

**TÁBATA TAKAHASHI FRANÇA**

**GENÓTIPO E FENÓTIPO DE PACIENTES LATINO-AMERICANOS  
COM DEFICIÊNCIA DE CD40L E NOVOS MECANISMOS  
IMUNOPATOLÓGICOS ASSOCIADOS À DOENÇA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da  
Universidade de São Paulo, para obtenção de Título  
de Doutora em Ciências.

São Paulo

2021

**TÁBATA TAKAHASHI FRANÇA**

**GENÓTIPO E FENÓTIPO DE PACIENTES LATINO-AMERICANOS  
COM DEFICIÊNCIA DE CD40L E NOVOS MECANISMOS  
IMUNOPATOLÓGICOS ASSOCIADOS À DOENÇA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto  
Coorientador: Dr. Otávio Cabral Marques

Versão Original.

São Paulo

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidata: Tábata Takahashi França  
Título da Dissertação: **Genótipo e fenótipo de pacientes latino-americanos com deficiência de CD40L e novos mecanismos imunopatológicos associados à doença.**

•  
Orientador: Prof. Dr. Antônio Condino Neto  
Coorientador: Dr. Otávio Cabral Marques

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou  
( ) **Aprovada**      ( ) **Reprovada**

Examinador (a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000  
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 17 de outubro de 2017.

**PARECER 1358/CEPSH**

CAAE nº 69005017.2.0000.5467

Protocolo CEPSH-ICB nº 1390/17

O Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE NEUTRÓFILOS EM PACIENTES COM DEFICIÊNCIA DE CD40L**", do pesquisador Prof. Dr. **Antonio Condino Neto** e da aluna Tábata Takahashi França.

Caberá aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: [www2.icb.usp.br/ich/cepsH](http://www2.icb.usp.br/ich/cepsH), como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria do CEP em **17/10/2018**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**  
Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

À minha família,  
pois a ela devo tudo que sou,  
pois sem ela eu nada seria...

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo e antes de mais nada, agradeço e dedico este trabalho à minha família...

Aos meus pais, Ildeu e Masae, por todo amor, ensinamentos, apoio e incentivo incondicional em todos momentos da minha vida.

Às minhas irmãs, Natalia e Talita, por toda amizade, momentos vividos, palavras de apoio, gestos de carinho e por estarem sempre presentes em minha vida.

À minha amada sobrinha Giovanna, por trazer sempre tanta luz e alegria à minha vida.

Aos meus cunhados, tios, tias, primos e primas, que por serem tantos se torna impossível citar um a um, por sempre acreditarem em mim e por comemorarem cada uma de minhas conquistas.

Agradeço aos meus tutores...

Professor Dr. Antônio Condino Neto, meu orientador nesta caminhada, pela oportunidade, orientação, conselhos, ensinamentos e por acreditar no meu potencial.

Dr. Otávio Cabral Marques, meu coorientador, pelos ensinamentos, orientação, apoio e incentivo essenciais ao desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Dr. Basel Al-Ramadi, meu orientador durante o estágio nos Emirados Árabes Unidos, pela oportunidade, apoio e ensinamentos, assim como à toda sua equipe pela amizade e por me acolherem tão bem e me fazerem sentir em casa mesmo estando tão distante.

Com muito carinho, agradeço aos meus amigos de laboratório (os quais levarei para a vida) ...

Christina Arslanian, pela amizade incondicional, palavras de incentivo e apoio, ombro amigo nos momentos difíceis e por tornar o dia a dia do laboratório mais fácil e acolhedor.

Lucila Barreiros, minha parceira de caminhada na pós-graduação, por todo companheirismo, momentos compartilhados, angustias divididas e apoio constante.

Silvana Lucchini, pelo apoio, suporte e carinho de sempre.

Leticia, Renata, Lillian, Sarah, Ranieri, Raissa, Tiago e a tantos outros que não estão mais por perto, mas que contribuíram imensamente para este trabalho, por toda parceria, discussões científicas, risadas, aprendizados, conquistas compartilhadas e vitórias comemoradas.

E claro, não poderia deixar de agradecer...

Aos amigos da vida, em especial Marcela, Márita e Shirley, por toda amizade e apoio, por celebrarem cada uma de minhas vitórias e por nunca me deixarem esquecer que há vida além do laboratório.

Às médicas Dra. Carolina Aranda, Dra. Cristina Worm Weber, Dra. Carolina Prando, Dra. Janáira Ferreira, Dra. Mayra Dorna e Dra. Beatriz Costa Carvalho (em memória), bem como às suas respectivas equipes, pela imensa colaboração, coleta e envio de amostras de sangue de pacientes, sem as quais este trabalho não teria sido possível.

Aos pacientes e aos seus pais e responsáveis, para os quais este trabalho é realizado, por aceitarem participar deste estudo e entenderem a importância da pesquisa.

Aos integrantes da banca de qualificação Professora Dra. Sônia Jancar, Professor Dr. Alexandre Barbuto e Dra. Cristiane Naffah, pelas ricas críticas e sugestões durante o Exame de Qualificação.

Aos amigos do Departamento de Imunologia, em especial Eni e Aurea, pelo suporte, apoio e carinho sempre presentes.

Aos Professores do Departamento de Imunologia, em especial Professor Dr. Niels Olsen, por todo conhecimento compartilhado e palavras de incentivo sempre presentes.

Aos colegas de Departamento de Imunologia por todos os momentos vividos.

## **Agradecimento especial**

Agradeço especialmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado e auxílio concedido (processo nº 2015/01699-3), sem o qual não seria possível a realização deste estudo.



“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,  
mais evidente fica nossa ignorância”.

(John F. Kennedy)

## RESUMO

FRANÇA, T. T. **Genótipo e fenótipo de pacientes latino-americanos com deficiência de CD40L e novos mecanismos imunopatológicos associados à doença.** 2021. 108 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Pacientes com deficiência de CD40L apresentam manifestações clínicas graves e heterogêneas, além de maior suscetibilidade a infecções de repetição causadas por diferentes classes de microrganismos, que se apresentam já nos primeiros anos de vida e contribuem de maneira significativa para a mortalidade desses indivíduos. Uma das características clínicas mais marcantes da deficiência de CD40L é a neutropenia, manifestação hematológica que afeta aproximadamente 70% dos indivíduos com a doença. Os neutrófilos são a primeira linha de defesa contra patógenos, mediando reações inflamatórias e participando do controle de infecções. Essas células são produzidas na medula óssea em um processo denominado granulopoiese, no qual as células progenitoras se diferenciam sequencialmente até atingirem o estágio final de neutrófilos maduros. Nosso grupo demonstrou anteriormente que, além de apresentar alterações no número de neutrófilos, pacientes com deficiência de CD40L apresentam neutrófilos circulantes com respostas efetoras prejudicadas, sugerindo falhas no desenvolvimento celular. Assim, o presente trabalho teve duas linhas principais de estudo: a caracterização clínica, laboratorial e genética de pacientes latino-americanos deficientes de CD40L e a investigação dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e tráfego de neutrófilos na deficiência de CD40L. Para tanto, analisamos dados retrospectivos de 50 pacientes latino-americanos afetados pela síndrome e investigamos o efeito da deficiência de CD40L no desenvolvimento e tráfego de neutrófilos por meio de avaliações funcionais e análise do transcriptoma de neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L e camundongos nocaute para o gene *Cd40lg* (camundongos CD40L<sup>-/-</sup>). Clinicamente, caracterizamos a maior coorte de pacientes latino-americanos com deficiência de CD40L, descrevemos seis novas variantes no *CD40LG* e apresentamos o maior número de patógenos já relatado em uma única coorte de pacientes com deficiência de CD40L. Os resultados experimentais revelaram que os neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L apresentaram defeitos na migração *in vitro*, mecanismo imunopatológico até então não descrito na síndrome. Além disso, camundongos CD40L<sup>-/-</sup> apresentaram desregulação na geração de neutrófilos na medula óssea e redução no número celular em órgãos periféricos. Corroborando esses resultados, a análise do transcriptoma de neutrófilos de camundongos CD40L<sup>-/-</sup> e pacientes com deficiência de CD40L aponta para desregulação na granulopoiese e tráfego celular. Juntos, os resultados obtidos apontam para defeitos na geração e distribuição dos neutrófilos na ausência de CD40L. A caracterização clínica e a elucidação dos mecanismos envolvidos na deficiência de CD40L contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos imunopatológicos associados à doença e permite o avanço no conhecimento sobre o papel do CD40L no desenvolvimento celular e na resposta imune.

**Palavras-chave:** CD40 ligante. Deficiência de CD40L. Neutrófilo. Granulopoiese. Desenvolvimento celular. Tráfego celular.

## ABSTRACT

FRANÇA, T. T. **Genotype and phenotype of Latin American patients with CD40L deficiency and new immunopathological mechanisms associated with the disease.** 2021. 108 p. Ph.D. thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Patients with CD40L deficiency present severe and heterogeneous clinical manifestations and increased susceptibility to recurrent infections caused by different classes of microorganisms, which begin in the first years of life and significantly contribute to the mortality of these patients. One of the main clinical features of CD40L-deficient patients is neutropenia, a hematologic manifestation that affects approximately 70% of individuals with the disease. Neutrophils are the first line of defense against pathogens, mediating inflammatory reactions and participating in infection control. These cells are produced in the bone marrow in a process called granulopoiesis, in which the progenitor cells sequentially differentiate until they reach the final stage of mature neutrophils. Our group has previously shown that, in addition to presenting changes in neutrophils' number, patients with CD40L deficiency have circulating neutrophils with impaired effector responses, suggesting failures in cell development. Thus, the present work had two main lines of study: the clinical, laboratory, and genetic characterization of Latin-American patients with CD40L deficiency and the investigation of the molecular mechanisms involved in the development and trafficking of neutrophils in the CD40L deficiency. We retrospectively analyzed data from 50 Latin-American patients affected by the syndrome and investigated the effect of CD40L deficiency on the development and trafficking of neutrophils through functional experiments and transcriptome analysis of neutrophils from patients with CD40L deficiency and knockout mice for *Cd40lg* (CD40L<sup>-/-</sup> mice). Clinically, we characterized the largest cohort of Latin American patients with CD40L deficiency, described six new variants in *CD40LG*, and presented the largest number of pathogens reported so far in a single cohort of CD40L-deficient patients. Experimentally, we revealed that neutrophils from patients with CD40L deficiency showed *in vitro* migration defects, an immunopathological mechanism not previously described in the syndrome. Furthermore, CD40L<sup>-/-</sup> mice showed dysregulation in the generation of neutrophils in the bone marrow and reduced cell number in peripheral organs. Corroborating these results, the transcriptome analysis of CD40L<sup>-/-</sup> mice and patients with CD40L deficiency suggests dysregulation in granulopoiesis and neutrophil trafficking. Together, these results point to defects in the generation and distribution of neutrophils in the absence of CD40L. The clinical characterization and elucidation of the mechanisms involved in the CD40L deficiency contribute to a better understanding of the immunopathological mechanisms associated with the disease and advance the understanding of the role of CD40L in cell development and immune response.

**Keywords:** CD40 ligand. CD40L deficiency. Neutrophil. Granulopoiesis. Cell development. Cell traffic.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** A interação CD40L-CD40 na resposta imune.
- Figura 2-** Geração e tráfego de neutrófilos na medula óssea.
- Figura 3-** Fluxograma da coleta de dados epidemiológicos.
- Figura 4-** Apresentação clínica no momento do diagnóstico e níveis de imunoglobulina antes da reposição com imunoglobulina intravenosa (IVIG).
- Figura 5-** Micro-organismos isolados na coorte de estudo.
- Figura 6-** Fluxograma experimental do diagnóstico de pacientes com deficiência de CD40L.
- Figura 7-** Estratégia de análise utilizada para avaliação da expressão de CD40L.
- Figura 8-** Pacientes identificados com deficiência de CD40L.
- Figura 9-** Expressão de CD40L em portadoras sadias da mutação.
- Figura 10-** Variantes identificadas no *CD40LG*.
- Figura 11-** Investigação genética do paciente P15.
- Figura 12-** Delineamento do trabalho experimental realizado com amostras humanas e camundongos.
- Figura 13-** Fluxograma experimental dos ensaios realizados com neutrófilos humanos.
- Figura 14-** Fluxograma experimental dos ensaios realizados com camundongos CD40L<sup>-/-</sup>.
- Figura 15-** Estratégia de análise e gráfico de pontos representativos do ensaio de migração.
- Figura 16-** Avaliação da capacidade migratória de neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L em resposta a estímulos quimioatraentes.
- Figura 17-** Variação da migração apresentada pelos pacientes com deficiência de CD40L avaliados em diferentes momentos.
- Figura 18-** Expressão dos receptores FPR1, CXCR2 e C5aR em neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L.
- Figura 19-** Comparação entre resposta migratória e expressão de receptores.
- Figura 20-** Avaliação da polimerização da actina em neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L após estimulação com quimioatraentes.
- Figura 21-** Microscopia de fluorescência da actina polimerizada após ativação celular.
- Figura 22-** Avaliação das populações de células mielóides totais, neutrófilos e monócitos na medula óssea.
- Figura 23-** Avaliação da distribuição das células linfóides na medula óssea.

**Figura 24-** Avaliação da distribuição das populações de células mielóides totais, neutrófilos e monócitos no baço.

**Figura 25-** Avaliação da distribuição das populações de células mielóides totais, neutrófilos e monócitos na cavidade peritoneal.

**Figura 26-** Avaliação das células linfóides no baço e na cavidade peritoneal.

**Figura 27-** Análise do transcriptoma de neutrófilos da medula óssea de camundongos CD40L<sup>-/-</sup>.

**Figura 28-** Processos biológicos afetados em camundongos CD40<sup>-/-</sup>.

**Figura 29-** Assinatura transcriptômica das fases de desenvolvimento de neutrófilos da medula óssea (MO).

**Figura 30-** Genes diferencialmente expressos (DEGs) exibidos em estágios normais de desenvolvimento dos neutrófilos e sua comparação com perfil apresentado por camundongos CD40L<sup>-/-</sup>.

**Figura 31-** Comparação do perfil transcricional exibido por neutrófilos nos estágios normais de desenvolvimento com o perfil exibido por camundongos CD40L<sup>-/-</sup>.

**Figura 32-** Vias de sinalização enriquecidas nos estágios normais de desenvolvimento dos neutrófilos e alteradas em camundongos CD40L<sup>-/-</sup>.

**Figura 33-** Comparação do perfil transcricional apresentado por neutrófilos de camundongos CD40<sup>-/-</sup> e de pacientes com deficiência de CD40L.

**Figura 34-** Processos desregulados na deficiência de CD40L em camundongos e humanos.

**Figura 35-** Mecanismo proposto de granulopoiese induzida por CD40L.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Manifestações clínicas na deficiência de CD40L.

**Tabela 2-** Características demográficas de pacientes latino-americanos com deficiência de CD40L.

**Tabela 3-** Características genéticas e moleculares da população de estudo.

**Tabela 4-** Manifestações clínicas apresentadas durante a vida.

**Tabela 5-** Transplante de células tronco hematopoiéticas.

**Tabela 6-** Causas de falecimento.

**Tabela 7-** Sequência dos *primers* utilizados para sequenciamento do *CD40LG*.

**Tabela 8-** Agentes infecciosos isolados, mutações identificadas e ensaios realizados na coorte de estudo.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	célula apresentadora de antígeno
B6	camundongos B57L/6
CD40-Ig	molécula de fusão CD40-muIg
CD40L	CD40 ligante
CD40L <sup>-/-</sup>	camundongos nocaute para o gene <i>Cd40lg</i>
<i>CD40LG</i>	gene codificante da molécula CD40 ligante
CD40Ls	CD40 ligante solúvel
CMV	Citomegalovírus
CSR	troca de classe das imunoglobulinas
DC	célula dendrítica
DEGs	genes diferencialmente expressos
EII	erros inatos da imunidade
EROs	espécies reativas do oxigênio
FSC	parâmetro de tamanho celular
G-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos
GPCR	receptores acoplados à proteína G
HIGM	síndrome de hiper-IgM
Ig	imunoglobulina
IVIG	imunoglobulina intravenosa
LASID	Sociedade Latino-americana de Imunodeficiências
MFI	mediana da intensidade de fluorescência
MO	medula óssea
NETs	armadilhas extracelulares de neutrófilos
PBS	solução salina tamponada com fosfato
RhG-CSF	G-CSF humano recombinante
RNAseq	sequenciamento do RNA
SHM	hipermutação somática
SSC	parâmetro de complexidade celular
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCTH	transplante de células tronco hematopoiéticas
WT	Sem mutação
X-HIGM	síndrome de hiper-IgM ligada ao X

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Erros inatos da imunidade: um breve olhar sobre o panorama atual.....	18
1.2. As Síndromes de Hiper IgM e sua forma ligada ao X, a deficiência de CD40L.....	19
1.3. Características moleculares e papel do CD40L na resposta imune. ....	21
1.4. Os neutrófilos na saúde e na doença.....	24
1.5. Os neutrófilos e a deficiência de CD40L. ....	27
CAPITULO 1 - ASPECTOS CLÍNICOS, GENÉTICOS E LABORATORIAIS DE PACIENTES LATINO-AMERICANOS COM DEFICIÊNCIA DE CD40L .....	29
2. OBJETIVO.....	30
2.1. Objetivo geral .....	30
2.2. Objetivos específicos .....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
3.1. Critérios de inclusão .....	31
3.2. Coleta dos dados.....	31
3.3. Análise de dados.....	32
4. RESULTADOS .....	33
4.1. Características demográficas de pacientes latino-americanos com deficiência de CD40L .....	33
4.2. Heterogeneidade das características genéticas e moleculares: mutações hipomórficas, proteínas não funcionais e novas mutações .....	34
4.3. Sintomas iniciais da doença: variação na apresentação clínica e nos valores de imunoglobulinas.....	36
4.4. Manifestações clínicas ao longo da vida: apresentações clínicas graves e recorrentes e amplo espectro de patógenos causadores de infecções.....	37
4.5. Desfecho da doença: Transplante de células tronco hematopoiéticas e óbitos .....	39
CAPITULO 2 - IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTES COM DEFICIÊNCIA DE CD40L. ...	41
5. OBJETIVO.....	42
5.1. Objetivo geral .....	42



5.2.	Objetivos específicos .....	42
6.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	43
6.1.	Indivíduos incluídos no estudo.....	43
6.2.	Obtenção de células mononucleares de sangue periférico.....	44
6.3.	Ativação celular e avaliação da expressão de CD40L.....	44
6.4.	Investigação genética .....	45
7.	RESULTADOS .....	47
7.1.	Identificação de nove pacientes com deficiência de CD40L .....	47
7.2.	Variantes identificadas no <i>CD40LG</i> .....	50
CAPITULO 3 - O PAPEL DO CD40L NO DESENVOLVIMENTO E TRÁFEGO DE NEUTRÓFILOS.....		53
8.	OBJETIVO.....	54
8.1.	Objetivo Geral .....	54
8.2.	Objetivos específicos .....	54
9.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	55
9.1.	Estudo com amostras humanas.....	55
9.1.1.	Pacientes envolvidos no estudo .....	56
9.1.2.	Isolamento de neutrófilos de sangue periférico.....	57
9.1.3.	Ensaio de migração.....	58
9.1.4.	Expressão de receptores de quimiocinas.....	58
9.1.5.	Avaliação da polimerização da actina.....	59
9.2.	Estudo com modelo animal .....	60
9.2.1.	Camundongos selvagens e nocautes para o $Cd40lg^{-}$ .....	60
9.2.2.	Coleta de células da cavidade peritoneal, baço e medula óssea .....	61
9.2.3.	Fenotipagem celular.....	61
9.2.4.	Isolamento de neutrófilos da medula óssea e sequenciamento do RNA .....	62
9.3.	Seleção de dados de sequenciamento públicos .....	63
9.4.	Análise bioinformática.....	63
9.5.	Análise estatística .....	64

10. RESULTADOS .....	65
10.1. Neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L apresentam defeitos na migração em resposta à quimiocina IL-8.....	65
10.2. Variação na expressão dos receptores FPR1, CXCR2 e C5aR em neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L.....	67
10.3. Neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L apresentam níveis normais de polimerização da actina .....	69
10.4. Camundongos CD40L <sup>-/-</sup> apresentam alteração na mielopoiese e granulopoiese .....	70
10.5. Redução das células mielóides em órgãos periféricos de camundongos CD40L <sup>-/-</sup> ...	72
10.6. Neutrófilos de camundongos CD40L <sup>-/-</sup> apresentam desregulação no transcriptoma	75
10.7. A ausência de CD40L interfere na trajetória de maturação de neutrófilos, resultando na geração de células com perfil transcricional distinto.....	78
10.8. A deficiência de CD40L desregula processos essenciais ao desenvolvimento e tráfego de neutrófilos em camundongos e humanos .....	81
11. DISCUSSÃO.....	84
CONCLUSÕES FINAIS.....	92
12. REFERÊNCIAS .....	93
ANEXOS.....	102

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Erros inatos da imunidade: um breve olhar sobre o panorama atual

Os Erros Inatos da Imunidade (EII), também conhecidos como Imunodeficiências Primárias, são um grupo de desordens genéticas congênitas que podem comprometer o funcionamento de diferentes componentes do sistema imune<sup>1</sup>. Como consequência dessas alterações, indivíduos portadores de EIIs são susceptíveis à infecções graves e recorrentes, desordens autoimunes e neoplasias<sup>2</sup>. A última atualização publicada pela União Internacional das Sociedades de Imunologia em 2021 reportou a existência de 456 defeitos monogênicos<sup>3</sup>, números que tem aumentado rapidamente nos últimos anos em decorrência dos avanços tecnológicos e científicos na área do diagnóstico de doenças genéticas<sup>1,4</sup>.

Embora os EIIs sejam classicamente considerados doenças raras, dados atuais indicam que essas doenças são mais frequentes do que inicialmente imaginado, apresentando prevalência coletiva estimada de 1/1.000 à 1/5.000 de indivíduos (variação de acordo com a doença e população estudada)<sup>5</sup>. De acordo com dados recentes da Sociedade Latino-Americana de Imunodeficiências (LASID, do inglês *Latin-American Society for Immunodeficiencies*), o Brasil tem atualmente 1.988 pacientes com EIIs registrados em seu sistema (fonte: <https://lasidregistry.org/view/statistics/general/2021-06>), número que representa prevalência de aproximadamente um paciente com EII para cada 107 mil habitantes (dados coletados em agosto de 2021; população brasileira estimada em 214 milhões). Embora estes números abaixo da prevalência mundial estimada possam ser parcialmente atribuídos à ausência de cadastro no sistema, eles também sugerem que milhares de pacientes brasileiros com EIIs podem estar sem diagnóstico definido e, conseqüentemente, sem tratamento adequado.

Os EII são classificados em 9 grupos de acordo com o defeito imunológico associado<sup>1</sup>. O grupo de doenças classificadas como “Imunodeficiências que Afetam a Imunidade Celular e Humoral” são imunodeficiências combinadas nas quais o funcionamento de ambos componentes celulares e humorais da imunidade encontram-se afetados, resultando em desordens complexas e de fenótipos heterogêneos<sup>1,2,4,6</sup>. Inserida no subgrupo de imunodeficiências combinadas podemos encontrar a deficiência de CD40 ligante (CD40L), também conhecida como Síndrome de hiper-IgM ligada ao X (X-HIGM, do inglês *X-linked Hyper-immunoglobulin M syndrome*), pois embora esta síndrome tenha sido inicialmente

caracterizada como uma imunodeficiência predominantemente de anticorpos, pacientes com esta doença também apresentam defeitos nos componentes celulares da imunidade inata e adquirida, afetando desta maneira a resposta imune em sua totalidade<sup>1,7</sup>.

## 1.2. As Síndromes de Hiper IgM e sua forma ligada ao X, a deficiência de CD40L

As Síndromes de Hiper-IgM (HIGMs, do inglês *Hyper-immunoglobulin M syndrome*) compreendem um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas clinicamente por níveis séricos normais ou elevados de IgM associados à redução ou ausência das demais classes de anticorpos<sup>8</sup>. As HIGMs de origem genética podem apresentar padrão de herança autossômica recessiva (variantes nos genes codificantes das moléculas CD40, AID, UNG, ATM e PMS2), autossômica dominante (variantes em  $I\kappa B\alpha$ , AID ou PI3K) e ligada ao X (variantes no CD40L e NEMO), podendo resultar em doenças distintas e com apresentações clínicas variadas de acordo com a molécula afetada<sup>8-10</sup>.

As variantes causadoras das HIGM resultam em defeitos na troca de classe das imunoglobulinas (CSR, do inglês *class-switch recombination*) e possível comprometimento na hipermutação somática das imunoglobulinas (SHM, do inglês *somatic hypermutation*) gerados pela ausência ou desregulação no funcionamento de moléculas envolvidas nestes processos<sup>9-12</sup>. A CSR e a SHM são dois processos críticos na produção e maturação dos anticorpos que ocorrem em decorrência da interação dos linfócitos T com os linfócitos B. Essa interação de células T-B induz a troca na produção de imunoglobulinas (Igs) da classe IgM (Ig expressa por linfócitos B virgens e secretada após ativação T independente) pela geração e secreção das demais classes de Igs (IgG, IgA e IgE), além de induzir a maturação da afinidade das Igs via SHM, processo que resulta na produção de anticorpos com alta afinidade de ligação ao antígeno<sup>13</sup>.

Embora diversos genes tenham sido associados às HIGMs, aproximadamente 60-70% dos casos notificados são causados por mutações no gene *CD40LG*, que resultam na forma da doença ligada ao X, a X-HIGM ou deficiência de CD40L<sup>14,15</sup>. A deficiência de CD40L é uma imunodeficiência rara, com incidência global estimada de aproximadamente 1/1.000.000 de indivíduos e que afeta indivíduos do sexo masculino<sup>16,17</sup>. Os primeiros casos da doença foram relatados em 1961 de maneira independente pelos médicos Rosen e Burtin, os quais descreveram pacientes que apresentavam linfonodos pouco organizados com ausência de

centros germinativos e níveis séricos elevados de IgM associados à redução de IgG, razão pela qual a doença foi inicialmente chamada de Disgamaglobulinemia<sup>18-20</sup>.

Pacientes com deficiência de CD40L apresentam manifestações clínicas graves com espectro clínico variado<sup>9,15</sup> (**Tabela 1**). Esta característica se deve ao fato de que a sinalização gerada pelo CD40L exerce papel essencial não somente nos processos de CSR e SHM supracitados, mas também medeia outros diversos processos no organismo (discutidos no decorrer deste capítulo).

**Tabela 1. Manifestações clínicas na deficiência de CD40L\*.**

<b>Manifestações clínicas</b>	<b>N (%)</b>
Pneumonia	110 (81)
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	56 (41)
Infecção do trato respiratório superior	88 (65)
Neutropenia	88 (65)
Crônica	52 (38)
Intermitente/ cíclica	36 (27)
Anemia	30 (22)
Diarreia	55 (41)
Úlcera oral	49 (36)
Sepse	18 (13)
Hepatite	16 (12)
Colangite esclerosante	16 (12)
Infecções do sistema nervoso central	16 (12)
Tumores	5 (4)

\* Adaptado de Qamar e Fuleihan, 2014<sup>12</sup>.

Pacientes deficientes de CD40L apresentam infecções recorrentes e graves já no primeiro ano de vida e são susceptíveis a infecções oportunistas causadas por diversas classes de patógenos como bactérias, vírus, parasitas e fungos<sup>11,15,21</sup>. Vale ressaltar que o espectro de agentes etiológicos causadores de infecções pode variar de acordo com as condições ambientais (exposição aos patógenos) e socioeconômicas (acesso ao saneamento básico), podendo dessa maneira influenciar no fenótipo da doença<sup>9,22</sup>. Além de infecções recorrentes, pacientes com deficiência de CD40L também apresentam outras manifestações clínicas graves como neutropenia, distúrbios gastrointestinais e quadros de sepse que, em conjunto, contribuem para a alta mortalidade associada à doença<sup>17,22</sup>.

Devido às alterações na produção de anticorpos, pacientes com deficiência de CD40L recebem terapia de reposição de Igs, tratamento que reduz significativamente a frequência e gravidade das infecções apresentadas por pacientes com defeitos na produção de anticorpos<sup>14,23-25</sup>. Associadas à reposição de Ig, terapias antibacterianas e antifúngicas podem

ser administradas para prevenir ou tratar infecções em curso<sup>6,22</sup>, enquanto a administração do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) recombinante humano (rhG-CSF) é comumente utilizado na tentativa de reverter os quadros de neutropenia grave desses pacientes<sup>26,27</sup>. Atualmente, a única opção terapêutica curativa para a deficiência de CD40L é o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH), e um número crescente de pacientes submetidos a este procedimento tem sido descritos na literatura<sup>28-32</sup>. No entanto, um estudo retrospectivo de coortes internacionais incluindo 176 pacientes com deficiência de CD40L provenientes de diversos países revelou ausência de diferença estatística significativa na sobrevida de pacientes tratados ou não com TCTH<sup>17</sup>. Além disso, o TCTH é ainda um desafio na América Latina, onde estima-se que menos de 10% dos transplantes necessários no tratamento de EIIs sejam realizados<sup>33</sup>.

Assim, apesar dos protocolos de tratamento mostrarem eficácia na redução da incidência das infecções apresentadas pelos pacientes com deficiência de CD40L, a sobrevida ainda é insatisfatória, e apenas aproximadamente 20% dos indivíduos afetados sobrevivem mais que 25 anos<sup>16</sup>. Complicações clínicas graves como infecções com risco de morte, quadros de colangite esclerosante e surgimento de malignidades se mantem frequentes mesmo em pacientes sob tratamento<sup>22</sup>, destacando a necessidade de um melhor entendimento dos mecanismos imunopatológicos associados à doença e do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que visem a melhora da qualidade de vida desses pacientes.

### **1.3. Características moleculares e papel do CD40L na resposta imune.**

Somente em 1993, vinte e dois anos depois dos primeiros casos de X-HIGM serem descritos por Rosen e Burtin, cinco grupos independentes descreveram a relação causal entre a X-HIGM e mutações no gene *CD40LG*<sup>34-38</sup>. Em humanos, o *CD40LG* encontra-se localizado no cromossomo X e é composto por cinco exons que codificam as porções intracelular, transmembrana e extracelular da molécula CD40L<sup>39,40</sup>. Variantes patogênicas no *CD40LG* podem resultar na ausência, redução, ou expressão de moléculas não funcionais de CD40L<sup>41</sup>. O CD40L, também conhecido como CD154 ou gp39, é uma proteína de membrana do tipo II pertencente à família do fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*)<sup>42,43</sup>. Esta molécula é altamente expressa por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e plaquetas ativadas e pode ser clivada em sua forma solúvel, o CD40Ls, e agir de maneira sistêmica<sup>44</sup>. O CD40L é também expresso em menor quantidade por linfócitos T CD8<sup>+</sup>, células NK, linfócitos B,

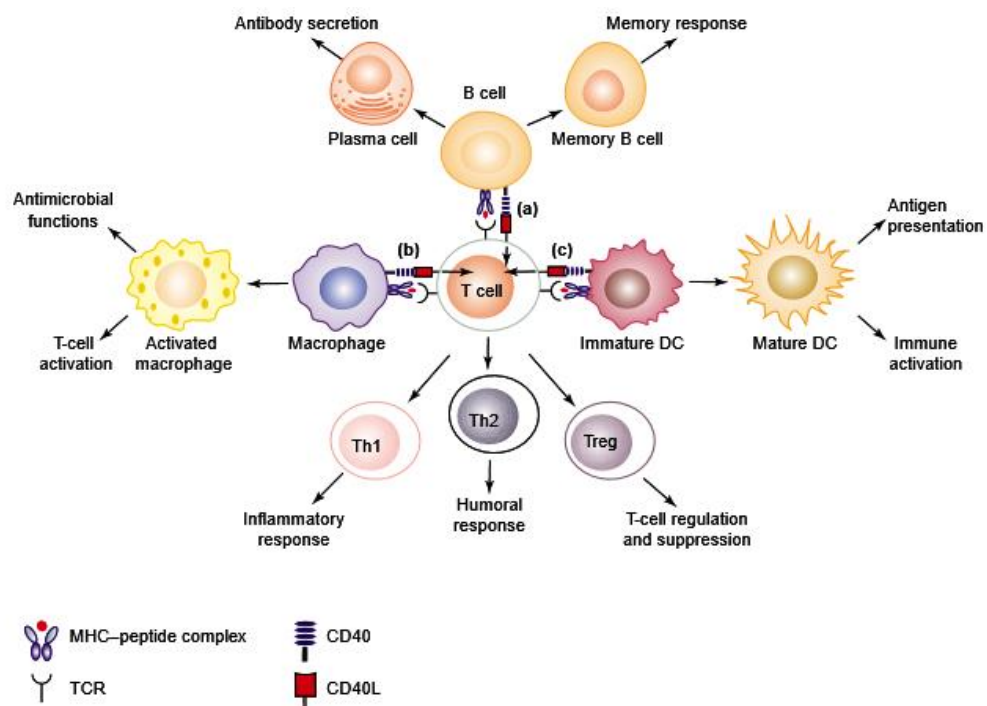
células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*), monócitos/macrófagos, células endoteliais, neutrófilos, entre outras células<sup>45</sup>.

O principal receptor do CD40L é o CD40, proteína transmembrana do tipo I pertencente à superfamília de receptores do TNF e seu gene se encontra localizado no cromossomo 20<sup>46</sup>. O CD40 é constitutivamente expresso em células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *antigen presenting cells*) como linfócitos B, macrófagos e DCs, sendo também expresso por plaquetas, células endoteliais, linfócitos T e neutrófilos após ativação<sup>45,47</sup>. A interação do CD40L com o CD40 induz o recrutamento de proteínas adaptadoras associadas ao receptor TNF (TRAF, do inglês *TNF-receptor associated factors*), predominantemente TRAF1, TRAF2 e TRAF6, que desencadeiam a ativação de diferentes vias de sinalização intracelulares, incluindo a ativação das vias do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, do inglês *nuclear factor  $\kappa$ B*) e JNK/p38/ERK<sup>47</sup>. A sinalização pode também ocorrer independente de proteínas TRAFs por meio de tirosinas quinases incluindo Jak3 e PI3K, gerando subsequente ativação da via Jak-STAT<sup>48,49</sup>. A estimulação destas diferentes vias culminam na ativação dos fatores de transcrição AP1, NF- $\kappa$ B e NF-AT e subsequente indução da expressão de genes relacionados a produção de citocinas e resposta celular<sup>48-50</sup>. Além disso, outras moléculas como o Mac-1,  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 e  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 também podem interagir com o CD40L<sup>51-53</sup>, destacando a importância da sinalização gerada pelo CD40L em diferentes contextos da resposta imune<sup>54</sup>.

O papel da interação CD40L-CD40 entre linfócitos T e APCs é amplamente conhecido<sup>50,55</sup>. Em linfócitos B, a interação CD40L-CD40 promove a formação do centro germinativo, a indução dos processos de CSR e SHM, e a geração de linfócitos B de memória<sup>56-60</sup>. Em DCs, a sinalização pelo CD40 induz a produção de citocinas e a expressão de moléculas coestimulatórias, gerando sinais para que essas células amadureçam e adquiram as características necessárias para ativação efetiva dos linfócitos T e desencadeamento da resposta imune adaptativa<sup>61</sup>. Em macrófagos, a interação CD40L-CD40 ativa a secreção de citocinas pro-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e interleucina 12 (IL-12), induz a produção de óxido nítrico (importante para a resposta contra o patógeno) e aumenta a capacidade de apresentação de antígenos<sup>62</sup> (**Figura 1**).

