisão de sair do CG e se tornar uma célula B de memória ou um plasmócito ou ainda uma célula T_{FH} circulante.

O “*homing*” de um linfócito é dependente do estágio de diferenciação e do contato antigênico.⁽¹⁰²⁾ Assim após o reconhecimento do antígeno por células dendríticas, os linfócitos T tornam-se células de memória e adquirem um “*homing*”, isto é, uma adesão específica aos receptores de quimiocinas, o que lhes permite residir seletivamente em ambientes específicos de tecido, aumentando assim a eficácia da resposta imune.

Por outro lado, na ausência de estimulação antigênica, um linfócito *naive* sairá dos tecidos linfoides secundários através dos linfáticos eferentes e retornará ao conjunto de linfócitos em recirculação.⁽⁹⁶⁾

Assim, nosso estudo avaliou o perfil da população de células T_{FH} e linfócitos B do sangue e tonsilas palatinas.

1.2.2 Doenças e células T foliculares

As células T_{FH} são essenciais para a maturação da afinidade dos anticorpos, para troca de classe e, portanto, proteção contra antígenos. Assim para as doenças infecciosas é necessário a quantidade e qualidade de células T_{FH} que serão associadas com as respostas dos anticorpos. Células T_{FH} incapazes de cooperarem com as células B são observadas em indivíduos com vírus da imunodeficiência humana (HIV – *Human Immunodeficiency Virus*) o que parece aumentar a dificuldade para gerar

anticorpos neutralizantes contra a doença.⁽¹⁰³⁾ Contudo as células T_{FH} não são importantes apenas no controle dos antígenos, células T_{FH} também estão associadas com a regulação da microbiota intestinal, se houver maior número de células T_{FH} , então maior quantidade de anticorpos e menor diversidade da microbiota e consequentemente uma homeostase intestinal menos saudável.⁽¹⁰⁴⁾

Já nas doenças autoimunes o aumento da frequência das células T_{FH} são observadas no sangue como por exemplo na síndrome de Sjogren's.⁽¹⁰⁵⁾ e Dermatomiosite Juvenil.⁽¹⁶⁾ Cada uma dessas doenças está associada com a grande produção de autoanticorpos. Porém, para a doença autoimune Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE – *Systemic Lupus Erythematosus*) os autoanticorpos são considerados marcadores primários da doença e não a causa da doença. Interessante que uma variação comum do SLE em humanos que causa severa disfunção renal associado com inflamação e alta concentração de autoanticorpos apresenta células T_{FH} e células B no rim inflamado.⁽¹⁰⁶⁾ Estas informações sugerem que as células T_{FH} podem contribuir para doenças autoimunes facilitando a geração descontrolada de autoanticorpos e facilitando a formação e manutenção de folículos ectópicos. Uma outra interessante associação das células T_{FH} é na produção de IgE e, portanto, células T_{FH} são importantes nos processos alérgicos, mas são poucos os trabalhos publicados com estes estudos.⁽¹⁰⁷⁾

Embora possam ser atribuídas funções para as células T_{FH} nas doenças infecciosas, autoimunes e alérgicas ainda que não esperado, é possível que exista a associação das células T_{FH} com infiltrado tumoral e assim acontecer um desenvolvimento de folículos das células B fora do lugar habitual. Foi publicado esta possibilidade em câncer de mama⁽¹⁰⁸⁾ e colorretal.⁽¹⁰⁹⁾ Desta forma, cada vez mais existe a necessidade de aumentar os estudos das células T_{FH} e entender sua função nos diversos tipos de doença.

1.3 Justificativa e hipótese

O papel dos linfócitos T_{FH} em doenças infecciosas e autoimunes pode indicar a caracterização sobre o *status* da doença ou o imunológico do indivíduo.

A hipótese desse estudo é que as células T_{FH} do sangue e dos órgãos linfoides secundários (tonsilas palatinas) apresentem perfil fenotípico parecido, embora em quantidades diferentes. Neste caso, pode-se considerar a possível utilização desse

modelo de estudo para avaliação de qualquer tipo de doença na qual a obtenção de biópsias dos órgãos linfoides secundários é impossibilitada.

1.4 Objetivos

1. Quantificar e caracterizar a população T_{FH} circulantes no sangue e células T_{FH} dos órgãos linfoides secundários a partir da análise das tonsilas palatinas de doadores saudáveis;

2. Quantificar e caracterizar os marcadores para subpopulações das células B (*naive*, memória, centro germinativo e plasmoblastos) circulantes no sangue e dos órgãos linfoides secundários a partir da análise das tonsilas palatinas de doadores saudáveis.

2 MÉTODOS

2.1 Doadores

Os doadores de sangue e tonsilas palatinas, até o momento do estudo foram pacientes do Dr. Denilson Storck Fomin, médico otorrinolaringologista, do Hospital Israelita Albert Einstein; a seleção dos doadores foi realizada sob a responsabilidade do próprio médico. Foram incluídos no estudo 18 doadores, sendo 11 homens e 7 mulheres entre 24 e 50 anos (média: 38 anos) submetidos à cirurgia para retirada das tonsilas (amigdalectomia). Todos os doadores aqui incluídos foram considerados saudáveis pela ausência de doenças à critério do médico responsável. Os critérios de inclusão foram doadores maiores de 18 anos com indicação de extração devido à problemas na respiração ou dificuldades para engolir, já os de exclusão para nossos doadores foram menores de 18 anos.

Foram coletadas amostras de sangue e de tonsilas palatinas de cada doador “saudável” após o preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Na admissão, os indivíduos responderam um questionário padrão onde constam os dados pessoais, enfocando a autorização da utilização do sangue e tonsilas do participante.

Os procedimentos aqui descritos não ultrapassaram os limites descritos de risco mínimo de acordo com a regulamentação da convenção de Genebra para pesquisa com seres humanos e do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein sob número CAAE nº: 0861112.6.20020071, e pelo Sistema Gerenciador de Projetos de Pesquisa (SGPP) 1606-2.

2.2 Obtenção das células mononucleares a partir de sangue periférico

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) foram isoladas a partir de 20 a 40mL de sangue total heparinizado utilizando gradiente de centrifugação Ficoll/Paque PLUS (Amersham Biosciences). Todo

material foi processado imediatamente após o recebimento. Brevemente, o sangue foi diluído (1:1) em solução tampão salina Hank's (HBBS – *Hank's Balanced Salt Solution*) e adicionado cuidadosamente a tubo contendo Ficoll/Paque PLUS (1:1:1, em relação a sangue e HBBS). Após centrifugação por 40 minutos a 2300 rpm a 18-20°C, com aceleração de 5 e *break* de 9, as células foram coletadas da interface entre o gradiente de centrifugação e o soro, transferidas para novos tubos e lavadas duas vezes com HBBS por centrifugação por 10 minutos a 1700rpm a 18-20°C. O precipitado foi ressuspensionado em 1mL de HBBS.

As hemácias ainda presentes foram lisadas através da solução tampão de Lise ACK [cloreto de amônia – 8,3g/L, EDTA disódico dihidratado – 0,0372 e bicarbonato de potássio – 1,0g/L (Gibco™)]. Para neutralizar a ação da solução de lise após 3 minutos foi adicionado meio de cultura R10, composto por: 500mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco™), 50mL soro fetal bovino (Gibco™) inativado pelo calor (56°C por 30 minutos), 5mL solução tampão Hepes 1M (Gibco™); 5mL L-Glutamina – 200mM (Gibco™), solução piruvato 100mM (Gibco™), 5 mL penicilina e estreptomicina (Gibco™), 0,5mL 2-mercaptoetanol (Gibco™) e novamente foram centrifugados por 10 minutos 1700rpm em temperatura de 18 a 20°C.

Uma alíquota de 10µL das células obtidas foi reservada para análise de viabilidade celular que foi definida utilizando o corante Azul de Tripán a 1% (Sigma®), na diluição 1:10, a partir do contador de células automático *Countess II FL* (Thermo Fisher Scientific).

A correção da concentração celular estabelecida foi de 1×10^7 células/mL. Após os cálculos, nova centrifugação foi realizada por 10 minutos a 1700 rpm em temperatura de 18 a 20°C. As células foram ressuspensionadas em 1mL de meio de congelamento (90% de soro fetal bovino (Gibco™) inativado, 10% dimetil sulfóxido (DMSO) (Hibri-Max®), e transferidas para criotubos, que permaneceram no *freezer* (-80°C) durante 24 horas. Posteriormente, os criotubos foram transferidos para tanques de nitrogênio líquido, alocados no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital Israelita Albert Einstein; as amostras permaneceram estocadas nos tanques até o momento da realização dos experimentos.

2.3 Obtenção das células a partir das tonsilas palatinas

As tonsilas palatinas coletadas, acondicionadas em frascos tipo Falcon contendo 10mL meio de cultura RPMI 1640 estéril (Gibco™), e encaminhadas imediatamente para o Centro de Pesquisa Experimental, Hospital Israelita Albert Einstein, para processamento. No laboratório, e dentro de cabine de fluxo laminar, o material foi colocado em uma placa de Petri e recortado em pequenos fragmentos com uso de bisturi. A seguir, estes fragmentos foram transferidos para um tubo tipo Falcon de 50mL e então submetidos a digestão por collagenase: a esses fragmentos, foram adicionados 9,5mL em meio de cultura RPMI 1640 estéril (Gibco™), 0,5mL de collagenase tipo VIII (Sigma, #catálogo C2139) e 0,5μL de uma mistura penicilina, estreptomicina e anfotericin B (Gibco™, cat #15240-096), com agentes antibióticos e antimicóticos, o material foi incubado a 37°C no banho-maria, por 1-2 horas. Após este período, foi observada a ausência de fragmentos, além de turvação do meio, o que sinalizou a efetividade do processo de digestão do material. A seguir, as suspensões celulares obtidas foram filtradas em gaze para remoção de restos de tecido, transferidas para um tubo tipo Falcon de 50mL, e o material filtrado foi centrifugado a 1200rpm por 10 minutos a temperatura de 18 a 20°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido em 10mL de meio cultura RPMI 1640 estéril (Gibco™).

Uma alíquota de 10μL das células obtidas foi reservada para análise de viabilidade celular que foi definida utilizando o corante Azul de Tripan a 1% (Sigma®), na diluição 1:10, a partir do contador de células automático *Countess II FL* (Thermo Fisher Scientific).

A correção da concentração celular estabelecida foi de 1×10^7 células/mL. Após os cálculos, nova centrifugação foi realizada por 10 minutos a 1200rpm em temperatura de 18 a 20°C. As células foram ressuspendidas em 1mL do meio de congelamento (90% de soro fetal bovino (Gibco™) inativado, 10% DMSO (Hibri-Max®) e transferidas para criotubos, que permaneceram no *freezer* -80°C durante 24 horas. Posteriormente, os criotubos foram transferidos para tanques de nitrogênio líquido, alocados no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital Israelita Albert Einstein; as amostras permaneceram estocadas nos tanques até o momento da realização dos experimentos.

2.4 Descongelamento das células mononucleares do sangue periférico e das células oriundas das tonsilas palatinas

Todo o processo de descongelamento das células foi realizado em cabine de fluxo laminar previamente esterilizado por 15 minutos com a luz ultravioleta.⁽¹⁰⁸⁾

A estratégia de descongelamento dos criotubos contendo células do PBMC e também os tubos com células oriundas de tonsila palatinas deu-se por etapas de descongelamento, a fim de minimizar o estresse celular e manter a viabilidade e integridade das células. Dessa forma, assim que os tubos foram retirados dos tanques de nitrogênio líquido mantidos em um recipiente com gelo por poucos minutos, e então seguiram para o banho-maria mantido a 37°C por cerca de 1 a 2 minutos, onde foram parcialmente descongelados.

