

**Otávio Cabral Marques**

**NOVOS MECANISMOS IMUNOPATOLÓGICOS NA  
DEFICIÊNCIA DE CD40 LIGANTE**

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

São Paulo  
2012

**OTÁVIO CABRAL MARQUES**

**Novos Mecanismos Imunopatológicos na  
Deficiência de CD40 ligante**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Condino Neto

Co-Orientador: Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto

Versão original

São Paulo  
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Cabral Marques, O.

Novos mecanismos imunopatológicos na deficiência de CD40 ligante  
/ Otávio Cabral Marques. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Condino Neto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências  
Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração:  
Imunologia. Linha de pesquisa: Imunodeficiências primárias.

Versão do título para o inglês: Novel immunopathological  
mechanisms in the CD40L deficiency.

1. Deficiência de CD40 ligante 2. Infecções fúngicas 3. Células  
dendríticas 4. Neutrófilos I. Condino Neto, Prof. Dr. Antônio II.  
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa  
de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0161/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Otávio Cabral Marques.

Título da Tese: Novos mecanismos imunopatológicos na deficiência de CD40 ligante.

Orientador(a): Prof. Dr. Antônio Condino Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

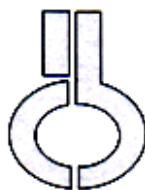
Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

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

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

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

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cap. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438  
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 25 de março de 2009.

**PARECER 880/CEP**

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 93ª reunião realizada em 24.003.09, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Estudo da atividade microbicida dos fagócitos, resposta imune celular e apresentação de antígeno em pacientes deficientes de CD40 Ligante*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão.**

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, Item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **24 de março de 2010.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A ZANOTTO  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmo.Sr.  
OTÁVIO CABRAL MARQUES  
Departamento de Imunologia  
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

*"Dedico esta tese: aos pacientes e familiares que colaboraram com nossos esforços para revelar novos mecanismos imunopatológicos na deficiência de CD40 ligante e desejo profundamente que nossos achados possam de alguma forma contribuir para melhorar a qualidade de vida de cada um deles; à minha esposa Lena Schimke que compartilha cada momento da vida comigo e com quem tenho aprendido que não importa credo, filosofia, distância, ou fronteiras que impeçam a vivência do amor e que o amor não é uma utopia, mas sim um sentimento que vivifica; ao meu filho Gabriel Marques cujas palavras são incapazes de expressar o que ele significa para mim, mesmo pequenino sempre mensurou a importância desta tese na minha vida, conforme revelado pela constante expressão jocosa "para variar CD40 ligante, né pai?"; aos meus pais Paulo Marques e Suerleide Cabral cujo amor e apoio incondicionais me sustentam e felicitam onde quer que eu esteja; ao meu avô Arnaldo Marques (in memoriam) cuja grandeza de ser e de pensar continuam a influenciar às nossas vidas constantemente; à minha querida avó Maria José Cabral e à minha tia Sônia Maria de Moura por todo amor, carinho e cuidado que sempre tiveram comigo; à minha irmã Paula Cabral Marques com quem tive a alegria de compartilhar os primeiros passados da vida; aos meus irmãos Arnaldo Marques Neto e Paulo Alexandre Marques que são a prova de que o tempo, a distância e qualquer barreira desaparecem na presença do amor; ao meu co-orientador José Alexandre Barbuto que com sua simpatia e valorização que dava a cada resultado obtido, me estimulava a seguir em frente. Por fim, não poderia deixar de oferecer esta tese ao meu orientador Antônio Condino Neto, a quem serei eternamente grato por todas as oportunidades que me ofereceu e a confiança que me dispensou"*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Condino Neto quem admiro e estimo muito por tudo que fez por mim. Agradeço-o pelo aprendizado, pela sua grande compreensão, maturidade e companheirismo com que sempre se relacionou comigo. Felicita-me a perspectiva de conviver mais alguns anos em sua presença;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. José Alexandre Barbuto que além de ser um grande cientista é um grande filósofo e pensador. Sou grato desde as primeiras sugestões que me deu por ocasião do Exame de Qualificação do mestrado até a orientação amigável que continua a me fornecer;

Ao Prof. Dr. Troy R. Torgerson pela supervisão e orientação durante os meses que estive no *Seattle Children's Research Institute* e pela revisão crítica dos manuscritos que derivaram desta tese;

Ao Prof. Dr. Hans Ochs pela supervisão, orientação e apoio durante os meses que estive no *Seattle Children's Research Institute* e pela revisão crítica dos manuscritos que derivaram desta tese. Sou muito grato a ele e sua esposa Ute Ochs pela acolhida fraterna e carinho com que me receberam em sua casa durante minha adaptação inicial em Seattle. Além disso, gostaria de agradecer o Prof. Dr. Hans Ochs, pois através dele tomei conhecimento sobre os bastidores da descoberta e publicação da primeira mutação no gene *CD40LG*.

Aos médicos Profa. Dra. Beatriz Costa Carvalho, Dra. Cristina Weber Worm, Dra. Janaira Fernandes Ferreira, Prof. Dr. Nelson Rosário Filho, Gisele Kuntze bem como as suas respectivas equipes pelo apoio a esta tese e pela organização, coleta e envio de amostras de sangue dos pacientes deficientes de CD40 ligante para nosso laboratório. Sem o apoio de cada um deles esta tese não teria sido realizada;

A farmacêutica-bioquímica Dra. Eunice Z. Duarte pela boa vontade que sempre coletou e enviou as amostras de sangue dos pacientes deficientes de CD40L residentes no Rio Grande do Sul;

À Dra. Lena Schimke pelo seu criticismo do ponto de vista médico e pelas revisões da língua inglesa que contribuíram muito na elaboração dos manuscritos que derivaram desta tese;

Ao Dr. Arnaldo Marques Neto e ao Doutorando Paulo Vitor Soeiro Pereira pela leitura crítica desta tese;

À técnica BSc. Christina Arslanian que participou ativamente desta tese e dos meus sete anos de vida no laboratório de imunologia humana e pós-graduação. Meu muito obrigado pelo seu coração e cuidado materno que dispensa a cada um de nós no laboratório;

À gerente de projetos Silvana Luchini pela grande eficiência e competência que realiza seu trabalho e contribue com todos do nosso laboratório. Sou muito grato pela amizade e companherismo que desenvolvemos ao longo dos anos;

Aos companheiros do laboratório de Imunologia Humana e pós-graduandos Paulo Vitor Soeiro Pereira, Walmir Cutrin, Éric Hainer Ostroski, Taj Ali Kan, Angela Falcai, Marília Kanegae, Edgar Borges de Oliveria, Patrícia Macchiaverni, Josias Brito Frazão, Marina Wall e Núria Zurro pelos sete anos de convivência. Cada um, de forma particular, me ajudou e foi essencial ao meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional;

Aos colegas do laboratório de imunologia dos tumores e pós-graduandos Rodrigo Nalio Ramos, Bruna Zelante, Isabela Migliori, Patricia Argenta Toniolo, Graziela Magnoli, Lilian Sally Chin, Cristiano Jacob, Giovana Cechim, Karen Steponavicius, Ana Carolina Franco Ferreira, bem como à Dra Patrícia Cruz Bergami e à técnica Célia Pizzo com quem aprendi a trabalhar com as células dendríticas;

Aos colegas e pós-graduandos Cláudia Feriotti Tunes, Tânia Alves da Costa, Eliseu Frank de Araújo e Silvia Bazan pela contribuição e suporte na realização dos experimentos referentes à atividade fungicida frente ao *P. brasiliensis*;

Aos colegas de laboratório do Seattle Children's Research Institute: Stephanie Anover, Stacey Rylaarsdam, Karin Golob, Nicholas Hubbard, Takashi Yamazaki, Mary Hackett com quem aprendi muito;

A professora Dra. Sônia Jancar Negro e a pós-graduanda Mariana Morato Marques pelo fornecimento das amostras de *C. albicans*, pelos experimentos que realizamos com a Pentraxina e discussão crítica desses resultados;

A Professora Dra. Vera Lúcia Garcia Calich pela supervisão dos experimentos referentes a atividade fungicida dos neutrófilos frente ao *P. brasiliensis*;



Aos Professores Dr. Anderson de Sá Nunes, Dra. Sônia Jancar Negro e Dra. Cristina Kokron pelas valiosas críticas e sugestões por ocasião do Exame de Qualificação;

À bibliotecaria Monica da Silva Amaral pela revisão da formatação desta tese

Por fim, meu muitíssimo obrigado ao governo do Estado de São Paulo e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo fundamental apoio financeiro, sem o qual este trabalho não teria se tornado realidade.

"A alegria na vida não consiste em conquistar sonhos ou atingir metas. Mas sim experienciar alegremente cada instante vivido, compartilhando e cooperando uns com os outros. Assim deixaremos de ter momentos fugazes de alegria e cada momento de nossas vidas será uma alegria só. Nesse processo, erros e acertos são ensaios que burilam o nosso Espírito na grande jornada evolutiva da existência. Não importa se acertamos ou erramos, pois tudo nos faz crescer. O aparente erro de hoje, na verdade, é a luz do amanhã. Nascemos, vivemos e morremos para sermos felizes na infinitude"

*(Otávio Cabral Marques)*

## RESUMO

Cabral-Marques O. Novos mecanismos imunopatológicos na deficiência de CD40L. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Pacientes portadores da deficiência de CD40 ligante (CD40L) ou Hiper-IgM ligada ao X (X-HIGM) são suscetíveis a graves infecções causadas por bactérias extracelulares como resultado de uma ineficiente resposta mediada por anticorpos. Contudo, esses pacientes também são suscetíveis a infecções fúngicas cujos mecanismos subjacentes permanecem pouco esclarecidos. Identificamos em nosso grupo de pacientes (12 indivíduos) alta incidência de infecções fúngicas (83%). Dentre essas, os primeiros casos de paracoccidiodomicose (PCM) e aspergilose invasiva. Por essa razão, investigamos os mecanismos imunológicos relacionados à resposta imune antifúngica nestes pacientes através da avaliação da função das células dendríticas (DCs) e neutrófilos. Os resultados demonstraram que as DCs imaturas (iDCs) dos pacientes apresentaram expressão reduzida das moléculas HLA-DR, CD80 e CD86, porém normal das moléculas TLR2, TLR4, HLA-ABC e CD14. Por sua vez, DCs maduras (mDCs) após ativação pelos fungos *P. brasiliensis* ou *C. albicans* apresentaram baixa expressão das moléculas HLA-DR e CD80. Contudo a expressão das moléculas CD40, HLA-ABC e CD83 foi normal. No sobrenadante das culturas de mDCs dos pacientes, detectamos baixa secreção de IL-12 e altas concentrações de IL-10. Nas co-culturas das mDCs com os linfócitos autólogos, encontramos proliferação normal dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, e produção normal de IL-17 e TGF- $\beta$ . Entretanto, a produção de IFN- $\gamma$  foi significativamente reduzida, ao passo que a produção de IL-4 e IL-5 foi aumentada. Após tratamento com CD40L solúvel (CD40Ls), a expressão reduzida das moléculas co-estimuladoras (CD80/CD86) e HLA-DR, a produção diminuída de IL-12 e o desequilíbrio no padrão de resposta T *helper* (Th) 1/Th2 foram revertidos. O estudo dos neutrófilos dos pacientes demonstrou falhas na atividade fungicida em resposta ao fungo *P. brasiliensis*, mas normal em resposta à *C. albicans*. Este fato foi relacionado a capacidade intrínseca normal em induzir a explosão respiratória dos neutrófilos (medida pela produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em resposta ao PMA, todavia, uma reduzida produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em resposta à ambos os fungos foi observada. Essas falhas na explosão respiratória não pareceram ser devidas à reduzida ingestão dos fungos, expressão do citocromo *b*<sub>558</sub>, ou sinalização via o receptor delectina 1. Contudo, defeitos na sinalização via TLR1/TLR2 e TLR2/TLR6 foram observados. Juntos, nossos dados evidenciam o papel da interação CD40L-CD40 na mediação da resposta imune antifúngica e demonstram que defeitos nesta via resultam em suscetibilidade às infecções fúngicas que vão além das previamente descritas (*Pneumocystis jirovecii*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*). Além disso, falhas na resposta de DCs e neutrófilos sugerem que defeitos nestas células da imunidade inata são mecanismos imunopatológicos subjacentes à suscetibilidade às infecções fúngicas.