Todavia, papel do CD40L na manutenção da homeostasia corporal é muito mais abrangente do que inicialmente imaginado. Estudos demonstram que a deficiência de CD40L afeta não somente a resposta efetora de linfócitos T, mas também gera defeitos intrínsecos em células da linhagem mielocítica como DCs<sup>63,64</sup>, macrófagos<sup>65</sup> e neutrófilos<sup>66</sup>, comprometendo a ativação e respostas efectoras destas células. Além disso, a sinalização pelo CD40L também

está envolvida na amplificação e regulação de respostas inflamatórias<sup>48</sup>. Em células endoteliais vasculares, a interação do CD40Ls com o CD40 expresso por essas células induz o aumento da expressão de moléculas de adesão, como a E-selectina, a VCAM e a ICAM, e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, componentes envolvidos no recrutamento e extravasamento celular em direção ao sítio infeccioso<sup>67-69</sup>. Ainda no contexto inflamatório, a sinalização gerada pelo CD40Ls potencializa a migração dos leucócitos<sup>53,70</sup> e aumenta a expressão e ativação da molécula MAC-1 em neutrófilos<sup>71-73</sup>, importante para os processos de rolamento, adesão, transmigração e diapedese<sup>74</sup>.



**Figura 1. A interação CD40L-CD40 na resposta imune.** Linfócitos T CD4<sup>+</sup> expressando CD40L interagem com o CD40 expresso por APCs e induz diferentes funções em linfócitos B (a), macrófagos (b) e DCs (c)<sup>55</sup>.

Ademais, a interação CD40L-CD40 também é importante para a manutenção da homeostasia na medula óssea (MO)<sup>75</sup>, embora os mecanismos envolvidos ainda sejam pouco explorados. Células estromais da MO e células progenitoras mielocíticas expressam constitutivamente o receptor CD40 em sua superfície<sup>76</sup>. A sinalização gerada pelo CD40Ls induz as células estromais a secretarem o ligante de Flt3 (Flt3L), citocina importante na regulação do processo de hematopoiese<sup>77</sup>, e os fatores de crescimento celulares G-CSF e o fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos (GM-CSF)<sup>78</sup>, citocinas essenciais na regulação da mielopoiese (geração de células da linhagem mielóide) e da granulopoiese, processo no qual os neutrófilos são gerados<sup>78</sup>.



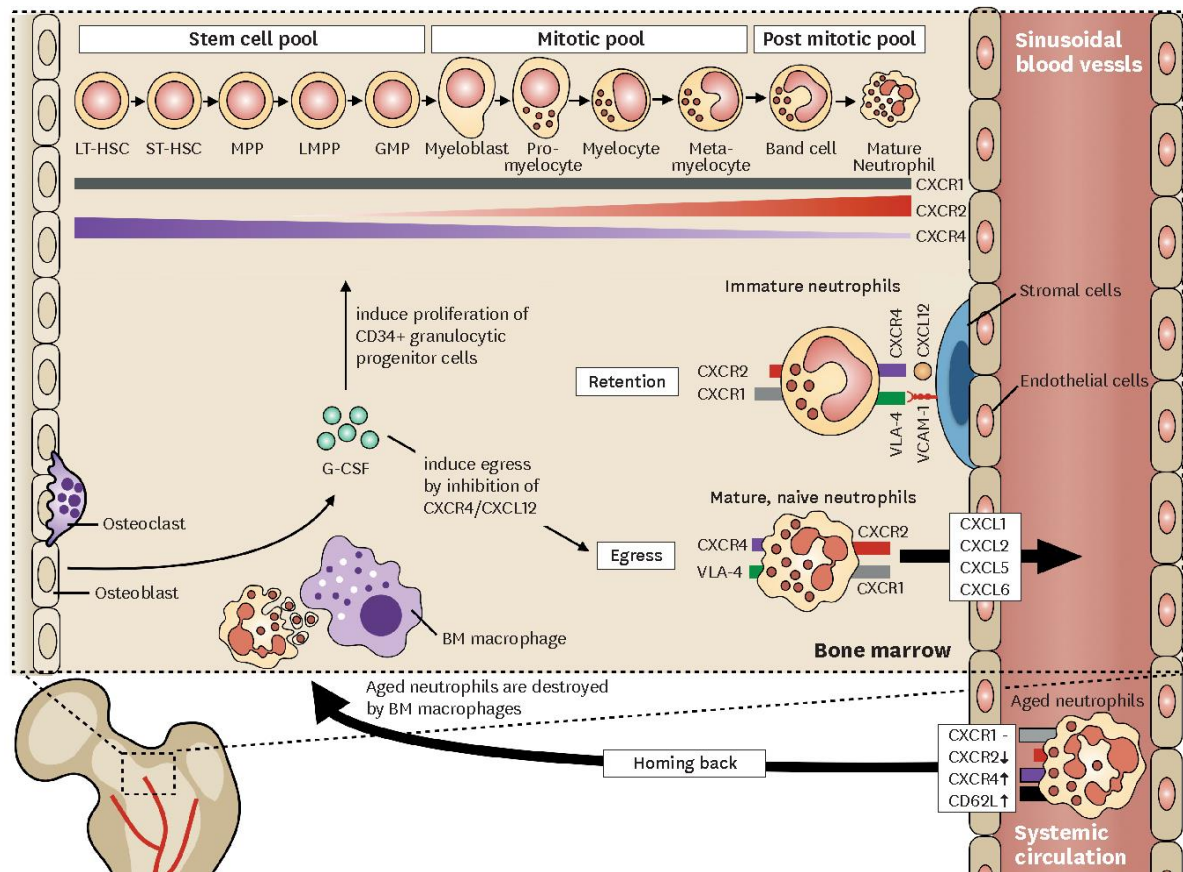
#### 1.4. Os neutrófilos na saúde e na doença.

Os neutrófilos são a população de leucócitos mais abundante na circulação sanguínea em humanos e possuem papel essencial na defesa do hospedeiro contra infecções<sup>79</sup>. Eles são os primeiros leucócitos a serem recrutados para o sítio inflamatório e compõem a primeira linha de defesa do hospedeiro na defesa contra microrganismos invasores, agindo ativamente na eliminação dos microrganismos e mediando o recrutamento de outros leucócitos para o sítio infeccioso<sup>80-82</sup>. Sob condições normais, aproximadamente  $10 \times 10^8$  neutrófilos são gerados diariamente, números que podem aumentar até 10 vezes durante o processo infeccioso<sup>83</sup>.

Os neutrófilos se desenvolvem na MO a partir de células tronco hematopoiéticas em processo no qual progenitores mielóides se diferenciam sequencialmente em mieloblastos, promielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastonetes e por fim em neutrófilos maduros<sup>75</sup>. O principal fator de crescimento envolvido na geração e maturação dos neutrófilos é o G-CSF<sup>84,85</sup>, citocina produzida na MO por células estromais que atua na proliferação, sobrevivência e diferenciação de progenitores granulocíticos em neutrófilos maduros<sup>86,87</sup>. Ao atingir o estágio final de maturação, os neutrófilos são liberados para a circulação sanguínea aptos a realizarem suas funções efetoras fundamentais para a manutenção da homeostasia corporal e controle de infecções. Por outro lado, em diferentes patologias, neutrófilos imaturos podem ser liberados da MO e apresentar comprometimento em funções efetoras como diminuição da expressão de receptores de membrana e capacidade reduzida de interação com bactérias<sup>88</sup>, redução da liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*)<sup>89</sup>, diminuição na fagocitose e sinalização de cálcio<sup>90</sup>, resistência à apoptose espontânea<sup>91</sup> e diminuição da capacidade migratória<sup>92</sup>, fatores que podem contribuir significativamente para o agravamento dessas doenças.

O número de neutrófilos na circulação sanguínea é mantido por um fino balanço entre granulopoiese, retenção/liberação de neutrófilos na MO, morte na periferia e remoção de neutrófilos senescentes da circulação<sup>93</sup>. A regulação do tráfego dos neutrófilos da MO para a circulação sanguínea é em grande parte regulada pela atividade antagonista dos receptores CXCR4 e CXCR2<sup>94</sup>. A secreção de CXCL12 pelas células estromais da MO promove a retenção dos neutrófilos através da interação com o receptor CXCR4 altamente expresso em neutrófilos imaturos. Ao passo que os neutrófilos avançam nos estágios de maturação, a expressão de CXCR4 diminui e o receptor CXCR2 passa a ser expresso. Por fim, a ligação do CXCR2 com seus ligantes CXCL1, CXCL2 e CXCL8 (também conhecido como IL-8),

secretados fora da MO, direcionam os neutrófilos a favor do gradiente de concentração para a circulação sanguínea<sup>84,94-96</sup>. Além disso, o G-CSF também participa do controle do tráfego dos neutrófilos na MO e da regulação do número de neutrófilos no sangue ao inibir a secreção de CXCL12 pelas células estromais e diminuir a expressão de CXCR4 nas células mielóides<sup>97,98</sup>, contribuindo para a interrupção da interação CXCR4-CCL12 e consequente liberação dos neutrófilos para a circulação sanguínea<sup>98-101</sup> (**Figura 2**).



**Figura 2. Geração e tráfego de neutrófilos na medula óssea.** Os neutrófilos se desenvolvem na medula óssea (MO) a partir de células tronco hematopoiéticas e expressam diferentes receptores de acordo com os estágios do desenvolvimento. O CXCR2 é expresso de acordo com a evolução da maturação, enquanto que a expressão de CXCR4 é reduzida. A retenção dos neutrófilos na MO é mediada pela interação CXCR4-CXCL12, ao passo que a interação do CXCR2 com seus ligantes resulta na saída dos neutrófilos da MO. O G-CSF induz a proliferação de progenitores granulocíticos e participa do controle do tráfego dos neutrófilos pela inibição da produção de CXCL12. Neutrófilos senescentes reduzem a expressão de CXCR2 e CD62L e aumentam a expressão de CXCR4 e CCR5, resultando no retorno à MO para destruição pelos macrófagos residentes (adaptado de Hong, 2017)<sup>95</sup>.

O recrutamento de neutrófilos para o sítio infeccioso é uma das primeiras etapas da resposta inflamatória, sendo fundamental para a resposta efetiva contra agentes infecciosos<sup>102</sup>. Este processo é regulado por diversas moléculas que medeiam os eventos de rolamento, adesão e transmigração celular pelo endotélio<sup>74,102,103</sup>. As duas principais famílias de moléculas de adesão envolvidas no recrutamento dos neutrófilos são as selectinas e as

integrinas<sup>104</sup>. O recrutamento é iniciado pela interação entre as selectinas P e E, expressas por células endoteliais ativadas, à ligantes presentes nos neutrófilos, como o PSGL-1, gerando uma interação de baixa afinidade que resulta no rolamento dos neutrófilos na superfície endotelial. Em seguida, a interação entre as integrinas VLA-4, LFA-1 e MAC-1 expressas nos neutrófilos com seus ligantes VCAM-1 e ICAM-1 expressos pelo endotélio, geram interações de alta afinidade que culminam na firme adesão dos neutrófilos ao endotélio<sup>102</sup>. A subsequente transmigração envolve a interação de moléculas como LFA-1, MAC-1 e VLA-4 aos seus ligantes presentes no endotélio e na matriz extracelular<sup>103,105</sup>.

Outro grupo de receptores que possuem papel importante no processo de migração de neutrófilos são os receptores acoplados à proteína G (GPCRs, do inglês *G protein-coupled receptors*), moléculas que regulam o processo de quimiotaxia e medeiam alterações no citoesqueleto essenciais para a migração endotelial<sup>106</sup>. Diversos mediadores pró-inflamatórios como fMLP, LTB4 e CXCL8 (IL-8) exercem sua atividade quimioatraente pela interação com os GPCRs expressos na superfície dos neutrófilos<sup>107</sup>. Por exemplo, a sinalização gerada pela interação entre o receptor CXCR2 expresso nos neutrófilos com a quimiocina IL-8 resulta na ativação celular e alteração conformacional das integrinas para o estado de alta afinidade, contribuindo para a firme adesão celular e transmigração pelo endotélio<sup>107</sup>.

No sítio inflamatório, a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), a liberação de NETs e a degranulação são os principais mecanismos utilizados pelos neutrófilos para a eliminação de microrganismos invasores<sup>108</sup>. As EROs são geradas durante a explosão respiratória pelo complexo NADPH-oxidase, o qual gera reativos intermediários do oxigênio como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio<sup>109</sup>. Estes reativos são gerados nos fagossomos e juntamente com a ação de enzimas lisossomais atuam na destruição dos microrganismos fagocitados<sup>93</sup>. Por outro lado, as NETs, estruturas em forma de rede constituídas por cromatina descondensada e fatores antimicrobianos, são expelidas pelos neutrófilos e agem contra patógenos extracelulares<sup>110,111</sup>. Por fim, os grânulos dos neutrófilos, que são formados durante o processo de maturação celular – começam a ser produzidos na transição entre os estágios mieloblasto-pró-mielócito e sua geração se estende até que a maturação celular se complete- contribuem para a eliminação de patógenos intra e extracelulares por meio de sua ação no interior dos fagolisossomos ou pela liberação do conteúdo granular no meio extracelular, processo conhecido como degranulação<sup>103,112-114</sup>.

A redução do número de neutrófilos é uma manifestação hematológica presente em diversas condições patológicas, podendo apresentar causas heterogêneas com etiologia muitas vezes desconhecidas<sup>115</sup>. A neutropenia pode ocorrer em decorrência de diversos fatores como

defeitos na granulopoiese, retenção ou apoptose descontrolada na MO, destruição periférica anormal ou desequilíbrio na distribuição nos tecidos<sup>116</sup>. Desordens no número de neutrófilos podem resultar em risco aumentado a infecções fúngicas e bacterianas, destacando a importância dos neutrófilos no controle de infecções<sup>26,117</sup>. A administração de rhG-CSF para o tratamento de neutropenias é aprovada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)<sup>118</sup>, porém embora o rhG-CSF se mostre eficaz na correção do número de neutrófilos na maioria dos casos<sup>6,85,118</sup>, o efeito do tratamento é variável<sup>6</sup> e parece não corrigir os defeitos funcionais apresentados pelos neutrófilos de pacientes com neutropenia congênita<sup>119</sup>.

### **1.5. Os neutrófilos e a deficiência de CD40L.**

A neutropenia é a manifestação não infecciosa mais comum apresentada na deficiência de CD40L, sendo essa a única população celular afetada numericamente nesses pacientes<sup>12</sup>. Aproximadamente 70% dos pacientes com deficiência de CD40L vivenciam episódios de neutropenia<sup>12,14,115</sup>, que pode se apresentar nas formas episódica, cíclica ou crônica e presumidamente confere aos pacientes com deficiência de CD40L maior vulnerabilidade a infecções graves e recorrentes<sup>117</sup>.

A etiologia da neutropenia apresentada por esses pacientes não é completamente conhecida, mas estudos sugerem que a ausência da sinalização gerada pelo CD40Ls na MO e consequente redução na liberação de fatores essenciais ao processo de granulopoiese pelas células estromais durante a geração e maturação dos neutrófilos possui relação com este achado hematológico<sup>75,120</sup>. De fato, estudos demonstraram que a sinalização pelo CD40L na MO exerce papel sobre a proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas progenitoras CD34<sup>+</sup><sup>120,121</sup> e sobre os processos de mielopoiese e granulopoiese<sup>77,78</sup>. Nesse contexto, embora a interação direta do CD40Ls com as células hematopoiéticas tenha sido relatada<sup>120</sup>, acredita-se que a principal influência exercida pelo CD40L sobre o desenvolvimento da linhagem mielóide e granulocítica seja indireta, pela ação do CD40Ls sobre a função de células estromais da MO. No entanto, as consequências advindas da ausência da sinalização pelo CD40L na MO durante o processo de granulopoiese sobre os neutrófilos gerados permanecem não elucidadas.

Trabalho recente de nosso grupo revelou que além de apresentar defeitos em respostas efetoras importantes para a ação no sítio infeccioso, os neutrófilos circulantes de pacientes com deficiência de CD40L apresentam perfil de maturação celular alterado<sup>66</sup>. A análise inicial

do transcriptoma de neutrófilos periféricos de pacientes com deficiência de CD40L realizada neste mesmo estudo indicaram possíveis alterações no processo de diferenciação mielóide e na regulação da migração celular<sup>66</sup>. Fortalecendo essa teoria, investigações realizadas na MO de pacientes deficientes de CD40L sugeriram maturação da linhagem mielóide incompleta estacionada no estágio promielócito-mielócito<sup>14,122</sup>. Em conjunto, estes achados sugerem que a sinalização pelo CD40L exerce papel importante na maturação da linhagem granulocítica, indicando que a imunopatologia associada à deficiência de CD40L pode ser muito mais abrangente e complexa do que inicialmente imaginado.

**CAPITULO 1 - ASPECTOS CLÍNICOS, GENÉTICOS E LABORATORIAIS DE  
PACIENTES LATINO-AMERICANOS COM DEFICIÊNCIA DE CD40L**

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo geral**

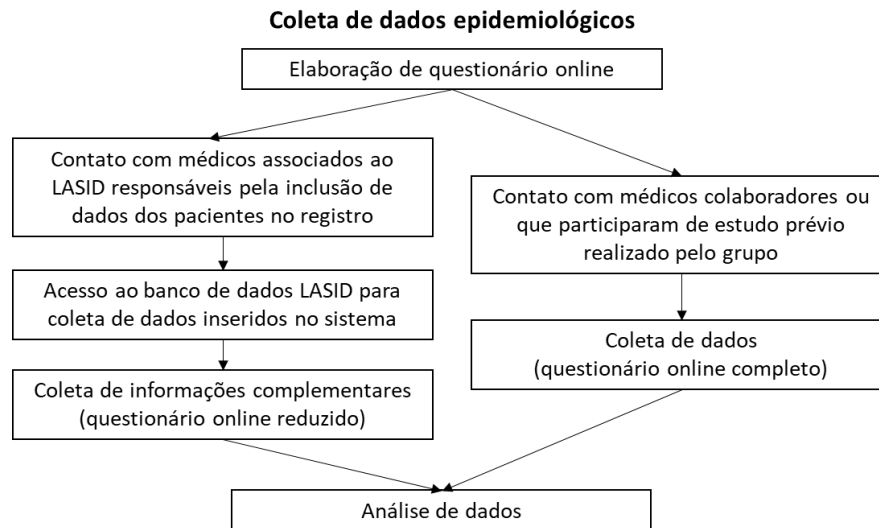
Realizar investigação retrospectiva para identificar as características clínicas, laboratoriais e genéticas de pacientes latino-americanos com deficiência de CD40L.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Coletar dados epidemiológicos de pacientes com deficiência de CD40L.
- Identificar as características clínicas, laboratoriais e genéticas dos pacientes incluídos no estudo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido através da coleta de dados clínicos, laboratoriais e genéticos de pacientes previamente diagnosticados com deficiência de CD40L por meio de questionário online e pelo acesso ao banco de dados LASID (**Figura 3**).



**Figura 3. Fluxograma da coleta de dados epidemiológicos.** O estudo foi realizado através da coleta de informações clínicas, laboratoriais e genéticas de pacientes com deficiência de CD40L por meio de questionário online e pelo acesso ao banco de dados da Sociedade Latino-Americana de Imunodeficiências (LASID).

#### 3.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo pacientes do sexo masculino previamente diagnosticados com deficiência de CD40L com base na combinação de pelo menos dois dos seguintes critérios: (1) resultados laboratoriais e clínicos sugestivos da doença, (2) redução drástica ou ausência na expressão de CD40L e (3) identificação de variante patogênica ou predita como patogênica por análise *in silico* no *CD40LG*.

#### 3.2. Coleta dos dados

Os dados de pacientes com deficiência de CD40L disponíveis no banco de dados do LASID foram coletados após a autorização dos pacientes e do médico responsável pela inserção dos dados no registro. Informações adicionais sobre a análise molecular, manifestações clínicas e desfecho dos casos foram solicitadas aos médicos colaboradores e



coletadas por questionário online. Os dados de pacientes não incluídos no banco de dados LASID, ou por opção do médico colaborador, foram coletados inteiramente por meio de questionário online. Os campos de dados solicitados incluíram: informações demográficas, critérios de diagnóstico, variantes genéticas identificadas, história familiar relacionada à doença, registro de tratamentos medicamentosos e TCTH, achados laboratoriais, apresentação clínica e desfecho da doença. A aprovação do estudo foi obtida no Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Certificado de Apresentação de Apreciação Ética: 09027513.6.1001.5467).

### **3.3. Análise de dados**

Foram consideradas como primeiras manifestações clínicas os sintomas iniciais apresentados pelos pacientes antes do diagnóstico de deficiência de CD40L (pacientes sem sintomas antes do diagnóstico não foram incluídos nesta análise). Foi considerado como atraso no diagnóstico o espaço de tempo entre o primeiro sintoma e o diagnóstico. Níveis de referência brasileiros de Igs sérica ajustados por idade foram utilizados para categorizar os níveis de Ig dos pacientes antes do início da terapia com imunoglobulina intravenosa (IVIG) como baixo (percentil  $\leq$  P3), normal (percentil  $>$  P3 a  $<$  P97) ou alto (percentil  $\geq$  P97). As manifestações clínicas representadas na análise incluem àquelas reportadas ao longo da vida em mais de um paciente (não foram incluídas manifestações apresentadas por apenas um paciente). Os tipos de infecção foram registrados independente do isolamento dos organismos infecciosos causadores. As variantes genéticas foram consideradas ainda não descritas quando estas não foram encontradas nas seguintes bases de dados pesquisadas: 1,000 Genomes project, GnomAD, Clinvar, HGMD e dbSNP.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Características demográficas de pacientes latino-americanos com deficiência de CD40L

Foram incluídos no estudo o total de 50 pacientes provenientes de 6 países (Brasil, Argentina, Peru, México, Uruguai e Costa Rica), dos quais onze pacientes foram caracterizados por manifestações clínicas típicas e identificação de variante no *CD40LG*, 3 por manifestações clínicas e ausência ou drástica redução na expressão de CD40L ou expressão de molécula não funcional, 1 por expressão anormal de CD40L e identificação de variante, enquanto 35 pacientes apresentaram todos os 3 critérios combinados. As características demográficas da coorte de estudo encontram-se resumidas na **Tabela 2** e a descrição detalhada dos dados demográficos e laboratoriais de individuais de cada paciente são apresentadas no **Anexo A**.

**Tabela 2. Características demográficas de pacientes latino-americanos com deficiência de CD40L.**

	<b>Todos países</b>	<b>Brasil</b>	<b>Demais países</b>
Número de pacientes incluídos no estudo	50	28	22
Idade no momento do estudo*	13 anos (2-35 anos)	13 anos (2-32 anos)	14 anos (5-35 anos)
Idade de início dos sintomas*	7 meses (1m-7a)	6 meses (1m-7a)	6 meses (1m-2a8m)
Idade no diagnóstico*	1a5m (1m-29a)	2a1m (1m-29a)	10 meses (2m-17a)
Atraso no diagnóstico*	1 ano (0-22 anos)	1a6m (0-22 anos)	8 meses (0-16 anos)
Histórico familiar de EII; n (%)	19 (38)	8 (28)	11 (50)
Desfecho da doença			
Vivo; n (%)	41 (82)	23 (82)	18 (82)
Em tratamento medicamentoso; n (%)	26 (52)	17 (61)	9 (41)
TCTH bem sucedida; n (%)	15 (30)	6 (21)	9 (41)
Falecido; n (%)	9 (18)	5 (17)	4 (18)
Idade de falecimento*	8 anos (1-26 anos)	8 anos (1-26 anos)	7 anos (3-14 anos)

\* Valores apresentados expressos em: mediana (intervalo). EII: Erros inatos da imunidade; TCTH: transplante de células tronco hematopoiéticas; m: meses; a: anos.

A idade mediana do início dos sintomas da doença foi de 7 meses (1 mês - 7 anos) e a idade mediana no diagnóstico foi de 1 ano e 5 meses (1 mês - 29 anos), com mediana de atraso no diagnóstico de 1 ano. Os pacientes P6, P24, P33 e P42 não puderam ser incluídos na análise de atraso do diagnóstico, uma vez que a data de início dos sintomas não estava disponível para o paciente P6 e os demais pacientes foram diagnosticados antes do início dos sintomas. Quarenta e um pacientes (82%) estavam vivos no momento da coleta de dados, 26 deles (52%) recebendo tratamento medicamentoso padrão e 15 pacientes (30%) haviam sido submetidos ao TCTH com sucesso.

#### 4.2. Heterogeneidade das características genéticas e moleculares: mutações hipomórficas, proteínas não funcionais e novas mutações

A caracterização genética e a análise molecular da população de estudo encontram-se resumidas na **Tabela 3**. A investigação genética foi realizada em 47 pacientes, não tendo sido realizada apenas nos pacientes P28, P43 e P47. As mutações identificadas apresentam-se distribuídas entre todos os exons do *CD40LG*, com a maior incidência no exon 5, como esperado (exon mais longo e com mais mutações descritas). No entanto, variantes em sítios de *splicing* e possíveis mutações em regiões de processamento do RNA (promotor ou na cauda poli-A) do gene também foram identificadas. As variantes mais frequentes foram c.158\_161del (p.I53Kfs\*13), apresentada por cinco pacientes não aparentados, e c.368C> A (p.A123E), identificada em quatro pacientes de 2 famílias distintas. Seis das 47 variantes observadas não foram encontradas na literatura (c.256\_260dup, c.410-1G> A, c.594dup, c.642del, c.299T> A, c.385G> T) e portanto foram consideradas novas mutações. Trinta e nove pacientes foram caracterizados molecularmente por meio da análise da expressão de CD40L em células T ativadas. A maioria das variantes resultou na ausência da expressão de CD40L. Os pacientes P17, P18 e P23 expressaram quantidades normais de CD40L, porém estas moléculas se mostraram não funcionais (ausência de ligação ao CD40-Ig). Ademais, o paciente P2 teve uma inserção *in-frame* de 2 aminoácidos (c.116\_121dup, p.A40\_L41insPA), resultando na redução da expressão da proteína e em fenótipo clínico leve, conforme descrito anteriormente<sup>123</sup>, enquanto o paciente P34 apresentou uma mutação pontual no exon 5 (c.655G> A), também associada à expressão reduzida de CD40L<sup>124-127</sup>.

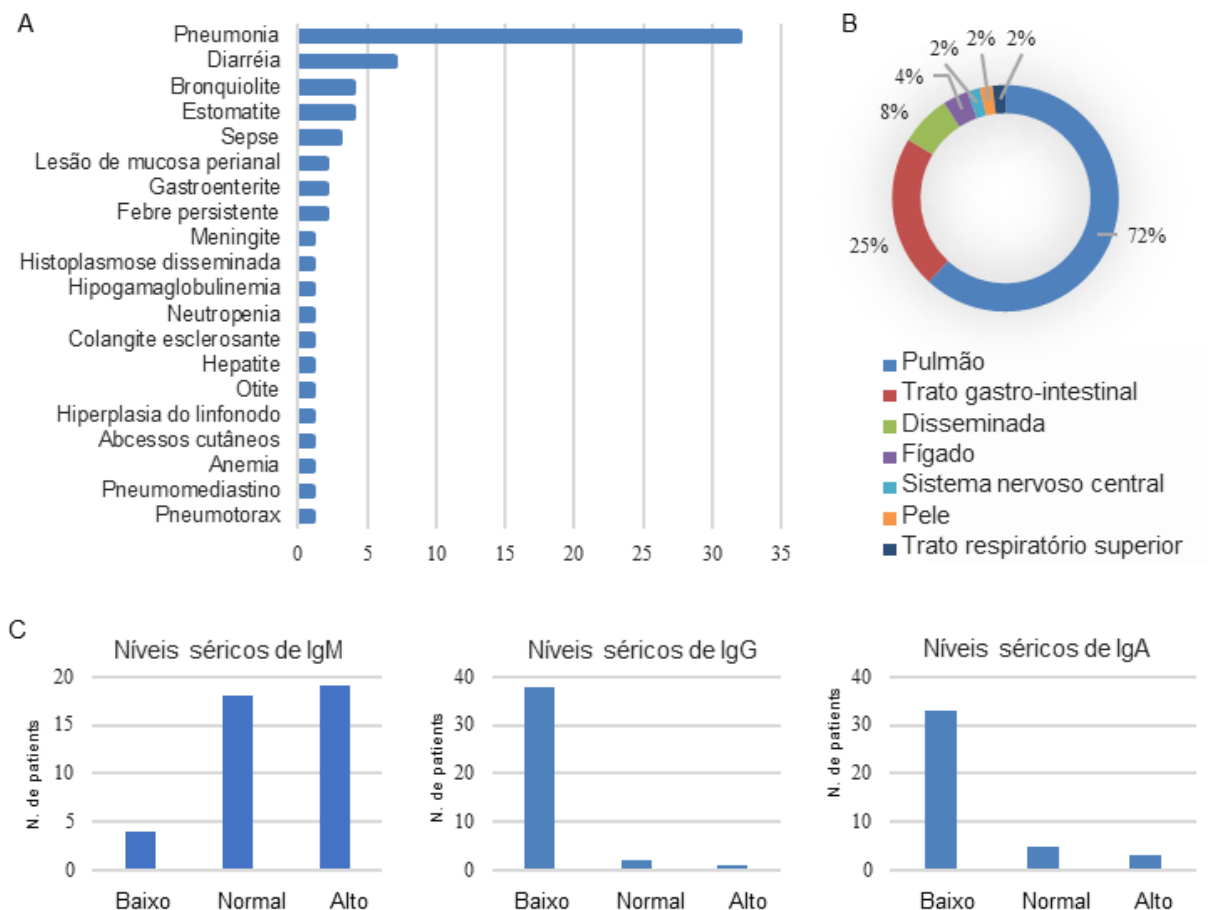
Tabela 3. Características genéticas e moleculares da população de estudo.

Pt.	País	Caracterização genética			Análise molecular		Ref.
		Troca no nucleotídeo	Efeito predito na proteína	Localização	Expressão CD40L	Ligação CD40-Ig	
P1	Brazil	c.15C>A	p.Y5*	Exon 1	N/A	N/A	#
P2	Brazil	c.116_121dup	p.A40_L41insPA	Exon 1	(-)	(-)	123
P3	Brazil	c.156G>C	p. K52N	Exon 1	N/A	N/A	128
P4	Brazil	c.157-1G>T	Skipping do exon 2	Intron 1	-	-	129
P5	Brazil	c.157-1G>T	Skipping do exon 2	Intron 1	-	-	129
P6	Brazil	c.158_161del	p.I53Kfs*13	Exon 2	-	N/A	130
P7	Brazil	c.158_161del	p.I53Kfs*13	Exon 2	-	N/A	130
P8	Brazil	c.158_161del	p.I53Kfs*13	Exon 2	-	N/A	130
P9	Brazil	c.158_161del	p.I53Kfs*13	Exon 2	-	-	130
P10	Brazil	c.158_161del	p.I53Kfs*13	Exon 2	-	-	130
P11	Brazil	c.256_260dup	p.I87Mfs*11	Exon 2	-	-	Nova
P12	Brazil	c.289_346del	Skipping exon 3	Del. exon 3	-	N/A	129
P13	Brazil	c.377T>G	p.V126G	Exon 4	-	N/A	131
P14	Brazil	c.410-1G>A	Defeito de <i>splicing</i>	Intron 4	-	-	Nova
P15	Brazil	c.419G>A	p.W140*	Exon 5	-	N/A	38
P16	Brazil	c.420G>C	p.W140C	Exon 5	-	N/A	131
P17	Brazil	c.431G>A	p.G144E	Exon 5	+	-	130
P18	Brazil	c.440C>A	p.T147N	Exon 5	+	-	132
P19	Brazil	c.493_494dup	p.R165Kfs*27	Exon 5	-	N/A	131
P20	Brazil	c.574_577dup	p.L193Qfs*9	Exon 5	-	-	129
P21	Brazil	c.594dup	p.G199Rfs*2	Exon 5	-	-	Nova
P22	Brazil	c.642del	p.A215Pfs*27	Exon 5	-	-	Nova
P23	Brazil	c.654C>A	p.C218*	Exon 5	+	-	133
P24	Brazil	c.654C>A	p.C218*	Exon 5	N/A	N/A	133
P25	Brazil	c.761C>T	p.T254M	Exon 5	-	-	134
P26	Brazil	c.347_783del	p.T116Kfs*27	Del. exons 4-5	-	-	*
P27	Brazil	No mRNA <sup>a</sup>	Não expressa	NI	-	-	129
P28	Brazil	N/A			-	N/A	
P29	Argentina	c.299T>A	p.L100*	Exon 3	N/A	N/A	Nova
P30	Argentina	c.303_306del	p.N101Kfs*26	Exon 3	N/A	N/A	135
P31	Argentina	c.303_306del	p.N101Kfs*26	Exon 3	N/A	N/A	135
P32	Argentina	c.368C>A	p.A123E	Exon 4	-	N/A	36
P33	Argentina	c.368C>A	p.A123E	Exon 4	-	N/A	36
P34	Argentina	c.655G>A	p.G219R	Exon 5	(-)	N/A	124
P35	Argentina	c.757T>A	p.F253I	Exon 5	-	N/A	136
P36	Argentina	c.759_767del	p.T254_F256del	Exon 5	-	N/A	137
P37	Argentina	No mRNA <sup>a</sup>	Não expressa	NI	-	N/A	129
P38	México	c.347_409del	p.G116_S136del	Del. exon 4	-	-	36
P39	México	c.368C>A	p.A123E	Exon 4	-	-	36
P40	México	c.368C>A	p.A123E	Exon 4	-	-	36
P41	México	c.658C>T	p.Q220*	Exon 5	-	-	138
P42	México	c.409+3A>T	Defeito de <i>splicing</i>	Intron 4	-	N/A	#
P43	México	N/A			-	-	
P44	Uruguay	c.374_375del	p. H125Rfs*4	Exon 4	N/A	N/A	137
P45	Uruguay	c.385G>T	p.E129*	Exon 4	-	N/A	Nova
P46	Uruguay	c.385G>T	p.E129*	Exon 4	N/A	N/A	Nova
P47	Uruguay	N/A			-	N/A	
P48	Peru	c.770G>T	p.G257V	Exon 5	N/A	N/A	139
P49	Peru	c.770G>T	p.G257V	Exon 5	N/A	N/A	139
P50	Costa Rica	c.419G>A	p.W140*	Exon 5	N/A	N/A	38

Obs: <sup>a</sup> Possível mutação na região promotora ou na cauda poli-A (sequenciamento normal da região codificante); # Variante reportada no Clinvar; \* Relato de caso em revisão para publicação no momento da redação desse manuscrito. Pt.: paciente; Del.: deleção; N/A: não avaliada; - = ausente; + = presente; (-) = reduzida.

### 4.3. Sintomas iniciais da doença: variação na apresentação clínica e nos valores de imunoglobulinas

A maioria dos pacientes (89%) apresentou sua primeira manifestação antes dos 2 anos de idade. As primeiras manifestações clínicas da população de estudo encontram-se apresentadas na **Figura 4A**. A pneumonia foi a manifestação inicial mais frequente (68%), seguida da diarreia (15%), bronquiolite (8%), estomatite (8%) e sepse (6%). Alguns pacientes relataram mais de um sintoma inicial, enquanto os pacientes P24, P33 e P42 não foram incluídos nessa análise, pois foram diagnosticados antes da manifestação da doença. Quanto ao local das infecções, o pulmão foi o órgão mais acometido (72%), seguido do trato gastrointestinal (25%) e das infecções disseminadas (8%) (**Figura 4B**).