A seguir, ao criotubo, foi adicionado 1mL de meio de cultura de R10, composto por: 500mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco™), 50mL soro fetal bovino (Gibco™) inativado pelo calor (56°C por 30 minutos), 5mL solução tampão Hepes 1M (Gibco™); 5mL L-Glutamina – 200mM (Gibco™), solução piruvato 100mM (Gibco™), 5mL penicilina e estreptomicina (Gibco™), 0,5mL 2-mercaptoetanol (Gibco™) e posteriormente todo o conteúdo foi transferido para um tubo cônico tipo Falcon de 15mL contendo mais 1mL de meio de cultura R10 (composto descrito acima). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1800rpm por 10 minutos em temperatura de 18 a 20°C, o sobrenadante foi desprezado e mais 2ml de R10 foi adicionado ao tubo.

Uma alíquota de 10µL das células obtidas foi reservada para análise de viabilidade celular que foi definida utilizando o corante Azul de Tripan a 1% (Sigma®), na diluição 1:10, a partir do contador de células automático *Countess II FL* (Thermo Fisher Scientific). A seguir, os tubos foram centrifugados (10mL RPMI, por 10 minutos, entre 18 a 20°C), e as células ressuspensas em meio de cultura R10 na concentração de 1×10^6 células/mL; então, as células (1×10^6 células/poço) foram transferidas para placa de 96 poços com fundo em V (Nunc® Brand Products), para imunofenotipagem.

2.5 Imunofenotipagem das células

Para avaliar e comparar o perfil das células T_{FH} presentes no sangue e nos órgãos linfoides secundários, foram utilizados 2 diferentes painéis de anticorpos utilizados para caracterização das populações celulares de interesse: células T_{FH} e células B, como mostra a tabela 1.

Tabela 1. Pannel de anticorpos

Populações celulares	Fluorescências									
	FITC	PE	APC	PE-Cy7	PE-CF594	PerCP-Cy5.5	BV421	BV605	APC-Cy7	Am Cyan
Células T_{FH}	CXC R5	ICOS	IL21R	PD1	Bcl6 *	CD3	LIVE/DEAD	CD4	-	CD40L
Células B	IgD	CD21	IgM	-	CD27	CD3	LIVE/DEAD	CD38	CD19	-

*Marcador intracelular. FITC: Isoticianato Fluoresceína. PE: Ficoeritrina. APC: Aloficocianina. PECy7: Ficoeritrina-cianina7. PE CF594: Ficoeritrina CF594. PerCP Cy5.5: Complexo Peridina Clorofila Proteína-Cianina 5.5. BV421: Violeta Brilhante 421. BV605: Violeta Brilhante 605. APC-CY7: Aloficocianina-cianina7.

Para cada um dos painéis, 1×10^6 células por poço foram transferidas para placas fundo V (Nunc® Brand Products) para análise dos marcadores de superfícies celular. Às células, foi adicionada a solução contendo as misturas dos anticorpos dos respectivos painéis (Tabela 1).

Previamente a marcação, as microplacas contendo as células mononucleares do sangue e as de tonsilas palatinas foram centrifugadas a 1800rpm por 5 minutos a 18-20°C, e tiveram seus sobrenadantes descartados, e as células ressuspendidas em 200µL de tampão salina fosfatada 7,2g (Gibco™), (PBS 1x), contendo 2mL de EDTA 500mM, 2,5g de soro fetal bovino (Sigma®); novamente a microplaca contendo as células foi centrifugada 1800 rpm por 5 minutos a 18-20°C, e o sobrenadante foi desprezado.

Na sequência foram feitas as devidas marcações para células T_{FH} e células B. Adicionalmente, tanto para células B e T_{FH} , foi utilizado o marcador de exclusão de morte celular, Live/Dead (Invitrogen). A concentração utilizada nas distintas marcações foi 0,5-1,0µg/ 10^6 células.

Após a adição da mistura dos distintos anticorpos de cada painel de marcação celular, as células permaneceram em incubação por 30 minutos em temperatura

ambiente e ao abrigo de luz. Na sequência, com o término da incubação, a placa foi centrifugada a 1800 rpm por 5 minutos a 18-20°C, o sobrenadante foi desprezado e as células fixadas com adição de 300µL de paraformaldeído a 1% [9mL de PBS (1x)] e 1mL de paraformaldeído [10x (Sigma)] para fixação dos anticorpos monoclonais utilizados. A seguir, as células foram transferidas para microtubos apropriados para citometria (Fisherbrand®, Houston, TX) e armazenadas em refrigeração a 4°C até o momento da leitura no citômetro de fluxo.

Para a marcação intracelular de Bcl-6, foi utilizado o kit Fixador/Permeabilizador (eBioscience) para Foxp3 (Human Fox P3 Staining Kit, BD) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, foram adicionados 200µL de Tampão A para fixar as células e incubadas por dez minutos, temperatura ambiente e ao abrigo de luz; em seguida as células foram centrifugadas a 1800rpm por 5 minutos, a 18-20°C. Em seguida, as células foram permeabilizadas com 200µL de Tampão C (A + B 1:200, v/v) e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente, e ao abrigo de luz. Após nova centrifugação (1800rpm por 5 minutos, a 18-20°C), o anticorpo anti-Bcl-6 marcado com o fluorocromo PeCF594 foi adicionado ao *pellet* celular, e as células foram novamente incubadas por 30 minutos, no escuro. Após o término da incubação, a placa foi centrifugada a 1700rpm por 5 minutos, a 18-20°C, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas 200µL de tampão de FACS Buffer por duas vezes a 1700rpm por 5 minutos. As células foram então fixadas com adição de 300µl de paraformaldeído a 1% [9mL de PBS (1x) e 1mL de paraformaldeído (10x) (Sigma)] para fixação dos anticorpos monoclonais utilizados. A seguir, as células foram transferidas para microtubos apropriados para citometria (Fisherbrand®, Houston, TX) e armazenadas em refrigeração a 4°C até o momento da leitura no citômetro de fluxo.

A aquisição e a leitura de intensidade de fluorescência foram feitas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa™ (BD Biosciences). Adquiridos 1 milhão de eventos para cada amostra (sangue e tonsila). As análises foram realizadas com auxílio do programa Flow Jo Software v 9.8.

Ressalta-se que todos os anticorpos monoclonais aqui utilizados foram previamente titulados. Então, individualmente, variou-se as quantidades das concentrações para cada marcador: 1,5µL de CXCR5; 1,5µL de IgD; 0,5µL de ICOS; 20µL

de IL21R; 3,0µL de IgM; 5µL de PD-1; 1,5µL de CD19; 1,5µL de CD3; 2µL de Bcl-6; 3,0µL de CD27; 1,5µL de CD4; 5,0µL de CD38; 5µL de CD40.

2.5.1 Preparação de microesferas (*Beads*) para ajuste da voltagem do citômetro de fluxo BD L SRFortessa™

Em câmara de fluxo laminar previamente esterilizado por 15 minutos com a luz ultravioleta,⁽¹⁰⁸⁾ foram preparadas as microesferas ou popularmente chamadas de “*Beads*” que foram marcadas com o fluorocromo conjugado com os anticorpos de interesse, a fim de ajustar a correta voltagem de emissão de fluorescência de cada fluorocromo.

Para isso, em tubo tipo Falcon, 2 gotas de microesferas positiva e 2 gotas de microesferas negativa foram adicionadas em 800µL de tampão de FACS Buffer, que após homogeneizado por agitação em vortex; a seguir, esse volume foi distribuído (100µL) em cada microtubo para citometria, aqui denominado tubo “solução estoque”.

No total foram preparados 8 tubos, contendo 2µL dos anticorpos monoclonais relacionados com seus respectivos fluorocromos. Desta forma cada microtubo para citometria foi preparado da seguinte forma: 1) 100µL de solução estoque + 2µL de FITC; 2) 100µL de solução estoque + 2µL de PE; 3) 100µL de solução estoque + 2µL de PerCP (ou PE.Cy5); 4) 100µL de solução estoque + 2µL de Texas Red; 5) 100µL de solução estoque + 2µL de PE.Cy7; 6) 100µL de solução estoque + 2µL de APC; 7) 100µL de solução estoque + 2µL de APC.Cy7; e 8) 100µL de solução estoque + 2µL de Alexa 700.

Para começar a leitura no citômetro de fluxo, células sem marcação foram passadas para definição do local de cada população através do tamanho (*Forward Scatter* – FSC) e granulosidade (*Side Scatter* – SSC). Em seguida, com as *beads* finalizamos os ajustes de voltagem definindo corretamente a emissão de fluorescência ideal de cada fluorocromo.

2.5.2 Estratégia de análises para a população das células T foliculares

A estratégia de análise de presença das populações de células T foliculares (T_{FH}) utilizadas nesse trabalho para células oriundas de tonsilas palatinas e de PBMC está apresentada nas figuras 3 e 4 e nas figuras 5 e 6, respectivamente.

Essas estratégias de análises foram iniciadas pela avaliação da não oscilação do laser, denominada região “Time” (Time x PE). A partir de então, foram selecionados apenas os eventos que foram adquiridos isoladamente pelo citômetro de fluxo, chamada então de “*Singlets*”, qualificada pelo tamanho e altura (FSC-H) em relação a área (FSC-A). Na sequência, foi feita uma janela de aquisição da população de linfócitos totais (FSC-A x SSC-A) dentro do “*gate*” de “*Singlets*”, que seguiu de uma janela composta por células vivas separadas das células mortas chamada de *Live/Dead* (*Live/Dead* x CD3). A partir da seleção de células contidas no *gate Live/Dead*, foi selecionada uma janela com a população de células $CD4^+CXCR5^+$. Todo este processo pode ser observado no esquema da figura 4 para células de tonsila e figura 6 para PBMC, e a partir desta população $CD4^+CXCR5^+$ as populações de interesse avaliadas nesse estudo para marcação do fenótipo para as células T_{FH} foram Bcl-6, CD154, IL21R e ICOS representados nas figuras 5 e 7, respectivamente para células oriundas de tonsilas palatinas e de sangue.

As estratégias descritas acima foram utilizadas tanto para células oriundas de tonsilas palatinas quanto para as oriundas de amostras de sangue.

A figura 5 demonstra todo o esquema proposto para análise de T_{FH} em sangue, com exceção da última janela para a separação da população de interesse separada que enfoca a população $CD4^+CXCR5^+$. Esta diferença se deve ao fato que não estamos nos órgãos linfoides secundários, ambiente definido pela presença das células T_{FH} ; assim, houve a necessidade da utilização de um marcador clássico, característico da célula em estudo para validar nossos resultados e confirmar o fenótipo da célula do estudo, e a partir desta população (Figura 6) seguir com os demais marcadores de T_{FH} já utilizados na estratégia das tonsilas, ou seja: ICOS, PD-1, IL21R, Bcl-6 e CD154.

Para identificar exatamente os *gates* das populações celulares a partir da utilização de múltiplos fluorocromos, partiu-se do método de separação de

fluorescências sem uma marcação, conhecido como *Fluorescence minus one* (FMO), usado para interpretar os dados de citometria.⁽¹¹⁰⁾

Tonsila T_{FH}

Estratégia para análises de células T nas amostras de Tonsilas. A primeira janela “Time” região em que não houve oscilação do laser, na sequência, “Singlets” são as células que passaram no feixe do laser apenas uma vez. Então, segue-se para uma janela de células com “Linfócitos Totais”, seguindo para a janela de “células vivas”. A partir desta janela separamos o grupo de células CD4⁺CXCR5⁺ para a marcação e definição das células T_{FH}.

Figura 3. Estratégia para análises das células T nas tonsilas

Tonsila T_{FH}

Análise dos marcadores presentes na população de células positivas para CXCR5⁺CD4⁺, com as seguintes especificidades: PD-1, Bcl6, CD154, IL21R e ICOS.