**Palavras-chave:** Deficiência de CD40L. Infecções fúngicas. Células dendríticas. Neutrófilos.

## ABSTRACT

Cabral-Marques O. Novel immunopathological mechanisms in the CD40L deficiency. [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Patients with CD40 ligand (CD40L) deficiency or X-linked Hyper-IgM syndrome are susceptible to severe infections caused by extracellular bacteria as a result of an inappropriate immune response mediated by antibodies. However, these patients are susceptible to fungal infections whose underlying mechanisms remain poorly understood. We identified in our cohort of patients (12 subjects) a high incidence of fungal infections (83%). Among them, we report the first case of paracoccidioidomycosis and invasive aspergillosis. Therefore we investigated the immunopathological mechanisms underlying the susceptibility to fungal infections in the CD40L deficiency. To address this issue, we evaluated the function of dendritic cells (DCs) and neutrophils from CD40L-deficient patients. The results showed that immature DCs (iDCs) from the patients present reduced protein expression of HLA-DR, CD80 and CD86 but normal expression of TLR2, TLR4, HLA-ABC and CD14. On the other hand, DCs pulsed with *C. albicans* or *P. brasiliensis* (mDCs) presented low expression of HLA-DR and CD80 molecules but normal expression of CD40, HLA-ABC and CD83. In the supernatants of DC cultures from the patients we detected low secretion of IL-12 and high levels of IL-10. In co-cultures of mDCs and autologous T lymphocytes we found normal proliferation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and normal IL-17 and TGF- $\beta$  production. However, the production of IFN- $\gamma$  was significantly reduced, while IL-4 and IL-5 were increased. After treatment with trimeric soluble CD40L (CD40Ls), the expression of costimulatory (CD80/CD86) and HLA-DR molecules, IL-12 production, and imbalanced T helper (Th) Th1/Th2 response have been reversed. In addition, the studies of neutrophils from these patients showed impaired fungicidal activity in response to the fungus *P. brasiliensis* but not to *C. albicans*. In addition, the respiratory burst of the patient's neutrophils (measured by the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in response to PMA was normal but impaired in response to both fungi. The impaired oxidative burst seems not to be due to failure of phagocytic capacity, cytochrome *b*<sub>558</sub> expression, or in the dentin 1 signaling. However, defective TLR1/TLR2 and TLR2/TLR6 signaling were observed. Taken together, our data highlight the key role of CD40L-CD40 interaction in mediating antifungal immunity and demonstrate that defects in this pathway cause susceptibility to broader array of fungal pathogens than those previously described (*Pneumocystis jiroveci*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*). In addition, failure in DCs and neutrophils responses are immunopathological mechanisms underlying the susceptibility to fungal infections in CD40L-deficient patients.

**Keywords:** CD40L deficiency. Fungal infections. Dendritic cells. Neutrophils.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Troca de classe de Imunoglobulinas (CSR) .....	27
<b>Figura 2</b> - Curva de sobrevivência de pacientes deficientes de CD40L .....	28
<b>Figura 3</b> - Sinalização CD40L- CD40.....	31
<b>Figura 4</b> - Papel das DCs na diferenciação dos linfócitos T .....	34
<b>Figura 5</b> - Diagrama esquemático da interação CD40L-CD40 na medula óssea .....	36
<b>Figura 6</b> - Visão geral da ativação do neutrófilo .....	38
<b>Figura 7</b> - Heredogramas das famílias estudadas .....	43
<b>Figura 8</b> - Expressão do CD40L na superfície dos linfócitos T CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ativados.....	63
<b>Figura 9</b> - Mutações identificadas no <i>CD40LG</i> .....	65
<b>Figura 10</b> - Novas mutações identificadas no <i>CD40LG</i> .....	66
<b>Figura 11</b> - Morfologia e padrão da expressão das moléculas HLA-DR, CD14, CD40, CD80 e CD86 na superfície de células dendríticas .....	67
<b>Figura 12</b> - Expressão e secreção normal de PRRs pelas iDCs dos pacientes deficientes de CD40L .....	68
<b>Figura 13</b> - Expressão reduzida das moléculas HLA-DR, CD80 e CD86 na superfície das iDCs dos pacientes deficientes de CD40L .....	69
<b>Figura 14</b> - Expressão reduzida das moléculas HLA-DR e CD80 na superfície das mDCs dos pacientes deficientes de CD40L .....	71
<b>Figura 15</b> - Produção de IL-12 e IL-10 pelas mDCs dos pacientes deficientes de CD40L .....	72
<b>Figura 16</b> - DCs dos pacientes deficientes de CD40L induzem a produção de IL-17 .....	73
<b>Figura 17</b> - Linfoproliferação normal nas co-culturas das iDCs ou mDCs com linfócitos T autólogos.....	74
<b>Figura 18</b> - mDCs dos deficientes de CD40L induzem um desvio do padrão de resposta Th1 para Th2 .....	76
<b>Figura 19</b> - O desequilíbrio na produção de IFN- $\gamma$ e IL-4 após ativação com mDCs é restaurada pelo CD40Ls exógeno.....	77
<b>Figura 20</b> - Produção normal de TGF- $\beta$ pelas co-culturas com iDCs .....	77
<b>Figura 21</b> - Os neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L ingerem normalmente os fungos <i>P. brasiliensis</i> e <i>C. albicans</i> e as partículas de zymosan....	79
<b>Figura 22</b> - Atividade fungicida reduzida em resposta ao fungo <i>P. brasiliensis</i> .....	80
<b>Figura 23</b> - Atividade fungicida normal em resposta ao fungo <i>C. albicans</i> .....	81
<b>Figura 24</b> - Neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L apresentam falhas na explosão respiratória .....	83
<b>Figura 25</b> - Expressão normal do citocromo <i>b<sub>558</sub></i> na superfície dos neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L.....	84
<b>Figura 26</b> - Neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L apresentam falhas na ativação via TLR1/2 e TLR2/TLR6 .....	86

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Classificação das imunodeficiências primárias.....	24
<b>Quadro 2</b> - Primers utilizados na reação de RT-PCR quantitativo-relativo.....	51
<b>Quadro 3</b> - Primers utilizados na reação de PCR e seqüenciamento do <i>CD40LG</i> ...	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Comparação entre a idade dos primeiros sintomas, diagnóstico da HIGM e diagnóstico genético molecular da deficiência de CD40L .....	43
<b>Tabela 2</b> - Características laboratoriais dos pacientes deficientes de CD40L .....	44
<b>Tabela 3</b> - Infecções observadas nos pacientes Brasileiros com deficiência do CD40L e seus respectivos agentes etiológicos .....	45
<b>Tabela 4</b> - Mutações encontradas no <i>CD40LG</i> dos pacientes deficientes de CD40L .....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AID</b>	citidina desaminase induzida por ativação, do inglês <i>activation-induced cytidine deaminase</i>
<b>AIDS</b>	síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
<b>AIRE</b>	gene regulador autoimune, do inglês <i>autoimmune regulator</i>
<b>APCs</b>	células apresentadoras de antígenos, do inglês <i>antigen-presenting cells</i>
<b>APECED</b>	poliendocrinopatia autoimune-candidíase-distrofia ectodérmica, do inglês <i>autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy</i>
<b>Bcl-xl</b>	do inglês <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
<b>BHI</b>	meio Agar infusão de cérebro e coração, do inglês <i>brain heart infusion</i>
<b>CD40L</b>	CD40 ligante
<b>CD40LG</b>	gene CD40 ligante
<b>CD40Ls</b>	CD40 ligante solúvel
<b>CLRs</b>	receptores de lectinas tipo C, do inglês <i>C-type lectin receptors</i>
<b>CSR</b>	troca de classe de imunoglobulina, do inglês <i>class-switch recombination</i>
<b>CFSE</b>	5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
<b>CFU</b>	unidades formadoras de colônia, do inglês <i>colony forming units</i>
<b>DAPI</b>	4'6-diamidino-2-phenylindole
<b>DCs</b>	células dendríticas, do inglês <i>dendritic cells</i>
<b>DEPC</b>	dietilpirocarbonato
<b>DGC</b>	doença granulomatosa crônica
<b>DHR</b>	dihidrorodamina
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>DNAc</b>	ácido desoxirribonucleico complementar
<b>DNAg</b>	ácido desoxirribonucleico genômico
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ELISA</b>	ensaio de imunoabsorbância ligado à enzima, do inglês <i>enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
<b>ERK</b>	quinase regulada por sinais extracelulares, do inglês <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<b>EROs</b>	espécies reativas do oxigênio
<b>FITC</b>	isotiocianato de fluoresceína, do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i>
<b>G-CSF</b>	fator estimulador de colônias de granulócitos, do inglês <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
<b>GM-CSF</b>	fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos, do inglês <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peróxido de hidrogênio ou água oxigenada
<b>HIGM</b>	síndrome de hiper IgM
<b>HIV</b>	vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>human immunodeficiency virus</i>



<b>HLA</b>	antígeno leucocitário humano, do inglês <i>human leukocyte antigen</i>
<b>HPV</b>	vírus do papiloma humano, do inglês <i>human papilloma vírus</i>
<b>ICAM-1</b>	molécula de adesão intercelular-1, do inglês <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
<b>iDCs</b>	células dendríticas imaturas, do inglês <i>imature dendritic cells</i> . Representam as DCs não estimuladas.
<b>IDPs</b>	imunodeficiências primárias
<b>IFIs</b>	infecções fúngicas invasivas
<b>IFN</b>	interferon
<b>Ig</b>	imunoglobulina
<b>IGIV</b>	imunoglobulina intravenosa
<b>IGSC</b>	imunoglobulina subcutânea
<b>IL</b>	interleucina
<b>IP</b>	iodeto de propídio
<b>JAK</b>	Janus quinase, do inglês <i>Janus kinase</i>
<b>JNK</b>	quinase c-Jun NH2-terminal, do inglês <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
<b>L-selectina</b>	molécula também conhecida como CD62L, do inglês <i>L-selectin</i> ou <i>CD62L antigen ligand</i>
<b>MAPK</b>	proteína quinase ativada por mitógeno, do inglês <i>mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MCP-1</b>	proteína quimiotática de monócitos, do inglês <i>monocyte chemoattractant protein</i>
<b>mDCs</b>	células dendríticas maduras, do inglês <i>mature dendritic cells</i> . Representam as DCs estimuladas
<b>MFI</b>	mediana da intensidade de fluorescência, do inglês <i>median fluorescence intensity</i>
<b>MHC</b>	complexo principal de histocompatibilidade, do inglês <i>major histocompatibility complex</i>
<b>MPO</b>	mieloperoxidase
<b>NADPH</b>	nicotidamina adenina dinucleotido fosfato, do inglês <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
<b>NETs</b>	armadilhas extracelulares neutrofílicas do inglês, <i>neutrophil extracellular traps</i>
<b>NFAT</b>	fator nuclear das células T ativadas, do inglês <i>nuclear factor of activated T-cells</i>
<b>NF-κB</b>	fator nuclear kappa B, do inglês <i>nuclear factor-kappa B</i>
<b>NK</b>	células matadoras naturais, do inglês <i>natural killer</i>
<b>·OH</b>	radical hidroxila
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	ânion superóxido
<b>PAMP</b>	padrões moleculares associados a patógenos, do inglês <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
<b>PBMCs</b>	células mononucleares do sangue periférico, do inglês <i>peripheral blood mononuclear cells</i>