**Figura 4. Apresentação clínica no momento do diagnóstico e níveis de imunoglobulina antes da reposição com imunoglobulina intravenosa (IVIG).** (A) Primeiras apresentações clínicas de 47 pacientes estudados e (B) respectivos órgãos afetados. (C) Níveis de imunoglobulina de 41 pacientes antes da reposição de IVIG categorizados como baixo (percentil  $\leq P3$ ), normal (percentil  $> P3$  à  $< P97$ ) ou alto (percentil  $\geq P97$ ) baseados na referência brasileira de imunoglobulinas séricas ajustada por idade.

Com relação aos níveis séricos de Ig, nove pacientes foram excluídos da análise uma vez que os dados anteriores ao início da terapia com IVIG não estavam disponíveis (**Anexo A**). A maioria dos pacientes apresentavam níveis séricos de IgM elevados ou normais (19 e 18 pacientes, 46% e 43%, respectivamente) antes do diagnóstico, contudo 4 pacientes apresentaram níveis baixos (**Figura 4C**). Os níveis de IgG estavam diminuídos em 38 pacientes (92%), exceto nos pacientes P30 e P34, que apresentaram níveis normais, e em P24, que foi o único que apresentou níveis elevados de IgG. A maioria dos pacientes apresentou níveis reduzidos de IgA (33 pacientes, 80%), embora níveis normais (P1, P14, P23, P40 e P49) e altos (P9, P24 e P30) de IgA também tenham sido relatados (**Figura 4C**).

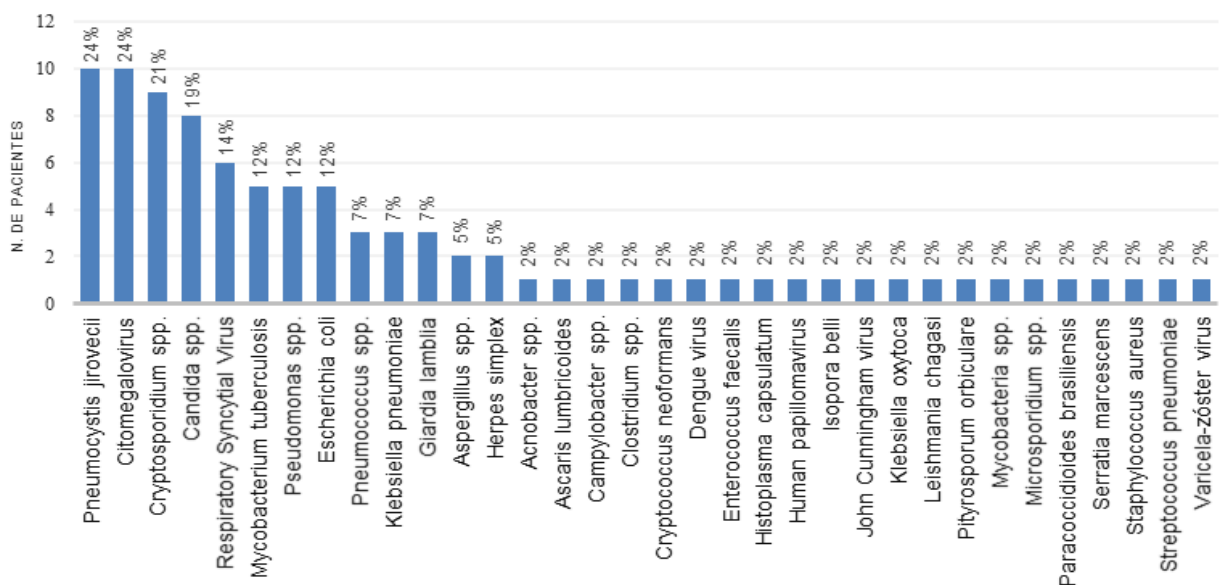
#### 4.4. Manifestações clínicas ao longo da vida: apresentações clínicas graves e recorrentes e amplo espectro de patógenos causadores de infecções

Todos os pacientes apresentaram infecções, em sua maioria recorrentes, durante o curso de sua doença (**Tabela 4**).

**Tabela 4. Manifestações clínicas apresentadas durante a vida.**

<b>Manifestações clínicas</b>	<b>n (%)</b>
Pneumonia	43 (86)
Neutropenia	35 (70)
Intermitente	15 (30)
Crônica	11 (22)
Isolada (1-3 episódios)	7 (14)
Cíclica	2 (4)
Infecções do trato respiratório superior	35 (70)
Otite	17 (34)
Tonsilite	10 (20)
Manifestações gastrointestinais	30 (60)
Diarreia	29 (58)
>10 episódios/ Crônico	14 (28)
1-5 episódios	12 (24)
5-10 episódios	3 (6)
Sepse	18 (36)
Linfoadenopatia	9 (18)
Infecções de pele	9 (18)
Autoimunidade	7 (14)
Hepatite	7 (14)
Infecção do trato urinário	6 (12)
Colangite esclerosante	5 (10)
Infecção no sistema nervoso	5 (8)
Meningite	3 (6)
BCGite	2 (4)
Malignidades	2 (4)
Artrite	2 (4)

A pneumonia foi a infecção mais prevalente, relatada por 43 pacientes (86%), seguida por infecções do trato respiratório superior (otite média e amigdalite; n= 35, 70%) e sintomas gastrointestinais (n= 30, 60%). Vinte e nove pacientes (58%) sofreram de diarreia, dos quais 14 (28%) apresentaram mais de 10 episódios. Outras manifestações relatadas incluíram sepse (n= 18, 36%) e manifestações do sistema nervoso central (n= 5, 8%), incluindo 3 pacientes com meningite, um com leucoencefalopatia multifocal progressiva e um com encefalite. A neutropenia foi a complicação não infecciosa mais presente, ocorrendo em 35 pacientes (70%), os quais apresentaram padrões de neutropenia intermitente, crônica, isolada ou cíclica. Digno de nota, quarenta e oito pacientes necessitaram de hospitalizações devido a complicações clínicas graves, variando de 1 a 14 hospitalizações totais (pacientes P7, P20, P25 e P27 necessitaram de mais de 10 hospitalizações, e o paciente P16 exigiu 14 hospitalizações). Trinta e cinco organismos infecciosos foram identificados em 41 pacientes (**Figura 5**), incluindo bactérias (41%), vírus (21%), fungos (20%) e parasitas (18%). Os patógenos mais comumente isolados foram *Pneumocystis jirovecii* (24%) e Citomegalovírus (CMV; 24%), seguidos por *Cryptosporidium* spp. (21%), *Candida* spp. (19%) e vírus sincicial respiratório (14%). Outros agentes etiológicos comuns em pacientes deficientes de CD40L como *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas* spp. e *Escherichia coli* (12% cada) foram relatados. Por outro lado, foram identificados microrganismos não relatados anteriormente como causadores de infecções em pacientes com deficiência de CD40L, incluindo *Ascaris lumbricoides*, *Campylobacter* spp., Vírus da Dengue, *Klebsiella oxytoca* e *Pityrosporum orbiculare*.



**Figura 5. Micro-organismos isolados na coorte de estudo.** Trinta e dois micro-organismos foram isolados no decorrer da vida em 41 pacientes.

#### 4.5. Desfecho da doença: Transplante de células tronco hematopoiéticas e óbitos

Dezenove pacientes foram submetidos ao TCTH (idade mediana no momento do transplante: 3 anos e 3 meses, variando de 1 ano à 14 anos e 4 meses), dos quais 15 pacientes (78%) tiveram sucesso no transplante (**Tabela 5**). O Brasil relatou uma menor quantidade de pacientes submetidos ao TCTH quando comparado aos outros países combinados (21% e 41% dos pacientes, respectivamente). Onze pacientes foram transplantados com menos de 5 anos de idade e 8 foram submetidos ao procedimento com 5 anos ou mais. O sucesso do TCTH foi superior dentre os pacientes transplantados nos 5 primeiros anos de vida em comparação com pacientes transplantados mais velhos (90% e 62%, respectivamente). Onze pacientes (57%) desenvolveram a doença do enxerto-contra-hospedeiro, 8 pacientes (42%) tiveram complicações infecciosas (7 causadas por reativação de CMV) e 4 apresentaram outras complicações. O único óbito pós-TCTH ocorreu no paciente que foi transplantado mais velho (P38, transplantado com 14 anos e 4 meses), que morreu de sepse um mês após o procedimento. Oito pacientes eram falecidos na data do estudo, os quais apresentaram causas de morte múltiplas, com idades de óbito variando de 1 ano e 3 meses a 26 anos (**Tabela 6**).

**Tabela 5. Transplante de células tronco hematopoiéticas.**

	<b>Todos pacientes</b>	<b>TCTH de 0-5 anos de idade</b>	<b>TCTH com <math>\geq 6</math> anos de idade</b>
Número de pacientes	19	11	8
Idade no diagnóstico*	9 meses (1 m-10 a)	5 meses (1 - 9 meses)	1a5m (1 -10 anos)
Idade no transplante*	3a3m (1 ano-14a4m)	2a4m (1 ano-3a4m)	10a1m (6a8m-14a4m)
Tipo de doador			
Halogenico aparentado; n (%)	5 (26)	2 (18)	3 (37)
Halogenico não-aparentado; n (%)	10 (52)	8 (73)	2 (25)
Haploidentico aparentado; n (%)	3 (15)	0 (0)	3 (37)
Sem informação; n (%)	1 (5)	1 (9)	0 (0)
Transplante bem-sucedido			
Sim; n (%)	15 (78)	10 (90)	5 (62)
Não; n (%)	4 (21)	1 (9)	3 (37)
Complicações após TCTH; n (%)			
DEVH; n (%)	11 (57)	6 (54)	5 (62)
Aguda; n (%)	9 (47)	4 (36)	5 (62)
Crônica; n (%)	1 (5)	1 (9)	0 (0)
Sem informação; n (%)	1 (5)	1 (9)	0 (0)
Infecção; n (%)	8 (42)	5 (45)	3 (37)
Outras complicações; n (%)	4 (21)	1 (9)	3 (37)
Desfecho			
Óbito; n (%)	1 (5)	0 (0)	1 (12)
Vivo; n (%)	18 (95)	11 (100)	7 (87)

\* Valores apresentados expressos em: mediana (intervalo). TCTH: Transplante de células tronco hematopoiéticas; DEVH: doença do enxerto contra o hospedeiro.



**Tabela 6. Causas de óbito.**

<b>Paciente</b>	<b>Idade de óbito</b>	<b>Causa da morte</b>
P12	7 anos	Leucoencefalopatia multifocal progressiva
P16	26 anos	Adenocarcinoma do ducto biliar e falência múltipla de órgãos
P21	1ano e 3 meses	Falência respiratória devido à contaminação fúngica na cânula de traqueostomia
P25	16 anos	Sepse
P28	8 anos e 4 meses	Broncopneumonia e sepse
P31	8 anos e 8 meses	Sepse e falência múltipla de órgãos
P38	14 anos e 5 meses	Sepse
P42	7 anos e 9 meses	Meningite
P45	3 anos e 4 meses	Infecção disseminada por <i>Cryptosporidium</i> spp.

**CAPITULO 2 - IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTES COM  
DEFICIÊNCIA DE CD40L.**

## **5. OBJETIVO**

### **5.1. Objetivo geral**

Identificar pacientes com deficiência de CD40L por meio de análise molecular e genética.

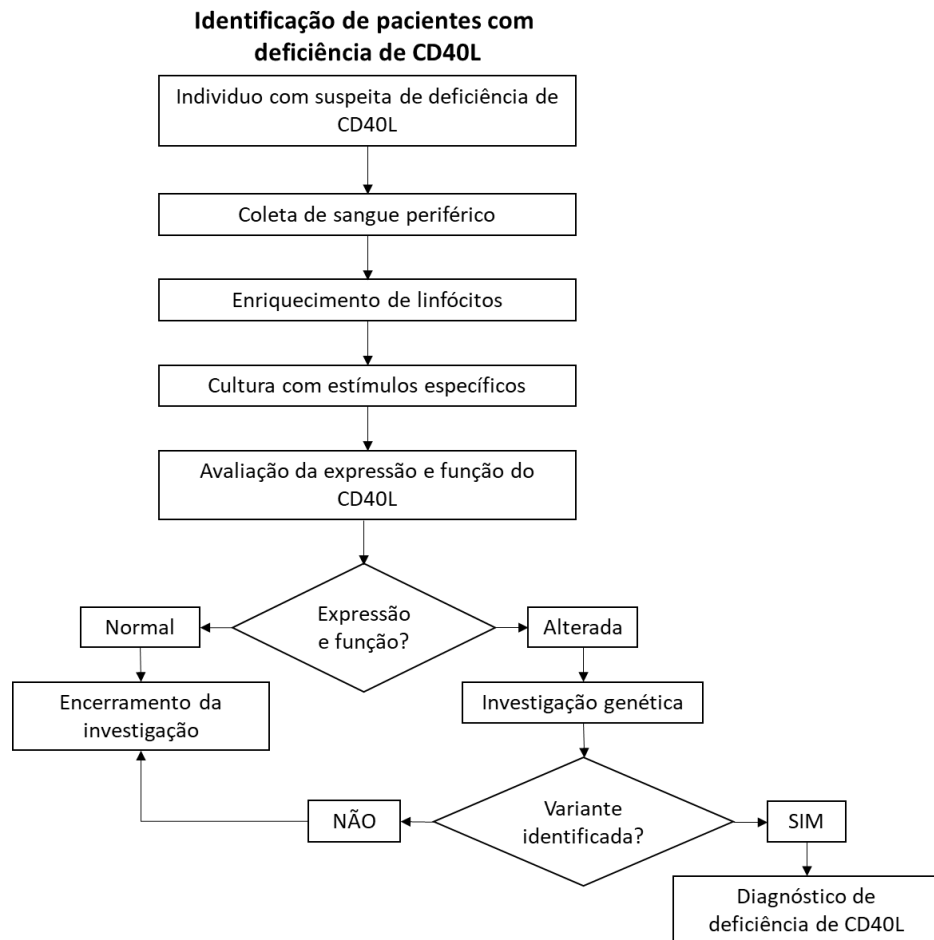
### **5.2. Objetivos específicos**

A partir de amostra de sangue venoso periférico coletada de pacientes com suspeita de deficiência de CD40L:

- Avaliar a expressão e a função do CD40L em linfócitos T CD4+ ativados.
- Investigar a presença de variantes patogênicas no *CD40LG*.

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

A sequência dos procedimentos e experimentos realizados encontram-se representados na **Figura 6**.



**Figura 6. Fluxograma experimental do diagnóstico de pacientes com deficiência de CD40L.** Sequência dos procedimentos e experimentos realizados para a identificação de pacientes com deficiência de CD40L.

### 6.1. Indivíduos incluídos no estudo

As amostras de sangue foram coletadas somente de indivíduos em condições clínicas estáveis de saúde, evitando desse modo qualquer alteração clínica em decorrência da coleta. A coleta de sangue dos participantes ocorreu mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e todos os procedimentos realizados respeitaram os limites de risco mínimo estipulados pela regulamentação da convenção de Genebra para pesquisa com seres humanos e do Conselho Nacional de Saúde. O projeto de pesquisa, o protocolo

experimental e o termo de consentimento contemplam os quesitos éticos e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB – USP (CAAE 69005017.2.0000.5467).

## **6.2. Obtenção de células mononucleares de sangue periférico**

As amostras de sangue periférico venoso dos pacientes com suspeita de deficiência de CD40L e de indivíduos sadios (utilizados como controle experimental) foram coletadas em tubos de coleta estéreis contendo heparina sódica (Becton Dickinson [BD] Vacutainer) e a obtenção de células mononucleares de sangue periférico (linfócitos e monócitos) foi realizada através de separação celular por gradiente de densidade. Para tanto, de 6-10 ml de sangue foram diluídos em 6-10mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS; proporção volume/volume [v/v]) e então a amostra foi lentamente adicionada em tubo cônico de 50ml contendo 12ml de Ficoll-Hypaque 1.077 (densidade 1,077g/mL; GE Healthcare). A amostra foi centrifugada à 900 x g (parada sem freio), por 20 minutos, e a interface celular contendo as células mononucleares foi então coletada e transferida para tubos cônicos novos de 50ml. A suspensão celular foi lavada pela adição de 30ml de PBS seguida de centrifugação à 600 x g, por 10 minutos, e então o *pellet* celular foi suspenso em 1 ml de meio RPMI com vermelho de fenol suplementado (2% de antibiótico penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino). A quantificação do número celular foi realizada em câmara hemocitométrica e a viabilidade das células verificada pela adição de azul de tripan (0,4%; Sigma-Aldrich), sendo considerado aceitável quando 95% ou mais células apresentaram-se viáveis.

## **6.3. Ativação celular e avaliação da expressão de CD40L**

A avaliação da expressão do CD40L foi investigada na população de células TCD4+ por citometria de fluxo como previamente descrito (com adaptações)<sup>134</sup>. Resumidamente,  $4 \times 10^6$  células foram transferidas para placa de cultura de 6 poços contendo 2ml de meio RPMI suplementado e mantidas em cultura por 3 horas em estufa CO<sub>2</sub> na presença ou ausência de 1µg/ml de ionomicina (Sigma-Aldrich) e 20ng/ml de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich) para ativação celular. Após o tempo de estímulo, a fração rica em linfócitos (células não aderentes presentes no sobrenadante) foi coletada e as células foram lavadas (adição de 2 ml de PBS seguida de centrifugação à 600 X g, por 10 minutos) e ressuspendidas

em 500ul de PBS para marcação celular. Para tanto, a suspensão celular foi incubada em tubos de citometria à 4°C por 30 minutos com os anticorpos anti-CD3, CD4, CD69 e CD40L (BD). Além disso, foi utilizada na investigação a molécula de fusão CD40-muIg (CD40-Ig; Ancell), proteína de fusão contendo o domínio extracelular do CD40 ligada a porção Fc de anticorpo IgG, utilizada para avaliar a capacidade do CD40L expresso se ligar ao receptor CD40 (avaliação da função do CD40L). Em todos os ensaios foi utilizado o marcador de viabilidade celular FVS510 (BD) para excluir células não viáveis da avaliação. Após incubação, as células foram lavadas duas vezes e fixadas com PBS com paraformaldeído à 0,5%. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo Attune NXT (Thermo Fisher Scientific). Foram adquiridos 10.000 eventos da população celular de interesse (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) e a análise estatística dos dados foi realizada no software FlowJo V10 (Tree Star Inc.).

#### 6.4. Investigação genética

A busca por variantes patogênicas no *CD40LG* foi realizada através do sequenciamento do DNA pelo método de Sanger, como previamente descrito<sup>131</sup>. Resumidamente, o DNA foi extraído a partir de amostra de sangue periférico coletada em tubo contendo EDTA (BD) utilizando o kit de extração de DNA *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega) seguindo as instruções do fabricante. Após extração do DNA, foi realizada reação de PCR com os *primers* específicos para amplificação dos 5 exons do *CD40LG* (Tabela 7).

**Tabela 7. Sequência dos *primers* utilizados para sequenciamento do *CD40LG*.**

Região amplificada	Primer	Sequência
Exon 1	<i>foward</i>	CGTTTTTGTCTGGGAGAGAA
	<i>reverse</i>	TGTGGAAACTGAGGCACTTG
Exon 2	<i>foward</i>	TGCCGTGGAAATGAATGTAG
	<i>reverse</i>	AACATTGGCATTGTCAGTTTC
Exon 3	<i>foward</i>	CAGATCCATGGACTCCCAAT
	<i>reverse</i>	ATCGGCATTAAAGGAACACATC
Exon 4	<i>foward</i>	ATGAGACCGATGGAAACAGC
	<i>reverse</i>	CAGATTGCATTCCACCTCCTT
Exon 5	<i>foward</i>	CAAGTCTCTGAAATATGCTCAA
	<i>reverse</i>	CCATAAGGAGGATCCTAGGGTTA

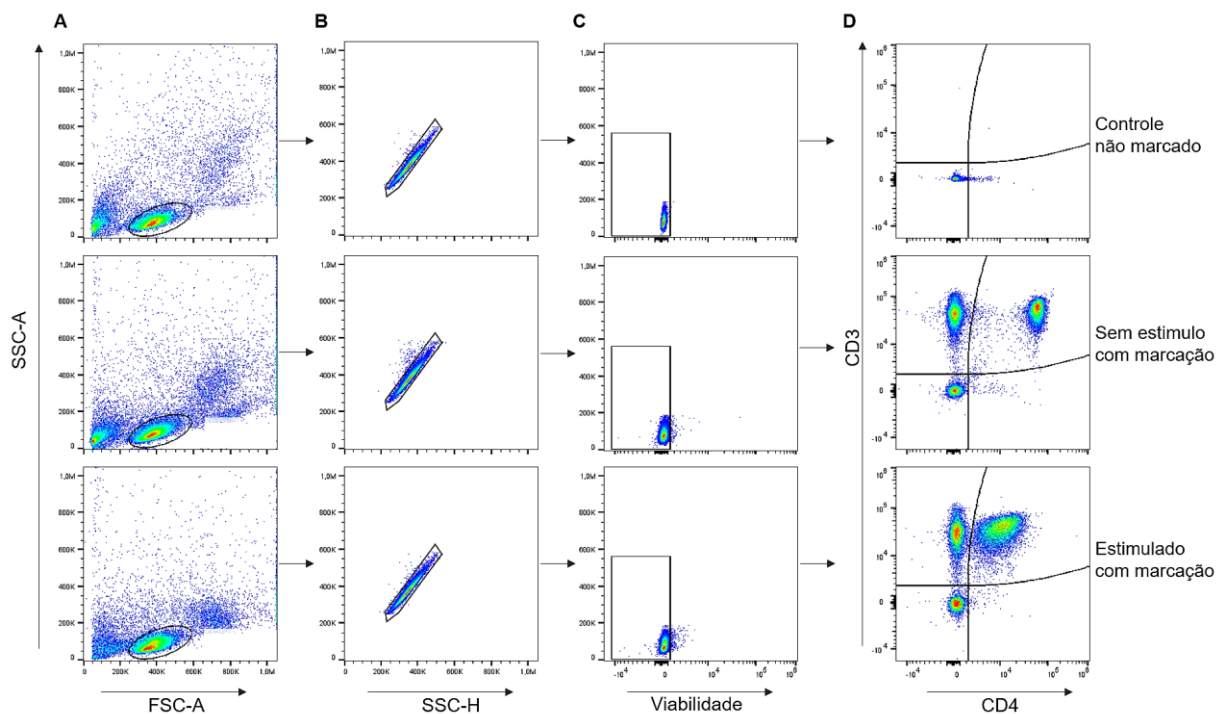
Após a reação de PCR e confirmação das sequencias amplificadas em gel de agarose 1,5%, os produtos do PCR foram purificados com o Kit GFX PCR DNA e *Gel Band Purification* (GE Healthcare) ou com o reagente ExoSAP (Thermo Fisher), conforme as

instruções dos fabricantes. As reações de sequenciamento foram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) com o auxílio do software BioEdit (Tom Hall, Ibis Therapeutics). As variantes genéticas foram consideradas ainda não descritas quando estas não foram encontradas nas seguintes bases de dados pesquisadas: 1,000 Genomes project, GnomAD, Clinvar, HGMD e dbSNP. As análises *in silico* das variantes foram realizadas pelo aplicativo Mutation Taster.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Identificação de nove pacientes com deficiência de CD40L

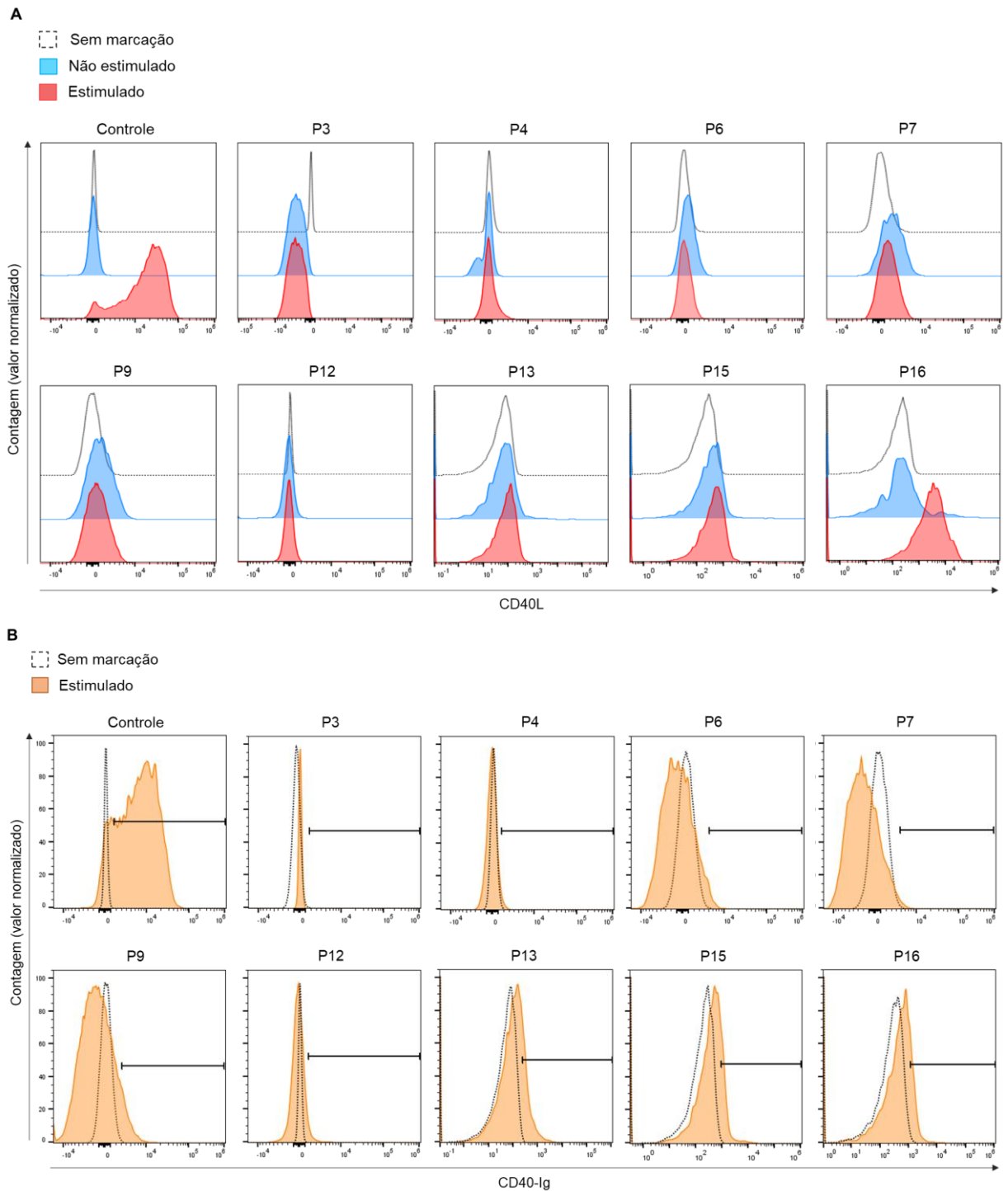
Médicos colaboradores encaminharam amostras de 18 pacientes com suspeita de deficiência de CD40L (suspeita diagnóstica baseada nas manifestações clínicas e resultados laboratoriais) para a investigação da expressão de CD40L. As principais características clínicas e laboratoriais, os resultados obtidos na avaliação da expressão do CD40L e na ligação com a molécula CD40mu-Ig e o resultado da investigação genética encontram-se resumidos no **Anexo B**. Uma vez que a expressão da molécula CD40L em linfócitos T auxiliares (células  $CD3^+CD4^+$ ) ocorre somente após ativação celular, os linfócitos isolados a partir de amostra de sangue periférico foram ativados para posterior avaliação da expressão do CD40L e ligação com a molécula CD40-Ig. A estratégia de análise utilizada para a avaliação da expressão do CD40L encontra-se representada na **Figura 7A-D**.



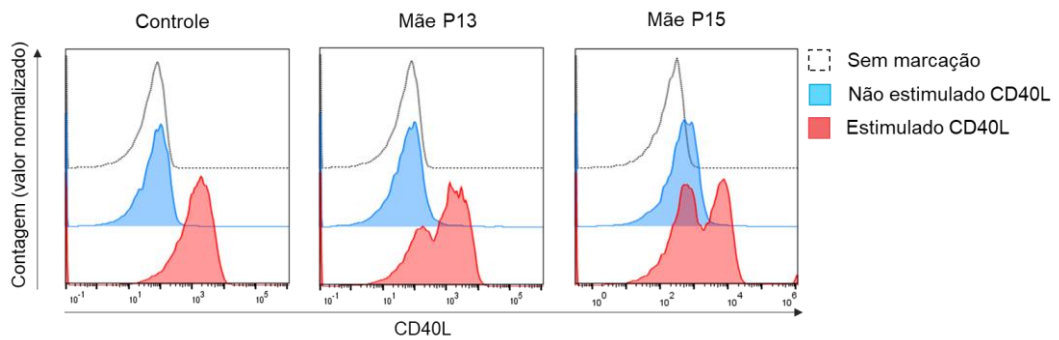
**Figura 7. Estratégia de análise utilizada para avaliação da expressão de CD40L.** (A) População de linfócitos determinada pelos parâmetros de FSC vs SSC, parâmetros associados ao tamanho e a complexidade celular, respectivamente. (B) Seleção de "single cells" pelos parâmetros SSC-A vs. SSC-H. (C) Seleção de células viáveis pela ausência de marcação com o reagente VS510. (D) População de linfócitos marcados com os anticorpos anti-CD3 e CD4 para identificação de linfócitos T auxiliares ( $CD3^+CD4^+$ ). Figura representativa da estratégia de análise utilizada nas amostras avaliadas.



Amostras de sangue de indivíduos sadios (controles) foram coletadas e analisadas paralelamente às amostras dos pacientes e utilizadas como controle experimental e referência de ativação celular/expressão do CD40L. De modo a excluir a possibilidade de ausência da expressão do CD40L devido a defeitos na ativação celular em decorrência de outros EII, a expressão da molécula CD69 foi utilizada como controle da ativação celular (dado não apresentado). Dentre os dezoito pacientes encaminhados para investigação, nove (P3, P4, P6, P7, P9, P12, P13, P15) apresentaram ausência da expressão da molécula CD40L (**Figura 8A**) e, conseqüentemente, ausência da ligação com a molécula CD40mu-Ig (**Figura 8B**). Por outro lado, o paciente P16 apresentou expressão normal do CD40L, porém não demonstrou ligação com a molécula CD40-Ig, caracterizando a expressão de moléculas de CD40L não funcionais (**Figura 8A e 8B**). Os pacientes P1 e P5 apresentaram expressão de CD40L reduzida (redução de aproximadamente 40% em comparação com indivíduo sadio), porém a investigação genética não revelou variantes patogênicas no *CD40LG* (dados não apresentados). Por fim, os pacientes P2, P8, P10, P11, P14, P17 e P18 apresentaram expressão do CD40L e ligação com o anticorpo CD40mu-Ig normais (dados não apresentados), excluindo assim a suspeita diagnóstica de deficiência de CD40L. A avaliação da expressão e função do CD40L nas mães dos pacientes P13 e P15 também foi investigada e ambas apresentaram redução na expressão de CD40L, sendo possível identificar dentre os linfócitos T CD4+ um grupo de células com expressão normal para o marcador e um grupo sem expressão, padrão característico de portadoras sadias de variantes ligadas ao X (**Figura 9**).



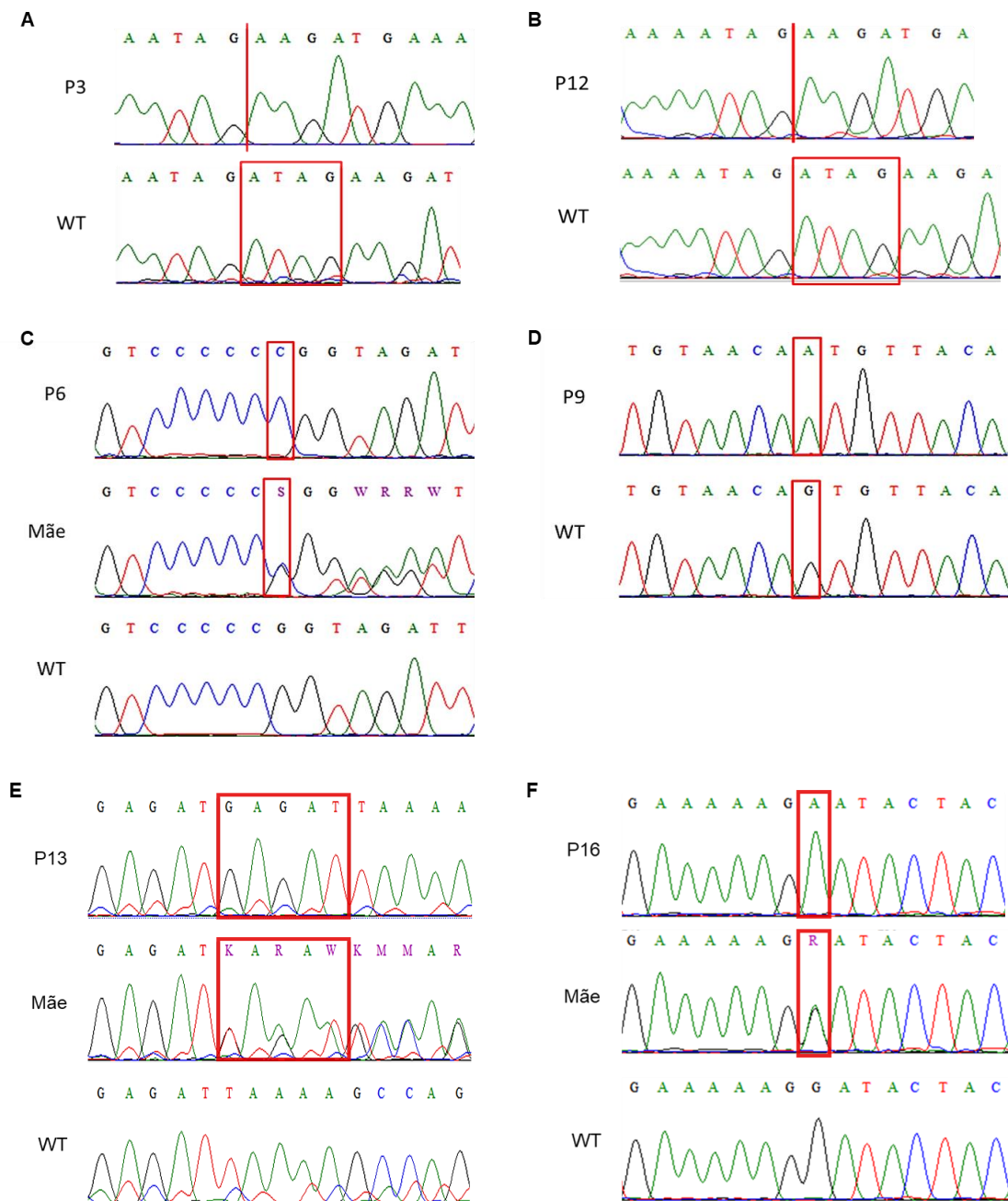
**Figura 8. Pacientes identificados com deficiência de CD40L.** Avaliação da expressão da molécula CD40L e sua ligação com o anticorpo CD40-Ig foi avaliada na população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> (células CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) por citometria de fluxo. (A) Histogramas da marcação com o anticorpo anti-CD40L e (B) com a molécula CD40-Ig dos pacientes P3, P4, P6, P7, P9, P12, P13, P15 e P16. Histograma controle representativo da expressão apresentada por indivíduos saudáveis.