Figura 4. Análise dos marcadores presentes nas células CXCR5⁺CD4⁺ em tonsilas

Sangue T_{FH}

Estratégia para análises de células T nas amostras de Sangue. A primeira janela “Time” região em que não houve oscilação do laser, na sequência, “*Singlets*” são as células que passaram no feixe do laser apenas uma vez. Então, segue-se para uma janela de células com “Linfócitos Totais”, seguindo para a janela de “células vivas”. A partir desta janela, separamos o grupo de células CD4⁺CXCR5 para a marcação e definição das células T_{FH}.

Figura 5. Estratégia para análises das células T no sangue

Sangue T_{FH}

Análise dos marcadores presentes na população de células positivas para CD4⁺ CXCR5⁺, com as seguintes especificidades: PD-1, Bcl6, CD154, IL21R e ICOS.

Figura 6. Análises dos marcadores presentes nas células CXCR5+CD4+ no sangue

2.5.3 Estratégia de análises para a população das células B

De maneira similar como descrito acima para células T foliculares, foi realizada a estratégia de análises para os linfócitos B. Foi realizada marcação para células oriundas de tonsilas e de PBMC. Em resumo, as células foram separadas em 4 principais janelas: a) “Time”, população observada pela não oscilação do laser; b) “*singlets*”, onde foram selecionados apenas os eventos que foram adquiridos isoladamente pelo citômetro de fluxo; c) janela definida pela população de “linfócitos”; d) separação das células vivas das células mortas denominada “*live/dead*”.

A partir da população de células vivas (*live/dead* x CD3), foram separadas 2 janelas com as populações de interesse no estudo. A partir dos marcadores

para IgD x CD38, subdividimos as populações em 4 fases do desenvolvimento de células B: células B *naive* (IgD⁺CD38⁻), células B de memória (IgD⁻CD38⁻), células B do CG ou CG (IgD⁺CD38⁺), e plasmoblastos (IgD⁻CD38⁺). Em paralelo, foi realizada uma análise das populações representadas pelos marcadores para memória CD27⁺ ou maturação (CD21⁺) das células B. Abaixo, é possível visualizar como cada população celular foi selecionada (Figuras 7 e 8):

Tonsila

Estratégia para análises das amostras de células B nas amostras de Tonsilas. A primeira janela "Time" região em que não houve oscilação do laser, na sequência, "Singlets" são as células que passaram no feixe do laser apenas uma vez. Na sequência a janela de "linfócitos totais, seguindo para a janela de "células vivas". As células CD19⁺ positivas foram separadas e fizemos duas análises: a população de células *naive*, memória, centro germinativo e plasmoblastos dentro do grupo de células IgG⁺CD38⁺ e outra análise de células CD27⁺CD21⁺.

Figura 7. Estratégia para análises das células B nas tonsilas

Sangue

Estratégia para análises das amostras de células B nas amostras de Sangue. A primeira janela “Time” região em que não houve oscilação do laser, na sequência, “Singlets” são as células que passaram no feixe do laser apenas uma vez. Na sequência, a janela de “linfócitos totais” seguindo para a janela de “células vivas”. As células CD19⁺ positivas foram separadas e fizemos duas análises: a população de células *naive*, memória, centro germinativo e plasmoblastos dentro do grupo de células IgG⁺CD38⁺ e outra análise de células CD27⁺CD21⁺.

Figura 8. Estratégia para análises das células B no sangue

2.6 Protocolo para imunofluorescência

Para o procedimento de imunofluorescência, foram utilizadas amostras de tonsilas palatinas que foram extraídas de doadores saudáveis no Hospital Israelita Albert Einstein. O material biológico foi congelado previamente aos cortes de 3µm de espessura em lâminas específicas para fixação dos tecidos e mantidos no *freezer* (-80°C). A seguir, as amostras contidas nas lâminas foram fixadas com acetona gelada à -20°C por 10 minutos a 4°C. Após a fixação, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS, acrescido de 0,5% de Tween-20. Em seguida, as lâminas foram incubadas com Saponina (0,5%) em

PBS por 10 minutos. Após este período as lâminas foram incubadas por 1 hora em solução de bloqueio (0,045g glicina, 20mL de PBS e BSA 1%) em temperatura ambiente.

As amostras foram marcadas para a presença de células T_{FH}, a partir de tripla marcação por sobreposição de imagens (*merge*), utilizando os anticorpos primários anti-CD4 de cabra (RD) - policlonal, anti-CXCR5 de rato (RD) - clone 51505 e anti Bcl-6 de coelho (ABCAM) - clone EP529Y. Estes anticorpos foram diluídos em PBS 1% BSA na concentração de 1:200 μ L (v:v). A marcação se deu pela incubação das lâminas *overnight*, 4°C em câmara úmida. Após a incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas 3x em PBS acrescido de 0,5% de Tween-20 (PBS-T20 0,5%).

Em seguida, foram adicionados, os anticorpos secundários Alexa 647 anti-IgG de cabra, Alexa 488 anti-IgG de rato e Alexa 568 anti-IgG de coelho (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), na concentração 1:200 μ L, que foram incubados por 2 horas em temperatura ambiente em câmara úmida. Após a incubação com os anticorpos secundários, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS- T20 0,5%.

Então, o anticorpo CD19 PeCy5 (BD Pharmingen) já conjugado foi acrescentado as marcações, e foi incubado por uma hora e trinta minutos, a temperatura ambiente, câmara úmida; seguiu-se nova etapa de lavagem das lâminas, 3 vezes, com PBS-T20 0,5% e então foram incubadas com DAPI (4',6 -diamino-2 phenylindole, d hydrochloride), Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, 300 μ M por 5 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS-T20 0,5%.

Após a confecção das lâminas como descrito acima, e com o reagente Prolong Golg Antifade Life Technologies, Thermo Fisher Scientific e vedadas 20 μ L de Vectashield (Vector Laboratories), as imagens foram adquiridas em microscópio confocal LSM 710 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). As seções foram visualizadas usando o *software* ZEN 2012 SP2 (Black, 64 bit) Versão 11.0 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Todos os ensaios de imunofluorescência também foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa do Dr. Richard Koup com a orientação do Dr. Constantinos Petrovas, (Laboratory at the Vaccine Research Center, National Institute of Allergy and infectious Diseases, National Institute of Health). Nestes tecidos foram marcados CD4, CD20, Ki67, PD-1, IgG, CD57, Bcl-6.

2.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad PRISM versão 5 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia USA). O teste t pareado foi escolhido para comparar os valores obtidos das amostras de sangue e tonsila. Para todos os testes, foi adotado um nível de significância de 0,05 ($\alpha=5\%$), onde os valores descritivos (p) abaixo desse valor são considerados significativos. Os dados foram representados por média e desvio padrão.

3 RESULTADOS

As análises estatísticas dos dados foram realizadas com o auxílio do programa GraphicPad PRISM versão 5 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia USA). O teste *t* pareado foi escolhido para comparar os valores obtidos das amostras de sangue e tonsila. Para todos os testes, foi adotado um nível de significância de 0,05 ($\alpha=5\%$), onde os valores descritivos (*p*) abaixo desse valor são considerados significativos. Os dados foram representados por média e desvio padrão.

3.1 Dados dos pacientes

Foram analisadas amostras de 18 indivíduos, (07 mulheres e 11 homens), doadores de sangue e tonsila que preencheram os critérios do Comitê de Ética. A idade dos doadores na época do estudo variou de 24 a 50 anos, e a média dos indivíduos foi de 38 anos. Apesar da obtenção de 18 amostras de doadores saudáveis, apenas em 12 doadores foram considerados os resultados para este estudo. Tivemos problemas nas aquisições das amostras e/ou não tivemos células suficientes para nosso padrão de análises.

São doadores “saudáveis”, sem nenhuma patologia segundo critério usado pelo médico otorrinolaringologista responsável Dr. Denilson Storck Fomin, após realizada a anamnese. Existia a ocorrência de problemas respiratórios e/ou infecções recorrentes; o que levou a indicação da adenoamigdalectomia.

No perfil dos doadores das amostras de sangue e tonsila palatinas usadas nas análises (Apêndice 1) pudemos observar a presença de dois doadores com sobrepeso, três doadores com apneia e 5 doadores não estavam com as vacinas em dia. Nenhum dos doadores relatou caso de diabetes. Quanto ao uso de medicações, são 2 doadores com uso de anti-hipertensivo e estatina, quatro doadores com uso de anti-histamínico e seis doadores com uso de corticoide nasal. Os demais sem descrição. Foram eliminados 6 doadores (2, 3, 8, 13, 17 e 18) e não relacionamos com algum tipo de doença ou medicação a necessidade da exclusão.

3.2 Imunofluorescência de tonsilas palatinas de indivíduos saudáveis: análise de distribuição das células $CD4^+ CXCR5^+$

Em paralelo ao objetivo principal do trabalho, foram caracterizadas as populações celulares $CD4^+ CXCR5^+$ quanto a distribuição nas tonsilas por microscopia confocal, a partir de marcações simples das populações de células positivas para CD4, CXCR5 e o fator de transcrição Bcl-6 característico das células T foliculares. A presença das populações celulares encontradas nas tonsilas palatinas pode ser observada na figura 9. Cada micrografia representada na figura 9 mostra uma marcação celular típica que compõe o fenótipo de células T_{FH} : painel A) $CD4^+$; painel B) $CXCR5^+$; painel C) $Bcl-6^+$; e painel D) Marcação do núcleo com DAPI (corante orgânico fluorescente). Com a sobreposição das imagens dos 4 marcadores, pode-se conferir a presença e distribuição de células T_{FH} nas tonsilas, representada no painel E. Todas as marcações foram realizadas em amostras de tonsilas palatinas de doadores saudáveis.

Presença das células $CD4^+$, $CXCR5^+$ e $BCL-6^+$ encontradas nas tonsilas palatinas de doadores saudáveis, por microscopia confocal. As micrografias representam individualmente os marcadores individuais para (A) $CD4^+$, (B) $CXCR5^+$ e (C) Bcl-6. O painel D representa a marcação do núcleo (DAPI) e o painel E, as células T_{FH} , encontradas nos tecidos dos órgãos linfoides secundários. As seções foram visualizadas usando uma versão ZEN 2012 SP2- 20x (Black, 64 bit) Versão 11.0 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Figura 9. Microscopia confocal

3.3 Avaliação das células T foliculares no sangue e tonsilas palatinas

Para caracterizar as populações celulares das células T_{FH} , foram utilizados seus marcadores característicos CXCR5, ICOS, PD-1, IL21R, CD40L e Bcl-6 em suspensões celulares oriundos do sangue e de tonsilas, por citometria de fluxo. Cada ponto colorido nos gráficos das figuras 10 a 15, a seguir, representa um indivíduo, no qual teve analisada amostra tanto de sangue quanto tonsila.

A imunofenotipagem das células dos indivíduos arrolados nesse estudo iniciou-se com a marcação das células T $CD4^+CXCR5^+$ (Figura 10). Observou-se no sangue que a média foi 5,38% e o desvio padrão (SD – *Standard deviation*) foi 3,26%, enquanto a média da frequência dessa população celular nas tonsilas foi 32,37% e SD 38,73%. Houve diferença estatística entre as amostras de sangue e tonsila ($p < 0,05$).

Também se observou nas amostras de tonsilas, que houve dois indivíduos, um indivíduo do sexo masculino (marcado em rosa) e outro do feminino (azul escuro), que atingiram quase 100% da presença do marcador para CXCR5 na população $CD4^+$.

Frequência de células $CD4^+$ que expressam o marcador CXCR5 em células do sangue e de tonsilas. As comparações entre os grupos foram realizadas a partir do teste t pareado. Cada ponto colorido equivale a um doador (indivíduo; $n=9$) do qual foi coletada amostra de sangue e de tonsilas.