<b>PBS</b>	solução salina tamponada com fosfato, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
<b>PCM</b>	paracoccidiodomicose
<b>phox</b>	oxidase do fagócito, do inglês <i>phagocyte oxidase</i>
<b>PI3K</b>	fosfatidilinositol-3-quinase, do inglês <i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>
<b>PMA</b>	forbol-12-meristato-13-acetato, do inglês <i>phorbol 12- myristate 13-acetate</i>
<b>PMS2</b>	do inglês <i>post-meiotic segregation 2</i>
<b>PRR</b>	receptores de reconhecimento de padrões, do inglês <i>pattern recognition receptors</i>
<b>PTX3</b>	pentraxina 3
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
<b>RT-PCR</b>	transcrição reversa acoplada à reação em cadeia da polimerase, do inglês, <i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
<b>R-10</b>	Meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino
<b>SCID</b>	imunodeficiência grave combinada, do inglês <i>severe combined immunodeficiency</i>
<b>SFB</b>	soro fetal bovino
<b>SHM</b>	hipermutação somática, do inglês, <i>somatic hypermutation</i>
<b>SOD</b>	superóxido dismutase
<b>STAT</b>	transdutor de sinal e ativador da transcrição, do inglês <i>signal transducer and activator of transcription</i>
<b>TAE</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>T-bet</b>	fator de transcrição T-box expresso em células T, do inglês <i>T-box expressed in T cells</i>
<b>TCLE</b>	termo de consentimento livre e esclarecido
<b>TGF</b>	fator de crescimento transformante, do inglês <i>transforming growth factor</i>
<b>Th</b>	T auxiliar, do inglês <i>T helper</i>
<b>TLRs</b>	receptores semelhantes ao toll, do inglês <i>toll-like receptors</i>
<b>TNF</b>	fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumor necrosis factor</i>
<b>TNFH</b>	domínio homólogo ao fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumor necrosis factor homology</i>
<b>TRAFs</b>	fatores associados ao receptor do fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumor necrosis factor receptor associated factors</i>
<b>UNG</b>	uracil DNA glicosilase
<b>VCAM-1</b>	molécula de adesão vascular-1, do inglês <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
<b>X-HIGM</b>	hiper IgM ligada ao X
<b>XLA</b>	agamaglobulinemia ligada ao X, do inglês <i>X-linked hypogammaglobulinaemia</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
1.1	Infecções fúngicas e imunodeficiências primárias	22
1.2	Deficiência de CD40L: classificação e dados históricos	24
1.3	Interação CD40L-CD40 e a troca de classe de imunoglobulinas	26
1.4	Interação CD40L-CD40: além da troca de classe de imunoglobulinas	29
1.5	Células dendríticas: maturação e a interação CD40L-CD40	32
1.6	Interação CD40L-CD40 e o desenvolvimento da resposta imune mediada pelos neutrófilos	34
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>40</b>
2.1	Objetivo Geral	40
2.2	Objetivos Específicos	40
<b>3</b>	<b>PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>42</b>
3.1	Características da coorte	42
3.1.1	<i>Infecções fúngicas: ocorrência de paracoccidioidomicose e aspergilose</i>	44
3.1.2	<i>Infecções causadas por bactérias extracelulares</i>	46
3.1.3	<i>Infecções causadas por vírus e outros agentes</i>	46
3.2	Citometria de fluxo	47
3.3	Análise genético-molecular	47
3.3.1	<i>Obtenção das células mononucleares de sangue periférico</i>	47
3.3.2	<i>Ativação dos Linfócitos T</i>	48
3.3.3	<i>Expressão protéica do CD40L</i>	48
3.3.4	<i>Extração do RNA total</i>	49
3.3.5	<i>Reação de transcrição reversa</i>	50
3.3.6	<i>Sequenciamento do DNAC</i>	50
3.3.7	<i>Extração do DNAG</i>	51
3.3.8	<i>Amplificações dos exons e sítios de splicing do CD40LG</i>	52
3.3.9	<i>Reações de sequenciamento</i>	53
3.4	Estudo das células dendríticas	54
3.4.1	<i>Obtenção de monócitos e diferenciação em células dendríticas</i>	54
3.4.2	<i>Cultivo de Candida albicans e Paracoccidioides brasiliensis</i>	55
3.4.3	<i>Ativação das células dendríticas</i>	55

<b>3.4.4</b>	<b><i>Produção de IL-10, IL12 e pentraxina 3</i></b> .....	55
<b>3.4.5</b>	<b><i>Fenotipagem das células dendríticas</i></b> .....	56
<b>3.4.6</b>	<b><i>Avaliação da capacidade linfoestimuladora das células dendríticas</i></b> .....	56
<b>3.5</b>	<b>Estudo dos neutrófilos</b> .....	57
<b>3.5.1</b>	<b><i>Ingestão dos fungos <i>P. brasiliensis</i> e <i>C. albicans</i> e partículas de zymosan</i></b> .....	57
<b>3.5.2</b>	<b><i>Atividade fungicida dos neutrófilos</i></b> .....	58
3.5.2.1	<i>Obtenção dos Neutrófilos</i> .....	58
3.5.2.2	<i>Quantificação da a atividade fungicida dos neutrófilos</i> .....	59
<b>3.5.3</b>	<b><i>Avaliação da explosão respiratória</i></b> .....	60
<b>3.5.4</b>	<b><i>Avaliação da expressão do citocromo <i>b<sub>558</sub></i></i></b> .....	60
<b>3.5.5</b>	<b><i>Avaliação da função dos PRRs envolvidos com a resposta antifúngica (TLR1, TLR2, TLR6 e dectina 1)</i></b> .....	61
<b>3.6</b>	<b>Análise estatística</b> .....	61
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	63
<b>4.1</b>	<b>Triagem dos pacientes através da avaliação da expressão proteica do CD40L</b> .....	63
<b>4.2</b>	<b>Mutações identificadas no <i>CD40LG</i></b> .....	64
<b>4.3</b>	<b>Estudo das células dendríticas dos pacientes deficientes de CD40L</b> .....	67
<b>4.3.1</b>	<b><i>Alteração fenotípica das iDCs dos pacientes deficientes de CD40L pode ser revertida pelo CD40Ls exógeno</i></b> .....	68
<b>4.3.2</b>	<b><i>Expressão reduzida das moléculas HLA-DR e CD80 na superfície das mDCs dos pacientes deficientes de CD40L</i></b> .....	70
<b>4.3.3</b>	<b><i>Células dendríticas dos pacientes deficientes de CD40L apresentam desequilíbrio na produção de IL-12 e IL-10</i></b> .....	72
<b>4.3.4</b>	<b><i>Avaliação funcional das células dendríticas nas co-culturas com linfócitos T</i></b> .....	73
4.3.4.1	<i>DCs dos pacientes deficientes de CD40L induzem produção normal de IL-17</i> .....	73
4.3.4.2	<i>Células dendríticas dos pacientes deficientes de CD40L induzem a proliferação de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup></i> .....	74
4.3.4.3	<i>mDCs dos pacientes deficientes de CD40L induzem um desvio do padrão de resposta Th1 para Th2</i> .....	75

<b>4.3.5</b>	<b>Análise da função dos neutrófilos</b> .....	78
4.3.5.1	Neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L ingerem normalmente os fungos <i>P. brasiliensis</i> , <i>C. albicans</i> e as partículas de zymosan .....	78
<b>4.3.6</b>	<b>Neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L apresentam falhas na atividade fungicida</b> .....	80
<b>4.3.7</b>	<b>Falhas na explosão respiratória de neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L em resposta aos fungos <i>P. brasiliensis</i> e <i>C. albicans</i></b> ....	82
<b>4.3.8</b>	<b>Neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L expressam o citocromo <i>b<sub>558</sub></i> normalmente</b> .....	84
<b>4.3.9</b>	<b>Neutrófilos dos deficientes de CD40L apresentam possíveis falhas na sinalização via PRRs</b> .....	85
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	87
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	100
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	102
	<b>APÊNDICE</b> .....	118

## 1 INTRODUÇÃO

Fungos são agentes etiológicos associados a um amplo espectro de doenças em humanos. As doenças causadas por esses organismos vão desde manifestações locais autolimitadas até infecções invasivas graves em pacientes imunossuprimidos. Esses fatos resultam em altos índices de mortalidade (Pappas, 2010). Dentre os pacientes imunossuprimidos estão os indivíduos transplantados, os tratados com quimioterápicos ou imunossupressores, os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV do inglês, *human immunodeficiency virus*) e os com imunodeficiências primárias (IDPs) (Antachopoulos et al., 2007; Fleming et al., 2002; Hage et al., 2002; Pfaller, Diekema, 2010)

Infecções fúngicas invasivas (IFIs) podem ter caráter endêmico ou oportunista. Nos últimos anos, a incidência de infecções fúngicas endêmicas tem aumentado, provavelmente devido às mudanças populacionais (migração, turismo e crescimento da população), ao passo que o aumento na incidência de infecções fúngicas oportunistas está associado com um aumento no número de pessoas em grupos de risco (Sifuentes-Osornio et al., 2012). Este panorama evidencia a necessidade de aclarar mecanismos da resposta imunológica antifúngica ainda não descritos, visando intervenções terapêuticas mais eficazes.

As infecções fúngicas ocorrem em todo o mundo e podem apresentar diferentes padrões de incidência, características epidemiológicas e agentes etiológicos, dependendo das características geográficas e socioeconômicas locais (Sifuentes-Osornio et al., 2012). Por exemplo, a incidência de infecções fúngicas na América Latina é significativamente mais elevada do que na América do Norte e Europa. A alta incidência e amplo espectro de infecções fúngicas na América Latina podem ser parcialmente explicados por diferentes condições ambientais e climáticas, como humidade, vegetação abundante e solo nutritivo, que favorecem o desenvolvimento dos fungos (Colombo et al., 2011).

A maioria dos fungos têm uma distribuição ubíquota no ambiente. Os seres humanos são expostos por inalação à esporos ou leveduras, mas muitos deles fazem naturalmente parte da microbiota do corpo humano. Dentre os fungos causadores de endemias estão *Paracoccidioides*, *Histoplasma* e *Coccidioides*, ao passo que entre os oportunistas estão *Aspergillus*, *Pneumocystis*, *Candida*,

Cryptococcus, Fusarium, Scedosporium e Paecilomyces (Pappas, 2010). Dentre as infecções endêmicas na América Latina, o *P. brasiliensis* é o agente etiológico mais prevalente, ao passo que *C. albicans* é o fungo oportunista mais frequentemente isolado em todo o mundo (Sifuentes-Osornio et al., 2012).