**Figura 9. Expressão de CD40L em portadoras sadias de mutações em *CD40LG*.** Avaliação da expressão da molécula CD40L foi avaliada na população de linfócitos TCD4+ (células CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) das mães dos pacientes P13 e P15. Histograma controle representativo da expressão apresentada por indivíduos sadios.

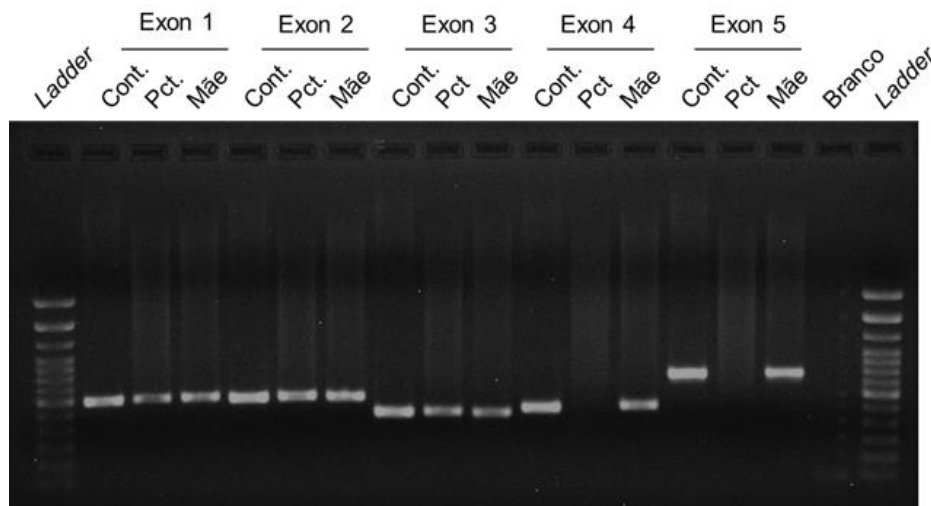
## 7.2. Variantes identificadas no *CD40LG*

A análise genética dos pacientes P3, P6, P9, P12, P13 e P16 foi realizada pelo método de Sanger através do sequenciamento e varredura dos 5 exons do *CD40LG* e regiões de *splicing*. Foram identificadas variantes patogênicas ou preditas como patogênicas em todas as seis amostras investigadas (**Figura 10**), das quais 3 não se encontram descritas na literatura. Os pacientes P3 e P12 apresentaram a mesma variante no exon 5, já descrita na literatura como patogênica (c.158\_161del/ p.I53Kfs\*13; **Figura 10A e 10B**). Os pacientes P6 (c.594dup/ p.G199Rfs\*2; **Figura 10C**), P9 (c.410-1G>A; **Figura 10D**) e P13 (c.256\_260dup/ p.I87Mfs\*11; **Figura 10E**) apresentaram variantes ainda não reportadas na literatura e preditas como possivelmente patogênicas pela análise *in silico*. O paciente P16 apresentou variante no exon 5 (c.431G>A/ p.G144E) previamente caracterizada como patogênica (**Figura 10F**). O sequenciamento das mães dos pacientes P6, P13 e P16 indicou condição de portadoras heterozigotas das variantes (**Figura 10C, 10E e 10F**, respectivamente).



**Figura 10. Variantes identificadas no *CD40LG*.** Análise genética do *CD40LG* realizada por sequenciamento de Sanger. (A e B) Deleção de 4 nucleotídeos (ATAG) no exon 2 (região da deleção indicada por traço vertical; caixa indica nucleotídeos deletados) nos pacientes P3 e P12. (C) Inserção de nucleotídeo C no exon 5 (nucleotídeo inserido indicado por caixa) no paciente P6. Cromatograma da mãe do paciente indica condição de portadora heterozigota da mutação. (D) Troca de nucleotídeo (G>A) em sítio de *splicing* no intron 4 (nucleotídeo trocado indicado por caixa) no paciente P9. (E) Duplicação de 5 nucleotídeos (GAGAT) no exon 5 (nucleotídeos duplicados indicados por caixa) no paciente P13. Cromatograma da mãe do paciente indica condição de portadora heterozigota da mutação. (F) Troca de nucleotídeo (G>A) no exon 5 (nucleotídeo trocado indicado por caixa) no paciente P16. Cromatograma da mãe do paciente indica condição de portadora heterozigota da mutação. WT (*wild type*): cromatograma representativo de sequência selvagem do *CD40LG* apresentada por indivíduos sadios.

A investigação genética do paciente P15 foi inicialmente realizada pelo sequenciamento do exoma no serviço médico que atende o paciente e apontou uma deleção dos exons 4 e 5 do *CD40LG*, resultado confirmado pela ausência de amplificação dos exons 4 e 5 por PCR (**Figura 11**).



**Figura 11. Investigação genética do paciente P15.** Visualização em gel de agarose dos 5 exons do gene *CD40LG* amplificados por PCR. Cont: indivíduo sadio; Pct: paciente; Branco: controle experimental da reação de PCR.

A investigação genética do paciente P7 foi realizada pelo sequenciamento do exoma no serviço médico que atende o paciente e revelou uma variante ainda não descrita na literatura localizada no exon 5 do *CD40LG* (c.642del/ p.A215Pfs\*27) e predita como provavelmente patogênica pela análise *in silico* (resultado não apresentado). O estudo genético do paciente P4 não foi realizado por opção dos pais de não prosseguir com a investigação molecular (mutação descrita no **Anexo B** referente a mutação previamente identificada em irmão mais velho falecido). Dentre os pacientes apresentados nessa sessão, os dados dos pacientes P3, P6, P7, P9, P12, P13, P15, P16 foram incluídos no estudo de pacientes latino-americanos (pacientes P9, P21, P22, P14, P10, P11, P26 e P17, respectivamente).

**CAPITULO 3 - O PAPEL DO CD40L NO DESENVOLVIMENTO E TRÁFEGO DE NEUTRÓFILOS.**

## 8. OBJETIVO

### 8.1. Objetivo Geral

Investigar o efeito da deficiência de CD40L no desenvolvimento e tráfego de neutrófilos.

### 8.2. Objetivos específicos

Avaliar em neutrófilos de sangue periférico de pacientes com deficiência de CD40L:

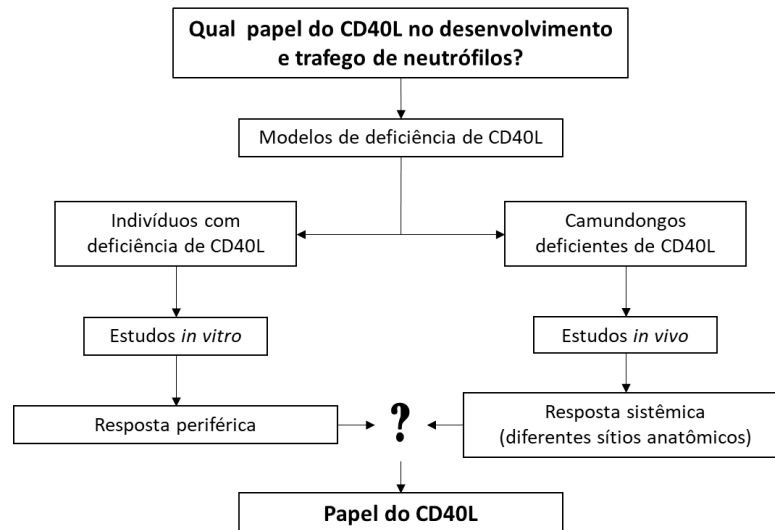
- Capacidade migratória;
- Expressão de receptores de quimiocinas;
- Polimerização da actina;
- Perfil transcripcional.

Avaliar em camundongos nocaute para o gene *Cd40lg*:

- Número de neutrófilos e demais populações celulares na medula óssea;
- Distribuição e celularidade de neutrófilos e demais populações celulares em órgãos periféricos (baço e cavidade peritoneal);
- Perfil transcripcional de neutrófilos da medula óssea.

## 9. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do trabalho foram utilizadas amostras de sangue periférico de pacientes com deficiência de CD40L e camundongos nocaute para o *Cd40lg* (CD40L<sup>-/-</sup>). O delineamento do trabalho encontra-se representada na **Figura 12**.



**Figura 12. Delineamento do trabalho experimental realizado com amostras humanas e camundongos.** O trabalho utilizou amostra de pacientes com deficiência de CD40L e camundongos nocaute para o *Cd40lg* (deficientes de CD40L) para investigar o efeito da ausência da sinalização pelo CD40L sob o desenvolvimento e tráfego de neutrófilos.

### 9.1. Estudo com amostras humanas

O estudo com humanos foi realizado a partir de neutrófilos isolados de amostra de sangue periférico coletadas de pacientes com deficiência de CD40L e de indivíduos sadios não aparentados. Para cada amostra de paciente processada, uma amostra de indivíduo sadio (controle) foi processada e os protocolos experimentais aplicados de maneira pareada. Sempre que possível, as amostras de sangue dos pacientes e dos indivíduos sadios foram mantidas em condições semelhantes de coleta, transporte e armazenamento, e os resultados obtidos com as amostras dos indivíduos sadios foram utilizados como controle experimental e para fins de comparação com a resposta apresentada pelos pacientes. A sequência dos procedimentos e experimentos realizados encontram-se representados na **Figura 13**.





**Figura 13. Fluxograma experimental dos ensaios realizados com neutrófilos humanos.** Sequência de procedimentos e experimentos realizados.

As amostras de sangue foram coletadas somente de indivíduos em condições clínicas estáveis de saúde, evitando desse modo qualquer alteração clínica em decorrência da coleta. A coleta de sangue dos indivíduos ocorreu mediante assinatura do TCLE e todos os procedimentos realizados respeitaram os limites de risco mínimo estabelecidos pela regulamentação da convenção de Genebra para pesquisa com seres humanos e do Conselho Nacional de Saúde. O projeto de pesquisa, o protocolo experimental e o termo de consentimento contemplam os quesitos éticos e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB – USP (CAAE 69005017.2.0000.5467).

### **9.1.1. Pacientes envolvidos no estudo**

O estudo utilizou amostras de sangue venoso periférico de pacientes previamente diagnosticados com deficiência de CD40L<sup>129</sup> e amostras de indivíduos saudáveis sem a presença de doença infectocontagiosa ou congênita diagnosticada até o momento da coleta. As infecções reportadas, mutações identificadas e ensaios realizados na coorte de pacientes deficientes de CD40L encontram-se descritos na **Tabela 8**.

**Tabela 8. Agentes infecciosos isolados, mutações identificadas e ensaios realizados na coorte de estudo.**

Pt.	Ano de nasc.	Patógenos isolados	Episódios de neutropenia	Troca no nucleotídeo	Efeito predito na proteína	Ensaio realizado		
						Migr.	Recept.	Polim. actina
KM	2007	<i>M. tuberculosis</i> <i>C. parvum</i>	Sim	c.419G>A	p.W140*	X	X	
PV	2008	<i>P. Jirovecii</i> <i>M. tuberculosis</i>	Sim	c. 437T>G	p.V126G	X		X
VB	2005	<i>P. jirovecii</i> HPV	Não	c.158_161del	p.I53Kfs*13	X		X
FB	1987	<i>Candida spp.</i>	Não	c.158_161del	p.I53Kfs*13	X	X	X
JV	2007	<i>P. jirovecii</i> <i>C. parvum</i>	Sim	c.440C>A	p.T147N	X	X	X
RO	2012	<i>C. dubliniensis</i> <i>P. aeruginosa</i>	Sim	c.158_161del	p.I53Kfs*13	X		X
BE	2005	IND	Sim	c.157-1G>T	Exon 2 skipping	X		
CG	2010	IND	Sim	c.156G>C	p.K52N			X

*C. dubliniensis*: *Cândida dubliniensis*; *C. albicans*: *Candida albicans*; *P. jirovecii*: *Pneumocystis jirovecii*; *M. tuberculosis*: *Micobacterium tuberculosis*; *E. coli*: *Escherichia coli*; HPV: Papilomavírus humano; *C. parvum*: *Cryptosporidium parvum*; Pt.:paciente; nasc.: nascimento; IND: informação não disponível; Migr.: migração; Recept.: receptores; Polim.: polimerização.

### 9.1.2. Isolamento de neutrófilos de sangue periférico

Os neutrófilos humanos foram isolados a partir de amostra de sangue periférico por sedimentação em Dextran (Sigma-Aldrich) seguida de centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque. Resumidamente, de 10-20 ml de sangue foram coletados em tubo estéril com heparina sódica, diluídos em 10-20 ml de Dextran 6% (proporção v:v) e sedimentados durante 20 minutos à 37 °C em estufa CO<sub>2</sub>. A fração rica em leucócitos e pobre em eritrócitos (camada superior) foi cuidadosamente transferida para tubo contendo 12 ml de Ficoll-Hypaque (densidade 1,077 g/ml) e submetida à centrifugação por 20 minutos à 900 x g, sem freio. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a lise hipotônica das hemácias residuais presentes no *pellet* celular foi realizada pela adição de 3 ml de água destilada estéril gelada, seguida da adição de 6ml de PBS aquecido. Após centrifugação de 10 minutos a 600 x g, o sobrenadante foi descartado e os neutrófilos foram ressuspensionados em meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol (Life Technologies), suplementado ou não com 5% de soro fetal bovino (inativado por calor). A quantificação celular foi realizada em câmara hemocitométrica, sendo a viabilidade celular avaliada pela utilização de azul de tripan 0,4%, tendo sido considerado aceitável quando 95% ou mais células apresentaram-se viáveis.

### 9.1.3. Ensaio de migração

A capacidade migratória em resposta a fatores quimioatraentes foi avaliada em placa de 24 poços contendo câmaras com membrana de policarbonato permeável com poros de 5  $\mu\text{m}$  (placa com *transwell*; Corning), como previamente descrito (com adaptações)<sup>140</sup>. Resumidamente, os neutrófilos ( $5 \times 10^5$ ) foram ressuspensos em 200 $\mu\text{l}$  PBS, adicionados na câmara superior (*transwell*) e mantidos em estufa com  $\text{CO}_2$  à 37 °C por 30 minutos para sedimentação celular. Após sedimentação, as câmaras com a suspensão celular foram transferidas para poços contendo 500 $\mu\text{l}$  de PBS sem tratamento ou contendo os estímulos quimioatraentes fMLP (20nM), IL-8 (10nM) ou C5-a (25nM). A placa foi então incubada por 45 minutos em estufa com  $\text{CO}_2$  à 37 °C e após tempo de incubação a suspensão dos poços inferiores (contendo as células que migraram) foi coletada e transferida para tubos de citometria. Para a dissociação das células aderidas, foram adicionados aos poços 300 $\mu\text{l}$  de PBS com EDTA 2mM e a placa foi incubada em estufa com  $\text{CO}_2$  à 37 °C por 15 minutos. Após incubação, a suspensão celular foi transferida para os tubos contendo as células previamente coletadas e as amostras foram fixadas com PBS-paraformaldeído 0,5%. O número de células que migraram foi quantificado por citometria de fluxo (Attune NxT). Foram adquiridos no citômetro metade do volume da suspensão celular obtida ao final do experimento (valores obtidos referentes a 50% do número de células que migraram). A migração espontânea apresentada pelos indivíduos sadios foi normalizada para 100% e as demais condições experimentais foram comparadas ao valor normalizado, como apresentado na fórmula abaixo, aonde MR é a migração relativa e MEC a migração espontânea apresentada pelo indivíduo controle sadio.

$$MR = \frac{\text{migração} \times 100}{MEC}$$

A migração apresentada pelas células dos pacientes foi comparada com a migração apresentada pelo indivíduo sadio processado simultaneamente de maneira a minimizar possíveis variações em decorrência do processamento em diferentes dias e condições.

### 9.1.4. Expressão de receptores de quimiocinas

A expressão dos receptores FPR1, CXCR2 e C5aR foi quantificada por citometria de fluxo. Para tanto, os neutrófilos ( $2 \times 10^5$ ) foram transferidos para tubos de citometria e

incubados com PBS contendo 1% de IgG humana e 2% de SFB durante 10 minutos para bloquear os receptores Fc e evitar ligações não específicas. Após incubação, as células foram lavadas (adição de 500µl PBS seguida de centrifugação à 600 x g, por 5 minutos) e ressuspendidas em 50µl de PBS para marcação com os anticorpos anti-CD66b (BD Biosciences), FPR1, CXCR2 e C5aR (Biolegend) por 30 minutos à 4°C em ambiente escuro. Após incubação, as células foram lavadas duas vezes e fixadas em PBS-paraformaldeído 0,5%. A análise foi realizada em citômetro de fluxo Attune NxT. A população de neutrófilos foi analisada utilizando os parâmetros de tamanho celular (FSC, do inglês *forward scatter*) versus complexidade celular (SSC, do inglês *side scatter*). A expressão dos receptores foi analisada a partir da população CD66b<sup>+</sup> (marcador específico de neutrófilos humanos). Foi realizada a aquisição de 10.000 eventos na população CD66b<sup>+</sup> para avaliação dos demais marcadores. A análise foi realizada no software FlowJo e resultados expressos em mediana da intensidade de fluorescência (MFI, do inglês *Median Fluorescence Intensity*).

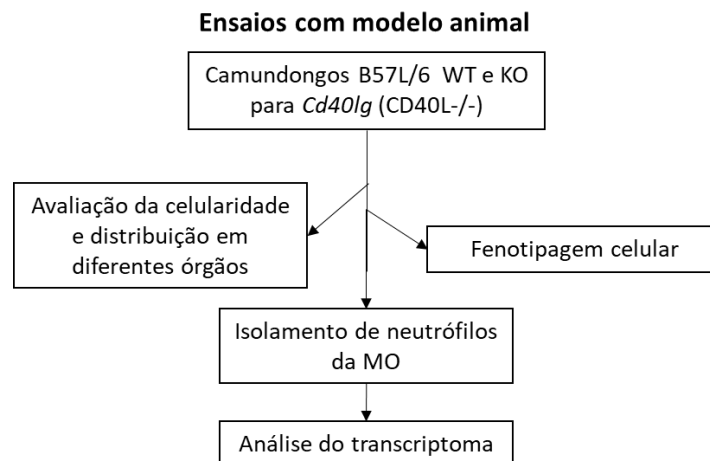
#### ***9.1.5. Avaliação da polimerização da actina***

A polimerização da actina foi quantificada pela marcação celular com o reagente faloidina, como previamente descrito (com adaptações)<sup>141</sup>. Resumidamente,  $2 \times 10^5$  neutrófilos foram ressuspendidos em 100µl de meio RPMI, ativados com os estímulos fMLP (20nM), IL-8 (10nM) ou C5-a (25nM) por 1 minuto e em seguida fixados com PBS-paraformaldeído 8% (adicionado à suspensão celular 100µL para uma concentração final de 4%) por 15 minutos. Após fixação, as células foram lavadas 2 vezes (adição de 500µl PBS seguida de centrifugação à 600 x g, por 5 minutos) e mantidas em PBS à 4°C de um dia para o outro. No dia seguinte, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,5% por 15 minutos e marcadas com o reagente faloidina (0,5ug/ml; Sigma-Aldrich), marcador específico de filamentos de actina polimerizada, por 40 minutos. Após marcação, as células foram lavadas 2 vezes e ressuspendidas em 500µl de PBS para leitura em citômetro de fluxo (Attune NxT). A polimerização espontânea da actina apresentada pelos indivíduos sadios (avaliada pelo parâmetro de MFI) foi normalizada para 100% e então as demais condições foram comparadas ao valor normalizado. Os resultados obtidos nos pacientes foram comparados com os resultados apresentados pelo indivíduo sadio processado simultaneamente de maneira a minimizar possíveis variações em decorrência do processamento em diferentes dias e condições.

A visualização da actina polimerizada foi realizada por microscopia de fluorescência como descrito previamente (com adaptações)<sup>142</sup>. Resumidamente, os neutrófilos ( $1 \times 10^5$  diluídos em 300 $\mu$ l RPMI) foram incubados na estufa com CO<sub>2</sub> à 37°C por 30 minutos para sedimentação em lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro (Knittel Glass) em placas de 24 poços. Após sedimentação, as células foram estimuladas com fMLP (50nM) ou IL-8 (20nM) por 1 minuto e em seguida fixadas pela adição de 300 $\mu$ l de PBS-paraformaldeído 8% (para uma concentração final da 4%) por 15 minutos. As lamínulas foram então lavadas com PBS e mantidas em PBS à 4°C de um dia para o outro. No dia seguinte, as lamínulas foram permeabilizadas em solução de Triton X-100 (0,5%), seguida de lavagem com PBS e incubação por 40 minutos com faloidina 1,25 $\mu$ g/ml. Após incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS e montadas em Mowiol sobre lâminas de vidro. A análise e captura de imagens foi realizada em microscópio de fluorescência AXIO Vert A.1 (Carl Zeiss).

## 9.2. Estudo com modelo animal

A sequência dos procedimentos e experimentos realizados encontram-se representados na **Figura 14**.



**Figura 14. Fluxograma experimental dos ensaios realizados com camundongos CD40L<sup>-/-</sup>.** Sequência de procedimentos e experimentos realizados nos camundongos CD40L<sup>-/-</sup>. WT: wild-type; KO: *knockout* ou nocaute; MO: medula óssea.

### 9.2.1. Camundongos selvagens e nocautes para o *Cd40lg*

Os camundongos C57BL/6 (B6) selvagens (sem mutação ou *wild-type* [WT]) foram adquiridos da empresa Harlem Olac (Bicester, Reino Unido) e os camundongos B6 nocautes

ou *knockout* para o *Cd40lg* ( $CD40L^{-/-}$ )<sup>143</sup> foram gentilmente doados pelo Doutor Richard Flavel (Departamento de Imunologia, Escola de Medicina da Universidade de Yale, New Haven). Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Medicina e Ciências da Saúde da Universidade dos Emirados Árabes Unidos (UAEU, Al Ain, Emirados Árabes Unidos) e investigados entre 8 a 12 semanas de idade. Os experimentos foram conduzidos no laboratório do Professor Doutor Basel Al-Ramadi (Departamento de Microbiologia, UAEU) de acordo e após aprovação do Comitê de ética em Estudo com Animais da UAEU.

### **9.2.2. Coleta de células da cavidade peritoneal, baço e medula óssea**

Resumidamente, a eutanásia dos camundongos foi realizada por método químico inalante através do confinamento dos animais em câmara com o anestésico inalatório isoflurano (IsoFlo®; Zoetis). Após eutanásia, foram injetados 10ml de PBS na cavidade intraperitoneal dos camundongos para suspensão das células intraperitoneais. O volume injetado foi em seguida coletado, centrifugado por 5 min à 600 x g sob refrigeração e o pellet celular ressuspendido em 1ml de PBS (mantido em gelo até contagem celular). Para coleta das células do baço, o órgão foi removido, pesado, macerado em 5ml de PBS e após centrifugação por 5 minutos à 600 x g (sob refrigeração) a lise das hemácias foi realizada pela adição de 1ml de tampão de lise de células vermelhas (Biolegend). Após lavagem das células pela adição de 9ml de PBS seguida de centrifugação por 5 minutos à 600 x g, o pellet celular foi ressuspendido em 1ml de PBS e mantido em gelo até contagem celular. A coleta da MO foi realizada pela extração dos ossos tíbia e fêmur dos membros inferiores e lavagem da parte interna do osso com 1ml de PBS. A suspensão celular foi então centrifugada por 5 minutos à 600 x g sob refrigeração e a lise das hemácias foi realizada pela adição de 1ml de tampão de lise. Em seguida, foram adicionados 9ml de PBS e a suspensão celular filtrada em filtro *cell strainer* de 40um. A suspensão foi então centrifugada por 5 minutos à 600 x g e o pellet celular foi ressuspendido em 1ml de PBS (mantido em gelo até contagem celular). Todos os grupos celulares foram quantificados em câmara hemocitométrica.

### **9.2.3. Fenotipagem celular**

A fenotipagem celular foi realizada em células da cavidade peritoneal, baço e MO. Para tanto, após a extração e processamento dos respectivos órgãos, as células ( $5 \times 10^5$ ) foram

distribuídas em placa de 96 poços com fundo redondo e incubadas por 30 minutos à 4°C com o anticorpo anti-CD16/CD32-*specific mAb* (Biolegend) para bloquear as ligações inespecíficas. Após lavagem da placa pela adição de 10µL de PBS e centrifugação por 5 minutos à 600 x g (sob refrigeração), as células foram marcadas com os anticorpos anti- CD3, CD4, CD8, CD19 e NK1.1 para marcação de células linfóides (painel 1) ou com os anticorpos anti-CD11b, Ly6G, CD11c e CD19 para marcações de células da linhagem mielóide (painel 2). O marcador de viabilidade *Zombie Aqua 510* foi utilizado em todas as marcações para excluir células não viáveis da análise. Foi realizada a aquisição de 30.000 células em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) e os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do software FACSDiva (BD Biosciences). A contagem das subpopulações foi estimada pela comparação da porcentagem de células expressando os marcadores específicos com a média do número total de células obtidas antes da marcação das células.

#### ***9.2.4. Isolamento de neutrófilos da medula óssea e sequenciamento do RNA***

Após a coleta e contagem das células da MO (descrito no item 3.3.2), os neutrófilos foram isolados em coluna magnética (separação negativa) utilizando o kit de separação celular *Neutrophil Isolation Kit-mouse* (Miltenyi Biotec) conforme instruções do fabricante. Resumidamente, as células (até  $50 \times 10^6$ ) foram incubadas por 10 minutos a 4°C com o coquetel de anticorpos. Após lavagem da suspensão celular pela adição de 4mL de tampão de marcação e centrifugação à 600 x g, por 5 minutos, as células foram incubadas por 15 minutos à 4°C com as esferas magnéticas. A separação foi realizada no separador automático AutoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec). Após separação celular, as células foram contadas e pureza celular verificada pela marcação com os anticorpos anti-CD11b e Ly6G, sendo considerada satisfatória as separações com pureza de células Ly6G<sup>+</sup> acima de 87%. As células foram armazenadas em 1m de Trizol à -80°C até envio à prestadora de serviços Novogene, onde as amostras foram processadas para extração e sequenciamento dos RNAs mensageiros. Após sequenciamento, as leituras foram alinhadas ao genoma de referência usando o software STAR.

### 9.3. Seleção de dados de sequenciamento públicos

Os conjuntos de dados públicos (*datasets*) de sequenciamento de RNA (RNAseq) foram obtidos dos repositórios de dados genômicos funcionais “*Gene Expression Omnibus - GEO- DataSets*”<sup>144,145</sup> e “*ArrayExpress*”<sup>146</sup>. Os termos “neutrófilo” e “desenvolvimento” foram usados como filtros iniciais. Os *datasets* foram filtrados com base no organismo (*Mus musculus*), fonte de neutrófilos (neutrófilos da MO) e tipo de estudo (perfil de expressão por sequenciamento de alto rendimento; *Next-generation sequencing- NGS*). Como critérios de controle de qualidade, foram excluídos todos os *datasets* com réplicas menores que três para cada grupo de estudo ou sem informações sobre o protocolo experimental aplicado. Por fim, dentre os estudos restantes, foram selecionados os *datasets* no qual os estudos originais correlacionaram as subpopulações de neutrófilos identificadas no estudo aos diferentes estágios clássicos de desenvolvimento de neutrófilos (mieloblastos, promielócitos, mielócitos, metamielócitos e células maduras). Apenas um conjunto de dados (*dataset* GSE137538)<sup>147</sup> correspondeu aos filtros aplicados e foi usado no estudo. Para o modelo humano, utilizamos os resultados de RNAseq obtidos em nosso último estudo (*dataset* E-MTAB-5316), sendo este o único *dataset* disponível em bancos de dados públicos correspondendo aos termos “neutrófilos” e “pacientes deficientes em CD40L”<sup>66</sup>.

### 9.4. Análise bioinformática

O nível de expressão gênica foi estimado após a normalização dos dados usando o método *Fragments Per Kilobase of Transcript Sequence by Million Base Pair Sequenced* (FPKM). A análise da expressão diferencial dos grupos foi realizada usando DESeq2 por meio da plataforma online NetworkAnalyst<sup>148</sup>. Para a visualização dos dados, diferentes ferramentas de bioinformática online e pacotes do software ‘R’ foram utilizados. O gráfico Volcano plot foi gerado usando o pacote R VolcanoPlot, a análise de coexpressão foi realizada usando o WebCemiTool<sup>149</sup>, os mapas de calor circulares foram gerados usando o pacote R Circlize, o Circleplot foi construído usando o Circos Table Viewer<sup>150</sup>, os mapas de calor (*heatmaps*) foram gerados usando o ClustVis<sup>151</sup>, os *heatmaps* de bolha foram gerados usando o Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>) e os diagramas de Venn foram criados usando o InteractiVenn<sup>152</sup>. As análises de ontologia genética foram realizadas pelo Panther<sup>153</sup> e NCI-Nature<sup>154</sup> e as interações de vias pelo Enrichr<sup>155</sup>.



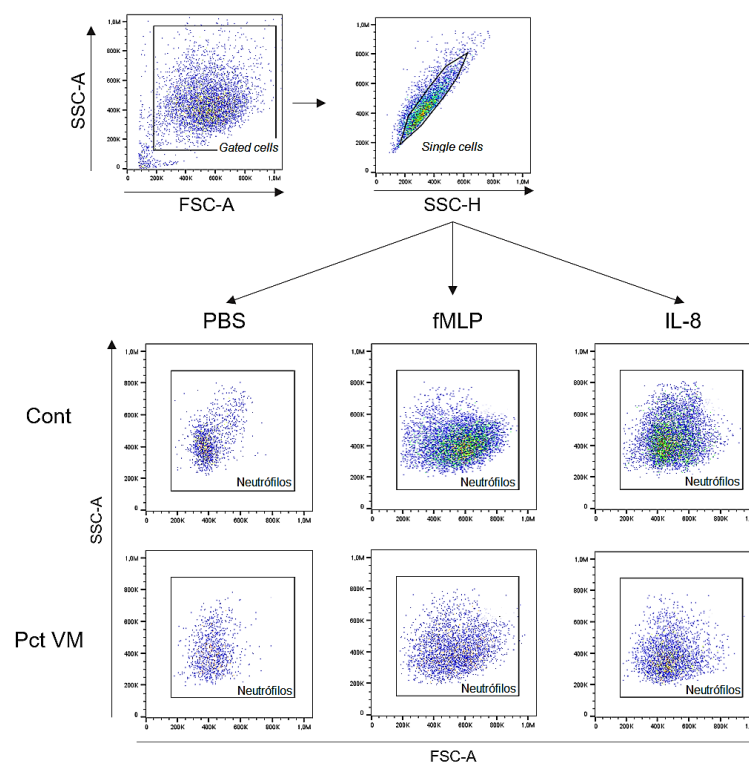
## 9.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). O teste estatístico mais indicado, de acordo com as amostras avaliadas e ensaios realizados, foram definidos após aplicação de teste de normalidade (D'Agostino-Pearson). De acordo com o ensaio e distribuição amostral apresentada, foi aplicado o teste estatístico Mann-Whitney (comparação entre grupos, dados com distribuição não paramétrica e não pareados) ou teste t de student (comparação entre grupos, dados com distribuição paramétrica e não pareados). O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

## 10. RESULTADOS

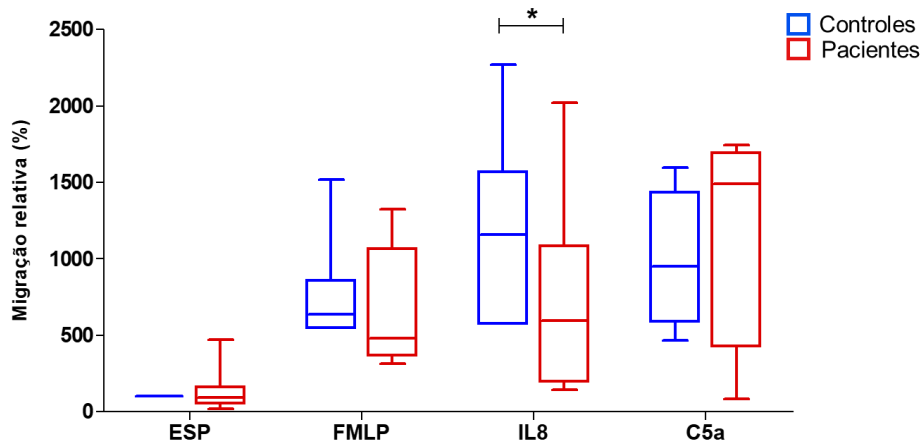
### 10.1. Neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L apresentam defeitos na migração em resposta à quimiocina IL-8

Uma vez que a análise preliminar do transcriptoma de pacientes com deficiência de CD40L e os ensaios conduzidos com camundongos CD40L<sup>-/-</sup> sugeriam defeitos na migração de neutrófilos<sup>66</sup>, decidimos avaliar a capacidade migratória dos neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L em resposta aos quimioatraentes fMLP, IL-8 e C5a. A estratégia de análise utilizada para a quantificação dos neutrófilos e o gráfico de pontos representativos do ensaio estão representados na **Figura 15**.



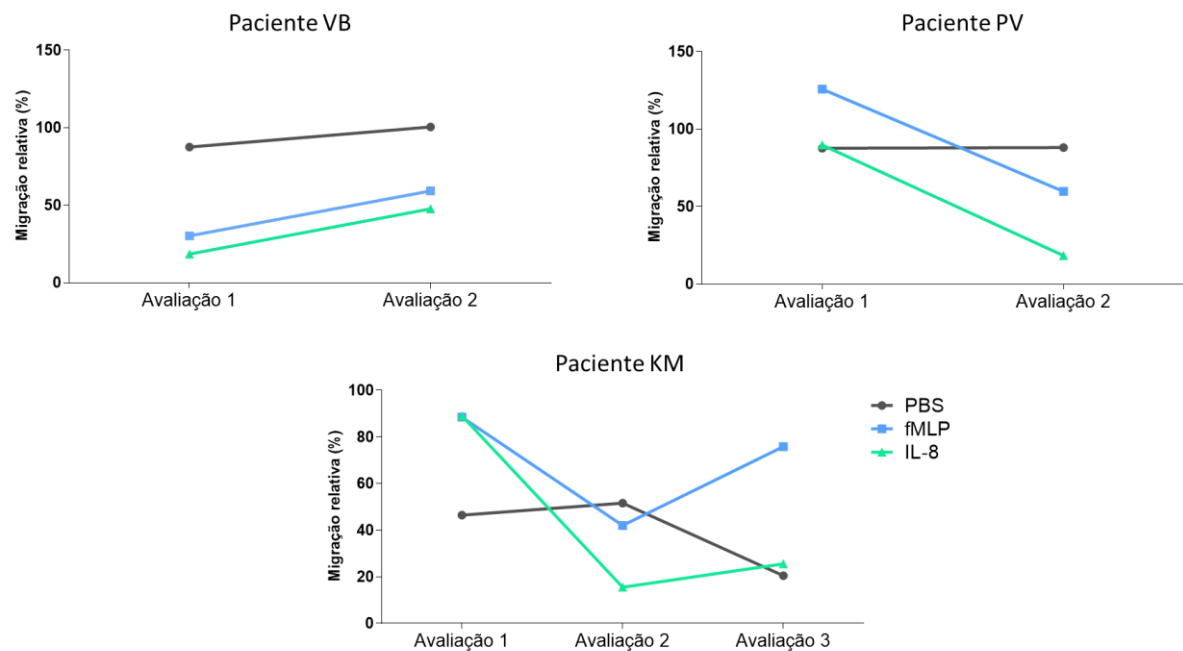
**Figura 15. Estratégia de análise e gráfico de pontos representativos do ensaio de migração.** Os neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L e de indivíduos saudáveis (controle) foram incubados em placa com *transwell* por 45 minutos com PBS, fMLP (20nM) ou IL-8 (10nM), e número de células que migraram foi quantificado por citometria de fluxo. Foi adquirido no citômetro metade do volume da suspensão celular obtida ao final do experimento (valores apresentados referentes a 50% do número de células que migraram). Gráfico de pontos representativo da avaliação realizada em indivíduos saudáveis e pacientes. Cont: controle; Pct: paciente.