Figura 10. Frequência de células $CD4^+$ que expressam CXCR5+

A seguir, avaliou-se a frequência de células $CD4^+CXCR5^+$ que expressam o marcador do fator de transcrição Bcl-6 que está relacionado com a diferenciação das células T_{FH} além do controle do ciclo celular, sobrevivência e mutação hipersomática em linfócitos B.

Na figura 11, nota-se que a média da frequência de Bcl-6 nas células $CD4^+CXCR5^+$ do sangue foi de 16,65% e o SD foi 19,09%, enquanto na tonsila, a média foi 42,40% e o SD 28,81%; houve diferença estatística entre as amostras do sangue e da tonsila ($p<0,05$).

Observa-se que, no sangue, a frequência do marcador Bcl-6 dentro dessa população apresentou-se menor em relação a amostra das tonsilas. Ainda, quando são comparados individualmente cada amostra, é possível destacar que três amostras, todas oriundas de indivíduos do sexo feminino, apresentaram maior frequência do marcador Bcl-6 em relação a todos os outros indivíduos incluídos nesse estudo, tanto nas tonsilas palatinas quanto no sangue.

Frequência de células $CD4^+CXCR5^+$ que expressam o marcador Bcl-6 em células do sangue e de tonsilas. As comparações entre os grupos foram realizadas a partir do teste t pareado. Cada ponto colorido equivale a um doador (indivíduo; $n=9$) do qual foi coletada amostra de sangue e de tonsilas.

Figura 11. Frequência das células $CD4^+CXCR5^+$ que expressam Bcl-6

Também foi avaliada a frequência de expressão do receptor da interleucina 21 (IL-21R), relacionado com a produção de imunoglobulinas em células CD4⁺CXCR5⁺ (T_{FH}) e em células B.

A partir da figura 12, observa-se maior porcentagem do marcador no sangue. A média da frequência de células $CD4^+CXCR5^+IL-21R^+$ no sangue foi 47,93% e SD foi 29,62%, já nas tonsilas, a média foi 6,50% e o SD foi 8,16%. Também houve diferença estatística entre as amostras de sangue e tonsila ($p<0,05$).

Tanto em amostras de sangue quanto tonsila, os indivíduos que alcançaram maior porcentagem do marcador IL-21R dentre a população de células CD4⁺CXCR5⁺ foram três do sexo feminino (marcados em amarelo, rosa claro e azul escuro) e uma amostra do sexo masculino (marcado em rosa escuro). Porém, duas amostras em azul escuro (feminino) e rosa escuro (masculino) não foram representativas para o marcador na tonsila. E duas amostras do sexo masculino (marcado em marrom e preto), não houve representatividade da frequência do marcador IL21R, ficando em quase zero a porcentagem deste marcador tanto em sangue quanto tonsila.

Frequência de células CD4⁺CXCR5⁺ que expressam o marcador IL-21R em células do sangue e de tonsilas. As comparações entre os grupos foram realizadas a partir do teste *t* pareado. Cada ponto colorido equivale a um doador (indivíduo; n=9) do qual foi coletada amostra de sangue e de tonsilas.

Figura 12. Frequência de células CD4+CXCR5+ que expressam receptor da interleucina 21

Outro marcador analisado foi CD154 (CD40L) nas células T, que tem a função de ligação com o CD40 as células B. Observou-se que a média de frequência de células $CD4^+CXCR5^+CD40L^+$ no sangue foi 16,11% e o SD foi 12,51%, e nas tonsilas, a média foi de 4,98% e SD 3,54%; houve diferença estatística entre as amostras de sangue e tonsila ($p<0,05$) (Figura 13). Em três amostras de sangue, duas amostras de doadores femininos (marcados em amarelo e rosa claro) e uma do sexo masculino (marcado em rosa escuro), nota-se maior expressão desse marcador comparado a média geral dos indivíduos do grupo. A porcentagem deste marcador tanto no sangue quanto nas tonsilas mostrou-se baixa quando comparado com os outros marcadores analisados neste estudo.

Frequência de células $CD4^+CXCR5^+$ que expressam o marcador CD154 (CD40L) em células do sangue e de tonsilas. As comparações entre os grupos foram realizadas a partir do teste t pareado. Cada ponto colorido equivale a um doador (indivíduo; $n=9$) do qual foi coletada amostra de sangue e de tonsilas.

Figura 13. Frequência de células $CD4^+CXCR5^+$ que expressam o marcador CD40L

Já a análise do marcador PD-1 em células $CD4^+CXCR5^+$, um receptor de superfície celular importante na regulação negativa do sistema imune, suprimindo a atividade das células T na reação inflamatória. Nossos resultados mostraram baixa porcentagem tanto no sangue e nas tonsilas palatinas (Figura 14). A média da frequência da população $CD4^+CXCR5^+PD-1^+$ no sangue foi 6,47% e o SD foi 6,27%, e nas tonsilas,

média de 7,76% e o SD 4,54%; não houve diferença significativa (NS) entre os indivíduos para as amostras de sangue e tonsilas.

Frequência de células $CD4^+CXCR5^+$ que expressam o marcador PD-1 em células do sangue e de tonsilas. As comparações entre os grupos foram realizadas a partir do teste t pareado. Cada ponto colorido equivale a um doador (indivíduo; $n=9$) do qual foi coletada amostra de sangue e de tonsila.

Figura 14. Frequência de células $CD4^+CXCR5^+$ que expressam o marcador PD-1

A análise da expressão do marcador coestimulatório ICOS dentre a população de células $CD4^+CXCR5^+$ foi avaliada nas amostras de sangue e de tonsilas, e mostraram-se altas, em porcentagem, nos dois grupos de amostras – sangue e tonsilas. A média para ICOS no sangue foi 70,12% e o SD 38,88%, e nas tonsilas a média foi 84,92% e o SD foi 29,15% e não mostraram diferenças estatísticas entre as amostras de sangue e tonsila (NS) (Figura 15). Os indivíduos que não apresentaram expressão alta de ICOS não são correspondentes nas amostras de sangue e de células oriundas de tonsilas.

Frequência de células $CD4^+CXCR5^+$ que expressam o marcador ICOS em células do sangue e de tonsilas. As comparações entre os grupos foram realizadas a partir do teste t pareado. Cada ponto colorido equivale a um doador (indivíduo; $n=9$) do qual foi coletada amostra de sangue e de tonsila.

Figura 15. Frequência de células $CD4^+CXCR5^+$ que expressam o marcador de molécula coestimulatória induzível de células T

A tabela 2 resume os dados de todos os gráficos apresentados nas figuras 10 a 15 encontrados nas populações das células T no sangue e tonsilas palatinas de doadores saudáveis.

Compilação de dados de porcentagem dos marcadores Bcl-6, IL-21R, CD40L, PD-1 e ICOS nas células T $CD4^+CXCR5^+$ encontradas no sangue e tonsilas palatinas de doadores saudáveis. É também apresentada a frequência de células $CD4^+$ que expressam CXCR5 ($CD4^+CXCR5^+$).

Tabela 2. Compilação de dados dos marcadores analisado

Marcadores	Sangue Média (SD)	Tonsila Média (SD)	Valor-p
CXCR5	5,38 (3,26)	32,37 (36,73)	<0,05
Bcl-6	16,65 (19,06)	42,40 (28,81)	<0,05
IL21R	47,93(29,62)	6,50 (8,16)	<0,05
CD40L	16,11 (12,51)	4,98 (3,54)	<0,05
PD1	6,47 (6,27)	7,76 (4,54)	NS
ICOS	70,12 (38,88)	84,92 (29,15)	NS

Valores apresentados como média da frequência de células (%). Média da diferença entre tonsila e sangue. Teste t pareado. NS: não significativo.

A tabela 3 resume os dados da média de todos os marcadores (Bcl-6, IL21R, CD40L, PD-1) e de cada doador apresentados individualmente, encontrados nas populações das células T no sangue e tonsilas.

Tabela 3. Marcadores Bcl-6, IL21R, CD40L, PD-1 e ICOS encontrados no sangue e tonsilas palatinas de doadores saudáveis

Variáveis			Sangue					Tonsilas				
Doador	Sexo	Idade	Bcl-6	IL-21R	CD40L	PD-1	ICOS	Bcl-6	IL-21R	CD40L	PD-1	ICOS
1	M	41										
2	M	50										
3	F	40										
4	M	39										
5	F	50										
6	F	24										
7	F	50										
8	F	28										
9	M	38										

Valores acima da média ; Valores abaixo da média ; Valores na média .

3.4 Avaliação das populações das células B no sangue e tonsilas

A fim de estabelecer uma análise quanto as características fenotípicas das populações de células B, as populações foram subdivididas através dos marcadores para IgD x CD38, dividimos em 4 fases do desenvolvimento das células B diferenciadas por células B *naïve* (IgD⁺CD38⁻), células B de memória (IgD⁻CD38⁻), CG ou CG (IgD⁺CD38⁺) e plasmoblastos (IgD⁻CD38⁺). A análise das células B foi realizada em amostras de suspensões celulares do sangue e tonsilas palatinas de doadores saudáveis, por citometria de fluxo. Cada ponto colorido nos gráficos das figuras 16 a 20, a seguir, representa um indivíduo, no qual teve analisada amostra tanto de sangue quanto tonsila.

A análise inicial de imunofenotipagem de células B partiu com marcação com CD19 dentro as células CD3⁺. A figura 16 mostra que no sangue a média da frequência de células CD19⁺ foi de 31,91% e o SD foi de 17,21%, enquanto que nas tonsilas palatinas a média encontrada foi 82,31% e o SD (12,27%). Houve diferença

estatística entre as amostras de sangue e tonsila ($p < 0,05$). Assim, a média da frequência de células $CD3^+CD19^+$ foi muito maior nas tonsilas palatinas em relação ao sangue.

Frequência de células $CD19^+$ no sangue e em amostras de tonsilas. As comparações entre os grupos foram realizadas a partir do teste t pareado. Cada ponto colorido equivale a um doador (indivíduo; $n=12$) do qual foi coletada amostra de sangue e de tonsila.

Figura 16. Frequência de células $CD19^+$ no sangue e tonsilas

Também foi avaliado o marcador do CG (IgD^+CD38^+), dentre a população de células $CD19^+$. Como mostra a figura 17, a média da frequência no sangue foi 4,08% e o SD foi 4,14%, e nas tonsilas palatinas foi de 6,23% e o SD foi 7,17%. Observa-se baixa porcentagem deste marcador tanto nas amostras de sangue quanto de tonsila, e não houve diferença significativa (NS).

Frequência de células CD19⁺ que expressam os marcadores IgD⁺CD38⁺ a fase de desenvolvimento das células B no centro germinativo em células do sangue e de tonsilas. As comparações entre os grupos foram realizadas a partir do teste *t* pareado. Cada ponto colorido equivale a um doador (indivíduo; n=12) do qual foi coletada amostra de sangue e de tonsilas.

Figura 17. Frequência de células CD19⁺ que expressam os marcadores IgD⁺CD38⁺ no sangue e tonsilas

As análises da população de células B incluíram a análise da fase da subpopulação de células B, os plasmoblastos. A média da frequência de IgD⁻CD38⁺ no sangue foi de 1,05% e o SD foi 1,42%, e nas tonsilas palatinas a média foi 1,01% e o SD foi 1,22% (Figura 18). A análise de expressão deste marcador em porcentagem mostrou-se bem baixa.

Frequência de células CD19⁺ que expressam os marcadores IgD⁻CD38⁺ (Plasmoblastos) em células oriundas do sangue e de tonsilas. As comparações entre os grupos foram realizadas a partir do teste *t* pareado. Cada ponto colorido equivale a um doador (indivíduo; n=12) do qual foi coletada amostra de sangue e de tonsilas.