O *P. brasiliensis* causa a PCM, cuja incidência e prevalência atuais ainda são desconhecidas pelo fato desta não ser é uma doença de relato obrigatório na maioria das países da América do Sul. Além disso, sua distribuição é altamente variável mesmo nas regiões em que a PCM é mais frequente (Barrozo et al., 2009). Esta infecção é adquirida por inalação dos propágulos produzidos pelo micélio fúngico, que no organismo humano se transforma em leveduras patogênicas (McEwen et al., 1987). Após o *P. brasiliensis* invadir o hospedeiro através do trato respiratório, ele persiste em macrófagos causando a formação de granulomas e com a possibilidade de se disseminar através do sistema reticuloendotelial e podendo causar hipertrofia de órgãos de órgãos linfóides, sepse, danos pulmonares ou outras manifestações na mucosa oral, pele, sistema nervoso central, sistemas gastrointestinal e outros órgãos (Morejon et al., 2009).

A *C. albicans* é um fungo dimórfico com duas fases de crescimento: 1) a forma de levedura presente na boca e inofensiva à mucosa; 2) forma de hifa que ocorre quando o epitélio sofre alteração por meio de trauma mecânico, fatores hormonais ou imunossupressão e invadem o tecido conjuntivo adjacente produzindo enzimas hidrolíticas, consideradas pelo organismo como fatores patogênicos capazes de desencadear a candidose (Al-Karaawi et al., 2002). O espectro clínico das infecções causadas por *C. albicans* abrange desde candidíase mucocutânea à infecções sistêmicas que podem gerar risco de morte (Romani, 2004). A incidência das infecções causadas por cândida na América Latina varia de país para país. No Brasil, por exemplo a incidência de infecções causadas por este agente etiológico é aproximadamente 10 vezes mais elevada do que na América do Norte e Europa (Nucci et al., 2010).

### **1.1 Infecções fúngicas e imunodeficiências primárias**

Muitas espécies de fungos co-evoluíram com os seus hospedeiros mamíferos ao longo de milhões de anos sugerindo a existência de complexos mecanismos de

vigilância imunológica por parte do hospedeiro e sofisticadas estratégias dos fungos para antagonizar a resposta imune (Romani, 2011). O sistema imune não permanece ignorante aos fungos comensais ou onipresentes. Necessário se faz, um bom equilíbrio entre os mecanismos pró e anti-inflamatórios para a manutenção de um relacionamento hospedeiro-fungo estável, cuja ruptura pode ter consequências patológicas graves.

A importância de uma resposta imune eficaz para um bom equilíbrio patógeno-hospedeiro é evidenciada pelos problemas de saúde vividos pelos pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês *acquired immunodeficiency syndrome*) e pelos portadores de IDPs. Estes indivíduos são suscetíveis a infecções fúngicas graves e potencialmente fatais causadas por espécies de *Aspergillus*, *Candida*, *Pneumocystis*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides* e outros (Antachopoulos et al., 2007; Walsh et al., 1996).

As IDPs foram descobertas em meados do século passado e representam uma oportunidade única para estudar a imunidade contra as infecções *in natura* (Bousfiha et al., 2010). Embora recentemente descobertas, os mecanismos responsáveis pela susceptibilidade a infecções fúngicas em muitas IDPs já foram bem esclarecidos (Antachopoulos et al., 2007). Este é o caso dos pacientes com a imunodeficiência grave combinada (SCID, do inglês *severe combined immunodeficiency*) (Berrington et al., 2000), aqueles com defeitos no número e/ou função de fagócitos, tais como a doença granulomatosa crônica (DGC) (Blumental et al., 2011), bem como aqueles portadores da poliendocrinopatia autoimune-candidíase-distrofia ectodérmica (APECED, do inglês *autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*) (Pedroza et al., 2012), deficiência de mieloperoxidase (Cech et al., 1979), deficiência de adesão leucocitária (Lekstrom-Himes, Gallin, 2000), síndrome de DiGeorge (Marcinkowski et al., 2000), síndrome de Wiskott-Aldrich (Imai et al., 2004), deficiência do receptor de interleucina (IL)-17 (Puel et al., 2011), e deficiência do transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT, do inglês *signal transducer and activator of transcription*)-3 (Renner et al., 2008). Por outro lado, pacientes com outras IDPs apresentando alta incidência de IFIs, tais como a deficiência de CD40 (Ferrari et al., 2001) e a deficiência de CD40 ligante (CD40L) (Levy et al., 1997), esta última também conhecida como síndrome de hiper IgM ligada ao X (X-HIGM), ainda aguardam



estudos que esclareçam a elevada susceptibilidade às infecções fúngicas que acometem esses indivíduos.

Gostaria de destacar que a terminologia deficiência de CD40L expressa mais claramente os mecanismos imunológicos que abordaremos ao longo desta tese. Por esta razão, daqui por diante utilizaremos esta terminologia ao invés de nos referirmos X-HIGM, a qual transmite uma conotação mais ligada às falhas na produção de anticorpos.

## 1.2 Deficiência de CD40L: classificação e dados históricos

As IDPs compõem um grupo de doenças geneticamente heterogêneas que afetam diferentes componentes da imunidade inata e adaptativa. Até o momento, mutações em mais de 120 genes distintos já foram identificadas resultando em IDPs. Elas estão classificadas em oito grupos distintos (Al-Herz et al., 2011) (**Quadro 1**).

### Quadro 1 - Classificação das imunodeficiências primárias

1	Imunodeficiências combinadas
2	Síndromes bem definidas com imunodeficiência
3	Deficiências predominantemente de anticorpos
4	Doenças de imunodesregulação
5	Defeitos congênitos do número e/ou função dos fagócitos
6	Defeitos da imunidade inata
7	Doenças autoinflamatórias
8	Deficiências do Complemento

Fonte: Adaptado de: (Al-Herz et al., 2011).

Atualmente a deficiência de CD40L tem frequência estimada em 1/1.000.000 de nascimentos (<http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/>) e está classificada tanto no grupo 1 (Imunodeficiências combinadas) quanto no grupo 3 (deficiências predominantemente de anticorpos) (Al-Herz et al., 2011). Esta classificação foi considerada pelo fato de falhas na troca de classe de imunoglobulina (Ig) ser considerada a característica mais estudada nesta IDP e porque falhas na maturação de linfócitos T foram demonstradas (Jain et al., 1999; Subauste et al., 1999).

Os primeiros relatos de suscetibilidade à infecções associados a defeitos na troca de classe de Ig (CSR, do inglês *class-switch recombination*), ocorreram no ano de 1961. Logo após as primeiras IDPs terem sido descritas (Aldrich et al., 1954; Bruton, 1952), Burtin descreveu (Burtin, 1961) uma criança que desenvolveu ao longo da vida pneumonias recorrentes, meningite e linfadenopatias. Esse paciente apresentou concentrações reduzidas de IgG e IgA e concentrações elevadas de IgM. Linfonodos sem centro germinativos também foram detectados nesse indivíduo. Posteriormente outros pacientes com essas características foram relatados, mas o defeito molecular subjacente ao fenótipo apresentado, permaneceu 32 anos sem ser revelado. Entretanto, no ano de 1984, a molécula CD40 foi descrita pela primeira vez como um antígeno expresso em células de carcinoma de bexiga (Koho et al., 1984). Quatro anos depois utilizando anticorpos anti-CD40, Gordon e colaboradores (Gordon et al., 1988) observaram pela primeira vez que a ativação via CD40 induz a proliferação dos linfócitos B. Daí em diante, se iniciaram os estudos para se revelar qual era a molécula capaz de se ligar ao CD40 e ativar os linfócitos B. Hirohata e colaboradores (Hirohata et al., 1988) demonstraram que linfócitos T ativados eram capazes de induzir a proliferação dos linfócitos B e a troca de classe de Igs. No ano de 1992, Noelle e colaboradores (Noelle et al., 1992) identificaram uma glicoproteína de 39-kDa, que passou a ser chamada de gp39. A expressão dessa proteína foi identificada na membrana de linfócitos T e demonstrou ser capaz de induzir a ativação dos linfócitos B. Neste mesmo ano, o gene codificador da gp39 foi localizado no cromossomo X de camundongos (Armitage et al., 1992) e humanos (Graf et al., 1992; Hollenbaugh et al., 1992) sendo o mesmo denominado CD40L (*CD40LG*).

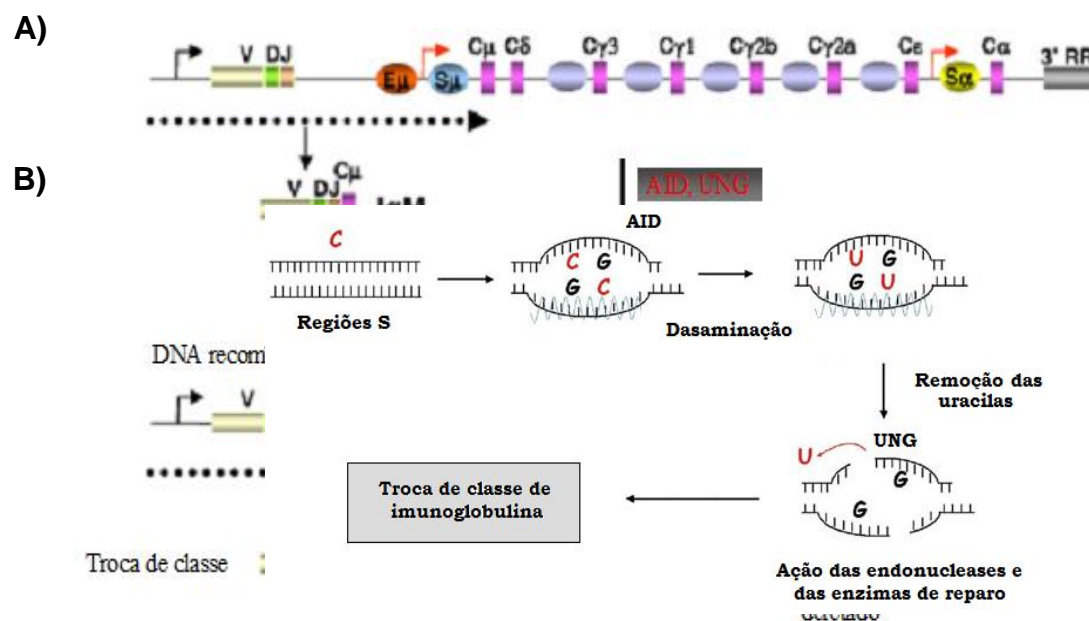
Foi então no fim do ano de 1992, após ter sido cunhado o termo síndrome de hiper IgM (HIGM) para a imunodeficiência descrita por Burtin e caracterizada por concentrações reduzidas de IgG, IgA e IgE associada a concentrações normais ou elevadas de IgM, que diferentes grupos cogitaram a possibilidade de mutações no CD40L serem responsáveis pelo fenótipo dos pacientes em questão (Prof. Dr. Hans Ochs, comunicação pessoal). No ano de 1993, o primeiro paciente deficiente de CD40L, um indivíduo Norte Americano residente no estado de Washington nos Estados Unidos, e outros subsequentemente descobertos foram descritos em Janeiro de 1993 (Aruffo et al., 1993). Nos meses subsequentes quatro outros grupos

distintos confirmaram que mutações no CD40L resultavam na IDPs hoje conhecida como deficiência de CD40L (Allen et al., 1993; DiSanto et al., 1993; Fuleihan et al., 1993; Korthauer et al., 1993).

Formas autossômicas da HIGM foram posteriormente identificadas. Elas podem ser causadas por mutações nos genes que codificam as proteínas citidina desaminase induzida por ativação (AID, do inglês *activation-induced cytidine deaminase*) (Revy et al., 2000), CD40 (Ferrari et al., 2001), uracil DNA glicosilase (UNG) (Imai et al., 2003) e *PMS2* (do inglês, *post-meiotic segregation 2* ou *PMS2*) (Peron et al., 2008).