A avaliação da migração revelou que neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L apresentam redução na migração em resposta ao quimioatraente IL-8 quando comparada com a migração apresentada pelos indivíduos saudáveis, enquanto a resposta aos demais quimioatraentes mostrou-se sem diferença estatística (**Figura 16**).



**Figura 16. Avaliação da capacidade migratória de neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L em resposta a estímulos quimioatraentes.** Após incubação dos neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L e de indivíduos saudáveis (controle) por 45 minutos com PBS, fMLP (20nM), IL-8 (10nM) ou C5-a (25nM) em placa com *transwell*, o número de células que migraram foi quantificado por citometria de fluxo. Valores apresentados correspondentes à migração espontânea dos indivíduos saudáveis normalizados para 100% e comparados aos demais valores apresentados. O valor de cada paciente foi comparado com os valores apresentados pelo indivíduo sadio processado no mesmo dia. Migração relativa expressa em %. n=7 (C5a: n=5); \* p< 0,05 (teste Mann-Whitney, two-tailed).

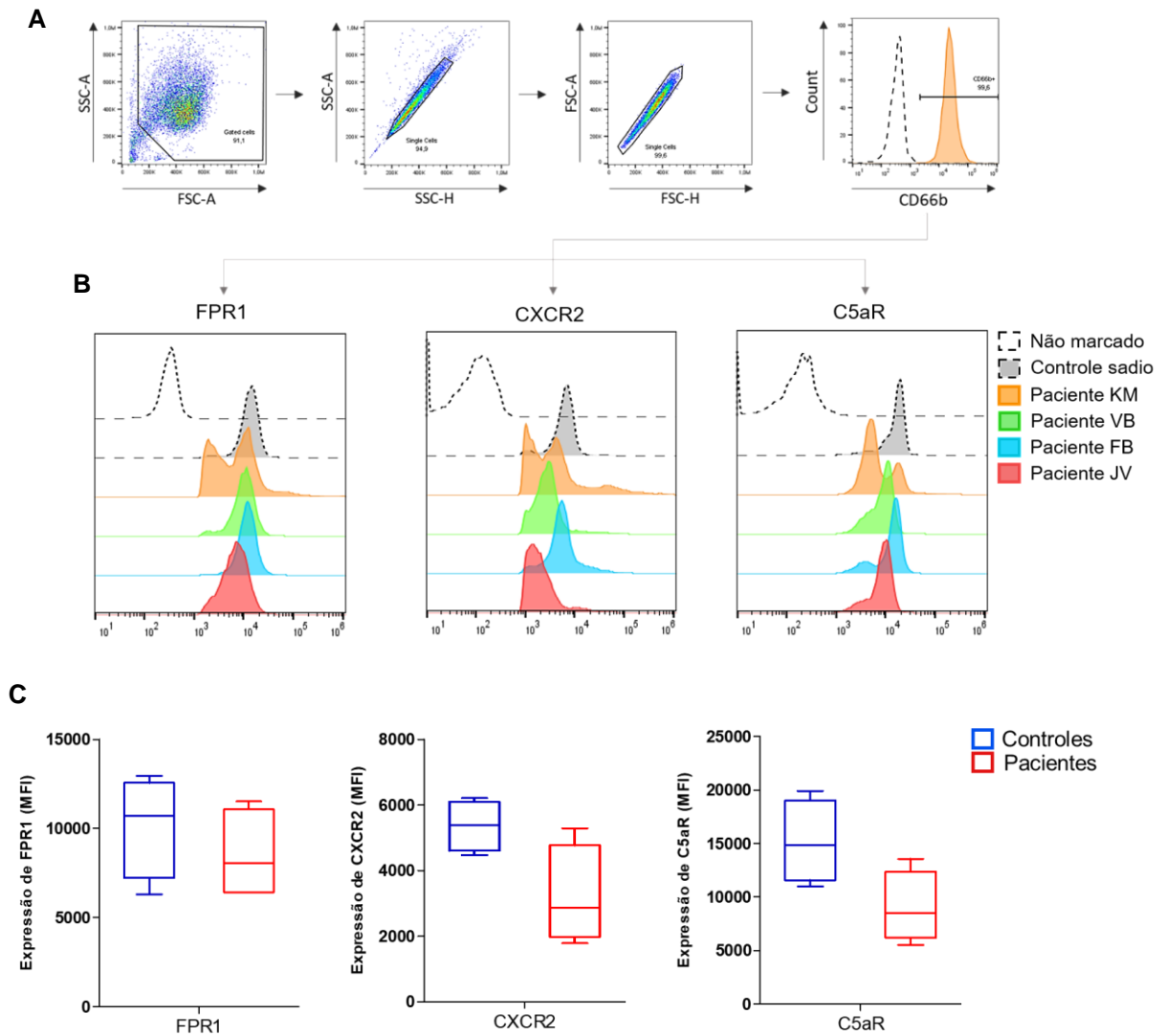
A capacidade migratória dos neutrófilos foi avaliada em sete pacientes, dos quais os pacientes VB, PV e KM foram avaliados em mais de uma oportunidade (todas as avaliações foram incluídas na análise apresentada na **Figura 16**). Os medicamentos em uso e condições clínicas dos pacientes em cada avaliação encontram-se resumidas no **Anexo C**. Enquanto os neutrófilos do paciente VB apresentaram migração reduzida em ambos os momentos avaliados e em resposta aos dois estímulos utilizados, a migração do paciente PV em resposta ao estímulo fMLP variou entre normal e reduzida, embora a redução na migração em resposta ao IL-8 mostrou-se consistente nas duas análises. Por sua vez, o paciente KM foi avaliado em três momentos diferentes, apresentando valores normais de migração na primeira coleta e valores alterados na segunda e terceira avaliação em resposta aos estímulos IL-8 e fMLP (**Figura 17**).



**Figura 17. Variação da migração apresentada pelos pacientes com deficiência de CD40L avaliados em diferentes momentos.** Após incubação dos neutrófilos de pacientes e de indivíduos saudáveis (controle) por 45 minutos com PBS, fMLP (20nM) ou IL-8 (10nM) em placa com *transwell*, o número de células que migraram foi quantificado por citometria de fluxo. Valores apresentados pelos indivíduos saudáveis foram normalizados para 100% e então comparados aos valores apresentados pelos pacientes. Os valores apresentados pelos pacientes foram pareados aos valores apresentados pelo controle sadio processado no mesmo dia. Migração relativa expressa em %.

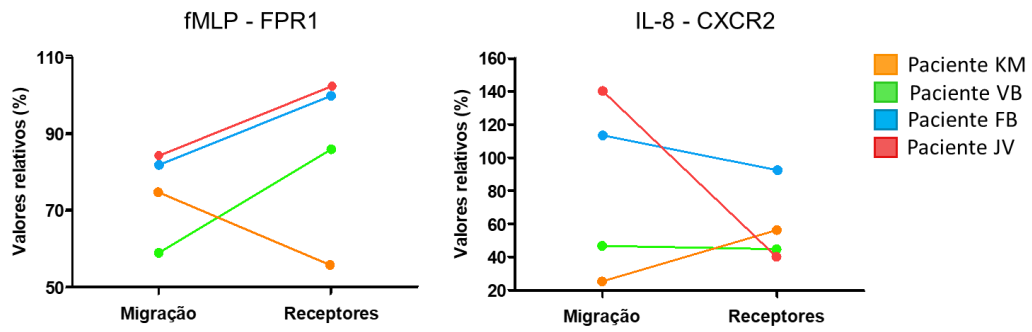
## 10.2. Variação na expressão dos receptores FPR1, CXCR2 e C5aR em neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L

Para investigar se a alteração na migração celular estava sendo causada pela ausência na expressão dos receptores, avaliamos a expressão dos receptores FPR1, CXCR2 e C5aR, receptores das quimiocinas fMLP, IL-8 e C5a, respectivamente, por citometria de fluxo. A estratégia de análise utilizada, o histograma representativo da marcação dos receptores e o resultado da avaliação encontram-se representados na **Figura 18A-C**. Embora na análise em grupo a expressão dos receptores não tenha apresentado diferença estatística quando comparado os pacientes com os indivíduos saudáveis (**Figura 18 C**), a análise individual do padrão de expressão dos receptores, ilustrado pelos histogramas representativos das marcações, sugere variação na expressão do receptor CXCR2 em três dos quatro pacientes avaliados (pacientes KM, FB e JB; **Figura 18B**).



**Figura 18. Expressão dos receptores FPR1, CXCR2 e C5aR em neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L.** A expressão dos receptores FPR1, CXCR2 e C5aR em neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L e de indivíduos sadios (controle) foram quantificadas por citometria de fluxo. (A) Estratégia de análise: população de neutrófilos determinada pelos parâmetros de FSC vs SSC e FSC-a vs FCS-H, seguida da seleção de “single cells” pelos parâmetros SSC-A vs SSC-H. Expressão de receptores avaliada nas células CD66b+ (neutrófilos). (B) Histograma representativo da marcação apresentada por pacientes e indivíduos controle. (C) Valores referentes a expressão dos receptores fMLP-R, CXCR2 e C5-a expressos em MFI. n=4.

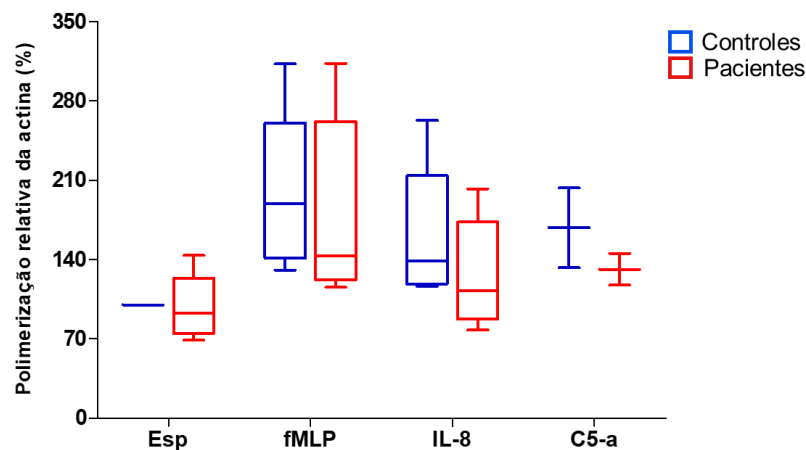
Considerando que a alteração na expressão do receptor CXCR2 poderia justificar a redução na migração em resposta ao IL-8, e assumindo que a ausência de significância estatística estaria relacionada ao baixo número de amostras analisadas, comparamos a migração apresentada em resposta aos estímulos fMLP e IL-8 com o nível de expressão de seus respectivos receptores (**Figura 19**). No entanto, não foram observados indícios de causalidade entre os resultados encontrados.



**Figura 19. Comparação entre resposta migratória e expressão de receptores.** Valores apresentados referente a migração relativa e expressão relativa de receptores dos pacientes KM, VB, FB e JV (experimentos realizados no mesmo dia). Os valores apresentados pelos indivíduos sadios foram normalizados para 100% e então comparados aos valores apresentados pelos pacientes. Migração relativa e expressão relativa expressas em %.

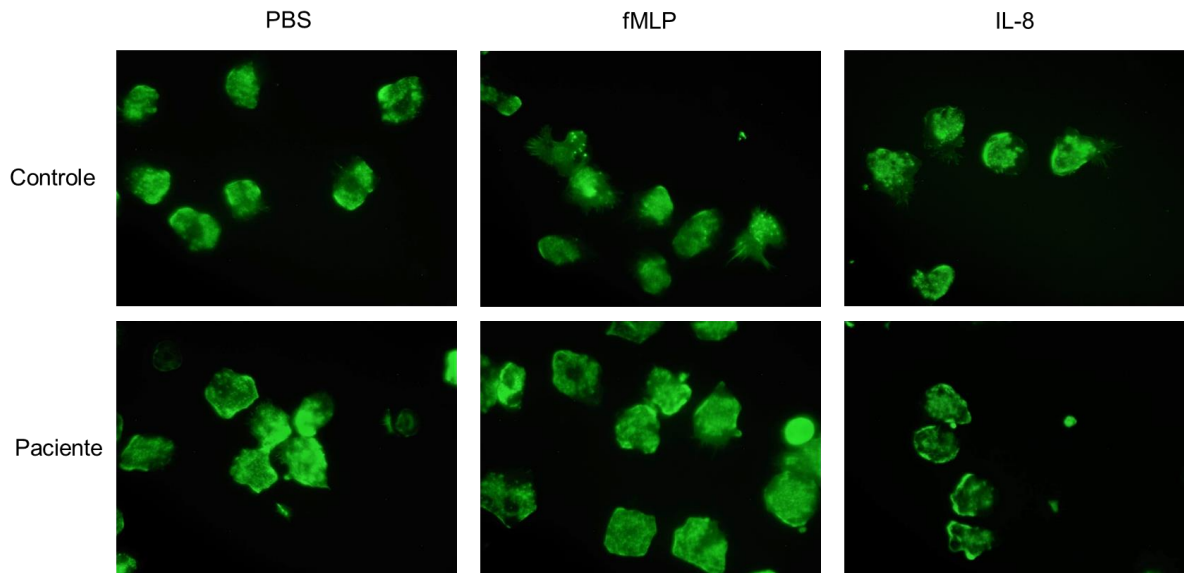
### 10.3. Neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L apresentam níveis normais de polimerização da actina

A polimerização da actina é um processo crucial para o remodelamento morfológico celular e permite o processo de diapedese e recrutamento ao sítio inflamatório<sup>141</sup>. Assim, avaliamos a polimerização da actina em neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L e de indivíduos sadios após a ativação celular com fMLP, IL-8 ou C5a por citometria de fluxo. A análise da marcação dos neutrófilos com faloidina, reagente intercalante de actina polimerizada, não indicou alteração quando comparados pacientes e indivíduos sadios (**Figura 20**).



**Figura 20. Avaliação da polimerização da actina em neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L após estimulação com quimioatraentes.** Os neutrófilos de pacientes e indivíduos sadios (controle) foram ativados com fMLP (50nM), IL-8 (20nM) ou C5a (25nM) por 1 minuto e a polimerização da actina foi quantificada pela marcação com o reagente faloidina por citometria de fluxo. Valores apresentados expressos em % de polimerização relativa da actina (valores apresentados pelos indivíduos sadios normalizados para 100% e então comparados aos valores apresentados pelos pacientes). Os valores dos pacientes foram pareados aos valores apresentados pelo controle processado no mesmo dia. n=5 (C5-a: n=2).

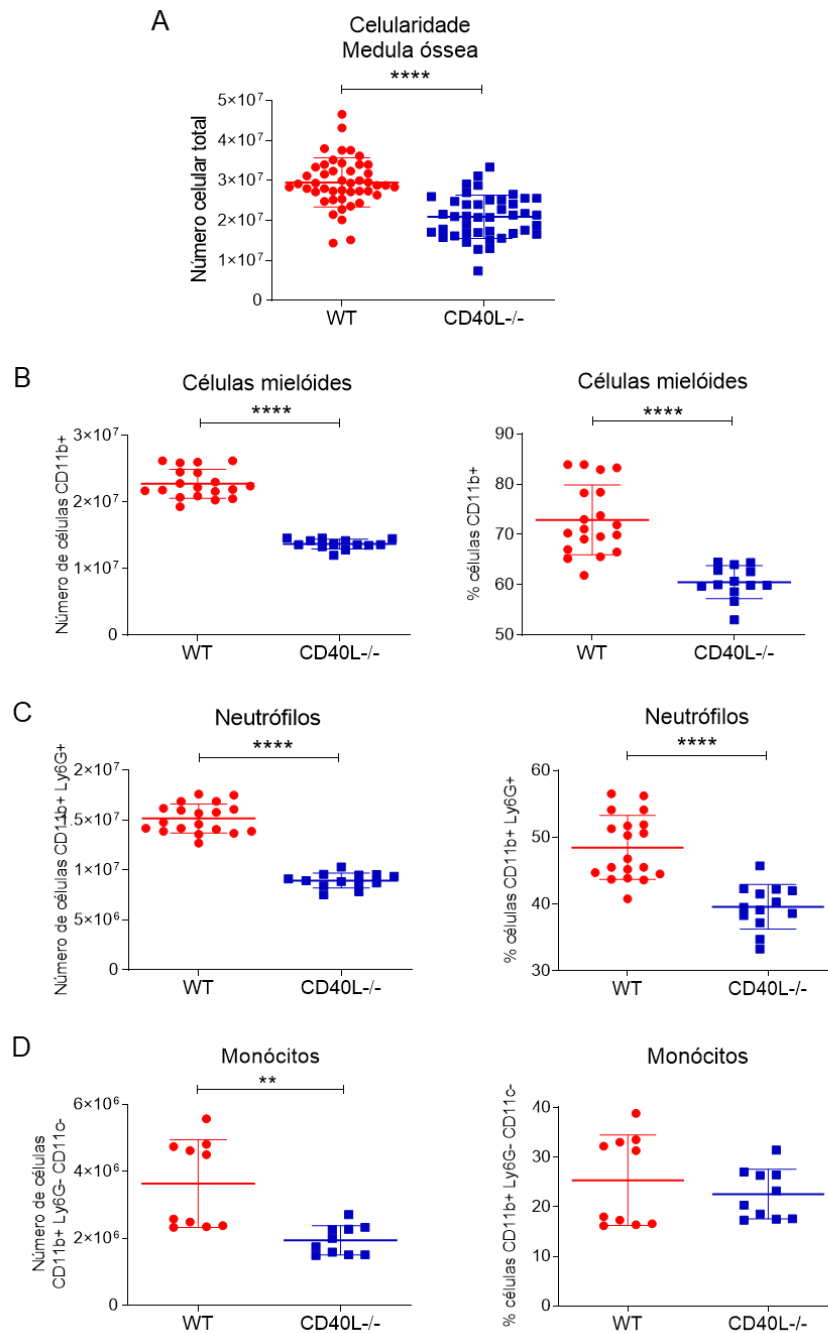
A polimerização da actina nos neutrófilos também foi avaliada por microscopia de fluorescência e confirmou uma intensidade de marcação similar (avaliação qualitativa) na comparação entre pacientes e indivíduos saudáveis (**Figura 21**).



**Figura 21. Microscopia de fluorescência da actina polimerizada após ativação celular.** Os neutrófilos de pacientes e indivíduos saudáveis (controle) foram ativados com fMLP (50nM) ou IL-8 (20nM) por 1 minuto seguida da marcação celular com faloidina. Imagens representativas da avaliação realizada em dois pacientes.

#### 10.4. Camundongos CD40L<sup>-/-</sup> apresentam alteração na mielopoiese e granulopoiese

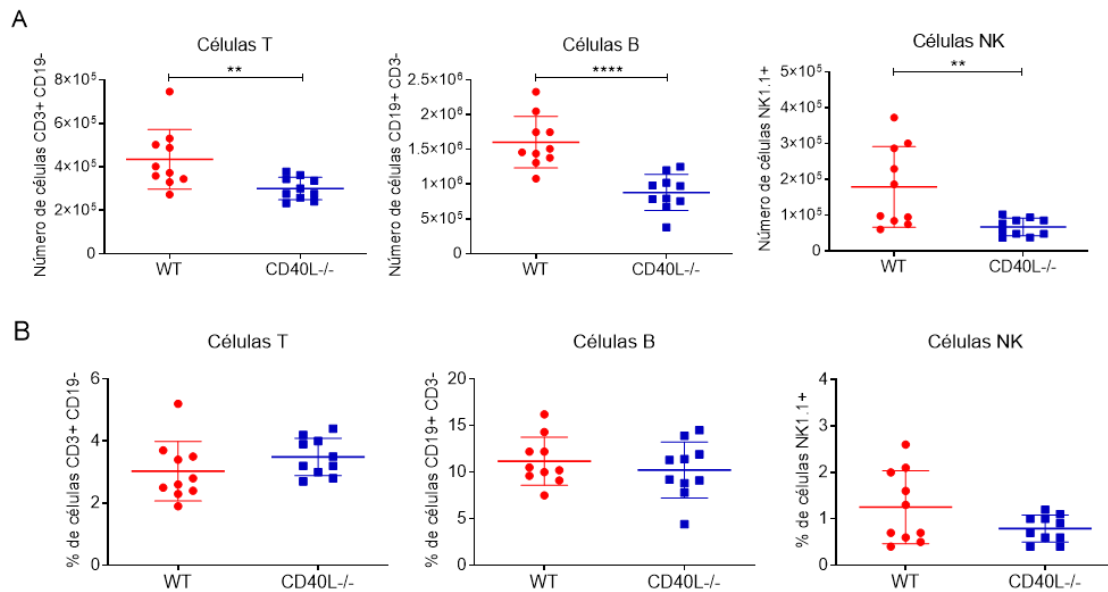
Estudos apontam que a sinalização pelo CD40L na MO participa dos processos de mielopoiese e granulopoiese<sup>77,78</sup>. Com o objetivo de investigar a consequência da ausência de CD40L na geração de neutrófilos, coletamos a MO de camundongos WT e de camundongos CD40L<sup>-/-</sup> e analisamos as populações celulares presentes por citometria de fluxo. A investigação revelou que camundongos CD40L<sup>-/-</sup> apresentaram redução significativa no número total de células na MO em comparação com o grupo controle WT (**Figura 22A**). A avaliação das populações celulares presentes na MO revelou redução no número e na porcentagem de células mielóides totais (CD11b<sup>+</sup>; **Figura 22B**) e suas subpopulações de neutrófilos (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>, **Figura 22C**) e monócitos (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup>, **Figura 22D**).



**Figura 22. Avaliação das populações de células mielóides totais, neutrófilos e monócitos na medula óssea.** A medula óssea (MO) de camundongos WT e CD40L<sup>-/-</sup> foram coletadas pela lavagem dos ossos fêmur e tíbia e as células marcadas com os anticorpos anti-CD11b, Ly6G, e CD11c para identificação de células mielóides, neutrófilos e monócitos por citometria de fluxo. (A) Contagem de leucócitos totais da MO (WT: n=46, CD40L<sup>-/-</sup>: n=42). Contagem e porcentagem de (B) células mielóides (CD11b<sup>+</sup>), (C) neutrófilos (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>) e (D) monócitos (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup>). WT: n = 19; CD40L<sup>-/-</sup>: n = 13; monócitos WT e CD40L<sup>-/-</sup>: n = 10. \*\* p < 0,01, \*\*\*\* p < 0,0001 (teste t de student, two-tailed).

Em contrapartida, embora os números absolutos das células linfóides (células T, B e NK) na MO tenham se mostrado reduzidos (**Figura 23A**), a porcentagem dessas subpopulações revelaram-se semelhantes na comparação entre os grupos (**Figura 23B**).

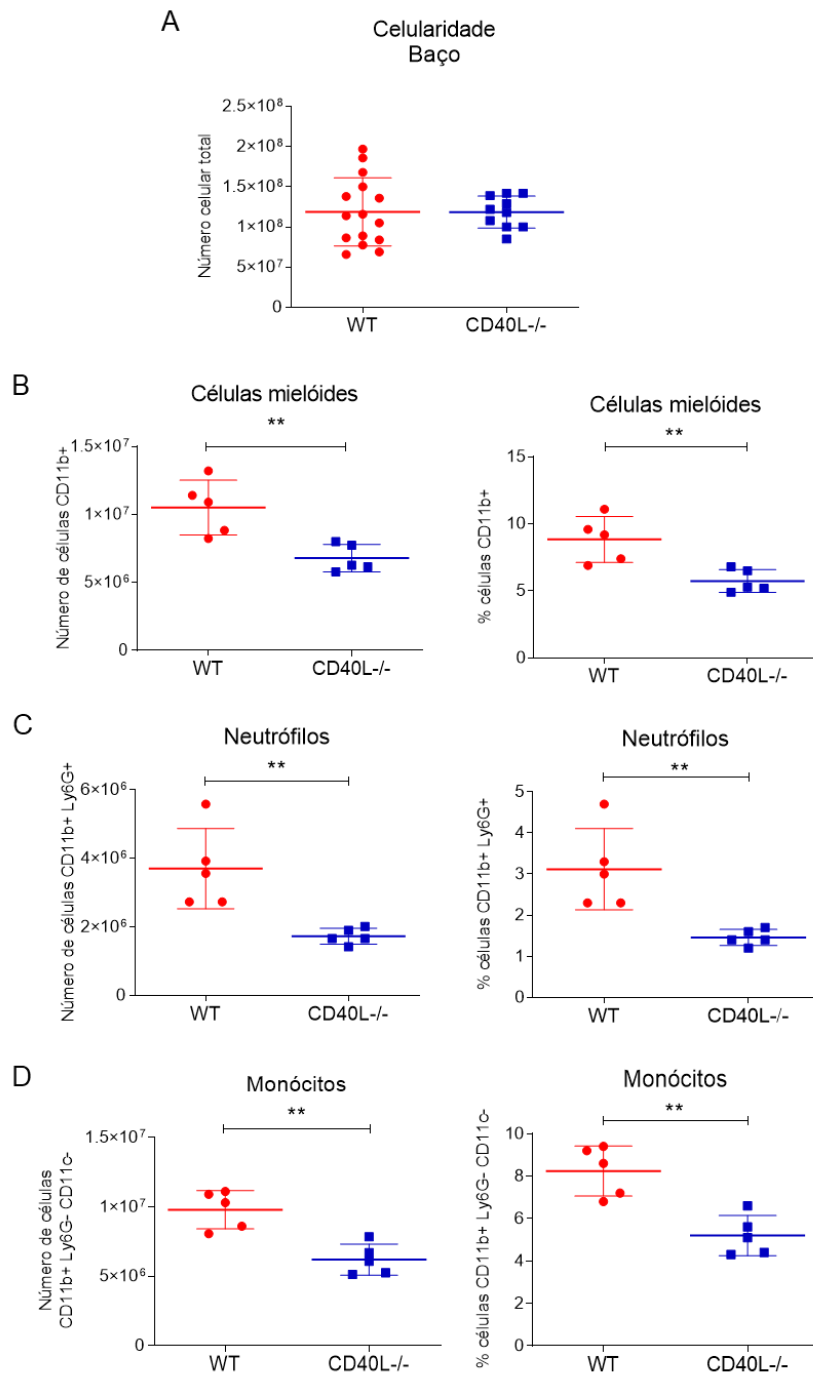




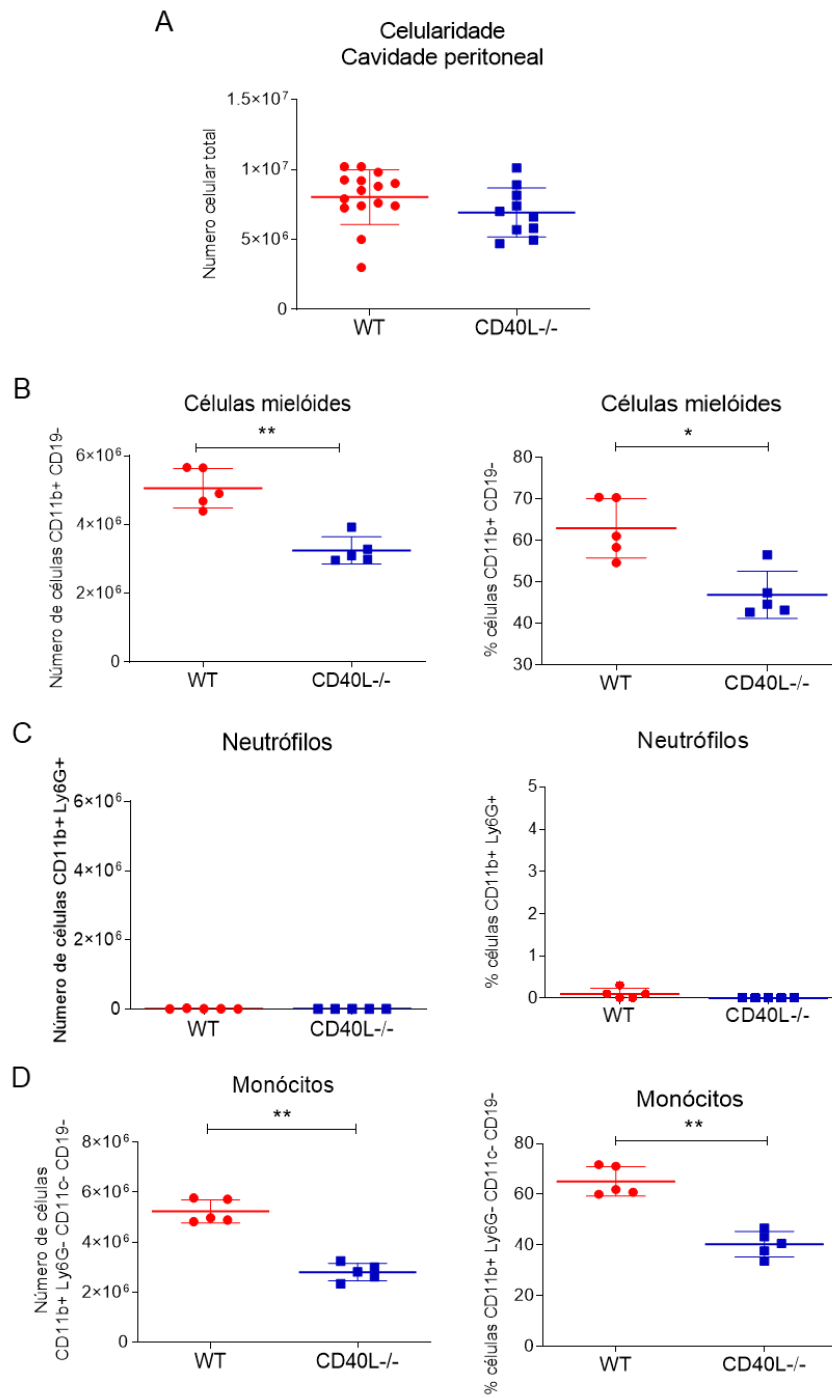
**Figura 23. Avaliação da distribuição das células linfoides na medula óssea.** As células da medula óssea de camundongos WT e camundongos CD40L<sup>-/-</sup> foram marcadas com os anticorpos anti-CD3, CD19 e NK1.1 para identificação de células T (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>), células B (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) e células NK (NK1.1<sup>+</sup>). As populações foram avaliadas quanto ao (A) número e (B) porcentagem celular. Valores referentes ao número celular calculado a partir da média da celularidade de cada órgão. n=10. \*\* p < 0,01, \*\*\*\* p < 0,0001 (teste t de student, two-tailed).

### 10.5. Redução das células mielóides em órgãos periféricos de camundongos CD40L<sup>-/-</sup>

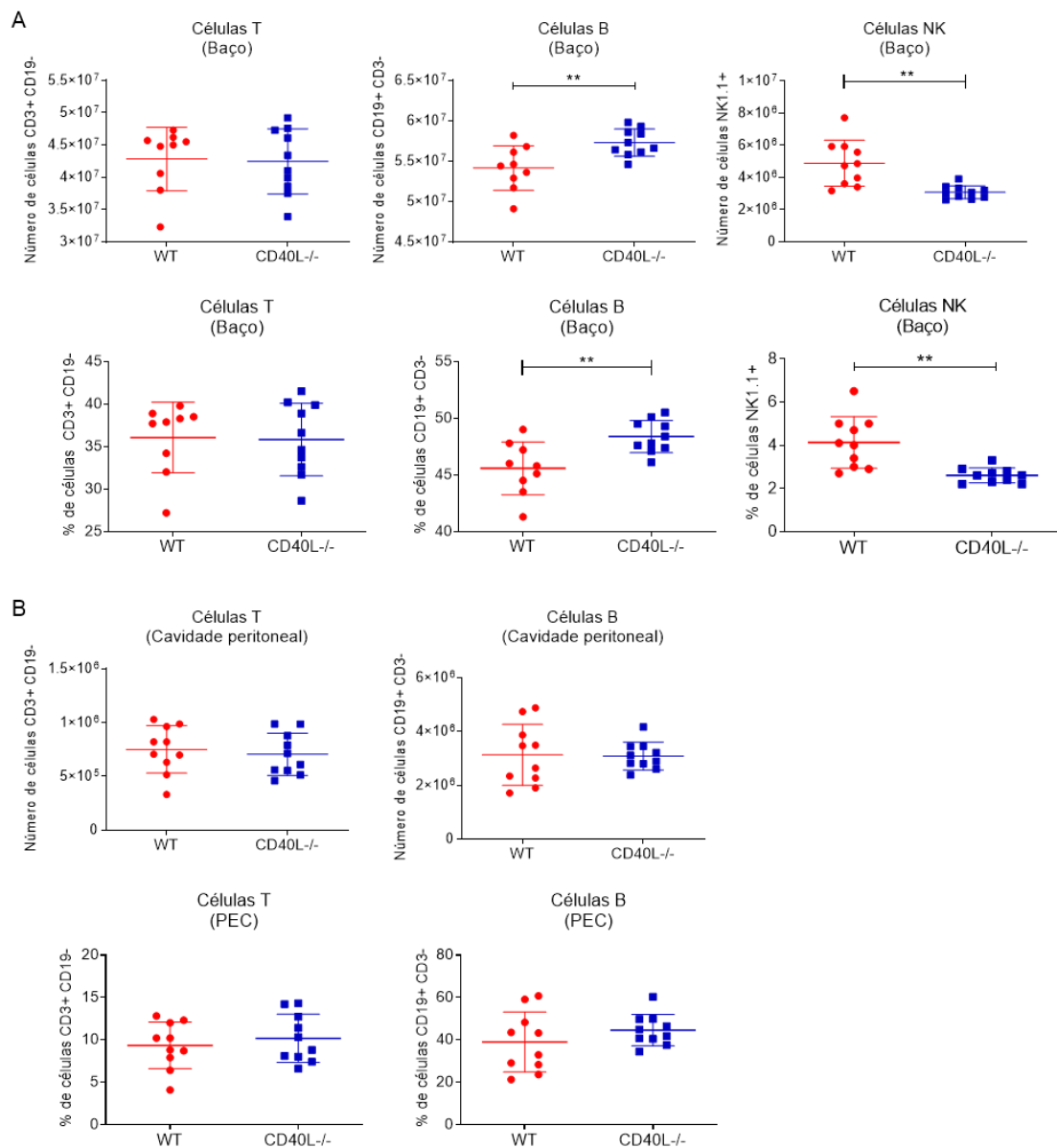
Para investigar a distribuição das células mielóides nos órgãos periféricos, avaliamos as populações de células mielóides totais, de neutrófilos e de monócitos presentes no baço e na cavidade peritoneal. Enquanto o número total de leucócitos no baço (**Figura 24A**) e na cavidade peritoneal (**Figura 25A**) se mostrou equivalente entre os dois grupos, os camundongos CD40L<sup>-/-</sup> apresentaram redução das três populações avaliadas tanto no baço (**Figura 24B-D**) quanto na cavidade peritoneal (**Figura 25B-D**; com exceção dos neutrófilos na cavidade peritoneal, pois esta população não é encontrada neste sítio anatômico em condições de homeostasia). No que se refere às subpopulações de células linfoides (células B, células T e células NK), o baço dos camundongos CD40L<sup>-/-</sup> exibiram porcentagem/números de células B aumentadas e números/porcentagens reduzidos de células NK (**Figura 26A**), embora não tenham sido observadas alterações na cavidade peritoneal (**Figura 26B**).