Figura 18. Frequência de células CD19⁺ que expressam os marcadores IgD⁻CD38⁺ no sangue e tonsilas

Em paralelo, avaliou-se a frequência de células *naïve* ($\text{IgD}^+\text{CD38}^-$) dentre as células $\text{CD3}^+\text{CD19}^+$; a média da frequência no sangue foi 63,09% e o SD foi 6,37% e nas tonsilas, média 59,22% e o SD 11,53% (Figura 19). As análises da porcentagem destes marcadores apresentaram um perfil parecido nas duas amostras, e não mostrou diferença significativa (NS) entre as células oriundas de sangue e de tonsilas.

Frequência de células CD19^+ que expressam o marcador $\text{IgD}^+\text{CD38}^-$ (células B *naïve*) em células oriundas do sangue e de tonsilas. As comparações entre os grupos foram realizadas a partir do teste *t* pareado. Cada ponto colorido equivale a um doador (indivíduo; $n=12$) do qual foi coletada amostra de sangue e de tonsilas.

Figura 19. Frequência de células CD19^+ que expressam o marcador $\text{IgD}^+\text{CD38}^-$ no sangue e tonsilas

Outra população analisada foi a das células B de memória, representada pela marcação de $\text{IgD}^-\text{CD38}^+$ nas células CD19^+ (Figura 20). Os resultados mostram que a média da frequência de células de memória no sangue foi 20,86% e o SD 6,68%, e nas tonsilas, a média foi 24,68% e o SD foi 9,51%; não houve diferença significativa entre os grupos (NS).

Frequência de células CD19⁺ que expressam o marcador IgD⁻CD38⁻ (células B de memória) em células oriundas do sangue e de tonsilas. As comparações entre os grupos foram realizadas a partir do teste *t* pareado. Cada ponto colorido equivale a um doador (indivíduo; n=12) do qual foi coletada amostra de sangue e de tonsilas.

Figura 20. Frequência de células CD19⁺que expressam o marcador IgD⁻CD38⁻ no sangue e tonsilas

A tabela 4 resume os dados das distintas populações de células B avaliadas nesse estudo em sangue e em tonsilas palatinas de doadores saudáveis, a partir dos gráficos apresentados nas figuras 16 a 20.

Compilação de dados de porcentagem dos marcadores: IgD⁺CD38⁺ (células B do CG), IgD⁻CD38⁻ (células B memória), IgD⁺CD38⁻ (células B *naive*) e IgD⁻CD38⁺ (plasmoblastos) nas células CD19⁺ encontradas no sangue e tonsilas palatinas de doadores saudáveis.

Tabela 4. Compilação de dados dos marcadores para células B no sangue e tonsilas

Marcadores	Sangue Média (SD)	Tonsila Média (SD)	Valor-p
CD19+	31,91 (17,21)	82,31 (12,27)	<0,05
Centro Germinativo(IgD+CD38+)	4,08 (4,14)	6,23 (7,17)	NS
Célula B Memória (IgD-CD38-)	20,86 (6,68)	24,68 (9,51)	NS
Células <i>Naive</i> (IgD ⁺ CD38 ⁻)	63,09 (6,37)	59,22 (11,53)	NS
Plasmoblastos (IgD ⁻ CD38 ⁺)	1,05 (1,42)	71,01 (1,22)	NS

Valores apresentados como média da frequência de células (%). Média da diferença entre tonsila e sangue. Teste *t* pareado. NS: Não Significativo.

A tabela 5 resume os dados da média de todos os marcadores para células B utilizados nesse estudo: CD19, CG,⁽⁴⁾ B de Memória, B *naïve*, e plasmoblastos, de cada doador apresentados individualmente, encontrados nas amostras do sangue e tonsilas.

Marcadores das subpopulações das células B encontrados no sangue e tonsilas palatinas de doadores saudáveis. Dados de cada doador divididos em 3 grupos: valores acima da média, abaixo da média e valores na média.

Tabela 5. Marcadores das subpopulações das células B encontrados no sangue e tonsilas

Variáveis			Sangue					Tonsilas				
Doador	Sexo	Idade (anos)	CD19	CG	B memória	B naïve	plasmoblasto	CD19	CG	B memória	B naïve	plasmoblasto
1	M	41										
2	M	50										
3	F	40										
4	M	39										
5	F	50										
6	F	24										
7	F	50										
8	F	28										
9	M	38										
10	M	37										
11	M	45										
12	M	34										

Valores acima da média ; Valores abaixo da média ; Valores na média .

A tabela 6 apresenta a compilação de todos os valores dos marcadores para células T_{FH} e células B dos pacientes avaliados nesse estudo. Os dados são mostrados de acordo com a expressão da média: acima da média, abaixo da média e na média para cada marcador.

Representação da expressão de todos marcadores para as células T_{FH} e células B de todos doadores utilizados nesse estudo. Dados de cada doador divididos em 3 grupos: valores acima da média, abaixo da média e valores na média.

Tabela 6. Representação da expressão de todos marcadores para as células T_{FH} e células B de todos doadores do estudo

Variáveis			Sangue										Tonsilas									
Doador	Sexo	Idade	BCL6	CD40L	PD1	ICOS	IL21R	CD19	CG	Memória	Naïve	Plasmoblasto	BCL6	CD40L	PD1	ICOS	IL21R	CD19	CG	Memória	Naïve	Plasmoblasto
1	M	41																				
2	M	50																				
3	F	40																				
4	M	39																				
5	F	50																				
6	F	24																				
7	F	50																				
8	F	28																				
9	M	38																				
10	M	37																				
11	M	45																				
12	M	34																				

Valor individual **acima da média**;

Valor individual **na média**;

Valor individual **abaixo da média**;

Sem análise.

4 DISCUSSÃO

Inicialmente, avaliou-se o perfil das células T com marcadores para células T_{FH} em amostras de sangue e tonsila de doadores saudáveis. Nossa principal motivação veio do interesse pelas células T_{FH} pois poderiam ser alvo importante no estudo de pacientes com ICV, que se trata de uma doença caracterizada pela hipogamaglobulinemia e muitas vezes com número de células B ou linfócitos normais. Nestes casos, aparentemente, estas células não conseguem amadurecer e por consequência não podem produzir imunoglobulinas. Outra condição, contudo, não confirmada, é que pacientes com ICV possam apresentar alguma disfunção nas subpopulações de linfócitos T,⁽¹¹¹⁾ incluindo as T_{FH} . Desta forma, partimos para a análise das células T_{FH} que a partir de estudos publicados em 2000 mostraram a presença de uma subpopulação de células T que poderiam auxiliar de forma mais robusta a produção de anticorpos pelas células B.^(5,6)

Então, o objetivo inicial foi o estudo dos linfócitos T foliculares em indivíduos com ICV, realizar a caracterização e quantificação do perfil das T_{FH} do CG e circulantes destes pacientes comparados com as células de doadores saudáveis.

Contudo, ao receber as amostras e dar início as análises percebemos o volume de moléculas (que convencionamos chamar de marcadores) para cada tipo de amostra (sangue e tonsila) que deveríamos dividir o trabalho em etapas. E assim, este trabalho demonstrou o perfil das células T_{FH} e células B nas amostras de doadores saudáveis.

Os linfócitos T_{FH} parecem ter um papel fundamental nas doenças infecciosas e autoimunes. A descrição de que células T_{FH} encontradas na circulação podem refletir o *status* dos centros germinativos nos permite considerar a hipótese que a análise dessa população na periferia poderia fornecer informações importantes quanto ao estado imunológico geral de um indivíduo em qualquer tipo de doença sem a necessidade de biópsias dos órgãos linfoides secundários, o que costuma ser difícil de ser realizado. Investigamos o perfil das células T_{FH} presentes nos órgãos linfoides secundários a partir de análises das células de tonsilas, bem como a presença e comparação quantitativa e fenotípicas dessas populações no sangue; em paralelo, avaliou-se as subpopulações de

linfócitos B, principais células que interagem com as T_{FH} . Para tanto, realizamos a caracterização e a quantificação de populações de células T_{FH} nas tonsilas palatinas e no sangue de doadores “saudáveis” (sem relatos de doenças durante a anamnese ou de provas laboratoriais sugestivas) seguida da comparação dessas populações em ambos compartimentos.

É descrito que antes da caracterização das células T_{FH} no ano 2000, autores reportaram a necessidade da colaboração entre as células T e B na resposta humoral.⁽¹⁾ Mais tarde, essas foram denominadas células T_{FH} , descritas como a subpopulação das células T que poderiam ter destaque maior nesta colaboração.

A geração da resposta adaptativa contra antígenos precisa ser rápida e envolve as células T CD4, assim brevemente, após seu recrutamento, as células migram para os órgãos linfoides secundários onde em colaboração com as células B fornecem ajuda específica levando a uma rápida expressão de plasmócitos de curta duração.⁽¹¹²⁾ Na sequência, células B junto com as células T CD4 iniciam a formação do CG, e consequentemente darão origem as células plasmáticas de longa duração e as células de memória.⁽¹¹³⁾

É sabido também que as células T CD4 de memória fornecem ajuda para células B *naive*, resultando em respostas imunológicas mais eficientes e mais rápidas. Todavia, células que impulsionam as células T para ajudar as células B durante a ativação merecem maiores estudos. A diferenciação em células T_{FH} parece dependente de estímulos sequenciais envolvendo as DCs, CD4 e células B.

Em camundongos a coestimulação mediada por CD28 resulta na regulação positiva de CXCR5.⁽²⁴⁾ Essa regulação positiva da expressão de CXCR5 juntamente com a regulação negativa de CCR7 faz com que as células T migrem para a borda entre as células T e B, mas nada ainda concreto de qual seria o perfil destas células circulantes.

As células T_{FH} apresentam uma maior dificuldade nos estudos devido à localização ou até pela impossibilidade de doação ou acesso aos órgãos linfoides secundários. Certos de que a comparação com a mesma população celular do sangue nos facilitaria o estudo destas células, partimos para experimentos com amostras de tonsilas

palatinas o que nos possibilitou uma visão de como estas células estão distribuídas nestes dois ambientes.

Através da marcação por microscopia confocal com 3 marcadores distintos: CD4, Bcl-6 e CXCR5, confirmamos a visualização das células T_{FH} , e que os resultados por nós obtidos eram concordantes com a literatura.^(5,6,18)

Na sequência das análises, usamos a estratégia para separar cada marcador, ou seja, as moléculas características de uma célula T_{FH} , por citometria de fluxo. A partir da população de “linfócitos totais” separamos a população de $CD4^+CXCR5^+$ e dentro desta população, cada marcador foi avaliado separadamente. Ainda em nossa estratégia de estudo, as células derivadas de tonsilas palatinas de doadores saudáveis foram comparadas com amostras de sangue periférico.