### 1.3 Interação CD40L-CD40 e a troca de classe de imunoglobulinas

A descoberta de defeitos na troca de classe de Igs foi essencial para se entender a importância deste processo na proteção do hospedeiro contra as infecções. Ao passo que o repertório de anticorpos primários ocorre no fígado fetal e na medula óssea resultando na geração das IgM e IgD de membrana, o repertório de anticorpos secundários ocorre nos órgãos linfóides secundários. O repertório de anticorpos secundários é caracterizado pela produção de Igs de vários isotipos (IgG, IgA e IgE) com alta afinidade pelo o antígeno e ocorre como consequência de dois processos: CSR e hipermutação somática (SHM, do inglês *somatic hypermutation*) (Notarangelo et al., 2006). Esses dois eventos dependem principalmente da interação do linfócitos T com o linfócito B através da interação CD40L-CD40 e da ação de citocinas. O CSR é realizado através da recombinação do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) entre duas distintas regiões de *switch* situadas *upstream* à C $\mu$  e de uma região C $x$  (C $\gamma$ , C $\alpha$  ou C $\epsilon$ ) de outro isotipo. Durante este processo, a sequência de DNA interveniente é eliminada (**Figura 1**). Através da CSR, a cadeia  $\mu$  da Ig é substituída por uma cadeia pesada diferente (C $x$ ), permitindo assim a produção de diferentes isotipos de anticorpos com propriedades biológicas distintas. Dentre elas, estão a proteção contra bactérias extracelulares e a grande maioria dos vírus (Chaudhuri et al., 2004; Kavli et al., 2005; Manis et al., 2002; Rothman et al., 1989; Schrader et al., 2005; Stavnezer, 2000).

**Figura 1** - Troca de classe de Imunoglobulinas (CSR)

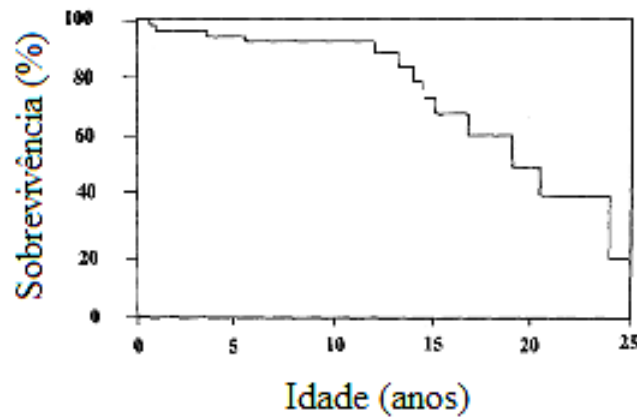
**(A)** Nas respostas primárias mediada pelos linfócitos B, os produtos codificados pelos segmentos gênicos VDJ, são ligados ao gene Cμ ocorrendo a síntese da IgM. A transcrição desta região se inicia após a ativação do promotor denominado Eμ. Após a ativação do linfócito B mediada pela interação CD40L-CD40 e citocinas, o DNA entre duas diferentes regiões S é deletado e os segmentos VDJ são justapostos com um dos diferentes genes C. Ao final deste processo uma Ig com diferente região constante da cadeia pesada, porém com os mesmos segmentos VDJ é produzida. **(B)** O papel da AID neste processo consiste na desaminação das citosinas nas regiões S do DNA, convertendo-as em uracila. Conseqüentemente, resíduos não pareados de Guanina-Uracila no DNA são gerados. Após este evento, a enzima UNG remove esses resíduos de uracil, formando pontos de quebra numa das fitas do DNA. A ação de endonucleases e outras enzimas de reparo conclui a CSR. C, citosina, G, guanina, U, uracila; AID, desaminase induzida pela ativação; UNG, uracil N-glicosilase; Regiões S, regiões de "switch" (S).

Fonte: Adaptado de: (Edry, Melamed, 2007; Notarangelo et al., 2006).

No contexto acima, as deficiências de CD40L e CD40 apresentam diferenças marcantes quando comparadas com as deficiências de AID e UNG. Essas quadro diferentes IDPs resultam em susceptibilidade às infecções causadas por bactérias extracelulares e vírus. Contudo essas IDPs se distinguem porque pacientes deficientes de CD40L e CD40 adicionalmente são suscetíveis às infecções causadas por bactérias intracelulares e fungos. Este fato se evidencia quando comparamos o prognóstico dos pacientes deficientes de CD40L e CD40 com aqueles deficientes de AID, UNG e PMS2, ou mesmo com pacientes portadores de outras IDPs predominantemente de anticorpos, tais como a agamaglobulinemia ligada ao X (XLA, do inglês *X-linked hypogammaglobulinaemia*). Ao serem tratados através da

administração de Ig intravenosa (IGIV) ou subcutânea (IGSC), pacientes com IDPs portando defeitos exclusivos de anticorpos, passam a ter uma qualidade de vida relativamente saudável (Cunningham-Rundles, 2011), ao passo que os pacientes deficientes de CD40L ou CD40 continuam apresentando infecções fúngicas com elevada morbidade e mortalidade. Para ilustrar este fato, está demonstrado a curva de sobrevivência dos pacientes deficientes de CD40L revelando que a porcentagem de sobrevivência desses indivíduos não passa dos 20% aos 25 anos de idade (Levy et al., 1997) (**Figura 2**).

**Figura 2** - Curva de sobrevivência de pacientes deficientes de CD40L



A análise retrospectiva de 56 pacientes deficientes de CD40L demonstra que aos 25 anos de idade a porcentagem de sobrevivência desses indivíduos é de 20%.  
Fonte: Adaptado de: (Levy et al., 1997).

É digno de nota que infecções causadas por fungos são as responsáveis por grande parte das mortes que aflige os pacientes deficientes de CD40L. Dentre os fungos que já isolados nesses indivíduos estão *Pneumocystis jiroveci* (Levy et al., 1997), *Candida albicans* (Winkelstein et al., 2003), *Cryptococcus neoformans* (Jo et al., 2002) e *Histoplasma capsulatum* (Hostoffer et al., 1994).

#### 1.4 Interação CD40L-CD40: além da troca de classe de imunoglobulinas

Fornecer respostas que justifiquem o fato de pacientes deficientes de CD40L serem suscetíveis a infecções fúngicas, terá importantes implicações no delineamento de novas modalidades terapêuticas para esses indivíduos e abrirá novos horizontes no que diz respeito ao entendimento *in natura* das funções da molécula CD40L na resposta imune antifúngica.

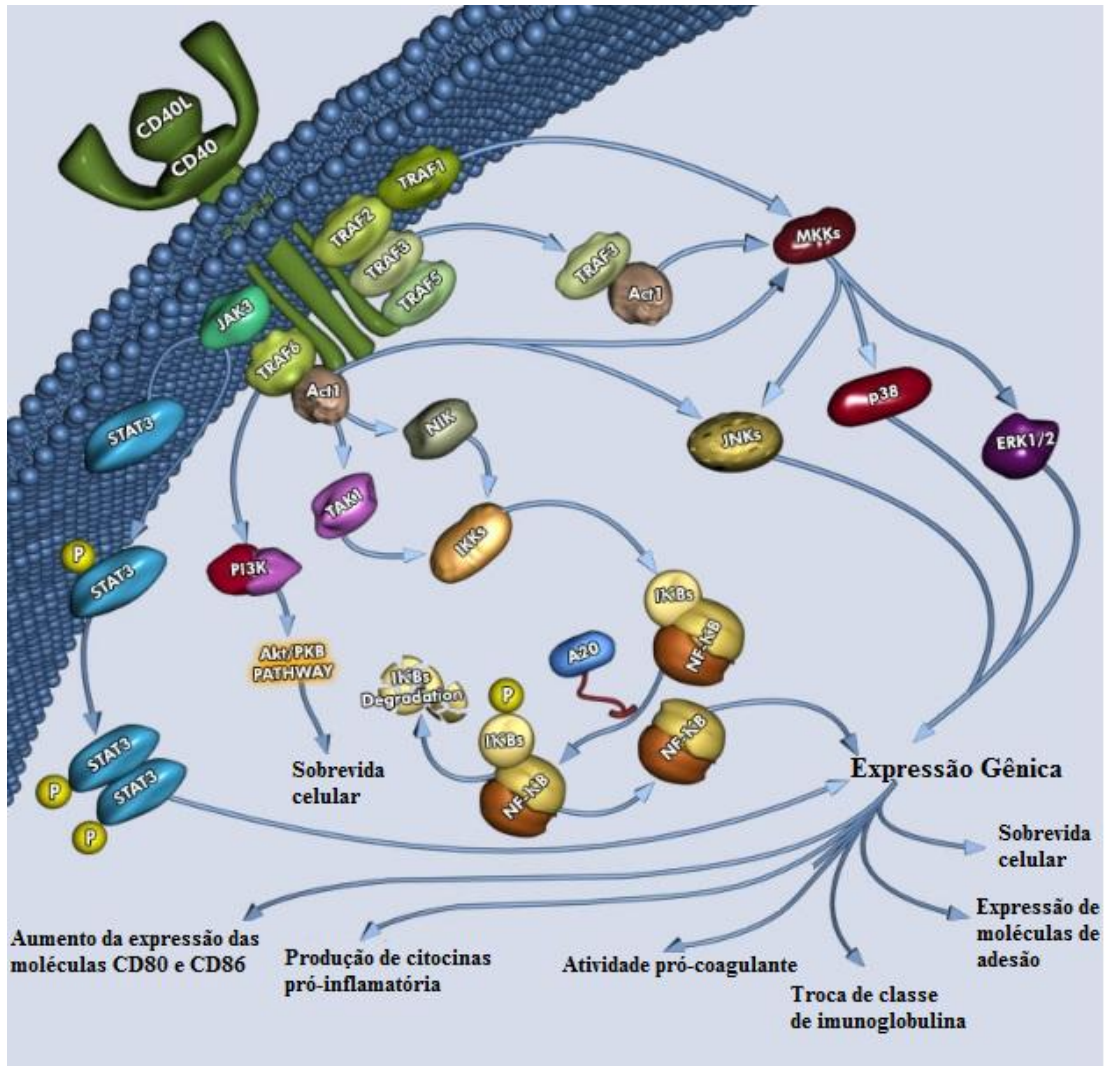
O conhecimento atual do papel da interação CD40L-CD40 em outras funções além da troca de classe de Igs, se baseia em modelos murinos e estudos *in vitro* com doadores saudáveis. Esses modelos não tem como levar em consideração a ausência da interação CD40L-CD40 durante a hematopoiese e desenvolvimento ontogenético das células em humanos. Além disso, antes de qualquer reflexão sobre o papel da interação CD40L-CD40 na regulação da resposta imune, precisamos considerar que o CD40L não transmite sinais ao CD40 exclusivamente através do CD40L expresso na superfície dos linfócito T CD4<sup>+</sup>. O CD40L solúvel (CD40Ls), produzido principalmente por plaquetas (Henn et al., 1998) e aquele clivado e liberado a partir da membrana dos linfócitos T ativados (Graf et al., 1995), também ativa a resposta imune sistemicamente.