**Figura 24. Avaliação da distribuição das populações de células mielóides totais, neutrófilos e monócitos no baço.** As células do baço de camundongos WT e CD40L<sup>-/-</sup> foram coletadas e em seguida marcadas com os anticorpos anti-CD11b, Ly6G e CD11c para identificação de células mielóides, neutrófilos e monócitos por citometria de fluxo. (A) Contagem de leucócitos totais no baço (WT: n= 15; CD40L<sup>-/-</sup>: n=10). Contagem e porcentagem de (B) células mielóides (CD11b<sup>+</sup>), (C) neutrófilos (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>) e (D) monócitos (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup>). n=5. \*\* p <0,01 (teste Mann-Whitney, two-tailed).



**Figura 25. Avaliação da distribuição das populações de células mielóides totais, neutrófilos e monócitos na cavidade peritoneal.** As células da cavidade peritoneal de camundongos WT e CD40L<sup>-/-</sup> foram coletadas e em seguida marcadas com os anticorpos anti-CD11b, Ly6G, CD11c e CD19 para identificação de células mielóides, neutrófilos e monócitos por citometria de fluxo. (A) Contagem de leucócitos totais no baço (WT: n= 15; CD40L<sup>-/-</sup>: n=10). Contagem e porcentagem de (B) células mielóides (CD11b<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>) (C) neutrófilos (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>) e (D) monócitos (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>). n=5. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 (teste Mann-Whitney, two-tailed).

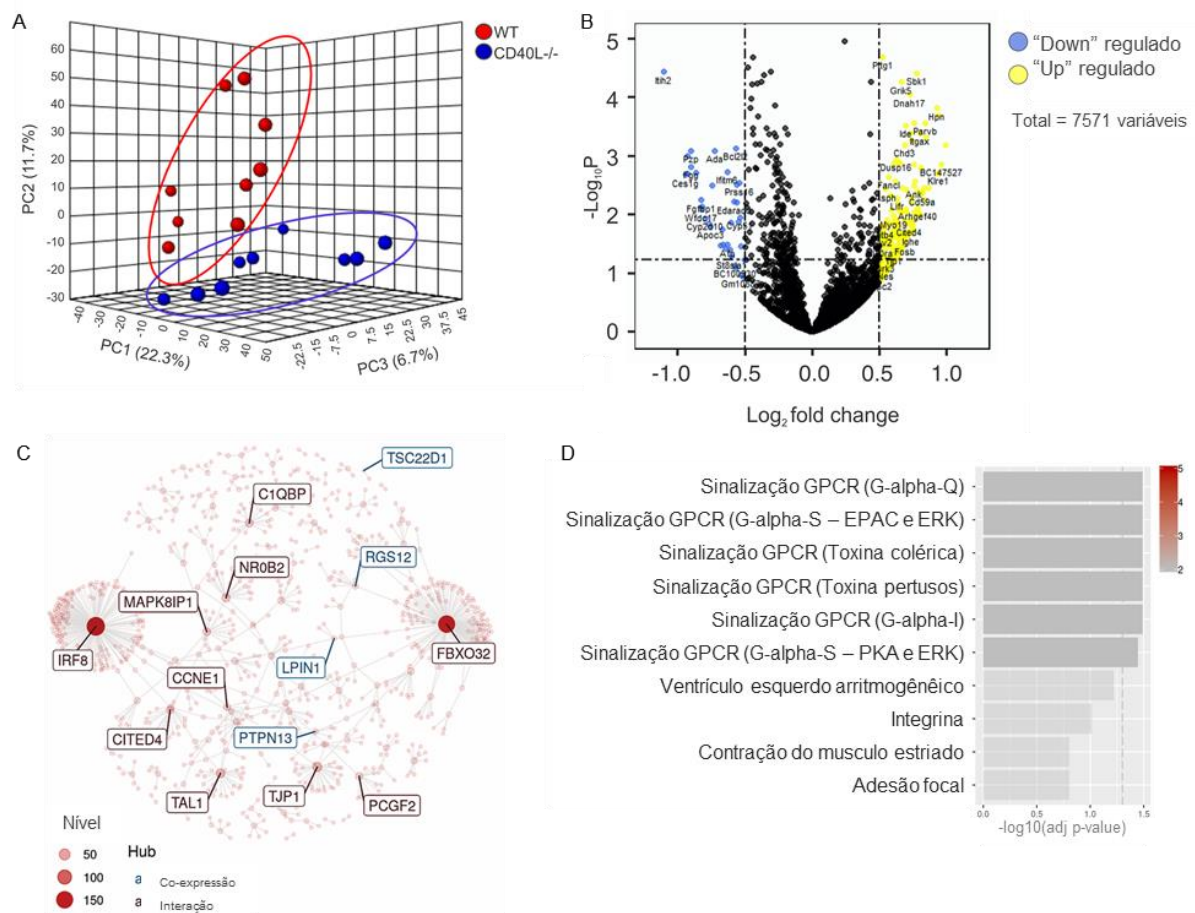


**Figura 26. Avaliação das células linfoides no baço e na cavidade peritoneal.** As células do baço e da cavidade peritoneal de camundongos WT e CD40L<sup>-/-</sup> foram marcadas com os anticorpos anti-CD3, CD19 e NK1.1 para identificação de células T (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>), células B (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) e células NK (NK1.1<sup>+</sup>). As populações foram avaliadas quanto ao (A) número e (B) porcentagem celular. Valores referentes ao número celular calculado a partir da média da celularidade de cada órgão. n=10. \*\* p < 0,01 (teste t de student, two-tailed).

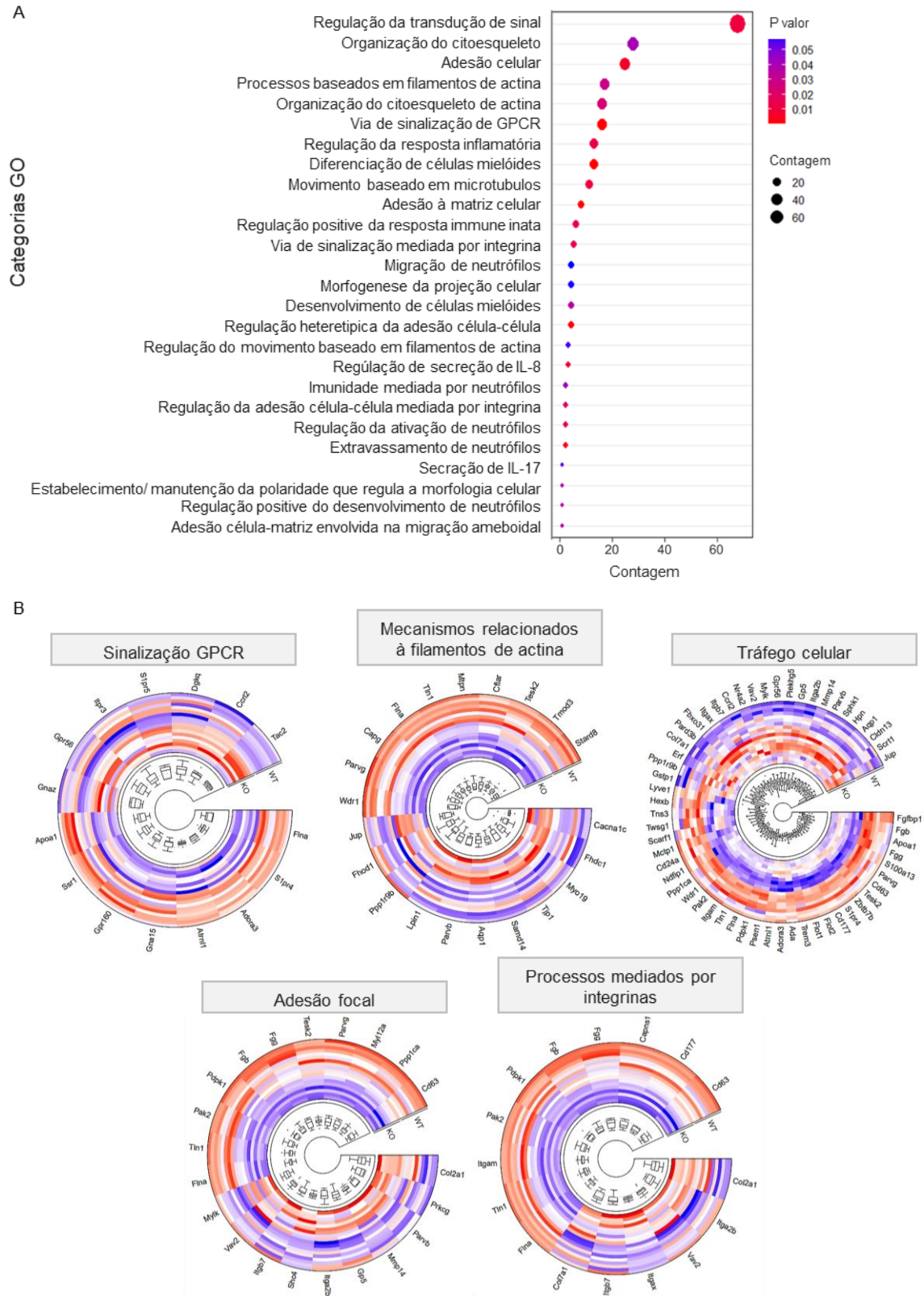
## 10.6. Neutrófilos de camundongos CD40L<sup>-/-</sup> apresentam desregulação no transcriptoma

Com o objetivo de investigar como a ausência do CD40L poderia estar influenciando o processo de desenvolvimento dos neutrófilos e suas consequências sob o perfil de resposta posteriormente apresentados por estas células, realizamos a investigação do transcriptoma de

neutrófilos obtidos da MO de camundongos B6 selvagens e nocautes para o *Cd40lg*. A análise do transcriptoma revelou que camundongos *CD40L<sup>-/-</sup>* apresentam perfil de transcrição distinto em comparação com camundongos WT (**Figura 27A**). Foram identificados 456 genes diferencialmente expressos (DEGs; 219 regulados para cima e 237 regulados para baixo) na comparação entre os dois grupos (**Figura 27B**). A análise de coexpressão e interação gênica, que gera redes de genes cuja expressão é correlacionada (são coexpressos ou interagem entre si), identificou um conjunto de genes altamente afetado ( $p$ -valor ajustado: 0,0081) constituído por 380 genes, dos quais os genes *Irf8* e *Fbxo32* foram reconhecidos como eixos centrais (hubs) do módulo (**Figura 27C**). Dentre os processos biológicos possivelmente afetados encontram-se diversos processos e moléculas envolvidas no tráfego celular, como a sinalização por GPCR, integrina e adesão focal (**Figura 27D**).



**Figura 27. Análise do transcriptoma de neutrófilos da medula óssea de camundongos *CD40L<sup>-/-</sup>*.** (A) Análise de componentes principais (PCA) do perfil de transcrição exibido por camundongos *CD40L<sup>-/-</sup>* e WT. (B) Gráfico de vulcão representando a alteração na expressão dos genes sequenciados. Genes que não apresentam diferenças significativas de expressão representados em preto, genes significativamente regulados para baixo em azul e para cima em amarelo ( $p$  valor ajustado  $\leq 0,05$ ). (C) Análise de coexpressão e interação gênica apresentando o módulo mais enriquecido, com destaque para genes com maior conectividade. (D) Análise funcional do conjunto de genes enriquecidos.

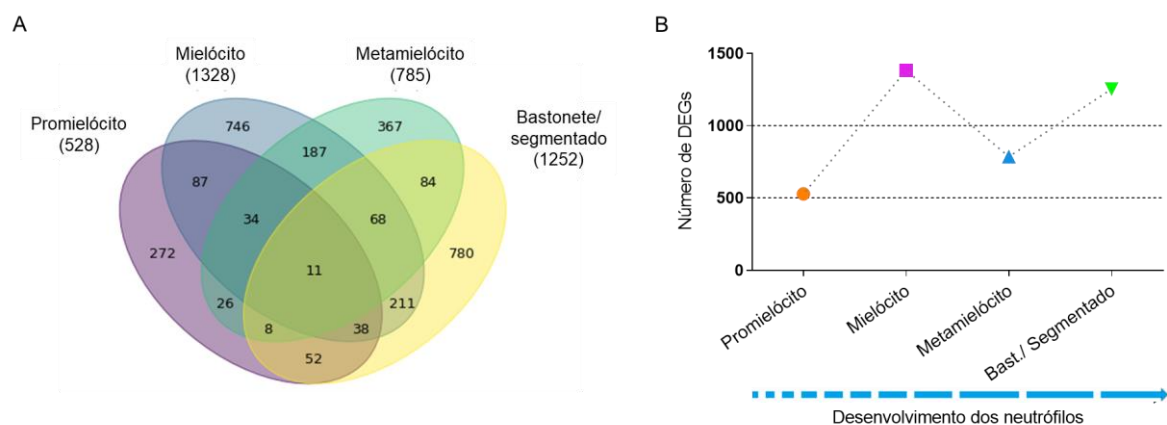


**Figura 28. Processos biológicos afetados em camundongos CD40<sup>-/-</sup>.** (A) Processos biológicos previstos como afetados pela análise de ontologia gênica (valor de  $p \leq 0,05$ ). (B) Conjunto de genes desregulados associados à processos envolvidos no tráfego celular.

Em concordância com a análise de coexpressão, a análise da ontologia gênica das DEGs apontou diversos processos biológicos desregulados nos camundongos CD40L<sup>-/-</sup> (**Figura 28A**), com destaque para os processos relacionados ao tráfego celular como a sinalização por GPCR, mecanismos envolvendo de filamento de actina, tráfego de células, adesão focal celular e processos mediados por integrinas (**Figura 28B**).

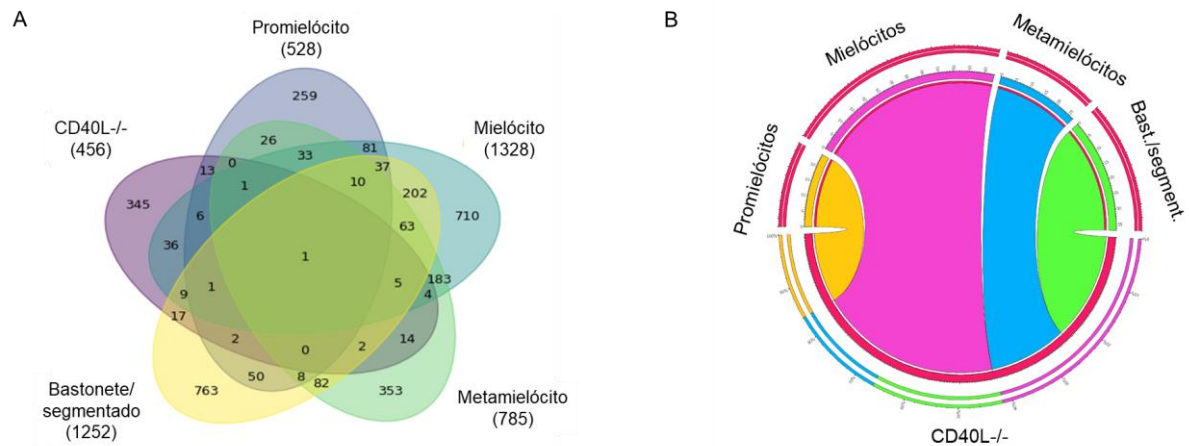
### 10.7. A ausência de CD40L interfere na trajetória de maturação de neutrófilos, resultando na geração de células com perfil transcricional distinto

Estudos prévios sugeriram que pacientes deficientes de CD40L apresentam maturação de neutrófilos interrompida no estágio de promielócito-mielócito na MO<sup>14,122</sup>. Uma vez que os camundongos CD40L<sup>-/-</sup> mostraram o perfil transcricional alterado, decidimos investigar o estágio de diferenciação dos neutrófilos através de uma análise comparativa entre o perfil de transcrição apresentado pelos camundongos CD40L<sup>-/-</sup> com o perfil transcricional de neutrófilos murinos WT nos diferentes estágios de desenvolvimento na MO previamente publicado em estudo realizado por Xie e colaboradores<sup>147</sup>. Primeiro, identificamos os DEGs apresentados pelos neutrófilos nos consecutivos estágios de diferenciação para caracterizar a assinatura transcriptômica de cada fase. Foram obtidos 528 DEGs para promielócitos, 1382 para mielócitos, 785 para metamielócitos e 1252 para células segmentadas por banda, o estágio maduro final (**Figura 29A e 29B**).



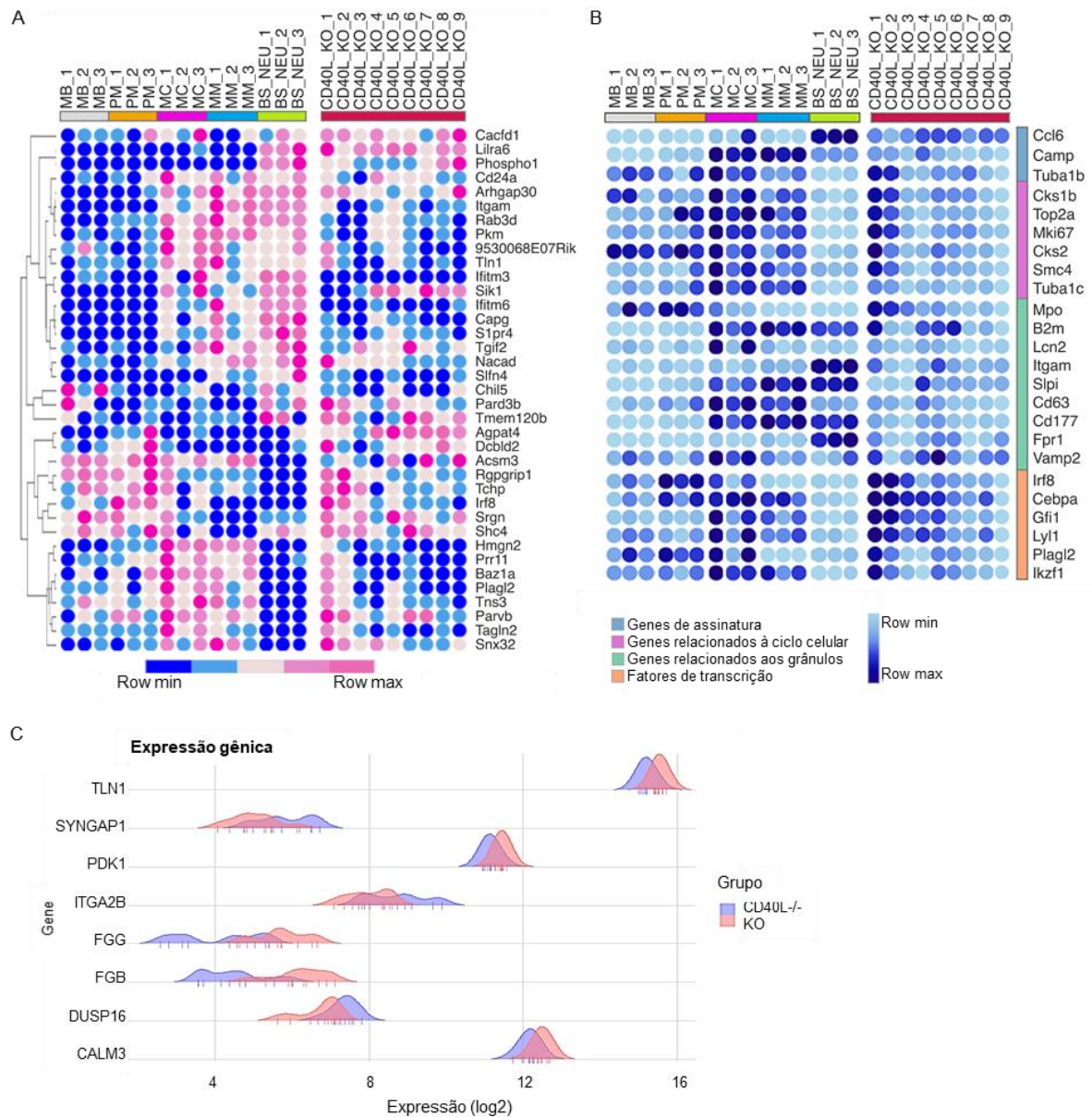
**Figura 29. Assinatura transcriptômica das fases de desenvolvimento de neutrófilos da medula óssea (MO).** Análise realizada utilizando conjunto de dados público provenientes de estudo que investigou perfil de transcrição exibido por neutrófilos da MO durante sua trajetória de desenvolvimento pela comparação do transcriptoma de cada estágio de desenvolvimento com o anterior. (A) Diagrama de Venn apresentando o número de DEGs de cada estágio de desenvolvimento dos neutrófilos obtida. (B) Gráfico apresentando o número de DEGs de cada estágio. Bast. / segment.: Bastonete/segmentado. p valor ajustado  $\leq 0,05$ .

Em seguida, comparamos os DEGs de cada estágio de desenvolvimento com os DEGs identificados nos camundongos CD40L<sup>-/-</sup>. Curiosamente, o grupo CD40L<sup>-/-</sup> mostrou mais genes em comum com o estágio de mielócitos (**Figura 30A e 30B**), o que concorda com a parada da maturação sugerida nos estudos de medula de pacientes deficientes de CD40L<sup>122</sup>.



Para avaliar se a diferenciação de neutrófilos de camundongos CD40L<sup>-/-</sup> apresentava-se de fato interrompida em algum estágio específico da maturação, comparamos a assinatura transcriptômica das diferentes fases de desenvolvimento com o perfil de transcrição dos camundongos CD40L<sup>-/-</sup> (**Figura 31A**). Além disso, também foram comparadas as classes de genes relacionadas ao desenvolvimento de neutrófilos apresentadas no trabalho de Xie e colaboradores<sup>147</sup> (**Figura 31B**). Surpreendentemente, o padrão de transcrição exibido pelos camundongos CD40L<sup>-/-</sup> não sobrepôs nenhum estágio específico do desenvolvimento. Embora não tenha sido possível definir um estágio específico do desenvolvimento celular, os neutrófilos de camundongos CD40L<sup>-/-</sup> também não apresentam o perfil exibido por células maduras, caracterizando a geração de células com perfil transcripcional único. Vale ressaltar que dentre os DEGs foram identificados fatores de transcrição associados ao desenvolvimento de neutrófilos (Irf8, Plagl2 e Ikzf1; **Figura 31B**) e moléculas envolvidas na sinalização de Flt3 essenciais no desenvolvimento das células mieloides (**Figura 31C**).

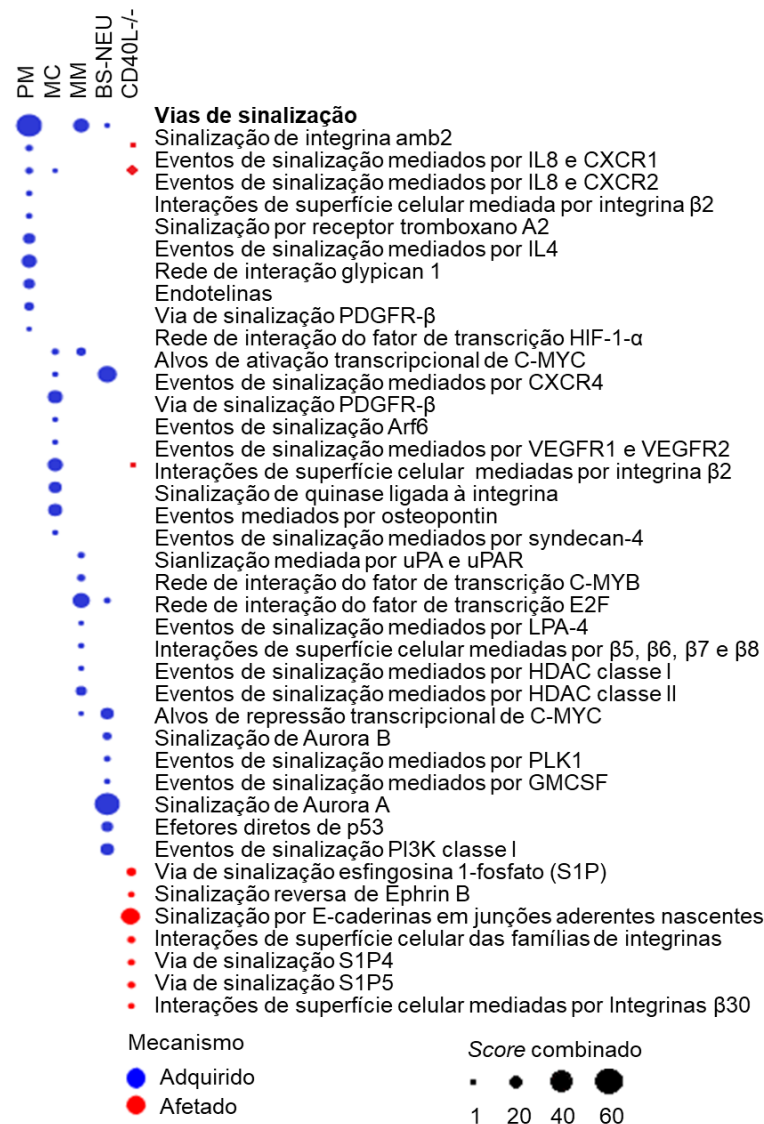




**Figura 31. Comparação do perfil transcricional exibido por neutrófilos nos estágios normais de desenvolvimento com o perfil exibido por camundongos  $CD40L^{-/-}$ .** (A e B) Mapas de calor comparando o padrão de expressão de genes assinatura de cada estágio do desenvolvimento (utilizados apenas DEGs exibidos em ambos os grupos) obtido em análise pareada (A) ou agrupados em classes específicas de genes referidos no artigo matriz como relacionados à granulopoiese e função de neutrófilos (B) comparados com o perfil de transcrição exibido por neutrófilos de camundongos  $CD40L^{-/-}$ . (C) Histogramas de DEGs envolvidos na sinalização de Flt3. MB: mieloblasto; PM: promielócitos; MC: mielócito; MM: metamielócitos; BS-NEU: Bastonete / segmentado;  $CD40L\_KO$ : camundongos  $CD40L^{-/-}$ .

Por fim, realizamos a análise de ontologia gênica das DEGs apresentadas em cada um dos estágios de desenvolvimento para definir as vias enriquecidas de cada fase e compara-las com as vias desreguladas em camundongos  $CD40L^{-/-}$ . As vias "eventos de sinalização mediados por IL8 e CXCR1", "eventos de sinalização mediados por IL8 e CXCR2" e "interações da superfície celular da integrina Beta2", que são adquiridas durante a trajetória de

desenvolvimento de neutrófilos no estágio de promielócito-mielócito, foram preditas como afetadas nos camundongos CD40L<sup>-/-</sup> (**Figura 32**).

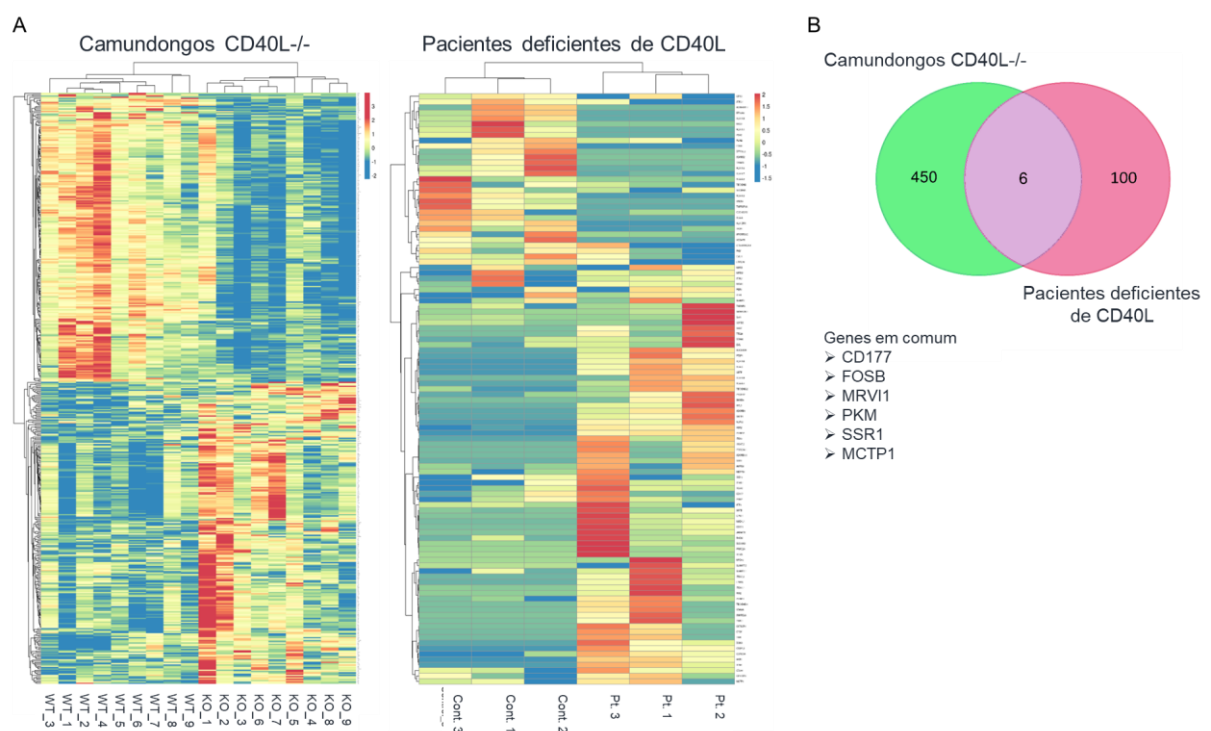


**Figura 32. Vias de sinalização enriquecidas nos estágios normais de desenvolvimento dos neutrófilos e alteradas em camundongos CD40L<sup>-/-</sup>.** Mapa de calor mostrando as 10 principais vias de sinalização adquiridas em cada estágio durante a trajetória de desenvolvimento dos neutrófilos (círculos azuis) e os processos afetados em neutrófilos CD40L<sup>-/-</sup> (círculos vermelhos). MB: mieloblasto; PM: promielócitos; MC: mielócito; MM: metamielócitos; BS-NEU: Bastonete / segmentado; CD40L<sub>KO</sub>: camundongos CD40L<sup>-/-</sup>.

## 10.8. A deficiência de CD40L desregula processos essenciais ao desenvolvimento e tráfego de neutrófilos em camundongos e humanos

Dado o perfil de neutrófilos alterado exibido por camundongos CD40L<sup>-/-</sup>, nos questionamos se a mesma alteração poderia ser observada em pacientes com deficiência de

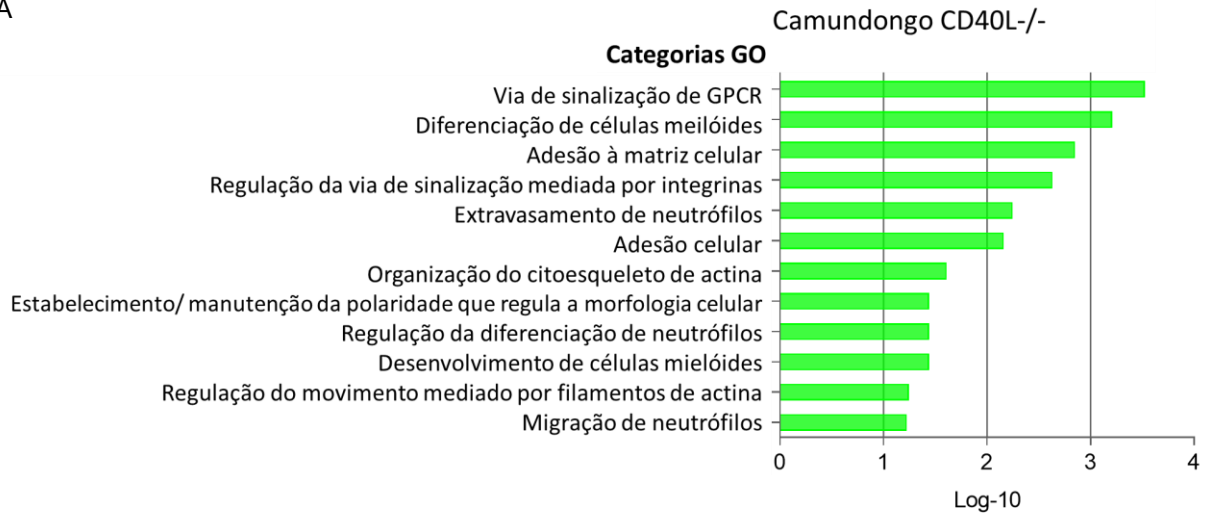
CD40L. Assim, analisamos e comparamos o transcriptoma de camundongos CD40L<sup>-/-</sup> com dados de expressão gênica de neutrófilos periféricos de pacientes com deficiência de CD40L<sup>66</sup>. A análise do transcriptoma identificou 106 DEGs em neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L em comparação com indivíduos saudáveis (**Figura 33A**). Seis DEGs comuns foram identificados entre camundongos e humanos (CD177, FOSB, MRVI1, PKM, SSR1 e MCTP1; **Figura 33B**), genes envolvidos em diversos mecanismos celulares, embora não tenha sido possível identificar uma única via ou mecanismo de resposta específico, o que pode ser justificado pelas diferenças relacionadas à espécie e fonte de neutrófilos.



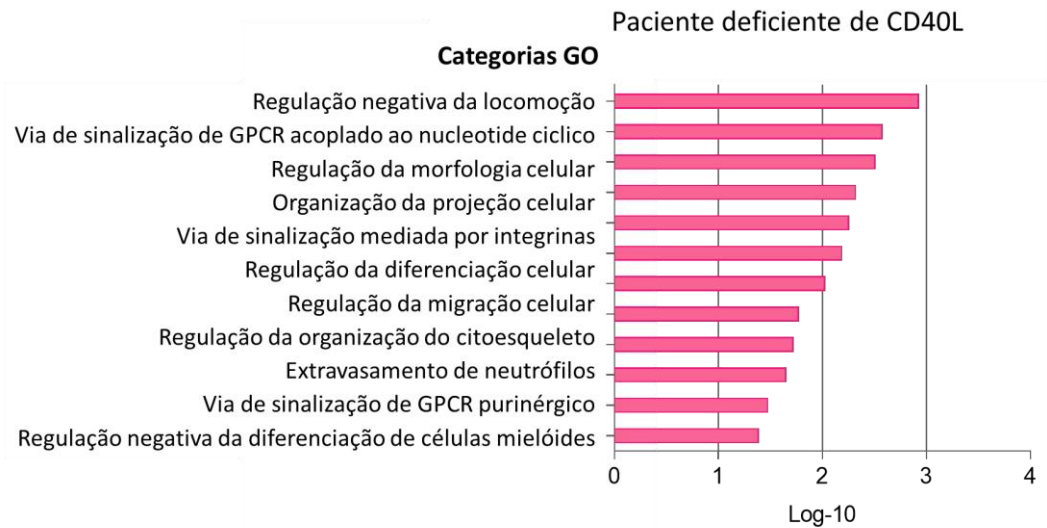
**Figura 33. Comparação do perfil transcricional apresentado por neutrófilos de camundongos CD40<sup>-/-</sup> e de pacientes com deficiência de CD40L.** O transcriptoma de neutrófilos da medula óssea de camundongos CD40L<sup>-/-</sup> e neutrófilos de sangue venoso periférico de pacientes com deficiência de CD40L<sup>66</sup> foram utilizados na análise. (A) Mapa de calor com agrupamento hierárquico dos 456 DEGs identificados em camundongos CD40L<sup>-/-</sup> e 106 DEGs identificados em pacientes com deficiência de CD40L (p valor ajustado  $\leq 0,05$ ). (B) Diagrama de Venn apresentando os DEGs compartilhados entre camundongos CD40L<sup>-/-</sup> e pacientes com deficiência de CD40L.