Geralmente, as células T_{FH} fornecem sinais para a maturação, diferenciação e sobrevivência das células B através de ICOS, PD-1, CD40L, e IL-21^(24,26) estes sendo os marcadores que analisamos no nosso estudo. O CXCR5 é um marcador clássico para as células T_{FH} , que orientam as células T a migrar para a zona da célula B ligando-se à CXCL13 que é expressa pelas DCs.⁽¹¹⁴⁾ Portanto, as células T CXCR5 normalmente devem expressar um baixo nível de CCR7, o que ajuda essas células T a migrar para os GCs.^(5,115-117)

Em nosso estudo, a avaliação do receptor da quimiocina CXCR5 mostrou uma porcentagem maior nas amostras das tonsilas palatinas quando comparada às amostras sanguíneas. Não está totalmente caracterizado, mas existe uma tendência de que a população das células T_{FH} circulantes expresse este receptor em menores quantidades.^(5,6)

A descoberta de Bcl-6 em células T_{FH} foi um marco para a identificação de células T_{FH} . O papel essencial de Bcl-6 foi confirmado em um estudo com camundongos, indicando que as células $TCD4^+$ que não expressavam o fator de transcrição Bcl-6 não conseguiam se diferenciar em células T_{FH} .⁽¹¹⁸⁾

Também foi descrito que a expressão de Bcl-6 em células $TCD4^+$ promove a expressão de CXCR5, CXCR4 e PD-1.⁽¹¹⁸⁾ A principal função de Bcl-6 nas células T_{FH} foi confirmada em estudos posteriores⁽¹¹⁾ e um deles revelou que Bcl-6 regula a diferenciação precoce de células T_{FH} em IL-21 e IL-6- de forma independente.⁽¹¹⁹⁾ Por

outro lado, o Bcl-6 pode se ligar a vários genes relacionados à migração celular, como CCR7, CCR6, PSGL-1, CXCR5, CXCR4 e PD-1.⁽¹¹⁹⁾

Demonstramos que o fator de transcrição o Bcl-6⁽²⁷⁾ das células T_{FH}, está presente no sangue e tonsila, embora, diferente do proposto por alguns autores,^(120,121) células T_{FH} circulantes apresentaram o fator de transcrição em menores quantidades em relação às amostras das tonsilas, mas estão presentes. No entanto, várias questões ainda estão em investigação, pois a falta deste marcador causa redução do CG e por consequência diminuição das células T_{FH} em humanos.⁽²⁵⁾

Outra função atribuída ao Bcl-6⁽¹²²⁾ é a inibição de um conjunto discreto de genes envolvidos na ativação de células B, diferenciação terminal e inflamação, além da regulação de sinais importantes das células B do CG. Estudos em células tumorais descreveram que a expressão desregulada de Bcl-6 é um marcador de respostas clínicas ruins, pois a expressão aumentada de Bcl-6 afeta a apoptose de células de linfoma tratadas com agentes quimioterápicos.⁽¹²³⁾ E em pacientes com SLE, o Bcl-6 foi descrito como um marcador da atividade da doença observado nas células T_{FH} circulantes.⁽¹²⁴⁾

Outro marcador de células T_{FH} analisado, foi o ICOS. A expressão de ICOS é induzida nas células T ativadas. Alguns autores até sugerem que ICOS, devido à sua alta expressão em células T ativada, o mesmo pode não ser um marcador confiável. Os sinais através de ICOS-ICOSL são essenciais para a diferenciação de células T_{FH}, sobrevivência e ativação de células B, troca de classe de anticorpos e formação de CG.⁽⁴⁶⁾ Em células T_{FH} humanas, ICOS é usado como um marcador de células GC T_{FH}.⁽²¹⁾ Células T deficientes em ICOS não expressam CXCR5 e são incapazes de migrar para os folículos, um achado também observado durante o bloqueio de anticorpos do ligante ICOS.⁽²²⁾

Em nossas amostras, o marcador ICOS teve a porcentagem alta nas duas populações, com um perfil muito parecido no sangue e tonsila como descrito na literatura.⁽⁴⁶⁾ Estudos publicados por Ferguson et al.⁽¹²⁵⁾ mostraram a importância da molécula coestimulatória ICOS da família do CD28 em conjunto com os sinais das DCs: para o desenvolvimento do CG, na mudança de classe e maturação da afinidade.⁽¹²⁶⁻¹²⁹⁾

Foi descrito que indivíduos com defeito em ICOS, apresentam hipogamaglobulinemia grave, redução de linfócitos B de memória, formação prejudicada

do CG e redução das células CXCR5 RO⁺.^(22,25,26) Na ausência de sinalização via CD28, a molécula ICOS seria uma das moléculas responsáveis pela resposta humoral T-dependente.

Seguindo a metodologia de pesquisa para os marcadores das células T_{FH}, analisamos o marcador de superfície PD-1, que geralmente é expresso por células T em exaustão, altamente presente em células T_{FH}. Os sinais de PD-1 / PD-Ls são geralmente considerados como sinais reguladores negativos que desfosforilam a sinalização do receptor de células T (TCR - *T-cell receptor*), inibindo assim a ativação e a produção de citocinas pelas células T.⁽³⁰⁾ Em adição a esse dado, PD-1 limita o número de células T_{FH}.⁽¹³⁰⁾

Claramente, mais evidências são necessárias para abordar o papel da PD-1 na migração e função das células T_{FH}. Além disso, foi descrito que CXCR5 ajuda a manutenção da população PD-1 nas T_{FH} nos GCs.⁽¹¹⁵⁾ Camundongos deficientes em CXCR5 têm um baixo número de GC e produção de anticorpos⁽¹³¹⁾ o que mostra o importante papel do CXCR5 na diferenciação de células T_{FH}.

Uma vez que o marcador CXCR5 junto com PD-1 é uma importante característica das células T_{FH} na formação do CG,⁽¹³²⁾ o aumento da expressão PD-1⁽¹³³⁾ gera também supressão das atividades das células T na reação inflamatória e auxilia na regulação das atividades das células T_{FH} como: na redução da proliferação celular, ativação e expressão das células T coestimulatórias (ICOS).⁽¹⁰³⁾

Em nossos experimentos o PD-1 não se expressou de forma significativa, mas está presente em ambas as amostras. É uma molécula essencial na geração das células T_{FH} e a deficiência pode gerar reações nos centros germinativos e reduções significativas das células T_{FH}.

Ainda nos estudos dos marcadores de superfície para T_{FH}, avaliamos a frequência da molécula CD40L. Nossos dados mostram uma baixa frequência destes marcadores nas tonsilas palatinas (estudos indicam que exista um papel significativo para as moléculas CD40L) e em nossas análises vimos uma porcentagem maior no sangue. A molécula CD40L é fundamental para troca de classe e diferenciação de células plasmáticas, uma vez que a deficiência funcional destas moléculas resulta na má formação do CG, porém a frequência por nós encontrada pode ser devido à fase que se

faz necessária a presença destas moléculas, como demonstrado nos estudos em camundongos.⁽¹³⁴⁾

De fato, seria interessante avaliar melhor se a ausência de CD40 ou CD40L segue para as anormalidades funcionais das células B, uma vez que Van Kooten et al.⁽¹³⁵⁾ sugeriram que a remoção de CD40L do sistema resultaria na diferenciação terminal das células B do CG em células com características de células plasmáticas, indicando que o ligante de CD40 direciona a diferenciação das células B do CG para células de memória ao invés de células plasmáticas.⁽¹³⁵⁻¹³⁷⁾

Ainda de acordo com estas observações, os pacientes com ICV que apresentam deficiência de CD40L, não expressam CXCR5⁺ em linfócitos T circulantes, sugerindo que a ausência desta população é causa ou consequência da má formação dos centros germinativos.⁽¹³⁸⁾

E finalizando nossas análises para os marcadores das células T_{FH}, o receptor de IL21, envolvido na diferenciação das células B plasmáticas e troca de isotipo das imunoglobulinas, é descrito como melhor marcador funcional para T_{FH}.⁽⁹⁾ A identificação da secreção de IL-21 pelas T_{FH} sugere que esta citocina seria também responsável pela seleção de células B e hipermutação somática.⁽¹³⁹⁾ Funcionalmente esta citocina é secretada em grandes quantidades pelas T_{FH}, e em nossos resultados apresentaram alta frequência de seu receptor no sangue e menor nas tonsilas. É interessante notar que existem diferentes padrões de expressão entre CXCR5 e IL21R nas células T_{FH} do sangue e tonsilas palatinas corroborando com nossos resultados⁽¹⁴⁰⁾ e sua principal função é induzir linfócitos B a secretarem imunoglobulinas.

Em paralelo às análises dos linfócitos T_{FH}, foram analisadas as frequências dos marcadores para as subpopulações das células B do sangue periférico e nas tonsilas. A estratégia para a separação das populações de interesse, por citometria de fluxo (descrito em materiais e métodos), utilizou os marcadores para populações de células B, com os marcadores IgD x CD38; para as análises das subpopulações de células B, foram avaliadas as quatro fases relacionadas com suas fases de desenvolvimento: células B *naive*, células B de memória, células B do CG ou CG, e plasmoblastos. Esta estratégia usada foi descrita por Amodio et al.⁽¹⁴¹⁾ Começamos as análises pela frequência da molécula CD19 comparadas no sangue e tonsilas. Este marcador descrito como

presente apenas em células B imaturas e ausentes no processo de diferenciação para plasmócitos, mostrou-se detectável em quase noventa por cento em nossas análises de tonsilas, uma frequência quase duas vezes maior que a população sanguínea, o que justifica as diferenças de comportamentos das populações dependendo do local encontrado. Portanto, a presença destes marcadores está ligada aos diversos papéis desenvolvidos pelas células B.⁽¹⁴²⁾

Analisamos o perfil de cada subgrupo (*naive*, CG, plasmoblastos e células B de memória), e todos apresentaram a frequência dos marcadores muito parecidos entre as amostras sangue e tonsilas; embora não tenham alcançado o nível de significância estatístico.

A idade dos participantes também pode ser um dado interessante na mudança qualitativa e quantitativa especialmente para as células B.⁽⁶⁸⁾ Entretanto, para estudar estas supostas alterações no fenótipo de superfície são necessários estudos com maior número de amostras uma vez que para nossa pesquisa encontramos marcadores com mesmo perfil nas duas amostras de doadores de ambos os sexos e pertencentes a diferentes faixas etárias.

Dados da literatura mostram que células T_{FH} humanas ativadas *in vitro* atuam sobre células B *naive* e de memória de modo a induzir a produção de imunoglobulinas através da presença de IL-21, IL-10 e ICOS, e foi observado que do ponto de vista funcional que as células T humanas diferenciadas e ativadas *in vitro* eram semelhantes às células T_{FH} do CG isoladas das tonsilas.⁽¹⁴³⁻¹⁴⁵⁾

Portanto, podemos sugerir que existem flutuações na frequência dos marcadores para as células T_{FH}, o que nos leva à confirmação da hipótese de perfis celulares no sangue e tonsilas palatinas com diferentes frequências e com perfil parecido, o que pode ser caracterizado em nosso trabalho.

Nosso número de amostras foi relativamente limitado, uma vez que obter tonsilas palatinas de doadores foi um desafio ao longo do estudo; com isso algumas das nossas análises não deram resultados significativos, mas é possível visualizar que o sangue reflete o que tem no órgão linfóide secundário (tonsila palatina). Com estes resultados podemos iniciar um modelo a partir das estratégias de marcação das células T_{FH} e B para avaliar alguns tipos de patologias, quando não podemos ter os órgãos

linfoides secundários. Um exemplo desse tipo de análise seria avaliar amostras de sangue de pacientes com ICV, uma vez que a obtenção de amostras teciduais destes doadores é bastante desafiadora.

Para ICV, mais especificamente, uma doença sem causa específica, pode existir a possibilidade de que as células T_{FH} apresentem um fenótipo diferente do observado nesse estudo, pois podem sofrer modificações ao longo do tempo e, por isso, essas células podem não ser representadas por uma única população. Poderia ainda ser caracterizada por um subgrupo de células que podem sofrer modificações na expressão de moléculas de superfície, assim como, mudanças na secreção das citocinas capazes de moldar de forma mais eficiente no auxílio às células B, ou seja, a existência de um grupo heterogêneo da subpopulação das células T_{FH} , o que justificaria o desenvolvimento da doença de forma tardia na grande maioria dos casos.

De forma geral, os resultados encontrados nesse estudo mostram um perfil semelhante, quali e quantitativamente, no sangue e tonsila. Contudo, Schmitt et al., descreveram a presença de subpopulações das células T_{FH} com marcadores para célula de memória no sangue, sendo estas células diferentes das células T_{FH} das tonsilas pois a expressão de marcadores é diferente.⁽¹²¹⁾

Assim, ainda fica a pergunta qual a origem das células T_{FH} circulantes, e ainda se o desenvolvimento das células circulantes não requer o CG? Outra questão importante a ser avaliada e discutida: a presença das células T_{FH} de memória no sangue humano poderia ser a mesma célula T_{FH} circulante?