Após ter sido detectada na superfície dos linfócitos B, a expressão do CD40 foi posteriormente identificada na superfície de basófilos (Valent et al., 1990), células epiteliais tímicas (Galy, Spits, 1992), células endoteliais (Karmann et al., 1995), fibroblastos (Fries et al., 1995), eosinófilos (Ohkawara et al., 1996), queratinócitos (Gaspari et al., 1996), células do músculo liso (Lazaar et al., 1998), monócitos (Alderson et al., 1993), macrófagos (Kennedy et al., 1996) progenitores mielóides (Saeland et al., 1992), células dendríticas (DCs) (Freudenthal, Steinman, 1990) e neutrófilos (Khan et al., 2006). Por sua vez, a molécula CD40L inicialmente identificada apenas na superfície dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, posteriormente foi detectada em várias outras células. Dentre elas estão os linfócitos CD8<sup>+</sup> (Paganelli et al., 1995), basófilos (Gauchat et al., 1993), monócitos (Cocks et al., 1993), mastócitos (Gauchat et al., 1993), linfócitos B (Grammer et al., 1995), eosinófilos (Gauchat et al., 1995), células exterminadoras naturais (NK) (Carbone et al., 1997), células dendríticas (DCs) (Pinchuk et al., 1996), macrófagos (Mach et al., 1997), células endoteliais (Mach et al., 1997), células do músculo liso (Mach et al., 1997), células

epiteliais (Gaweco et al., 1999) e plaquetas (Henn et al., 1998). Essa abrangência de expressão do CD40L e do CD40 sugere que *in vivo*, a interação CD40L-CD40 exerce um papel muito mais amplo do que na resposta imune mediada pelos anticorpos.

A ligação do CD40L ao CD40 resulta na redistribuição do CD40 presente na membrana plasmática e consequente agrupamento nos *lipid rafts*. A calda citoplasmática do CD40 contém domínios para o recrutamento de proteínas da família dos fatores associados ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAFs, do inglês *tumor necrosis factor receptor associated factors*) (McWhirter et al., 1999; Pham et al., 2002) e a sinalização via CD40 recruta TRAF2, TRAF3, TRAF5 e TRAF6 (O'Sullivan, Thomas, 2003; Pullen et al., 1999) (**Figura 3**).

Figura 3 - Sinalização CD40L- CD40



Após a ligação CD40L-CD40, distintas moléculas TRAFs são recrutadas para a calda citoplasmática do CD40. Estão demonstradas as vias de transdução e a descrição de algumas funções celulares que são ativadas pela interação CD40L-CD40.

Fonte: Adaptado de: © 2009 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Após estes passos iniciais, a transdução de sinais desencadeada, ativa vias de sinalização previamente caracterizadas. Dentre elas estão aquelas que envolvem as proteínas quinase ativada por mitógeno (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinase*) p38, a quinase regulada por sinais extracelulares (ERK, do inglês, *extracellular signal-regulated kinase*) 1/2, a Janus quinase (JAK, do inglês Janus kinase)/STAT3, o fator nuclear kappa B (NF-κB, do inglês nuclear factor-κB), a fosfatidilinositol-3-quinase (do inglês, *phosphatidylinositol-3-kinase*) e a quinase c-



Jun NH2-terminal (JNK, do inglês, *c-Jun N-terminal kinase*) (Dadgostar et al., 2002; Vonderheide, 2007).

Embora a sinalização induzida pela interação CD40L-CD40 esteja envolvida com diversas células do sistema imune, este estudo está focado na participação desta interação na regulação da função das DCs e neutrófilos.

### 1.5 Células dendríticas: maturação e a interação CD40L-CD40

As DCs são células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *antigen-presenting cells*) cruciais para a indução da imunidade ou tolerância (Tan, O'Neill, 2005). Desde a descoberta das DCs no ano de 1974 (Steinman et al., 1974), a habilidade dessas células em induzir tanto imunogenicidade quanto tolerância, tem sido explorada no tratamento de infecções, câncer e doenças autoimunes (Banchereau et al., 2001; Bozza et al., 2004).

Células progenitoras CD34<sup>+</sup> de humanos tanto do cordão quanto da medula óssea expressam o CD40. Em camundongos essas células sob a ação da interação CD40L-CD40, são capazes de proliferar e se diferenciar em DCs independentemente da ação do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Flores-Romo et al., 1997). Uma vez geradas, essas DCs foram capazes de efetivamente induzir a ativação dos linfócitos T. Estes dados sugerem que a interação CD40L-CD40 exerce importante papel na ontogenia do sistema imune conectando hematopoiese, imunidade inata e imunidade adaptativa. Dados adicionais corroboram este fato, conforme discutiremos abaixo (**Seção 1.6**).

A influência da interação CD40L-CD40 sobre as DCs geradas também transmite sinais que aumentam a sobrevivência celular. Este processo se dá pela regulação da apoptose mediante o aumento da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-x<sub>L</sub> (do inglês, *B-cell lymphoma-extra large*) e pela inibição da apoptose induzida pela interação Fas/Fas ligante (Bjorck et al., 1997).

As DCs estão presentes na maioria dos tecidos e reconhecem diferentes padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) (Visintin et al., 2001) através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*). Elas podem se diferenciar a partir dos monócitos dependendo do contexto tecidual que se

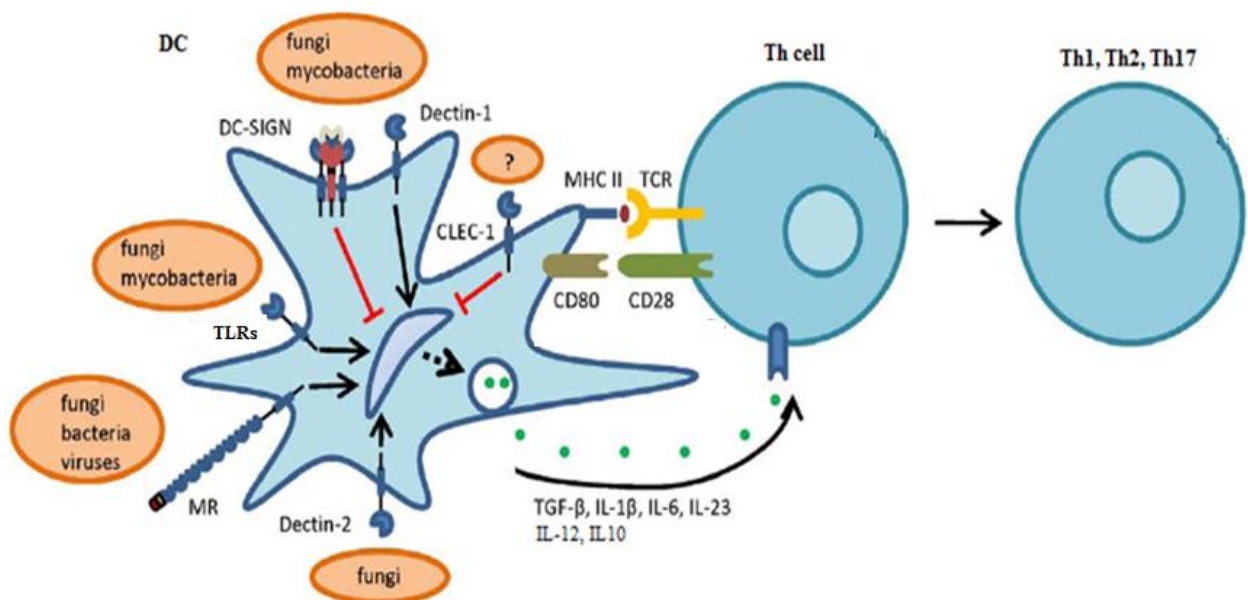
encontrem. As DCs após reconhecer, capturar e processar os antígenos elas "amadurecem". Neste momento, mesmo sem o contato célula-célula com o linfócito T, o CD40Ls exerce importantes funções. A interação CD40L-CD40 influencia o fenótipo das DCs aumentando a capacidade dessas células de expressar elevados níveis de complexos antígenos acoplados a moléculas do antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês *human leukocyte antigen*), também conhecidas como moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*). Além disso aumentam a expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) e da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1, do inglês *Intercellular Adhesion Molecule 1*). A interação CD40L-CD40 também é capaz de estimular as DCs e induzir a produção das citocinas IL-12, IL-10, IL-23, fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*)- $\alpha$  e IFN- $\alpha$  (Cella et al., 1996; Kerkmann et al., 2003; Sender et al., 2010; Yanagawa, Onoe, 2006), bem como a pentraxina 3 (PTX3). Esta última, é um PRR solúvel que reconhece fungos e é parcialmente regulado pela interação CD40L-CD40 (Doni et al., 2006; Garlanda et al., 2002).

Outro importante passo na diferenciação das DCs, também influenciado pela interação CD40L-CD40, é a mudança no padrão de expressão de receptores de quimiocinas. Por exemplo, esta interação induz o aumento da expressão das moléculas CCR7 e CXCR4 aumentando a capacidade migratória das DCs para os linfonodos para que possam "instruir" a resposta imune mediada pelos linfócitos T (Xia et al., 2008) (**Figura 4**).

Durante a interação DC-linfócito T, a IL-12 exerce papel central na resposta imune antifúngica. Esta citocina é responsável pelo desenvolvimento da resposta das células T auxiliar (Th, do inglês T helper)<sup>1</sup>, caracterizada pela produção de interferon (IFN)- $\gamma$  (Trinchieri, 1993). A função da IL-12 pode ser antagonizada pela citocina IL-10, que por sua vez, exerce papel importante na diferenciação Th2, caracterizada pela produção de IL-4 e IL5 (Rissoan et al., 1999). Estudos anteriores demonstram que um desvio de uma resposta Th1 para Th2 é associada com suscetibilidade às infecções fúngicas, pois a resposta imune antifúngica coordenada pelo IFN- $\gamma$  pode ser suprimida tanto ao nível indutor como efetor (Romani, 1997), pelas citocinas Th2.

Outra citocina que tem demonstrado ser importante em humanos na proteção contra os fungos é a IL-17 (Puel et al., 2011). A IL-17 induz a produção de IL-8 por células endoteliais e desta forma aumenta o recrutamento dos neutrófilos ao foco infeccioso (Laan et al., 1999). Nesse contexto, as DCs exercem papel importante na regulação da diferenciação dos linfócitos T produtores de IL-17 (Th17). Esse papel ocorre através da produção de IL-23 que é uma citocina que pode induzir a diferenciação de células Th17 (Sender et al., 2010).

**Figura 4** - Papel das DCs na diferenciação dos linfócitos T



Após reconhecer os patógenos via diferentes receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), as DCs amadurecem e "instruem" os linfócitos a se diferenciarem em células Th1, Th2 ou Th17 dependendo do contexto imunológico.

Fonte: Adaptado de: (Vautier et al., 2010)

### 1.6 Interação CD40L-CD40 e o desenvolvimento da resposta imune mediada pelos neutrófilos

Diferente das DCs, cuja maturação se dá na periferia, os neutrófilos são liberados da medula óssea já maduros. Contudo, eles também são influenciados por diversos fatores na periferia. Os neutrófilos constituem a maioria dos leucócitos

circulantes no sangue periférico e atuam como a primeira linha de defesa contra as infecções fúngicas. A ação dessas células é exercida diretamente através da ingestão dos patógenos e da atividade fungicida (von Vietinghoff, Ley, 2008).