Por fim, investigamos as consequências biológicas dos transcriptomas afetados. A análise de ontologia gênica dos DEGs indicou diversos processos biológicos afetados em neutrófilos de camundongo e humanos. Apesar das diferenças relacionadas à espécie, fonte de neutrófilos e número de DEGs, a análise previu a desregulação de processos semelhantes intimamente relacionados ao desenvolvimento celular e ao tráfego celular em camundongos e humanos (**Figura 34A e 34B**).

A



B



**Figura 34. Processos desregulados na deficiência de CD40L em camundongos e humanos.** Processos biológicos afetados apresentados por camundongos CD40L<sup>-/-</sup> (A) e pacientes com deficiência de CD40L (B) obtidos a partir da análise de ontologia gênica. Gráfico apresentado destacando os processos relacionados ao desenvolvimento celular e tráfego de neutrófilos. P valor ajustado  $\leq 0,05$ .

## 11. DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliamos retrospectivamente as características clínicas, laboratoriais e moleculares de 50 pacientes latino-americanos com deficiência de CD40L, essa representando a maior coorte de pacientes latino-americanos deficientes de CD40L descritos até o momento. Descrevemos aqui 6 novas mutações no *CD40LG* e relatamos o maior número de patógenos já descritos em uma única coorte de pacientes com deficiência de CD40L, alguns desses até então não relatados como causadores de infecções nesses pacientes. A maioria de nossos pacientes (92%) apresentaram os primeiros sintomas antes dos 2 anos de vida, tendo a grande maioria iniciado as manifestações clínicas antes mesmo de atingir 1 ano de idade (mediana de 7 meses). Trinta e dois de nossos pacientes (68% de 47 pacientes que apresentaram manifestações antes do diagnóstico) apresentaram pneumonia - isolada ou combinada com outras manifestações - como sintoma clínico inicial. A segunda manifestação clínica de abertura mais frequente foi a diarreia, embora várias outras manifestações também tenham sido relatadas, incluindo manifestações graves como septicemia e meningite.

Embora a deficiência de CD40L tenha sido inicialmente caracterizada por níveis séricos elevados de IgM associados à drástica redução ou ausência IgG e IgA<sup>20</sup>, estudos subsequentes apontaram que os níveis de Ig podem variar consideravelmente e que a IgM elevada está presente em apenas metade dos pacientes nos estágios iniciais da doença<sup>14,16,128,131</sup>, razão pela qual o termo HIGM têm sido refutado<sup>156</sup>. Em nossa coorte, 46% de 41 pacientes apresentavam níveis elevados de IgM, 44% apresentavam níveis normais e 10% tinham níveis baixos antes do início da reposição com IVIG. Além disso, apesar da esperada falta de recombinação de troca de classe das Igs, alguns pacientes apresentaram níveis normais ou elevados de IgG e IgA, assim como relatado em outros estudos<sup>14,16,128,136,157</sup>. Essa heterogeneidade dos níveis de Ig foi previamente associada à idade e à infecção crônica<sup>14,20</sup>, embora essa correlação não tenha sido observada em todos pacientes e os mecanismos envolvidos nessa alteração permaneçam não totalmente compreendidos.

As complicações clínicas mais comuns vivenciadas pelos nossos pacientes ao longo da vida foram pneumonias recorrentes, neutropenia, infecções do trato respiratório superior e manifestações gastrointestinais, achados semelhantes àqueles relatados em outras coortes de estudo<sup>14,16,129,158</sup>, embora difiram quanto às frequências apresentadas. Um dado alarmante é que a maioria dos pacientes apresentaram infecções recorrentes e graves ao longo da vida, sendo estas responsáveis por um prejuízo significativo na qualidade de vida desses indivíduos. Por exemplo, 28% dos pacientes relataram mais de 10 episódios de diarreia e 96%

necessitaram de hospitalização por causas diversas, dados que enfatizam a necessidade de opções terapêuticas adicionais às atualmente disponíveis.

Embora os pacientes de nossa coorte tenham apresentados muitas das infecções comumente relatadas em pacientes deficientes de CD40L, como infecções causadas por *P. jirovecii*, Citomegalovirus e *Cryptosporidium* spp.<sup>16</sup>, patógenos até então não descritos como causadores de infecções nestes pacientes, como *Ascaris lumbricoides*, *Campylobacter* spp., vírus da dengue, *Klebsiella oxytoca* e *Pityrosporum orbiculare* também foram relatados em nossa coorte. De fato, microrganismos causadores de infecções variam dependendo da exposição ao patógeno e das condições sanitárias locais<sup>9,22</sup>. Além disso, a incidência de infecções também pode variar dependendo da geografia, um exemplo sendo a incidência de infecções por *P. jirovecii* e *G. lamblia*, que em nossa coorte foi de 26% e 8%, respectivamente, enquanto estudo com coorte de pacientes norte-americanos relatou uma incidência de 48% e 2%<sup>16</sup>, respectivamente, destacando a importância da utilização de diferentes critérios diagnósticos em localizações geográficas específicas.

Como já mencionado, o TCTH representa a única opção curativa disponível para pacientes com deficiência de CD40L<sup>159</sup>, intervenção que impacta de maneira considerável na qualidade de vida de indivíduos afetados pela doença. No entanto, a presença de infecções pré-transplante, órgãos com funcionamento prejudicados (geralmente fígado e pulmão) e a falta de doador compatível são fatores associados a um prognóstico ruim, sendo a idade no momento do transplante considerada fator crucial no sucesso da intervenção<sup>17,28,30</sup>. Em concordância com essa observação, encontramos um desfecho mais favorável dentre os pacientes que realizaram o transplante antes dos 6 anos de idade em comparação com os pacientes transplantados com 6 anos ou mais. Ademais, as complicações relacionadas ao TCTH também foram mais frequentes nos pacientes submetidos ao procedimento após os 6 anos de idade e o único óbito pós-transplante ocorreu no paciente submetido ao TCTH com a idade mais avançada (paciente P34, transplantado aos 14 anos).

Lamentavelmente, embora 19 pacientes tivessem uma história familiar positiva ou com suspeita de EII (11 pacientes tinham membro da família previamente diagnosticado com deficiência de CD40L e 18 pacientes com história de morte familiar precoce causada por infecções), somente 3 pacientes (6%) foram diagnosticados antes do início dos sintomas. Apesar dos avanços no diagnóstico de doenças de causas genéticas apresentado nas últimas décadas, o diagnóstico precoce de pacientes com deficiência de CD40L ainda é um grande desafio, e a maioria dos estudos relatam uma idade mediana de diagnóstico de aproximadamente 2 anos após o início dos sintomas<sup>128,157,158,160-162</sup>. Satisfatoriamente, o atraso

geral no estabelecimento do diagnóstico observado em nossa coorte (mediana de 1 ano) é favorável quando comparado com outras coortes de estudo<sup>16,128,157,160-162</sup>, e melhor do que o tempo relatado no primeiro estudo com pacientes latino-americanos com deficiência de CD40L publicado em 2014 (atraso de aproximadamente 1,6 anos)<sup>129</sup>.

O diagnóstico precoce de pacientes com deficiência de CD40L é essencial para o direcionamento adequado do tratamento, impacta de forma significativa na qualidade de vida dos indivíduos afetados pela síndrome, reduz complicações clínicas e lesões de órgãos causados por infecções recorrentes e, conseqüentemente, repercute no sucesso do TCTH. Durante o período de desenvolvimento do estudo, médicos colaboradores encaminharam amostras de 18 indivíduos com suspeita de deficiência de CD40L, baseada nas manifestações clínicas e nos resultados laboratoriais sugestivos da doença, para avaliação da expressão de CD40L e investigação genética. Dos dezoito pacientes encaminhados para o estudo molecular, nove pacientes não expressaram a molécula CD40L e foram direcionados para a investigação genética.

Embora a deficiência de CD40L seja muitas vezes diagnosticada baseando-se somente nas manifestações clínicas e laboratoriais, e quando disponível na avaliação da expressão do CD40L, a investigação genética para a identificação de mutações no *CD40LG* é algumas vezes indispensável para o diagnóstico definitivo da doença, uma vez que mutações hipomórficas, que prejudicam mas não anulam a expressão e função das moléculas geradas, podem resultar em manifestações clínicas atípicas e que impossibilitam a confirmação do diagnóstico baseado somente nas manifestações clínicas e na expressão do CD40L<sup>6,123</sup>. Foram identificadas variantes no *CD40LG* em todos os nove pacientes que apresentaram alteração na expressão da molécula, das quais 5 variantes não se encontram descritas na literatura e nos bancos de dados investigados (todas preditas como patogênicas pela análise *in silico*). Todos os pacientes diagnosticados apresentavam história clínica de infecções precoces graves e de repetição, com destaque para os quadros de pneumonia e neutropenia apresentado por 89% e 66% dos pacientes, respectivamente, sendo que cinco dos pacientes apresentavam níveis elevados e quatro níveis normais de IgM, dados que vem de acordo com o observado na coorte latino-americana.

Enquanto os EIIs causados por defeitos de linfócitos B ou por deficiência predominantemente de anticorpos resultam em infecções bacterianas que geralmente afetam o trato respiratório<sup>163</sup>, pacientes com deficiência de CD40L apresentam manifestações clínicas mais graves e variadas, com um espectro clínico similar ao das imunodeficiências combinadas<sup>9,11,15</sup>, assim como observado nos pacientes aqui descritos. Uma das características

mais marcantes desses pacientes é a neutropenia, manifestação apresentada por 70% dos pacientes da coorte de estudo latino-americana e em seis dos nove pacientes diagnosticados durante o estudo. A neutropenia é uma manifestação hematológica presente em diversas patologias com causa geneticamente heterogênea, sendo que muitas vezes sua etiologia é até mesmo desconhecida<sup>115,116</sup>.

Os neutrófilos são as primeiras células imunes à atingirem o sítio infeccioso em resposta a sinais inflamatórios, exercendo desta maneira papel importante no controle de infecções<sup>106</sup>. Estudo recente do nosso grupo demonstrou que os neutrófilos circulantes de pacientes com deficiência de CD40L apresentam perfil fenotípico alterado, semelhante ao apresentado por neutrófilos com maturação incompleta, além de apresentarem suas funções efetoras, como geração de ROS e de NETs, comprometidas<sup>66</sup>. Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que camundongos CD40L<sup>-/-</sup> apresentam redução no recrutamento de neutrófilos em direção à cavidade peritoneal em resposta à injeção de tioglicolato, assim como demonstrado por outros<sup>66,164</sup>, e em resposta à infecção por *Salmonella typhimurium*<sup>66</sup>, dados que sugeriam falhas no tráfego de neutrófilos pelo corpo. Confirmando esses achados, a avaliação *in vitro* da migração dos neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L revelou redução significativa da migração em resposta à quimiocina IL-8 quando comparada com a resposta apresentada por indivíduos saudáveis. A avaliação da expressão de receptores de quimiocinas também foi investigada, porém apesar das análises individuais apontarem alterações na expressão do receptor CXCR2, a análise em grupo não indicou diferença estatística e não foram encontrados indícios de relação entre a migração reduzida para IL-8 com a falta de expressão de seu receptor. Esse achado sugere que a mudança na capacidade migratória pode não estar direta ou exclusivamente relacionada à defeitos na expressão do receptor, mas sim se manifestar como consequência de defeitos intrínsecos apresentados pelos neutrófilos desses pacientes, embora a análise de maior número de indivíduos seja necessária para confirmar esses resultados.

A resposta migratória induzida pelos quimioatraentes fMLP e C5a também foi investigada, porém não demonstraram alteração significativa. Embora a ativação pelos estímulos quimioatraentes fMLP, IL-8 e C5a sejam todas desencadeadas pela interação com receptores da família GPCRs, diferentes receptores utilizam vias de sinalização distintas. Enquanto a interação do fMLP e do C5a com seus receptores promovam a migração dos neutrófilos principalmente pela ativação de PLA2 e da proteína quinase ativada pelo mitógeno p38-MAPK<sup>165</sup>, a migração induzida pela IL-8 ativa principalmente as vias de sinalização intracelular da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e AKT<sup>166</sup>. Além disso, outras moléculas



como RAC2 e ERK1/2 também estão envolvidas em ambas as cascatas. A investigação do transcriptoma dos pacientes não apontou alteração em nenhuma das moléculas supramencionadas. Contudo, não podemos descartar a possibilidade de alterações em nenhuma das vias investigadas uma vez que o transcriptoma foi realizado a partir de neutrófilos em repouso, e mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos.

Mostramos aqui que camundongos CD40L<sup>-/-</sup> apresentam redução significativa no número total de células da MO e no número e porcentagem da população de células mielocíticas como consequência direta da redução da linhagem granulocítica. Esses resultados indicam que a ausência do CD40L resulta em defeitos na geração de células da linhagem mielóide e granulocítica. De fato, estudos apontam que a sinalização pelo CD40Ls regula a produção de fatores de crescimento essenciais para os processos de mielopoiese e granulopoiese<sup>77,78</sup>, embora o efeito direto da ausência de CD40L sobre a geração de neutrófilos permanecia não caracterizada. Em concordância com a alteração observada na MO, a população de células mielóides, neutrófilos e monócitos também se mostrou reduzida em sítios periféricos como baço e cavidade peritoneal mesmo na ausência de infecção. Embora não possamos excluir a possibilidade de que o número reduzido de neutrófilos e células mielóides em órgãos periféricos seja um efeito direto da diminuição do número dessas células na MO, os dados em conjunto sugerem que essa redução se apresenta como consequência de defeitos intrínsecos causados pelo desenvolvimento defeituoso, conforme indicado pela análise do transcriptoma.

Vale ressaltar que esse resultado está de acordo com a neutropenia apresentada pelos pacientes com deficiência de CD40L, alteração hematológica cuja etiologia não é totalmente entendida<sup>12</sup>. O desbalanço na geração de fatores de crescimento pelas células estromais da MO em consequência da ausência da sinalização pelo CD40L é a principal teoria sugerida para justificar a neutropenia apresentada por esses pacientes. Reforçando essa hipótese, um estudo realizado com camundongos sem G-CSF, um dos fatores de crescimento cuja secreção é influenciada pela presença de CD40Ls<sup>78</sup>, mostrou que esses animais apresentam neutropenia, deficiência de progenitores granulocíticos e mobilização de neutrófilos prejudicada<sup>87</sup>. Semelhante aos achados obtidos com camundongos deficientes de G-CSF, nossos resultados com camundongos também mostram geração reduzida de neutrófilos, desenvolvimento alterado e distribuição e tráfego de neutrófilos prejudicados na deficiência de CD40L. Juntos, esses dados reforçam a hipótese que os defeitos na granulopoiese presentes na deficiência de CD40L seriam causados por um efeito indireto da sinalização de CD40L

mediado pela ação de citocinas e fatores de crescimento sobre as células progenitoras, e não pela interação direta do CD40L com receptores expressos pelas células em desenvolvimento. No entanto, a possibilidade de um efeito direto da interação CD40L-CD40 sobre progenitores mielóides e células em desenvolvimento, os quais também expressam o CD40<sup>120</sup>, não pode ser descartada, e mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nesses achados.

É importante lembrar que pacientes com neutropenia são geralmente tratados rhG-CSF, tratamento que apesar de ser eficiente na recuperação do número de neutrófilos na maioria dos casos<sup>6,167</sup>, não se mostra eficaz na correção dos defeitos funcionais apresentados pelos neutrófilos, como relatado por estudo conduzido com pacientes com neutropenia congênita<sup>119,168</sup>. Esse achado indica que a administração de rhG-CSF por si só não é suficiente para corrigir possíveis defeitos de desenvolvimento, o que destaca a complexidade das interações e vias de sinalização ativadas durante o processo de granulopoiese. Em nosso estudo, a análise do transcriptoma de neutrófilos de camundongos CD40L<sup>-/-</sup> e de pacientes com deficiência de CD40L, ferramenta poderosa para estudar alterações celulares intrínsecas e suas consequências na resposta celular efetora posteriormente apresentada, revelou um perfil transcricional alterado em comparação com camundongos de tipo selvagem e indivíduos saudáveis, respectivamente. Curiosamente, apesar das diferenças em relação às espécies e fontes de neutrófilos, ambos os modelos mostraram processos biológicos afetados relacionados ao desenvolvimento celular e ao tráfego de neutrófilos na condição patológica. A análise ontogenética revelou comprometimento de diversos processos nos modelos de deficiência, com destaque para categorias relacionadas ao desenvolvimento (“diferenciação de células mielóides”, “regulação positiva da diferenciação de neutrófilos”, “regulação do desenvolvimento de neutrófilos”) e para os processos de tráfego e extravasamento de neutrófilos em direção ao sítio infeccioso (“adesão à matriz celular”, “extravasamento de neutrófilos”), resultados que corroboram os dados obtidos nos experimentos realizados com os camundongos e pacientes com deficiência de CD40L.

Vários subconjuntos de neutrófilos foram descritos em condições homeostáticas e patológicas, os quais apresentam diferentes fenótipos e são especializados em funções distintas<sup>79,95,169–171</sup>. Enquanto que, em condições homeostáticas, a heterogeneidade de neutrófilos pode ser atribuída à plasticidade pós-maturação como resultado da ativação celular ou senescência na periferia, a diversidade de neutrófilos em condições patológicas é muito mais complexa. Estudos prévios relataram a reprogramação do transcriptoma no nível da MO em condições patológicas como lúpus eritematoso sistêmico<sup>172</sup>, aterosclerose<sup>173</sup>, câncer<sup>174</sup> e

durante processos infecciosos<sup>147</sup>. Em nossa investigação, os camundongos CD40L<sup>-/-</sup> mostraram expressão alterada nos fatores de transcrição como Irf8 e C/EBP $\alpha$ , reguladores críticos do desenvolvimento de neutrófilos<sup>112</sup>, cujas expressão desregulada já foi associada à granulopoiese defeituosa<sup>175-181</sup>. Os resultados também revelaram a desregulação de diversos genes envolvidos na sinalização por Flt3, citocina envolvida no processo de mielopoiese cuja produção pelas células estromais da MO é estimulada pelo CD40L<sup>77</sup>. Além disso, a comparação do perfil de transcrição de neutrófilos de camundongos CD40L<sup>-/-</sup> com os estágios normais de maturação de neutrófilos indica que a ausência de CD40L afeta a trajetória de maturação normal dos neutrófilos, provavelmente resultando na geração de um subconjunto de neutrófilos distinto em vez de neutrófilos imaturos estacionados em um estágio do desenvolvimento específico, como anteriormente sugerido<sup>14,122</sup>.

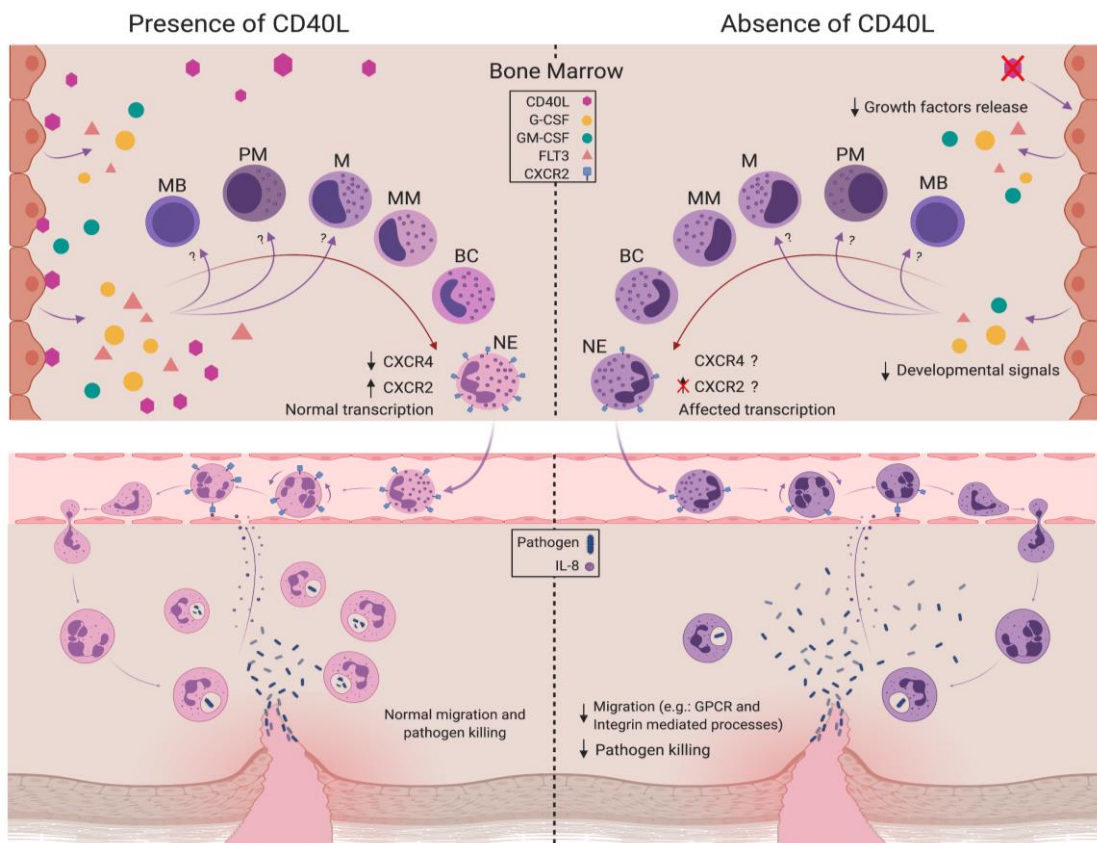
Interessantemente, mesmo com as diferenças relacionadas à espécie e fonte de neutrófilos os dados obtidos em humanos e camundongos se completam em diversos aspectos. Os pacientes deficientes de CD40L avaliados apresentaram redução na migração em resposta ao IL-8 e, embora a análise em grupo não tenha apontado diferença estatística, alguns pacientes avaliados apresentaram alteração na expressão do receptor CXCR2. Apesar de não podermos afirmar que a redução na migração seja consequência da alteração na expressão do receptor, esses dados apontam para uma alteração na via de CXCR2. Em camundongos CD40L<sup>-/-</sup>, as análises de coexpressão e a análise de ontologia apontou para problemas na sinalização de GPCR (família de receptores no qual encontram-se incluídos os receptores CXCR) e IL-8, predições suportadas pela análise em humanos. Além do mais, embora tenhamos identificado apenas 6 DEGs comuns entre humanos e camundongos, a análise do conjunto de genes alterados em cada espécie prediz efeitos biológicos similares, indicando alterações em vias relacionadas ao tráfego e desenvolvimento de neutrófilos, este último em acordo com as alterações observadas na MO dos camundongos.

Em conjunto, os dados obtidos fornecem evidências de que a ausência de CD40L resulta em defeitos na geração, desenvolvimento e tráfego de neutrófilos. Esses resultados sugerem que a imunopatologia associada à deficiência de CD40L pode ser muito mais ampla e complexa do que se imaginava inicialmente e apontam um papel essencial e não redundante da sinalização pelo CD40L nos estágios iniciais de maturação da linhagem granulocítica, embora os mecanismos envolvidos ainda não sejam totalmente compreendidos. Nosso estudo fornece novos *insights* sobre as relações complexas entre a sinalização do CD40L e a granulopoiese e contribui para o avanço no conhecimento sobre a imunopatologia associada à deficiência de CD40L, abrindo novas perspectivas para o entendimento dos mecanismos

envolvidos na neutropenia e disfunção dos neutrófilos nessa patologia. Em última análise, esperamos que este estudo possa contribuir como base teórico-experimental para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas que visem a reversão das falhas nos processos de geração e desenvolvimento celular apresentados por pacientes com deficiência de CD40L e, conseqüentemente, para a melhora na qualidade de vida desses pacientes.

## CONCLUSÕES FINAIS

Em conjunto, os dados obtidos fornecem evidências de que a ausência de CD40L resulta em defeitos na geração, desenvolvimento e tráfego de neutrófilos na ausência da sinalização pelo CD40L. A redução na geração de células da linhagem mielóide e granulocítica e o perfil de transcrição alterado em camundongos CD40L<sup>-/-</sup> evidencia falhas no processo de mielopoiese e granulopoiese causada pela ausência da sinalização pelo CD40L, indicando um papel não redundante da sinalização pelo CD40L nos processos supracitados. Ademais, neutrófilos de pacientes com deficiência de CD40L apresentaram defeitos na migração *in vitro*, mecanismo imunopatológico até então não descrito na síndrome, e perfil transcripcional alterado, similar ao observado em camundongos. Assim, acreditamos que a desregulação no processo de granulopoiese causada pela ausência de CD40L gerem falhas no desenvolvimento dos neutrófilos que culminam em defeitos no tráfego e distribuição destas células no organismo, assim como em defeitos no processo de migração destas células em direção ao sítio infeccioso em resposta à estímulos inflamatórios.



**Figura 35. Mecanismo proposto de granulopoiese induzida por CD40L.** Na presença de CD40L, células estromais da MO liberaram fatores de crescimento que atuam em linhagens mielóides e neutrófilos, influenciando a produção e o desenvolvimento dessas células; neutrófilos maduros são liberados para a corrente sanguínea capacitados a migrar para os locais de infecção em resposta a quimioatraentes e matar patógenos. Na ausência do CD40L, a geração e o desenvolvimento da linhagem granulocítica é prejudicada, resultando na geração de neutrófilos com perfil transcripcional desregulado que apresentam alteração na capacidade de trafegar pelo corpo, migrar para sítios infecciosos em resposta à sinais inflamatórios e eliminar os patógenos invasores. MB: Mieloblasto; PM: promielócitos; MC: mielócito; MM: metamielócitos; BC: bastonete; NE: neutrófilos maduros<sup>182</sup>.

## 12. REFERÊNCIAS

1. Picard, C. *et al.* International Union of Immunological Societies : 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol* **38**, 96–128 (2018).
2. Mccusker, C., Upton, J. & Warrington, R. Primary immunodeficiency. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* **14**, 141–152 (2018).
3. Tangye, S. G. *et al.* The Ever-Increasing Array of Novel Inborn Errors of Immunity: an Interim Update by the IUIS Committee. *J. Clin. Immunol.* **41**, 666–679 (2021).
4. Bousfiha, A. *et al.* The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol* **38**, 129–143 (2018).
5. Tangye, S. G., Al-herz, W., Bousfiha, A., Chatila, T. & Cunningham-rundles, C. Human Inborn Errors of Immunity : 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J. Allergy Clin. Immunol.* **40**, 24–64 (2020).
6. Bonilla, F. A. *et al.* Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 1186–1205 (2015).
7. Picard, C. *et al.* Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J. Clin. Immunol.* **35**, 696–726 (2015).
8. Notarangelo, L. D., Duse, M. & Ugazio, A. G. Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM). *Immunodefec. Rev.* **3**, 101–121 (1992).
9. de la Morena, M. T. Clinical Phenotypes of Hyper-IgM Syndromes. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **4**, 1023–1036 (2016).
10. Jhamnani, R. D., Nunes-santos, C. J., Bergerson, J. & Rosenzweig, S. D. Class-Switch Recombination ( CSR ) / Hyper-IgM ( HIGM ) Syndromes and Phosphoinositide 3-Kinase ( PI3K ) Defects. *Front. Immunol.* **9**, 3–8 (2018).
11. Davies, E. G. & Thrasher, A. J. Update on the hyper immunoglobulin M syndromes. *Br. J. Haematol.* **149**, 167–180 (2010).
12. Qamar, N. & Fuleihan, R. L. The Hyper IgM Syndromes. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **46**, 120–130 (2014).
13. Yu, K. & Lieber, M. R. Current insights into the mechanism of mammalian immunoglobulin class switch recombination. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **11**, 1–19 (2019).
14. Levy, J. *et al.* Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *J. Pediatr.* **131**, 47–54 (1997).
15. Yazdani, R. *et al.* The hyper IgM syndromes : Epidemiology , pathogenesis , clinical manifestations , diagnosis and management. *Clin. Immunol.* **198**, 19–30 (2019).
16. Winkelstein, J. A. *et al.* The X-Linked Hyper-IgM Syndrome: Clinical and Immunologic Features of 79 Patients. *Medicine (Baltimore)*. **82**, 373–384 (2003).
17. de la Morena, M. T. *et al.* Long term outcomes of 176 patients with X-linked hyper IgM syndrome treated with or without hematopoietic cell transplantaton. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, 1282–1292 (2017).
18. Rosen, F. S., Kevy, S. V, Merler, E., Janeway, C. A. & Gitlin, D. Recurrent bacterial infections and dysgammaglobulinemia: deficiency of 7S gamma-globulins in the presence of elevated 19S gamma-globulins. *Pediatrics* **28**, 182 LP – 195 (1961).
19. BURTIN, P. An example of atypical agammaglobulinemia (a case of severe hypogammaglobulinemia with increase of the beta-2 macroglobulin. *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.* **6**, 286–289 (1961).
20. Etzioni, A. & Ochs, H. D. The hyper IgM syndrome - An evolving story. *Pediatr. Res.* **56**, 519–525 (2004).
21. Smith, T. & Cunningham-rundles, C. Primary B-Cell Immunodeficiencies. *Hum. Immunol.* **80**, 351–362

- (2019).
22. França, T. T. *et al.* CD40 ligand deficiency: treatment strategies and novel therapeutic perspectives. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **15**, 529–540 (2019).
  23. Orange, J. S., Grossman, W. J., Navickis, R. J. & Wilkes, M. M. Impact of trough IgG on pneumonia incidence in primary immunodeficiency: A meta-analysis of clinical studies. *Clin. Immunol.* **137**, 21–30 (2010).
  24. Orange, J. S. *et al.* Use of intravenous immunoglobulin in human disease: A review of evidence by members of the Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, S525–553 (2006).
  25. De Gracia, J. *et al.* Immunoglobulin therapy to control lung damage in patients with common variable immunodeficiency. *Int. Immunopharmacol.* **4**, 745–753 (2004).
  26. Boxer, L. A. How to approach neutropenia. *Hematology* **2012**, 174–182 (2012).
  27. Notarangelo, L. D. & Hayward, A. R. X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (XHIM). *Clin. Exp. Immunol.* **120**, 399–405 (2000).
  28. Gennery, A. R. *et al.* Treatment of CD40 ligand deficiency by hematopoietic stem cell transplantation : a survey of the European experience , 1993-2002. *Blood* **103**, 1152–1157 (2004).
  29. Al-Saud, B. *et al.* Hematopoietic stem cell transplant for hyper-IgM syndrome due to CD40L defects: A single-center experience. *Pediatr. Transplant.* **19**, 634–639 (2015).
  30. Mitsui-Sekinaka, K. *et al.* Clinical features and hematopoietic stem cell transplantations for CD40 ligand deficiency in Japan. *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 1018–1024 (2015).
  31. Allewelt, H. *et al.* Hematopoietic Stem Cell Transplantation for CD40 Ligand Deficiency: Single Institution Experience. *Pediatr. Blood Cancer* **62**, 2216–2222 (2015).
  32. Ferrua, F. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation for CD40 ligand deficiency : Results from an EBMT / ESID-IEWP-SCETIDE-PIDTC study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **143**, 2238–2253 (2019).
  33. Costa-carvalho, B., González-Serrano, M., Espinosa-padilla, S. & Segundo, G. Latin American Challenges with the Diagnosis and Treatment of Primary Immunodeficiency Diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **13**, 483–489 (2016).
  34. Allen, R. C. *et al.* CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* **259**, 990–3 (1993).
  35. Aruffo, A. *et al.* The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* **72**, 291–300 (1993).
  36. DiSanto, J. P., Bonnefoy, J. Y., Gauchatt, J. F., Fischer, A. & Saint Basile, G. De. CD40 ligand mutations in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* **361**, 541–543 (1993).
  37. Fuleihan, R. *et al.* Defective expression of the CD40 ligand in X chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2170–2173 (1993).
  38. Korthäuer, U. *et al.* Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* **361**, 539–541 (1993).
  39. Shimadzu, M. *et al.* Structural organization of the gene for CD40 ligand: molecular analysis for diagnosis of X-linked hyper-IgM syndrome. *Biochim. Biophys Acta* **1260**, 67–72 (1995).
  40. Villa, A. *et al.* Organization of the human CD40L gene: Implications for molecular defects in X chromosome-linked hyper-IgM syndrome and prenatal diagnosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 2110–2114 (1994).
  41. Thusberg, J. & Vihinen, M. The structural basis of hyper IgM deficiency - CD40L mutations. *Protein Eng. Des. Sel.* **20**, 133–141 (2007).
  42. Noelle, R. J. *et al.* A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 6550–6554 (1992).
  43. Bodmer, J. L., Schneider, P. & Tschopp, J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends*

- Biochem. Sci.* **27**, 19–26 (2002).
44. Farrera, C. & Fadeel, B. Macrophage Clearance of Neutrophil Extracellular Traps Is a Silent Process. *J. Immunol.* **191**, 2647–2656 (2013).
  45. Libby, P. The CD40 / CD154 receptor / ligand dyad. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 4–43 (2001).
  46. Ramesh, N., Ramesh, V., Gusella, J. F. & Geha, R. Chromosomal localization of the gene for human B-cell antigen CD40. *Somat. Cell Mol. Genet.* **19**, 295–298 (1993).
  47. Michel, N. A., Zirlik, A. & Wolf, D. CD40L and Its Receptors in Atherothrombosis—An Update. *Front. Cardiovasc. Med.* **4**, 40 (2017).
  48. Kooten, C. Van, Banchereau, J. & Gene, C. D. L. CD40-CD40 ligand. **67**, (2000).
  49. Bishop, G. A., Moore, C. R., Xie, P., Stunz, L. L. & Kraus, Z. J. TRAF proteins in CD40 signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* **597**, 131–151 (2007).
  50. Elgueta, R. *et al.* Molecular mechanism and function of Cd40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* **229**, 1–31 (2009).
  51. Léveillé, C. *et al.* CD40 ligand binds to  $\alpha 5\beta 1$  integrin and triggers cell signaling. *J. Biol. Chem.* **282**, 5143–5151 (2007).
  52. El Fakhry, Y. *et al.* Functional interaction of CD154 protein with  $\alpha 5\beta 1$  integrin is totally independent from its binding to  $\alpha IIb\beta 3$  integrin and CD40 molecules. *J. Biol. Chem.* **287**, 18055–18066 (2012).
  53. Zirlik, A. *et al.* CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation* **115**, 1571–1580 (2007).
  54. Hassan, G. S., Merhi, Y. & Mourad, W. M. CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies. *Trends Immunol.* **30**, 165–172 (2009).
  55. Mathur, R. K., Awasthi, A. & Saha, B. The conundrum of CD40 function: Host protection or disease promotion? *Trends Parasitol.* **22**, 117–122 (2006).
  56. Wykes, M. Why do B cells produce CD40 ligand ? *Immunol. Cell Biol.* **81**, 328–331 (2003).
  57. Durandy, A. & Kracker, S. Immunoglobulin class-switch recombination deficiencies. *Arthritis Res. Ther.* **14**, 218 (2012).
  58. Foy, T. M. *et al.* gp39-CD40 Interactions Are Essential for Germinal Center Formation and the Development of B Cell. *J Exp Med* **180**, 157–163 (1994).
  59. Nonoyama, S., Hollenbaugh, D., Aruffo, A., Ledbetter, J. A. & Ochs, H. D. B cell activation via CD40 is required for specific antibody production by antigen-stimulated human B cells. *J. Exp. Med.* **178**, 1097–102 (1993).
  60. Noelle, R. J., Ledbetter, J. A. & Aruffo, A. CD40 and its ligand , an essential ligand- receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunol. Today* **13**, 431–433 (1992).
  61. van Kooten, C., Banchereau, J. & Banchereaut, J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Structure* **9**, 330–337 (1997).
  62. Kiener, P. A. *et al.* Stimulation of CD40 with Purified Soluble gp39 Induces Proinflammatory Responses in Human Monocytes. *J. Immunol.* **155**, 4917–4925 (1995).
  63. Fontana, S. *et al.* Functional defects of dendritic cells in patients with CD40 deficiency. *Blood* **102**, 4099–4106 (2003).
  64. Cabral-Marques, O. *et al.* Dendritic cells from X-linked hyper-IgM patients present impaired responses to *Candida albicans* and *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 778–86 (2012).
  65. Cabral-Marques, O. *et al.* Human CD40 ligand deficiency dysregulates the macrophage transcriptome causing functional defects that are improved by exogenous IFN- $\gamma$ . *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, 900–912.e7 (2017).
  66. Cabral-Marques, O. *et al.* CD40 ligand deficiency causes functional defects of peripheral neutrophils that are improved by exogenous IFN- $\gamma$ . *J. Allergy Clin. Immunol.* **142**, 1571-1588.e9 (2018).