Diferente das células *T helper*, as células T_{FH} são difíceis para serem geradas *in vitro* com estimulações, é devido possivelmente a dificuldade das interações das células T e B. A diferenciação celular T_{FH} é regulada por múltiplos fatores de transcrição, receptores, citocinas e até possivelmente por modificações no funcionamento de um gene.

Podemos ainda sugerir que o sequenciamento de mRNA de uma única célula, poderia facilitar estudos para entender a heterogeneidade e a distribuição da subpopulação de células T_{FH} nos tecidos e no sangue.

A partir dos dados obtidos nesse estudo, fomos capazes de criar o modelo atual do perfil das T_{FH} circulantes e do órgão linfóide secundário, assim como,

comparar os diferentes tipos de marcadores para células B em seus vários estágios de desenvolvimento nas amostras de sangue e tonsila. Mesmo que a caracterização da regulação das células T_{FH} foi limitada, acreditamos que, com desenvolvimento de novas tecnologias, novas moléculas poderão ser identificadas em um futuro próximo.

5 CONCLUSÕES

1 Os marcadores para células T_{FH} dos órgãos linfoides secundários mostram um perfil muito parecido com o observado no sangue (periferia); entretanto, nota-se que, comparando os dois compartimentos avaliados, a expressão de alguns marcadores como CXCR5 e Bcl-6 está reduzida no sangue e maior frequência na tonsila;

2 Os marcadores para subpopulações das células B (*naive*, memória, centro germinativo e plasmoblastos) parecem apresentar perfis muito parecidos, inclusive em termos de frequência nos dois ambientes estudados nas amostras de doadores saudáveis.

6 REFERÊNCIAS

1. Miller JF, Mitchell GF. Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med.* 1968;128(4):801–20.
2. Foy TM, Laman JD, Ledbetter JA, Aruffo A, Claassen E, Noelle RJ. gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *J Exp Med.* 1994;180(1):157–63.
3. Han S, Hathcock K, Zheng B, Kepler TB, Hodes R, Kelsoe G. Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers. *J Immunol.* 1995;155(2):556–67.
4. Dickinson RE, Milne P, Jardine L, Zandi S, Swierczek SI, McGovern N, et al. The evolution of cellular deficiency in GATA2 mutation. *Blood.* 2014;123(6):863–74.
5. Breitfeld D, Ohi L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med.* 2000;192(11):1545–52.
6. Schaerli P, Willmann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med.* 2000;192(11):1553–62.
7. Ozaki K, Kikly K, Michalovich D, Young PR, Leonard WJ. Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(21):11439–44.
8. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature.* 2000;408(6808):57–63.
9. Ozaki K, Spolski R, Feng CG, Qi CF, Cheng J, Sher A, et al. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science.* 2002;298(5598):1630–4.
10. Eto D, Lao C, DiToro D, Barnett B, Escobar TC, Kageyama R, et al. IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. *PLoS One.* 2011;6(3):e17739.
11. Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, et al. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science.* 2009;325(5943):1001–5.
12. Crotty S. A brief history of T cell help to B cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3):185–9.
13. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(1):22–33.
14. Dent AL, Shaffer AL, Yu X, Allman D, Staudt LM. Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science.* 1997;276(5312):589–92.

15. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity*. 2008;29(1):138–49.
16. Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*. 2011;34(1):108–21.
17. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*. 2009;325(5943):1006–10.
18. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med*. 2001;193(12):1373–81.
19. Förster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell*. 1996;87(6):1037–47.
20. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity*. 2007;27(2):190–202.
21. Bentebibel SE, Schmitt N, Banchereau J, Ueno H. 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*. 2011;108(33):E488–97.
22. Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Usui Y, Harada N, Yamazaki T, et al. The role of ICOS in the CXCR5+ follicular B helper T cell maintenance in vivo. *J Immunol*. 2005;175(4):2340–8.
23. Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Shlomchik MJ. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol*. 2010;11(6):535–42.
24. Walker LS, Gulbranson-Judge A, Flynn S, Brocker T, Raykundalia C, Goodall M, et al. Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers. *J Exp Med*. 1999;190(8):1115–22.
25. Bossaller L, Burger J, Draeger R, Grimbacher B, Knoth R, Plebani A, et al. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. *J Immunol*. 2006;177(7):4927–32.
26. Xu H, Li X, Liu D, Li J, Zhang X, Chen X, et al. Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature*. 2013;496(7446):523–7.
27. Choi YS, Kageyama R, Eto D, Escobar TC, Johnston RJ, Monticelli L, et al. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity*. 2011;34(6):932–46.

28. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2010;236:219-42.
29. F Fife BT, Pauken KE. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1217:45-59.
30. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol.* 2016;7:550.
31. Lederman S, Yellin MJ, Inghirami G, Lee JJ, Knowles DM, Chess L. Molecular interactions mediating T-B lymphocyte collaboration in human lymphoid follicles. Roles of T cell-B-cell-activating molecule (5c8 antigen) and CD40 in contact-dependent help. *J Immunol.* 1992;149(12):3817–26.
32. von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(11):867–78.
33. Turley SJ, Fletcher AL, Elpek KG. The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(12):813–25.
34. Mueller SN, Germain RN. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(9):618–29.
35. Cupedo T, Stroock A, Coles M. Application of tissue engineering to the immune system: development of artificial lymph nodes. *Front Immunol.* 2012;3:343.
36. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136(7):2348–57.
37. Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld JC, et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature.* 2008;453(7191):106–9.
38. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol.* 2009;10(8):857–63.
39. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1133–41.
40. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1123–32.
41. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* 2006;126(6):1121–33.
42. Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity.* 2009;30(5):616–25.

43. Del Prete G, Romagnani S. The role of TH1 and TH2 subsets in human infectious diseases. *Trends Microbiol.* 1994;2(1):4–6.
44. Vicari AP, Zlotnik A. Mouse NK1.1+ T cells: a new family of T cells. *Immunol Today.* 1996;17(2):71–6.
45. Martin F, Kearney JF. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunol Rev.* 2000;175:70-9.
46. Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, Mackay CR. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(11):853–65.
47. Werner-Favre C, Bovia F, Schneider P, Holler N, Barnet M, Kindler V, et al. IgG subclass switch capacity is low in switched and in IgM-only, but high in IgD+IgM+, post-germinal center (CD27+) human B cells. *Eur J Immunol.* 2001;31(1):243–9.
48. Harwood NE, Batista FD. Visualizing the molecular and cellular events underlying the initiation of B-cell activation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;334:153-77.
49. Huston DP. The biology of the immune system. *JAMA.* 1997;278(22):1804–14.
50. Lipsky PE. The induction of human B-cell activation, proliferation and differentiation by anti-CD3-stimulated T cells—a model of T cell/B cell collaboration. *Res Immunol.* 1990;141(4-5):424–7.
51. Garside P, Ingulli E, Merica RR, Johnson JG, Noelle RJ, Jenkins MK. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science.* 1998;281(5373):96–9.
52. Benson MJ, Erickson LD, Gleeson MW, Noelle RJ. Affinity of antigen encounter and other early B-cell signals determine B-cell fate. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(3):275–80.
53. Paus D, Phan TG, Chan TD, Gardam S, Basten A, Brink R. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med.* 2006;203(4):1081–91.
54. Shih TA, Roederer M, Nussenzweig MC. Role of antigen receptor affinity in T cell-independent antibody responses in vivo. *Nat Immunol.* 2002;3(4):399–406.
55. Chan TD, Gatto D, Wood K, Camidge T, Basten A, Brink R. Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts. *J Immunol.* 2009;183(5):3139–49.
56. Gatto D, Wood K, Brink R. EBI2 operates independently of but in cooperation with CXCR5 and CCR7 to direct B cell migration and organization in follicles and the germinal center. *J Immunol.* 2011;187(9):4621–8.
57. Pereira JP, Kelly LM, Xu Y, Cyster JG. EBI2 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature.* 2009;460(7259):1122–6.
58. Tarlinton DM, Smith KG. Dissecting affinity maturation: a model explaining selection of antibody-forming cells and memory B cells in the germinal centre. *Immunol Today.* 2000;21(9):436–41.

59. Manz RA, Thiel A, Radbruch A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature*. 1997;388(6638):133–4.
60. Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, et al. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood*. 2005;105(4):1614–21.
61. Wirths S, Lanzavecchia A. ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells. *Eur J Immunol*. 2005;35(12):3433–41.
62. Halliley JL, Kyu S, Kobie JJ, Walsh EE, Falsey AR, Randall TD, et al. Peak frequencies of circulating human influenza-specific antibody secreting cells correlate with serum antibody response after immunization. *Vaccine*. 2010;28(20):3582–7.
63. Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev*. 2004;197:179–91.
64. Chung JB, Silverman M, Monroe JG. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol*. 2003;24(6):343–9.
65. Burrows PD, Cooper MD. B cell development and differentiation. *Curr Opin Immunol*. 1997;9(2):239–44.
66. Maurer D, Holter W, Majdic O, Fischer GF, Knapp W. CD27 expression by a distinct subpopulation of human B lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1990;20(12):2679–84.
67. Maurer D, Fischer GF, Fae I, Majdic O, Stuhlmeier K, Von Jeney N, et al. IgM and IgG but not cytokine secretion is restricted to the CD27+ B lymphocyte subset. *J Immunol*. 1992;148(12):3700–5.
68. Chong Y, Ikematsu H, Yamaji K, Nishimura M, Nabeshima S, Kashiwagi S, et al. CD27(+) (memory) B cell decrease and apoptosis-resistant CD27(-) (naive) B cell increase in aged humans: implications for age-related peripheral B cell developmental disturbances. *Int Immunol*. 2005;17(4):383–90.
69. Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan IC. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature*. 1989;342(6252):929–31.
70. Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med*. 1994;180(1):329–39.
71. Casteleyn C, Breugelmans S, Simoens P, Van den Broeck W. The tonsils revisited: review of the anatomical localization and histological characteristics of the tonsils of domestic and laboratory animals. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:472460.
72. Slípka J. Palatine tonsils--their evolution and ontogeny. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1988;454:18–22.
73. Perry M, Whyte A. Immunology of the tonsils. *Immunol Today*. 1998;19(9):414–21.

74. Richardson MA. Sore throat, tonsillitis, and adenoiditis. *Med Clin North Am.* 1999;83(1):75-83, viii.
75. Bergler W, Adam S, Gross HJ, Hörmann K, Schwartz-Albiez R. Age-dependent altered proportions in subpopulations of tonsillar lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 1999;116(1):9–18.
76. Gorfien JL, Hard R, Noble B, Brodsky L. Quantitative study of germinal center area in normal and diseased tonsils using image analysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1999;108(4):398–402.
77. Brandtzaeg P. The B-cell development in tonsillar lymphoid follicles. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1996;523:55-9.
78. Eivazi S, Bagheri S, Hashemzadeh MS, Ghalavand M, Qamsari ES, Dorostkar R, et al. Development of T follicular helper cells and their role in disease and immune system. *Biomed Pharmacother.* 2016;84:1668-78.
79. López-González MA, Sánchez B, Mata F, Delgado F. Tonsillar lymphocyte subsets in recurrent acute tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 1998;43(1):33–9.
80. Grouard G, Durand I, Filgueira L, Banchereau J, Liu YJ. Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature.* 1996;384(6607):364–7.
81. Lindhout E, Vissers JL, Hartgers FC, Huijbens RJ, Scharenborg NM, Figdor CG, et al. The dendritic cell-specific CC-chemokine DC-CK1 is expressed by germinal center dendritic cells and attracts CD38-negative mantle zone B lymphocytes. *J Immunol.* 2001;166(5):3284–9.
82. Summers KL, Hock BD, McKenzie JL, Hart DN. Phenotypic characterization of five dendritic cell subsets in human tonsils. *Am J Pathol.* 2001;159(1):285–95.
83. Victora GD, Schwickert TA, Fooksman DR, Kamphorst AO, Meyer-Hermann M, Dustin ML, et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell.* 2010;143(4):592–605.
84. Warnatz K. Dissecting CXCR5+ T cell populations—on the quest for a better understanding of B cell help during T dependent antibody responses. *Eur J Immunol.* 2006;36(7):1662–4.
85. Bryant A, Calver NC, Toubi E, Webster AD, Farrant J. Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cell secretion of IgM and IgG in response to anti-IgM and interleukin-2. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990;56(2):239-48.
86. Saiki O, Ralph P, Cunningham-Rundles C, Good RA. Three distinct stages of B-cell defects in common varied immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(19):6008–12.
87. Ueno H, Banchereau J, Vinuesa CG. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nat Immunol.* 2015;16(2):142–52.
88. Wallin EF, Jolly EC, Suchánek O, Bradley JA, Espéli M, Jayne DR, et al. Human T-follicular helper and T-follicular regulatory cell maintenance is independent of germinal centers. *Blood.* 2014;124(17):2666–74.