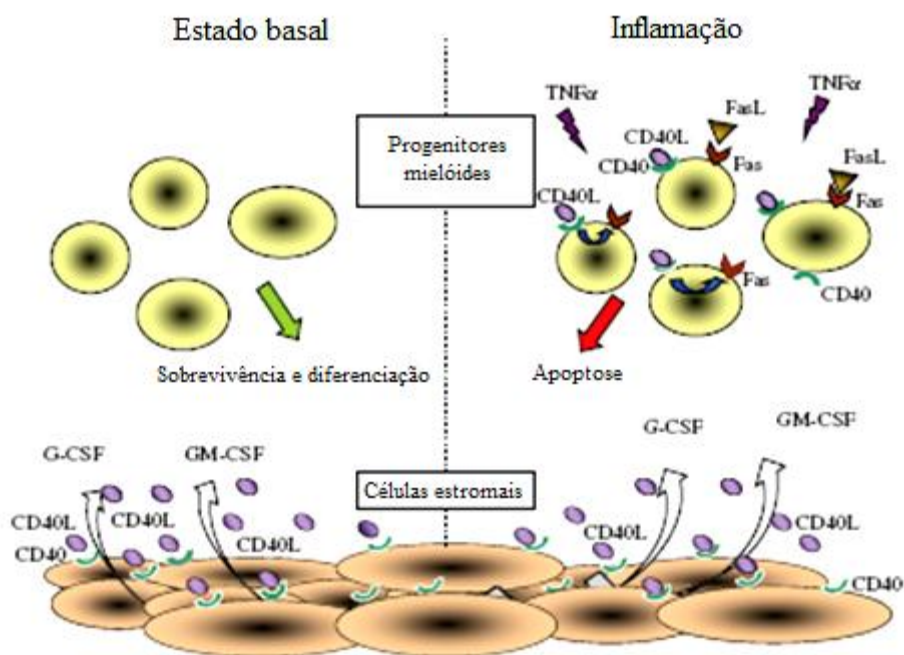
Um primeiro passo que resulta na ativação dos neutrófilos é o reconhecimento de PAMPs por PRRs (Romani, 2004). Dentre os PAMPs fúngicos que desencadeiam a resposta imune estão as moléculas  $\beta$ -glucano, glucuronoxilomanana e fosfolipomanana. Estas moléculas estão presentes na parede celular dos fungos *C. albicans*, *A. fumigatus*, *P. jiroveci*, *P. brasiliensis* e outros. Dos PRRs envolvidos no reconhecimento de PAMPs, os mais estudados são os receptores semelhantes ao toll (TLRs, do inglês *toll-like receptors*) e os receptores de lectina tipo C (CLRs, do inglês *C-type lectin receptors*) (Roeder et al., 2004; van de Veerdonk et al., 2008).

Dentre os TLRs existentes o TLR2 (que pode heterodimerizar com o TLR1 e TLR6) e o TLR9 estão envolvidos com a resposta imune antifúngica (Romani, 2011). Durante o processo de reconhecimento dos PAMPs, os TLRs podem colaborar com os CLRs. Este é o caso do TLR2 que em associação com a dectina 1 reconhecem  $\beta$ -glucanos (Gantner et al., 2003). Algumas das funções dos neutrófilos desencadeadas após a ativação via PRRs são ingestão de microorganismos, a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs), a degranulação, a produção de citocinas próinflamatórias e a regulação da expressão de moléculas de adesão tais como a L-selectina ou simplesmente CD62L (do inglês, *L-selectin* ou *CD62L antigen ligand*).

No contexto da resposta imune mediada pelos neutrófilos, qual seria a função da interação CD40L-CD40 na regulação dessas células? O CD40L transmite sinais que exercem um papel importante no desenvolvimento e diferenciação dos progenitores mielóides. Pouco sabe-se sobre quais genes são regulados pela interação CD40L-CD40 na medula óssea. Recentemente Mavroudi e colaboradores (Mavroudi, Papadaki, 2011) demonstraram que o CD40Ls interage com o CD40 expresso na superfície de células do estroma da medula óssea induzindo a produção do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF, do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*) e do GM-CSF (**Figura 5**). Entretanto, o papel da interação CD40L-CD40 na medula óssea depende do contexto imunológico presente no microambiente medular. Durante a reação inflamatória aguda, onde

estão presentes altas concentrações de TNF- $\alpha$ , Fas ligante, do próprio CD40Ls, e aumento da expressão do CD40 na superfície dos progenitores mielóides, ao invés de induzir diferenciação e desenvolvimento celular, a interação CD40L-CD40 induz a morte celular por apoptose.

**Figura 5** - Diagrama esquemático da interação CD40L-CD40 na medula óssea



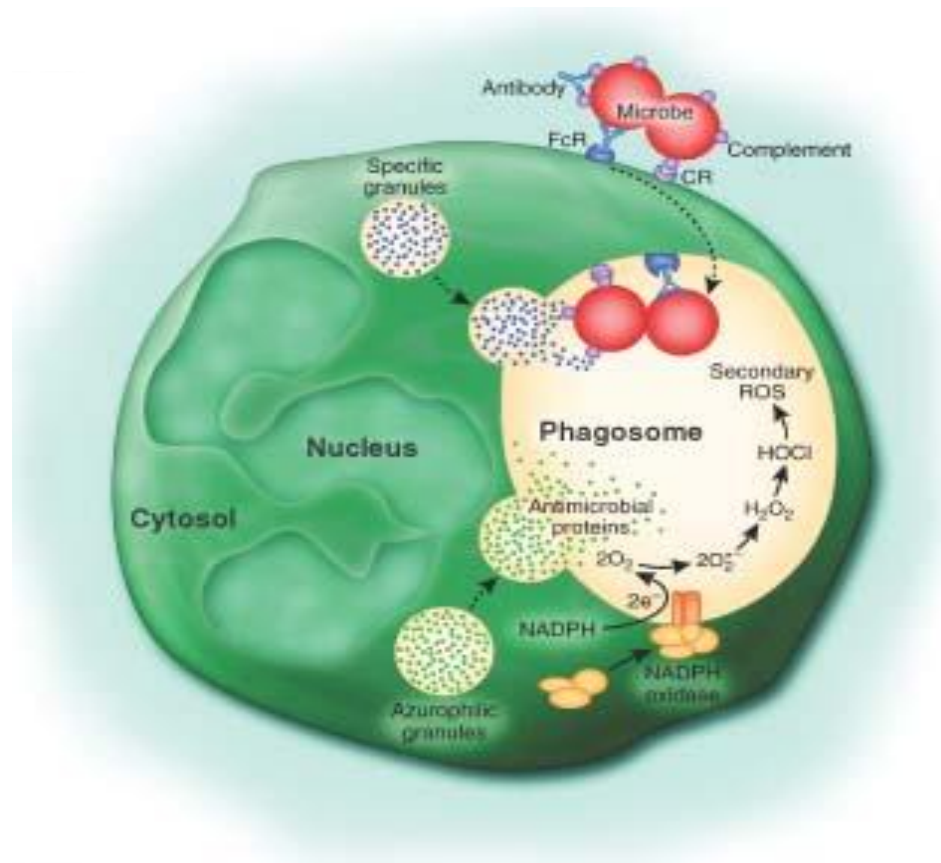
Em estado basal, a interação CD40L-CD40 regula o desenvolvimento de progenitores mielóides através da indução da produção de G-CSF e GM-CSF. Durante a inflamação aguda, a interação CD40L-CD40 induz a morte celular por apoptose.

Fonte: Adaptado de: (Mavroudi, Papadaki, 2011).

Outra forma importante de atuação da interação CD40L-CD40 sobre a ontogenia das células mielóides, possivelmente ocorre através da regulação da produção de IFN- $\gamma$ , conforme descrito no **seção 1.5**. O IFN- $\gamma$  é uma citocina pleiotrópica, e além das ações exercidas sobre os fagócitos maduros, também atua durante o processo de desenvolvimento dos progenitores mielóides. O exemplo mais evidente deste fenômeno é o fato de progenitores mielóides de pacientes com DGC quando tratados com INF- $\gamma$  exógeno, dão origem a fagócitos maduros capazes de

induzir mais apropriadamente a explosão respiratória e a atividade microbicida quando comparados com aqueles não tratados (Ezekowitz et al., 1990).

Outro papel relevante do IFN- $\gamma$  é estimular a produção de EROs pelos fagócitos maduros. O IFN- $\gamma$  (Berton et al., 1986), bem como o GM-CSF (Dang et al., 1999) e o G-CSF (Roilides et al., 1991) atuam no “*priming*” dos fagócitos aumentando a capacidade dessas células de gerarem mais EROs. A relevância clínica da produção de EROs foi reconhecida, ao ser demonstrado que os fagócitos dos pacientes com DGC apresentavam defeitos na atividade microbicida como resultado de mutações na nicotidamina adenina dinucleotido fosfato (NADPH, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*) oxidase (Holmes et al., 1967). A NADPH oxidase é constituída pelas proteínas de membrana p22-(phox, do inglês *phagocyte oxidase*) e gp91-phox (as quais compõem o citocromo *b*<sub>558</sub>) e pelas proteínas citosólicas p47-phox, p67-phox e p40-phox. A ativação dos fagócitos pode aumentar a expressão dessas proteínas, induzir a fosforilação da p47-phox e a translocação dos componentes citosólicos da NADPH oxidase para a membrana celular dos fagócitos. Conseqüentemente ocorre uma cadeia de eventos que é iniciada pela produção do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e seguida pela conversão do  $O_2^-$  em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela ação da superóxido dismutase (SOD). O  $H_2O_2$  é utilizado como substrato pela enzima mieloperoxidase (MPO) para a formação do ácido hipocloroso (HOCl) (Burg et al. 2001) (de Oliveira-Junior et al., 2011; El-Benna et al., 2005) (**Figura 6**). Paralelamente outros eventos importantes ocorrem, tais como a acidificação do fagolisossomo, a liberação de peptídeos microbicidas que podem atuar no interior dos fagócitos ou serem degranulados e a formação de armadilhas extracelulares neutrofílicas (NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*) (Ermer et al., 2009). Atuando conjuntamente, esses eventos são essenciais para a destruição dos patógenos fagocitados ou mesmo daqueles presentes no meio extracelular.

**Figura 6** - Visão geral da ativação do neutrófilo

Após reconhecer os patógenos, os neutrófilos rapidamente desencadeiam no fagolisossomo a produção de EROs e a liberação de peptídeos antimicrobianos que são, em conjunto, necessários a atividade microbicida.

Fonte: Adaptado de: (Kobayashi, DeLeo, 2009).

Pontuamos que o papel da interação CD40L-CD40 na regulação da função dos neutrófilos não se restringe a produção de IFN- $\gamma$ , G-CSF e GM-CSF. Postulamos que indiretamente a interação CD40L-CD40 pode modular a ação dos neutrófilos, *in vivo*, gerando um contexto pró-inflamatório através da ativação dos monócitos e macrófagos. Essas duas células ao serem ativadas com CD40Ls, sintetizam citocinas pró-inflamatórias incluindo a IL-1- $\beta$  (Wagner et al., 1994), o TNF- $\alpha$  e a IL-6, bem produzem a quimiocina IL-8 (Kiener et al., 1995). Em concordância, Song e colaboradores (Song et al., 2011) demonstraram uma diminuição significativa no recrutamento dos neutrófilos ao foco inflamatório. Este efeito foi atribuído à inibição da ativação do NF- $\kappa$ B. Conseqüentemente foram observados defeitos na

produção das citocinas acima descritas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6), da proteína quimiotática de monócitos (MCP, do inglês *monocyte chemoattractant protein*)-1 e na expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e da molécula de adesão vascular-1 (VCAM, do inglês *vascular cell adhesion molecule*-1).

Além de todo o papel indireto sobre a função dos neutrófilos recentemente foi demonstrado que essas células expressam o CD40 e que o CD40Ls é capaz de induzir diretamente o *priming* dos neutrófilos e aumentar a explosão respiratória dessas células (Khan et al., 2006).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar a função de células dendríticas e neutrófilos de pacientes deficientes de CD40L.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Realizar a caracterização clínica e genético-molecular de pacientes brasileiros com fenótipo da deficiência de CD40L com o objetivo de avaliar a função das DCs (derivadas de monócitos) e neutrófilos desses indivíduos.
  