67. Chen, Y. *et al.* Internalization of CD40 regulates its signal transduction in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **345**, 106–117 (2006).
68. Lievens, D., Eijgelaar, W. J., Biessen, E. A. L., Daemen, M. J. A. P. & Lutgens, E. The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* **102**, 206–214 (2009).
69. Lievens, D. *et al.* Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood* **116**, 4317–4328 (2010).
70. Li, G. *et al.* CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury. *Am. J. Pathol.* **172**, 1141–1152 (2008).
71. Khan, S. Y. *et al.* Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood* **108**, 2455–2462 (2006).
72. Rahman, M. *et al.* Platelet-derived CD40L (CD154) mediates neutrophil upregulation of mac-1 and recruitment in septic lung injury. *Ann. Surg.* **250**, 783–789 (2009).
73. Jin, R. *et al.* Soluble CD40 Ligand Stimulates CD40-Dependent Activation of the  $\beta$ 2 Integrin Mac-1 and Protein Kinase C Zeta (PKC $\zeta$ ) in Neutrophils: Implications for Neutrophil-Platelet Interactions and Neutrophil Oxidative Burst. *PLoS One* **8**, e64631 (2013).
74. Hyun, Y. & Hong, C. Deep insight into neutrophil trafficking in various organs. *J. Leukoc. Biol.* **102**, 617–629 (2017).
75. Mavroudi, I. & Papadaki, H. A. The Role of CD40 / CD40 Ligand Interactions in Bone Marrow Granulopoiesis. *Sci. World J.* **11**, 2011–2019 (2011).
76. Saeland, S. *et al.* Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD34+ hematopoietic cells. *Exp. Hematol.* **20**, 24–33 (1992).
77. Solanilla, A. *et al.* CD40-ligand stimulates myelopoiesis by regulating flt3-ligand and thrombopoietin production in bone marrow stromal cells. *Blood* **95**, 3758–64. (2000).
78. Mavroudi, I. *et al.* The CD40/CD40 ligand interactions exert pleiotropic effects on bone marrow granulopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* **89**, 771–783 (2011).
79. Rosales, C. Neutrophil : A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types ? *Front. Physiol.* **9**, 1–17 (2018).
80. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 173–182 (2006).
81. Minns, D., Smith, K. J. & Findlay, E. G. Orchestration of Adaptive T Cell Responses by Neutrophil Granule Contents. *Mediators Inflamm.* **2019**, 8968943 (2019).
82. Bennouna, S., Bliss, S. K., Curiel, T. J. & Denkers, Y. Cross-Talk in the Innate Immune System: Neutrophils Instruct Recruitment and Activation of Dendritic Cells during Microbial Infection. *J Immunol* **171**, 6052–6058 (2003).
83. Ley, K. *et al.* Neutrophils : New insights and open questions. *Sci. Immunol.* **4579**, 1–14 (2018).
84. Coffelt, S. B., Wellenstein, M. D. & Visser, K. E. De. Neutrophils in cancer : neutral no more. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 431–446 (2016).
85. Bendall, L. J. & Bradstock, K. F. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 355–367 (2014).
86. Liu, F., Wu, H. Y., Wesselschmidt, R., Kornaga, T. & Link, D. C. Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity* **5**, 491–501 (1996).
87. Lieschke, G. J. *et al.* Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* **84**, 1737–1746 (1994).
88. Pillay, J. *et al.* Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human

- experimental endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 211–220 (2010).
89. Lukášová, E. *et al.* Granulocyte maturation determines ability to release chromatin NETs and loss of DNA damage response; these properties are absent in immature AML granulocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 767–779 (2013).
  90. Taneja, R., Sharma, A. P., Hallett, M. B., Findlay, G. P. & Morris, M. R. Immature circulating neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling. *Shock* **30**, 618–622 (2008).
  91. Geering, B. & Simon, H. U. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ.* **18**, 1457–1469 (2011).
  92. Drifte, G., Dunn-Siegrist, I., Tissières, P. & Pugin, J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.* **41**, 820–832 (2013).
  93. Pruchniak, M. P., Arazna, M. & Demkow, U. Life of neutrophil : From stem cell to neutrophil extracellular trap. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **187**, 68–73 (2013).
  94. Eash, K. J. *et al.* CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J. Clin. Invest.* **120**, 2423–2431 (2010).
  95. Hong, C. Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity. *Immune Netw* **17**, 298–306 (2017).
  96. De Filippo, K. & Rankin, S. M. CXCR4, the master regulator of neutrophil trafficking in homeostasis and disease. *Eur. J. Clin. Invest.* **48**, c12949 (2018).
  97. Semerad, C. L. *et al.* G-CSF Is an Essential Regulator of Neutrophil Trafficking from the Bone Marrow to the Blood. *Immunity* **17**, 413–423 (2002).
  98. Semerad, C. L. *et al.* G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* **106**, 3020–3027 (2005).
  99. Hyun, K. K., De La Luz Sierra, M., Williams, C. K., Gulino, A. V. & Tosato, G. G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells. *Blood* **108**, 812–820 (2006).
  100. Köhler, A. *et al.* G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands. *Blood* **117**, 4349–4357 (2011).
  101. Petit, I., Ponomaryov, T., Zipori, D. & Tsvee, L. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat. Immunol.* **3**, 687–694 (2002).
  102. Voisin, M. B. & Nourshargh, S. Neutrophil trafficking to lymphoid tissues: physiological and pathological implications. *J. Pathol.* **247**, 662–671 (2019).
  103. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
  104. Domínguez-Luis, M. J. *et al.* L-selectin expression is regulated by CXCL8-induced reactive oxygen species produced during human neutrophil rolling. *Eur. J. Immunol.* **49**, 386–397 (2019).
  105. Sadik, C., Kim, N. & Luster, A. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* **32**, 452–460 (2011).
  106. Petri, B. & Sanz, M. J. Neutrophil chemotaxis. *Cell Tissue Res.* **371**, 425–436 (2018).
  107. De Oliveira, S., Rosowski, E. E. & Huttenlocher, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 378–391 (2016).
  108. Burn, G. L., Foti, A., Marsman, G., Patel, D. F. & Zychlinsky, A. The Neutrophil. *Immunity* **54**, 1377–1391 (2021).
  109. Elsbach, P. & Weiss, J. Oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms of microbicidal activity of neutrophils. *Immunol. Lett.* **11**, 159–163 (1985).
  110. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (80- )*. **303**, 1532–1535 (2004).

111. Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 134–147 (2018).
112. Lawrence, S. M., Corriden, R. & Nizet, V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **82**, 1–22 (2018).
113. Faurschou, M. & Borregaard, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* **5**, 1317–1327 (2003).
114. Hager, M., Cowland, J. B., Borregaard, N. & Ha, M. Neutrophil granules in health and disease. *J. Int. Med.* **268**, 25–34 (2010).
115. Spoor, J., Farajifard, H. & Rezaei, N. Congenital neutropenia and primary immunodeficiency diseases. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **133**, 149–162 (2019).
116. Rezaei, N. *et al.* Neutropenia in patients with primary antibody deficiency disorders. *Iran. J. Allergy. Asthma. Immunol.* **3**, 77–81 (2004).
117. Neth, O. W., Bajaj-Elliott, M., Turner, M. W. & Klein, N. J. Susceptibility to infection in patients with neutropenia: The role of the innate immune system. *Br. J. Haematol.* **129**, 713–722 (2005).
118. Mehta, H. M., Malandra, M. & Corey, S. J. G-CSF and GM-CSF in Neutropenia. *J. Immunol.* **195**, 1341–1349 (2015).
119. Donini, M. *et al.* G-CSF treatment of severe congenital neutropenia reverses neutropeniabut does not correct the underlying functional deficiency of the neutrophil in defending against microorganisms. *Blood* **109**, 4716–4723 (2007).
120. Flores-Romo, L. *et al.* CD40 ligation on human cord blood CD34 + hematopoietic progenitors induces their proliferation and differentiation into functional dendritic cells. *J. Exp. Med.* **185**, 341–349 (1997).
121. Canque, B., Camus, S., Yagello, M. & Gluckman, J. C. IL-4 and CD40 ligation affect differently the differentiation, maturation, and function of human CD34 cell-derived CD1a1CD142 and CD1a2CD141 dendritic cell precursors in vitro. *J Leukoc Biol* **64**, 235–244 (1998).
122. Jasinska, A. *et al.* Successful haploidentical PBSCT with subsequent T-cell addbacks in a boy with HyperIgM syndrome presenting as severe congenital neutropenia. *Pediatr. Transplant.* **17**, 1–4 (2012).
123. França, T. T. *et al.* A novel de novo mutation in the CD40 ligand gene in a patient with a mild X-linked hyper-IgM phenotype initially diagnosed as CVID: New aspects of old diseases. *Front. Pediatr.* **6**, 130 (2018).
124. Barnhart, B., Ford, G. S., Bhushan, A., Song, C. & Covey, L. R. A polymorphic CD40 ligand (CD154) molecule mediates CD40-dependent signalling but interferes with the ability of soluble CD40 to functionally block CD154:CD40 interactions. *Immunology* **99**, 54–61 (2000).
125. Rigaud, S. *et al.* Human X-linked variable immunodeficiency caused by a hypomorphic mutation in XIAP in association with a rare polymorphism in CD40LG. *Blood* **118**, 252–261 (2011).
126. Katta, A., Hong, J. & Knutsen, A. P. Hyper immunoglobulin M syndrome in a 15-year-old boy caused by a Gly219Arg missense mutation. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **110**, 391–393 (2013).
127. Aghamohammadi, A. *et al.* Clinical and laboratory findings in Hyper-IgM syndrome with novel CD40L and AICDA mutations. *J. Clin. Immunol.* **29**, 769–776 (2009).
128. Rawat, A. *et al.* Clinical and molecular features of X-linked hyper IgM syndrome – An experience from North India. *Clin. Immunol.* **195**, 59–66 (2018).
129. Cabral-Marques, O. *et al.* First report of the hyper-IgM syndrome registry of the latin american society for immunodeficiencies: Novel mutations, unique infections, and outcomes. *J. Clin. Immunol.* **34**, 146–156 (2014).
130. Macchi, P. *et al.* Characterization of nine novel mutations in the CD40 ligand gene in patients with X-linked hyper IgM syndrome of various ancestry. *Am. J. Hum. Genet.* **56**, 898–906 (1995).
131. Cabral-Marques, O. *et al.* Expanding the clinical and genetic spectrum of human CD40L deficiency: The occurrence of paracoccidioidomycosis and other unusual infections in brazilian patients. *J. Clin. Immunol.* **32**, 212–220 (2012).

132. Bajorath, J., Seyama, K., Nonoyama, S., Ochs, H. D. & Aruffo, A. Classification of mutations in the human CD40 ligand, gp39, that are associated with X-linked hyper IgM syndrome. *Protein Sci.* **5**, 531–534 (1996).
133. Nonoyama, S. *et al.* Mutations of the CD40 ligand gene in 13 Japanese patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Hum. Genet.* **99**, 624–627 (1997).
134. Seyama, K. *et al.* Mutations of the CD40 ligand gene and its effect on CD40 ligand expression in patients with X-linked hyper IgM syndrome. *Blood* **92**, 2421–2434 (1998).
135. Serra, H. *et al.* A new CD154 mutation. *Allergy* **65**, 1230–1231 (2001).
136. Danielian, S., Oleastro, M., Rivas, M. E., Cantisano, C. & Zelazko, M. Clinical follow-up of 11 Argentinian CD40L-deficient patients with 7 unique mutations including the so-called ‘milder’ mutants. *J. Clin. Immunol.* **27**, 455–459 (2007).
137. Katz, F. *et al.* Mutation analysis in CD40 ligand deficiency leading to X-linked hypogammaglobulinemia with hyper IgM syndrome. *Hum. Mutat.* **8**, 223–228 (1996).
138. Lin, Q. *et al.* A single strand conformation polymorphism study of CD40 ligand. Efficient mutation analysis and carrier detection for X-linked hyper IgM syndrome. *J. Clin. Invest.* **97**, 196–201 (1996).
139. Heinold, A. *et al.* Pitfalls of ‘hyper’-IgM syndrome: A new CD40 ligand mutation in the presence of low IgM levels. A case report and a critical review of the literature. *Infection* **38**, 491–496 (2010).
140. Partida-Sánchez, S. *et al.* Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat. Med.* **7**, 1209–1216 (2001).
141. Kutsuna, H. *et al.* Actin reorganization and morphological changes in human neutrophils stimulated by TNF, GM-CSF, and G-CSF: the role of MAP kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**, 55–64 (2004).
142. K, G JCarulli, G. *et al.* Actin Polymerization in Neutrophils from Donors of Peripheral Blood Stem Cells: Divergent Effects of Glycosylated and Nonglycosylated Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Am. J. Hematol.* **81**, 318–323 (2006).
143. Xu, J. *et al.* Mice Deficient for the CD40 Ligand. *Immunity* **1**, 423–431 (1994).
144. Edgar, R., Domrachev, M. & Lash, A. E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* **30**, 207–210 (2002).
145. Barrett, T. *et al.* NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Res.* **41**, D991–D995 (2013).
146. Athar, A. *et al.* ArrayExpress update – from bulk to single-cell expression data. *Nucleic Acids Res.* **47**, D711–D715 (2019).
147. Xie, X. *et al.* Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection. *Nat. Immunol.* **21**, 1119–1133 (2020).
148. Zhou, G. *et al.* NetworkAnalyst 3.0: A visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. *Nucleic Acids Res.* **47**, W234–W241 (2019).
149. Russo, P. S. T. *et al.* CEMiTool: A Bioconductor package for performing comprehensive modular co-expression analyses. *BMC Bioinformatics* **19**, 56 (2018).
150. Krzywinski, M. *et al.* Circos: an Information Aesthetic for Comparative Genomics. *Genome Res.* **19**, 1639–1645 (2009).
151. Metsalu, T. & Vilo, J. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* **43**, W566–W570 (2015).
152. Heberle, H., Meirelles, G. V., Silva, F. R., Telles, G. P. & Minghim, R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* **16**, 1–7 (2015).
153. Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X. & Thomas, D. PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **47**, 419–426 (2019).

154. Krupa, S. *et al.* The NCI-Nature Pathway Interaction Database: A cell signaling resource. *Nat. Preced.* (2007) doi:10.1038/npre.2007.1311.1.
155. Kuleshov, M. V. *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **44**, W90–W97 (2016).
156. Hennig, C., Happle, C. & Hansen, G. A bad wound may heal, but a bad name can kill - Lessons learned from ‘hyper-IgM syndrome’. *J. Allergy Clin. Immunol.* **128**, 1380–1382 (2011).
157. Tang, W. J. *et al.* Clinical, molecular, and T cell subset analyses in a small cohort of Chinese patients with hyper-IgM syndrome type 1. *Hum. Immunol.* **75**, 633–640 (2014).
158. Wang, L. L. *et al.* Clinical features and genetic analysis of 20 Chinese patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *J. Immunol. Res.* **Epub 2014**, (2014).
159. Castagnoli, R., Delmonte, O. M., Calzoni, E. & Notarangelo, L. D. Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Primary Immunodeficiency Diseases: Current Status and Future Perspectives. *Front. Pediatr.* **7**, 1–25 (2019).
160. Madkaikar, M. *et al.* X-linked hyper IgM syndrome: Clinical, immunological and molecular features in patients from India. *Blood Cells, Mol. Dis.* **53**, 99–104 (2014).
161. Du, X. *et al.* Clinical, genetic and immunological characteristics of 40 Chinese patients with CD40 ligand deficiency. *Scand. J. Immunol.* **90**, 1–12 (2019).
162. Erdos, M. *et al.* Molecular genetic analysis of Hungarian patients with the hyper-immunoglobulin M syndrome. *Mol. Immunol.* **45**, 278–282 (2008).
163. Azizi, G. & Yazdani, R. Predominantly antibody deficiencies. *Immunol. Genet. J.* **1**, 52–80 (2018).
164. Song, Z. *et al.* CD40 is essential in the upregulation of traf proteins and NF-KappaB-dependent proinflammatory gene expression after arterial injury. *PLoS One* **6**, 1–11 (2011).
165. Xiaowen Liu, Bo Ma, Asrar B. Malik, Haiyang Tang, Tao Yang, Bo Sun, Gang Wang, Richard D. Minshall, Yan Li, Yong Zhao, Richard D. Ye, and J. & Xu. Bidirectional Regulation of Neutrophil Migration by MAP Kinases. *Nat. Immunol.* **13**, 457–464 (2012).
166. Heit, B., Tavener, S., Raharjo, E. & Kubes, P. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J. Cell Biol.* **159**, 91–102 (2002).
167. Mori, M. *et al.* Mutation Analysis and Therapeutic Response to Granulocyte Colony-Stimulating Factor in a Case of Hyperimmunoglobulin M Syndrome With Chronic Neutropenia. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **22**, 288–289 (2000).
168. Marini, O. *et al.* Mature CD10+ and immature CD10- neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood* **129**, 1343–1356 (2017).
169. Silvestre-Roig, C., Fridlender, Z. G., Glogauer, M. & Scapini, P. Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends Immunol.* **40**, 565–583 (2019).
170. Silvestre-Roig, C., Hidalgo, A. & Soehnlein, O. Neutrophil heterogeneity: Implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood* **127**, 2173–2181 (2016).
171. Garley, M. & Jabłońska, E. Heterogeneity Among Neutrophils. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **66**, 21–30 (2018).
172. Grigoriou, M. *et al.* Transcriptome reprogramming and myeloid skewing in haematopoietic stem and progenitor cells in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **79**, 242–253 (2020).
173. Noz, M. P. *et al.* Reprogramming of bone marrow myeloid progenitor cells in patients with severe coronary artery disease. *Elife* **9**, e60939 (2020).
174. Durrans, A. *et al.* Identification of Reprogrammed Myeloid Cell Transcriptomes in NSCLC. *PLoS One* **7**, 1–22 (2015).
175. Zarebski, A. *et al.* Mutations in Growth Factor Independent-1 Associated with Human Neutropenia Block Murine Granulopoiesis through Colony Stimulating Factor-1. *Immunity* **28**, 370–380 (2008).
176. Hock, H. *et al.* Intrinsic Requirement for Zinc Finger Transcription Factor Gfi-1 in Neutrophil

- Differentiation. *Immunity* **18**, 109–120 (2003).
177. Sierra, M. de la L. *et al.* The transcription factor Gfi1 regulates G-CSF signaling and neutrophil development through the Ras activator RasGRP1. *Blood* **115**, 3970–3980 (2010).
  178. Yáñez, A., Ng, M. Y., Hassanzadeh-kiabi, N. & Goodridge, H. S. IRF8 acts in lineage-committed rather than oligopotent progenitors to control neutrophil vs monocyte production. *Blood* **125**, 1452–1459 (2015).
  179. Kurotaki, D. *et al.* IRF8 inhibits C/EBP $\alpha$  activity to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. *Nat. Commun.* **5**, 4978 (2014).
  180. Porse, B. T. *et al.* Loss of C/EBP $\alpha$  cell cycle control increases myeloid progenitor proliferation and transforms the neutrophil granulocyte lineage. *J Exp Med* **202**, 85–96 (2005).
  181. Zhang, L. & Friedman, A. D. SHP2 tyrosine phosphatase stimulates CEBPA gene expression to mediate cytokine-dependent granulopoiesis. *Blood* **118**, 2266–2274 (2011).
  182. França, T. T. *et al.* CD40L modulates transcriptional signatures of neutrophils in the bone marrow associated with development and trafficking. *J. Clin. Investig. Insight* **6**, e148652. (2021).

**ANEXOS**

## ANEXO A

País	Pt.	Ano de nascim.	Idade no estudo	Idade de falecim.	Idade início sintomas	Idade no diagnóst.	Atraso no diagnóst.	Histórico famil. de EII	Atraso no crescim.	Níveis séricos de Ig (mg/dl)			Neutrop.	Em tmt. medicament.	TCTH bem sucedida	
										Idade no exame	IgM	IgG				IgA
Brasil	P1	2013	8 anos	-	2 anos	6a7m	4a7m	Não	Sim	6 anos	68,4	153,8	48,6	Não	Sim	-
Brasil	P2	1989	32 anos	-		29 anos	22 anos	Não	Não	22 anos	625	<93	<7	Não	Sim	-
Brasil	P3	2010	11 anos	-	4 meses	5a6m	5a2m	Não	Não	5 anos	131	84	<7	Sim	Sim	-
Brasil	P4	1995	26 anos	-	4a10m	17 anos	12a2m	Não	Não	9 anos	111	460	51	Não	Sim	-
Brasil	P5	2005	16 anos	-	3 anos	5a1m	2a1m	Sim	Não	5 anos	905	<145	<24	Sim	Sim	-
Brasil	P6	1997	24 anos	-	< 1 ano	6 meses	-	Sim	Não	N/A	-	-	-	Não	Sim	-
Brasil	P7	2005	16 anos	-	3 meses	9 meses	6 meses	Sim	Sim	N/A	-	-	-	Sim	Sim	Não
Brasil	P8	2006	15 anos	-	5 meses	5 meses	0	Sim	Não	6 meses	50	54	<7	Não	Não	Sim
Brasil	P9	2012	9 anos	-	1a3m	5a8m	4a5m	Não	Não	1a7m	191	189	606	Sim	Sim	-
Brasil	P10	2015	6 anos	-	2 anos	3anos	1 ano	Não	Não	2a1m	191	<140	2,9	Não	Sim	-
Brasil	P11	2018	3 anos	-	10 meses	1a3m	5 meses	Não	Não	11 meses	53	<75	<10	Sim	Não	Sim
Brasil	P12	2002	-	7 anos	3 meses	3anos	2a9m	Sim	-	3 anos	362	22	5	Sim	-	-
Brasil	P13	2008	13 anos	-	3 meses	1a4m	1a1m	Sim	Não	7 meses	111	<164	<21,8	Sim	Sim	-
Brasil	P14	2017	4 anos	-	7 meses	1a3m	8 meses	Não	Não	11 meses	125	105,6	37	Sim	Sim	-
Brasil	P15	2003	18 anos	-	1 mês	1 ano	11 meses	Não	Não	1a8m	44	193	7	Sim	Sim	Não
Brasil	P16	1987	-	26 anos	7 meses	2a2m	1a7m	Não	-	2 anos	320	9,2	10	Sim	-	-
Brasil	P17	2011	10 anos	-	10 meses	9 anos	8a2m	Não	Não	8 anos	144,1	<30	<5	Sim	Sim	-
Brasil	P18	2007	14 anos	-	6 meses	6 meses	0	Não	Sim	7 meses	53,8	44,7	5,2	Sim	Sim	-
Brasil	P19	2009	12 anos	-	5 meses	5 meses	0	Sim	Não	5 meses	25,2	7	13,6	Sim	Não	Sim
Brasil	P20	2006	1 ano	-	1 ano	5 anos	4 anos	Não	Sim	3 anos	368	22	18	Sim	Sim	-
Brasil	P21	2016	-	1 ano	4 meses	1a3m	11 meses	Não	-	1a2m	127	<7	28	Sim	-	-
Brasil	P22	2008	13 anos	-	4 meses	10 anos	9a8m	Não	Não	9 anos	174	511	10	Sim	Não	Sim
Brasil	P23	2011	10 anos	-	11 meses	1a3m	4 meses	Não	Não	6 meses	216	46	23	Sim	Não	Sim
Brasil	P24	2015	6 anos	-	-	1 mês	-	Sim	Não	2 meses	37,5	775	33,7	Não	Não	Sim
Brasil	P25	1996	-	16 anos	3 anos	15 anos	12 anos	Não	-	15 anos	141	138	<23	Não	-	-
Brasil	P26	2019	2 anos	-	6 meses	1a6m	1 ano	Não	Não	1a4m	73	115	<27,9	Sim	Sim	-
Brasil	P27	2004	17 anos	-	6 meses	2 anos	1a6m	Não	Sim	ND	-	-	-	Sim	Sim	-
Brasil	P28	2007	-	8 anos	3 meses	3a3m	3 anos	Não	-	ND	-	-	-	Sim	-	-
Argentina	P29	2010	11 anos	-	7 meses	9 meses	2 meses	Não	Sim	8 meses	134	<200	17	Sim	Não	Sim
Argentina	P30	2006	15 anos	-	2 meses	2 meses	0	Sim	Não	2 meses	60	434	55	Sim	Sim	Não
Argentina	P31	1992	-	8 anos	2 anos	3 anos	1 ano	Sim	-	ND	-	-	-	Sim	-	-
Argentina	P32	1999	22 anos	-	4 meses	1a6m	1a2m	Sim	Não	1 ano	32	88	<7	Sim	Não	Sim
Argentina	P33	2005	16 anos	-	-	5 meses	-	Sim	Não	5 meses	57	56	<7	Não	Não	Sim
Argentina	P34	2011	10 anos	-	1 mês	8 meses	7 meses	Não	Não	5 meses	79	505	<7	Sim	Não	Sim
Argentina	P35	1986	35 anos	-	6 meses	12 anos	11a6m	Não	Sim	12 anos	362	71	9	Sim	Sim	-
Argentina	P36	2016	5 anos	-	7 meses	8 meses	1 mês	Não	Não	ND	-	-	-	Sim	Sim	-



Argentina	P37	2008	13 anos	-	3 meses	1 ano	9 meses	Não	Não	1 ano	94	283	8	Sim	Não	Sim
Mexico	P38	2004	-	14 anos	5 meses	5 meses	0	Sim	-	6 meses	69	13	8	Sim	-	Não
Mexico	P39	1998	23 anos	-	1 ano	17 anos	16 anos	Sim	Não	N/A	-	-	-	Não	Sim	-
Mexico	P40	2015	6 anos	-	3 meses	5 meses	2 meses	Sim	Não	5 meses	20,7	10	11,5	Não	Sim	-
Mexico	P41	2003	18 anos	-	1a6m	4a11m	3a5m	Não	Não	4 anos	329	57	5	Não	Sim	-
Mexico	P42	2009	-	7 anos	-	5 meses	-	Sim	-	5 meses	273	420	<23	Sim	-	-
Mexico	P43	2005	16 anos	-	2a8m	12a9m	10a1m	Não	Sim	5 anos	384	130	26	Não	Sim	-
Uruguai	P44	2015	6 anos	-	4 meses	8 meses	4 meses	Não	Não	5 meses	29,5	<137	<6	Não	Não	Sim
Uruguai	P45	2015	-	3 anos	8 meses	2a3m	1a7m	Sim	-	1a1m	112	<132	<5	Sim	-	-
Uruguai	P46	2015	6 anos	-	6 meses	6 meses	0	Sim	Sim	6 meses	50	<142	18	Não	Não	Sim
Uruguai	P47	2002	19 anos	-	1 ano	5a8m	4a8m	Não	Não	2 anos	75	<145	<22	Sim	Não	Sim
Peru	P48	2016	5 anos	-	1a1m	2a2m	2a1m	Sim	Não	ND	-	-	-	Sim	Sim	-
Peru	P49	2016	5 anos	-	5 meses	11 meses	6 meses	Não	Não	6 meses	36,8	37	7,1	Sim	Sim	-
Costa Rica	P50	2005	16 anos	-	1a2m	1a9m	7 meses	Não	Não	ND	-	-	-	Sim	Não	Sim

Pt.: paciente; Nasc.: nascimento; Diagnóst.: diagnóstico; a:ano; m: mês(es); Famil.: familiar; Crescim.: crescimento; Ig: imunoglobulina; ND: não disponível; <: menor que; Neutrop.: neutropenia; tmt.: tratamento; Medicament.: medicamentoso; TCTH: transplante de células tronco hematopoiéticas.

## ANEXO B

Pt.	Idade (data do exame)	Idade na 1ª manifest.	Primeira manifestação	Manifestações clínicas	Microrganismos isolados	IgM	IgG	IgA	Expr. CD40L	Ligação CD40-Ig	Variante identificada no <i>CD40LG</i>
P1	18 anos	7 anos	Sinusite	2 Pneumonia Diversas amigdalites Diversas sinusites 4 ITU 1 Sepse Linfoma de Burkitt		E	R	R	R	R	NI
P2	9 anos	5 anos		Diversas otites Diversas amigdalites Diversas diarreias Diversas sinusites		R	R	R	N	N	NR
<b>P3</b>	5 anos	1 ano e 3 meses	Abscesso de pele	3 Otites Abscesso de pele 1 Sepse Osteomielite	<i>Pseudomonas spp.</i> <i>Candida dubliniensis</i>	E	R	E	A	A	c.158_161del/ p.I53Kfs*13
<b>P4</b>	11 anos	4 meses	Pneumonia	Diversas Otites 14 pneumonias (2 DP) 1 Sepse	<i>Pneumococcus spp.</i>	E	R	R	A	A	NR (c.395A>G/ p. H125Rfs*128) <sup>a</sup>
P5	3 anos	8 meses	Sinusite	Diversas otomastoidites Diversas sinusites Diversas laringites <b>Neutropenia</b>		N	R	NR	R	R	NI
<b>P6</b>	1 ano	4 meses	Pneumonia/ bronquiolite	1 Pneumonia Bronquiolite Linfadenopatia Diversas ITU Colangite esclerosante Diarreia 1 Sepse <b>Neutropenia</b>	<i>Pseudomonas spp.</i> <i>Candida Spp.</i> CMV	N	R	R	A	A	c.594dup/ G199Rfs*2
<b>P7</b>	10 anos	4 meses	Pneumonia	Diversas Otites 2 pneumonias Diversas Amigdalites Estomatite Ulcera fúngica (mucosa oral) Artrite Diarreia	<i>Pneumocystis jirovecii</i> CMV VVZ	E	R	R	A	A	c.642del/ p.A215Pfs*27

				<b>Neutropenia</b>							
P8	11 anos	ND	ND	Autoimunidade							
				Diversas Otites		E	R	R	R	N	NR
				Diversas Pneumonias							
				Linfadenopatia							
				Diversas diarreias							
<b>P9</b>	1 ano	1 mês	Pneumonia/ bronquiolite	Bronquiolite		E	R	N	A	A	c. 410-1G>A/ Defeito de splicing
				2 pneumonias							
				Diarreia crônica							
				<b>Neutropenia</b>							
P10	1 ano	6 meses		1 Infec. sinobronquial	CMV	R	R	R	N	N	NR
				+ 10 diarreias							
P11	8 meses	3 meses	Pneumonia	2 pneumonias	VSR	E	R	R	N	N	NR
<b>P12</b>	4 anos	2 anos	Linfadenopatia	Pneumonia		N	R	R	A	A	c.158_161del/ p.I53Kfs*13
			Úlcera fúngica (mucosa oral)	Linfadenopatia							
				Úlcera fúngica (mucosa oral)							
<b>P13</b>	1 ano	10 meses	Pneumonia	Pneumonia		N	R	R	A	A	c.256_260dup/ p.I87Mfs*11
				Infec. trato respiratório superior							
				<b>Neutropenia</b>							
P14	18 anos	10 anos	Pneumonia	Diversas otites		E	R	R	N	N	NR
				5 Pneumonias							
				Diversas amigdalites							
				Hiperplasia do linfonodo							
				<b>Neutropenia</b>							
				Linfoma							
<b>P15</b>	1 ano	6 meses	Pneumonia	Pneumonia	<i>Campylobacter spp.</i>	N	R	R	A	A	c.347_783del/ Del. exons 4 e 5
				Úlcera cavidade oral							
				Diarreia							
				<b>Neutropenia</b>							
				Sepse							
<b>P16</b>	10 anos	1 ano	Pneumonia	6 Pneumonias		E	R	R	N	A	c.431G>A/ p.G144E
				Diversas otites							
				2 amidalites							
				Tonsilite							
				<b>Neutropenia</b>							
				Hepatite							
				Sepse							
				Colangite esclerosante							
P17	1 ano	1 ano	Pneumonia	2 Pneumonias	VSR	E	R	N	N	N	NI
				3 sepses							

				Hiperplasia de baço							
				Diarreia							
P18	10 meses	1 mês	ITU	ITU	<i>Enterobacter cloacae</i>	E	E	E	N	N	NR
				Infec. de corrente sanguínea	<i>Enterococcus faecalis</i>						
					<i>Staphylococcus hominis</i>						
					<i>Staphylococcus</i>						
					<i>epidermidis</i>						
					<i>Enterococcus faecium</i>						
					<i>Klebsiela oxytoca</i>						
					<i>Klebsiela pneumoniae</i>						

Pacientes destacados em vermelho indicam aqueles diagnosticados com deficiência de CD40L. Genes destacados em vermelho indicam mutações novas, não relatadas na literatura. Pt.: paciente; Manifest.: manifestação; ITU: Infecção do trato urinário; Infec.: infecção; CMV: Citomagalovirus; VVZ: Vírus varicela-zoster; VSR: Vírus sincicial respiratório; ND: não disponível; E: elevada; N: normal; R: reduzida; NR: não realizada; NI: não identificado.

## Anexo C

<b>Pt.</b>	<b>Avaliação</b>	<b>Infecções em curso</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Neutropenia?</b>
KM	1	<i>C. parvum</i>	IVIG Bactrim Filgrastin Azitromicin	Sim
	2	<i>C. parvum</i>	IVIG Bactrim Filgrastin Azitromicin rhIFN-gamma	Sim
	3	Sem infecções	IVIG Bactrim	ND
PV	1	<i>M. tuberculosis</i>	IVIG Sulfonamide Rifampicin Isoniazid	Sim
	2	Sem infecções	IVIG Sulfonamide	Sim
VB	1	Infecção do trato urinário	IVIG Bactrim Amoxicillin Acyclovir	Sim
	2	Sem infecções	IVIG Bactrim	ND

Pt.: paciente; IVIG: imunoglobulina intravenosa; ND: não disponível.