89. Yong PL, Orange JS, Sullivan KE. Pediatric common variable immunodeficiency: immunologic and phenotypic associations with switched memory B cells. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010;21(5):852-8.
90. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 2011;29:621-63.
91. Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS*. 2003;111(7-8):675-97.
92. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med*. 1974;139(2):380-97.
93. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557-69.
94. Foote PA Jr, Brook I. Penicillin and clindamycin therapy in recurrent tonsillitis. Effect of microbial flora. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1989;115(7):856-9.
95. Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*. 1988;240(4851):516-8.
96. Gowans JL, Knight EJ. The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1964;159:257-82.
97. Salmi M, Jalkanen S. Lymphocyte homing to the gut: attraction, adhesion, and commitment. *Immunol Rev*. 2005;206:100-13.
98. Friedl P. Preshaping and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(1):14-23.
99. Bajénoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, et al. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity*. 2006;25(6):989-1001.
100. Mempel TR, Junt T, von Andrian UH. Rulers over randomness: stroma cells guide lymphocyte migration in lymph nodes. *Immunity*. 2006;25(6):867-9.
101. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 1996;272(5258):60-6.
102. Warnock RA, Askari S, Butcher EC, von Andrian UH. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med*. 1998;187(2):205-16.
103. Cubas RA, Mudd JC, Savoye AL, Perreau M, van Grevenynghe J, Metcalf T, et al. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med*. 2013;19(4):494-9.
104. Kawamoto S, Maruya M, Kato LM, Suda W, Atarashi K, Doi Y, et al. Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity*. 2014;41(1):152-65.
105. Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG, et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2010;62(1):234-44.

106. Liarski VM, Kaverina N, Chang A, Brandt D, Yanez D, Talasnik L, et al. Cell distance mapping identifies functional T follicular helper cells in inflamed human renal tissue. *Sci Transl Med*. 2014;6(230):230ra46.
107. Liang HE, Reinhardt RL, Bando JK, Sullivan BM, Ho IC, Locksley RM. Divergent expression patterns of IL-4 and IL-13 define unique functions in allergic immunity. *Nat Immunol*. 2011;13(1):58–66.
108. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, et al. CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest*. 2013;123(7):2873–92.
109. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity*. 2013;39(4):782–95.
110. Roederer M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry*. 2001;45(3):194–205.
111. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol*. 1999;92(1):34–48.
112. Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*. 1991;354(6352):389–92.
113. Ho F, Lortan JE, MacLennan IC, Khan M. Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *Eur J Immunol*. 1986;16(10):1297–301.
114. Gao Y, Xue Sa, Griffin BE. Sensitivity of an epstein-barr virus-positive tumor line, Daudi, to alpha interferon correlates with expression of a GC-rich viral transcript. *Mol Cell Biol*. 1999;19(11):7305-13.
115. Haynes NM, Allen CD, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol*. 2007;179(8):5099–108.
116. Hardtke S, Ohl L, Förster R. Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help. *Blood*. 2005;106(6):1924–31.
117. Arnold CN, Campbell DJ, Lipp M, Butcher EC. The germinal center response is impaired in the absence of T cell-expressed CXCR5. *Eur J Immunol*. 2007;37(1):100–9.
118. Yu D, Rao S, Tsai LM, Lee SK, He Y, Sutcliffe EL, et al. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity*. 2009;31(3):457–68.
119. Poholek AC, Hansen K, Hernandez SG, Eto D, Chandele A, Weinstein JS, et al. In vivo regulation of Bcl6 and T follicular helper cell development. *J Immunol*. 2010;185(1):313–26.
120. He J, Tsai LM, Leong YA, Hu X, Ma CS, Chevalier N, et al. Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5⁺ CD4⁺ T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity*. 2013;39(4):770–81.

121. Schmitt N, Bentebibel SE, Ueno H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunol.* 2014;35(9):436–42.
122. Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity.* 2000;13(2):199–212.
123. Kurosu T, Fukuda T, Miki T, Miura O. BCL6 overexpression prevents increase in reactive oxygen species and inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic reagents in B-cell lymphoma cells. *Oncogene.* 2003;22(29):4459–68.
124. Huang X, Wu H, Qiu H, Yang H, Deng Y, Zhao M, et al. The expression of Bcl-6 in circulating follicular helper-like T cells positively correlates with the disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2016;173:161–70.
125. Ferguson SE, Han S, Kelsoe G, Thompson CB. CD28 is required for germinal center formation. *J Immunol.* 1996;156(12):4576–81.
126. Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, et al. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature.* 2001;409(6816):97–101.
127. Grimbacher B, Warnatz K, Peter HH. The immunological synapse for B-cell memory: the role of the ICOS and its ligand for the longevity of humoral immunity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2003;3(6):409–19.
128. Mak TW, Shahinian A, Yoshinaga SK, Wakeham A, Boucher LM, Puntillie M, et al. Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses. *Nat Immunol.* 2003;4(8):765–72.
129. McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, et al. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature.* 2001;409(6816):102–5.
130. Kawamoto S, Tran TH, Maruya M, Suzuki K, Doi Y, Tsutsui Y, et al. The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science.* 2012;336(6080):485–9.
131. Ansel KM, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, McHeyzer-Williams MG, Cyster JG. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J Exp Med.* 1999;190(8):1123–34.
132. Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity.* 2009;30(3):324–35.
133. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12(6):492–9.
134. Kawabe T, Naka T, Yoshida K, Tanaka T, Fujiwara H, Suematsu S, et al. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity.* 1994;1(3):167–78.
135. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol.* 2000;67(1):2–17.

136. Kawabe T, Matsushima M, Hashimoto N, Imaizumi K, Hasegawa Y. CD40/CD40 ligand interactions in immune responses and pulmonary immunity. *Nagoya J Med Sci.* 2011;73(3-4):69–78.
137. Arpin C, Déchanet J, Van Kooten C, Merville P, Grouard G, Brière F, et al. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science.* 1995;268(5211):720–2.
138. Warnatz K, Bossaller L, Salzer U, Skrabl-Baumgartner A, Schwinger W, van der Burg M, et al. Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood.* 2006;107(8):3045–52.
139. Spolski R, Leonard WJ. IL-21 and T follicular helper cells. *Int Immunol.* 2010;22(1):7–12.
140. Shulman Z, Gitlin AD, Weinstein JS, Lainez B, Esplugues E, Flavell RA, et al. Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science.* 2014;345(6200):1058–62.
141. Amodio D, Cotugno N, Macchiarulo G, Rocca S, Dimopoulos Y, Castrucci MR, et al. Quantitative multiplexed imaging analysis reveals a strong association between immunogen-specific B cell responses and tonsillar germinal center Immune dynamics in children after Influenza vaccination. *J Immunol.* 2018;200(2):538–50.
142. Pérez ME, Billordo LA, Baz P, Fainboim L, Arana E. Human memory B cells isolated from blood and tonsils are functionally distinctive. *Immunol Cell Biol.* 2014;92(10):882–7.
143. Ma CS, Suryani S, Avery DT, Chan A, Nanan R, Santner-Nanan B, et al. Early commitment of naïve human CD4(+) T cells to the T follicular helper (T(FH)) cell lineage is induced by IL-12. *Immunol Cell Biol.* 2009;87(8):590–600.
144. Schmitt N, Morita R, Bourdery L, Bentebibel SE, Zurawski SM, Banchereau J, et al. Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12. *Immunity.* 2009;31(1):158–69.
145. Borte S, Pan-Hammarström Q, Liu C, Sack U, Borte M, Wagner U, et al. Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Blood.* 2009;114(19):4089–98.

Abstract

Introduction: Follicular T cells represent a subpopulation of T lymphocytes that have the function of assisting B cells in the production of high affinity antibodies through somatic hypermutation and class switching. Follicular T cells found mainly in the germinal centers, but also described in the blood called a circulating follicular T cells. The role of follicular T cells in infectious and autoimmune diseases is essential to clarify an effective immune response. Moreover, considering the recent description that follicular T cells found in the circulation may reflect the status of the germinal centers. It is possible to consider that the analysis of this cell population, as well as cell subpopulation in the periphery, allows the supply of important state data general immunological status in any type of disease in which biopsy of secondary lymphoid organs is difficult or none. **Purposes:** We investigated the profile of follicular T cells present in secondary lymphoid organs from tonsil analyzes, as well as the presence and quantitative and phenotypic comparison of these populations in the blood. In parallel, we evaluated B lymphocyte subpopulations, the main cells that interact with follicular T cells. **Methods and Results:** The characterization and quantification of follicular T cell populations in the tonsils as well as the circulating blood cells of “healthy” donors (without reports of disease during anamnesis) were performed followed by comparison of these populations in both compartments. The results confirm the presence of follicular T-cell markers in secondary lymphoid organs, a profile very similar to that observed in blood (periphery). For B cell subpopulation markers (IgD + CD38 + - germinal center, IgD-CD38 - memory, IgD-CD38 + -plasmoblasts, IgD + CD38 - naive) also appear to have very similar profiles in both environments studied in donor samples healthy, with high frequency for memory and naive cells, and low frequency for germinal center and plasmoblasts. **Conclusions:** This work demonstrates that, although in different amounts, there appear to be the same markers in blood populations and secondary lymphoid organs. With the advancement of research, we will come to the study model that we can use for any type of disease where biopsy of secondary lymphoid organs not indicated.

Keywords: Follicular CD4 T cells; Germinal center; B cells; Palatine tonsils

Apêndice

Apêndice 1. Perfil dos doadores das amostras de sangue e tonsila palatinas

Doador	IMC	Diabetes	Apneia	Vacinas em dia	Medicações
1	23	N	S	S	Anti-histamínico
2	20	N	S	N	Corticoide Nasal, anti-hipertensivo, Estatina
3	25	N	N	N	Sem descrição
4	22	N	N	N	Sem descrição
5	21	N	N	N	Anti-histamínico
6	23	N	N	S	Sem descrição
7	24	N	N	S	Anti-histamínico
8	23	N	N	S	Anti-histamínico
9	22	N	N	S	Corticoide Nasal
10	21	N	N	S	Corticoide Nasal
11	19	N	N	S	Corticoide Nasal
12	22	N	N	S	Corticoide Nasal
13	24	N	N	S	Sem descrição
14	24	N	N	S	Sem descrição
15	25	N	S	S	Corticoide Nasal, anti-hipertensivo, Estatina
16	22	N	N	N	Sem descrição
17	19	N	N	S	Sem descrição
18	24	N	N	S	Sem descrição

IMC: índice de massa corporal; N: não; S: sim.