- b) Avaliar a função das iDCs e das DCs pulsadas com *C. albicans* e *P. brasiliensis* quanto:
  - ✓ A expressão das moléculas CD80, CD86, HLA-DR, CD40, CD83, TLR2, TLR4 e CD14;
  - ✓ A capacidade de secretar IL-12, IL-10 e PTX3;
  - ✓ A atividade estimuladora das DCs na co-cultura com linfócitos T autólogos através da:
    - I. Geração de células Th17;
    - II. Proliferação dos linfócitos T;
    - III. Liberação das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, TGF- $\beta$ , IL-17;
  - ✓ Avaliar a capacidade do CD40L exógeno em reverter as falhas observadas.
  
- c) Avaliar as seguintes funções dos neutrófilos:
  - ✓ Atividade microbicida quando desafiados com *P. brasiliensis* e *C. albicans*;
  - ✓ Capacidade de ingerir os fungos *P. brasiliensis*, *C. albicans* e partículas de zymosan;
  - ✓ Explosão respiratória em resposta ao forbol-12-meristato-13-acetato (PMA, do inglês *phorbol 12-myristate 13-acetate*) e aos fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans*;
  - ✓ A expressão basal do citocromo *b<sub>558</sub>* (gp91phox e p22phox);

- ✓ A função dos heterodímeros TLR1/TLR2 e TLR2/TLR6 e do receptor dectina 1 através do *shedding* da molécula CD62L.

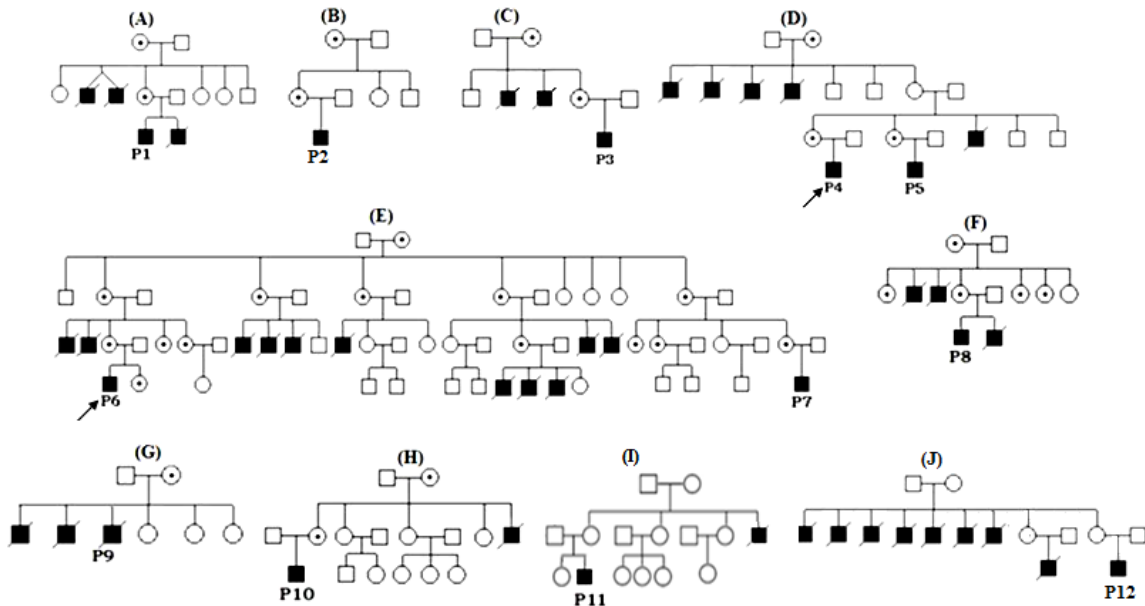
### 3 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Características da coorte

Amostra de sangue dos pacientes que estiverem em condições clínicas estáveis de saúde foram coletadas e destinada ao desenvolvimento do protocolo experimental desta tese. Os pacientes menores de idade estiveram sempre acompanhados dos pais ou responsável no momento da coleta e a retirada do sangue ocorreu após o preenchimento do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O protocolo experimental e o termo de consentimento contemplam os aspectos éticos analisados pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e não ultrapassaram os limites descritos de risco mínimo de acordo com as normas para pesquisa envolvendo seres humanos estabelecidas pelo Conselho Nacional de Saúde (Ministério da Saúde, 2003).

Nossa casuística inclui 12 pacientes do sexo masculino com deficiência de CD40L oriundos de 10 famílias distintas. Todos os pacientes pertencem a famílias não consanguíneas. Os heredogramas das famílias estudadas demonstram um padrão clássico de herança ligada ao cromossomo X (**Figura 7**). As amostras dos pacientes e dos familiares analisados foram encaminhadas por médicos pertencentes ao Grupo Brasileiro de Imunodeficiências ([www.bragid.org.br](http://www.bragid.org.br)).

**Figura 7 - Heredogramas das famílias estudadas**



Fonte: Adaptado de: (Cabral-Marques et al., 2012a)

Os pacientes apresentaram idade atual entre um e 23 anos. A primeira manifestação da deficiência de CD40L ocorreu para todos os pacientes antes do primeiro ano de vida e a média de idade dos pacientes foi de 0,4 anos (mínimo 0,1, máximo 0,6) (**Tabela 1**). A média de idade do diagnóstico da HIGM foi de 1,9 anos (mínimo 0,4, máximo 6). A média do diagnóstico molecular da deficiência de CD40L foi de 6,4 anos (mínimo 1, máximo 20).

**Tabela 1 - Comparação entre a idade dos primeiros sintomas, diagnóstico da HIGM e diagnóstico genético molecular da deficiência de CD40L**

Pt	Ano do nascimento	Idade dos 1º sintomas (anos)	Idade do diagnóstico clínico-laboratorial da HIGM (anos)	Idade do diagnóstico molecular da deficiência de CD40L (anos)
1*	2008	0,5	<1	1
2*	1987	0,5	2	20
3*	2007	0,6	1	2
4*	2007	0,4	2	1
5*	2003	0,1	2	6
6*	2005	0,3	1	3
7*	1997	0,4	3	11
8*	2006	0,4	1	2
9†	2002	0,3	2	6
10*	1993	0,5	6	15
11*	2009	0,4	1	2
12*	2004	0,5	<1	8

Pt, paciente; vivo; †falecido.

Fonte: Adaptado de: (Cabral-Marques et al., 2012a).

**Tabela 2** - Características laboratoriais dos pacientes deficientes de CD40L

Pt	Neutropenia	Subpopulação linfocitária (%)			Níveis de Igs (antes de IGIV*)			
		CD3 <sup>+</sup>		CD19 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup>	Idade (anos)	IgG	IgA	IgM
		CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>					
1	-	51	36	7	<1	164	21	111
2	+	37	27	5	2	10	9	320
3	+	63	12	13	1	100	6	92
4	+	55	35	7	2	210	6	90
5	+	43	20	7	2	230	24	51,6
6	+	31	23	19	1	90	10	95
7	-	43	12	13	3	270	7	180
8	-	52	23	7	1	44,7	5,2	53
9	-	55	23	19	2	22	5	362
10	+	40	23	6	6	250	5	400
11	-	45	8	17	1	131	10	89
12	+	11	21	31	<1	149	25	107

Pt, paciente; Igs, imunoglobulinas; IGIV, imunoglobulina intravenosa; +, alguma ocorrência de neutropenia ao longo da vida; - não ocorrência de neutropenia ao longo da vida; \* referências dos níveis de imunoglobulinas e das subpopulações de linfócitos foi determinada de acordo (Guerra-Maranhao et al., 2006). Fonte: Adaptado de: (Cabral-Marques et al., 2012a).

No momento do diagnóstico da HIGM, as médias das concentrações plasmáticas de imunoglobulinas IgG, IgA, e IgM (determinadas por nefelometria) foram respectivamente de 139 mg/dl (mínimo 7, máximo 270), 11,5 mg/dl (mínimo 5, máximo 24) e 167,5 mg/dl (mínimo 51, máximo 400) (**Tabela 2**). Os níveis das subpopulações linfocitária foram detectados como normais. Sete pacientes (P2, P3, P4, P5, P6, P10 e P12) apresentaram neutropenia, uma característica comumente observada em pacientes deficientes de CD40L (Levy et al., 1997).

### 3.1.1 Infecções fúngicas: ocorrência de paracoccidioidomicose e aspergilose

Os dados clínicos e agentes etiológicos isolados em cada paciente estão descritos na (**Tabela 3**). Dez dos 12 (83%) pacientes aqui estudados apresentaram infecções fúngicas graves. Seis deles desenvolveram pneumonia causada por *Pneumocystis jiroveci*, uma infecção que normalmente ocorre em pacientes deficientes de CD40L com idade inferior a cinco anos (Levy et al., 1997; Winkelstein et al., 2003). Três pacientes tiveram infecções causadas por *C. albicans*: P5 foi diagnosticado com candidíase esofágica, P6 com candidíase oral e perianal, P9 com candidíase cutânea. É importante notar que, no momento da candidíase, P5 e P6, mas não P9, foram tratados profilaticamente com sulfametoxazol-trimetoprim para

prevenir pneumonia causada por *P. jiroveci* e outros antibióticos não foram administrados a esses pacientes. Nenhum dos pacientes apresentavam neutropenia no momento ou meses antes do desenvolvimento da candidíase.

**Tabela 3** - Infecções observadas nos pacientes Brasileiros com deficiência do CD40L e seus respectivos agentes etiológicos

Pt	Infecções e agents etiológicos			Outras infecções (P.N.I)
	Fungos (idade em anos)	Bactérias extracelulares	Outros agents etiológicos	
1	pneumonia- <i>P. jiroveci</i> (0.6)			pneumonia
2	Pneumonia- <i>P. jiroveci</i> (0.6)	ITU- <i>E. coli</i>		OMA
3	-	-	diarreia - <i>C. parvum</i>	pneumonia
4				faringite, laringite, OMA, pneumonia
5	candidíase esofágica (3)			
6	pneumonia- <i>P. jiroveci</i> (1)		condiloma - HPV, herpes simplex vírus	OMA sinusite, pneumonia
7	candidíase oral e perianal (3)			OMA , sinusite, pneumonia
8	pneumonia- <i>P. jiroveci</i>			sepse, pneumonia
9	candidíase cutânea no couro cabeludo (1)	sepse - <i>Klebsiella</i> , sepse - <i>Actinobacter sp.</i> , otite- <i>P. aeruginosa</i>		pneumonia
10	PCM (11), pneumonia- <i>P. jiroveci</i> (0.6)			OMA, sinusite, pneumonia
11	-	-	-	granuloma pulmonar
12	Aspergilosis (6) <i>P. jiroveci</i> (6)		Diarréia- <i>C. parvum</i>	-

ITU, infecção do trato urinário; PCM, paracoccidiodomicose; HPV, vírus do papiloma humano; P.N.I, patógeno não isolado; OMA, otite média aguda.

Fonte: Adaptado de: (Cabral-Marques et al., 2012a).

Com a idade de seis meses, o paciente P10, nascido e residente em São Paulo, capital, desenvolveu pneumonia causada por *P. jiroveci*, otite média aguda e sinusite. Aos 11 anos de idade, enquanto sob terapia com IGIV, o P10 apresentou febre prolongada e tosse. A tomografia computadorizada do tórax mostrou linfadenopatia mediastinal e a biópsia do linfonodo confirmou inflamação granulomatosa tuberculóide como consequência da presença do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* no interior de granulomas. É importante notar que a P10 não apresentou neutropenia meses antes ou durante a paracoccidiodomicose (PCM). P10 foi tratado durante oito meses com itraconazol e recuperou-se.

Nos primeiros anos de vida, P11 apresentou pneumonias recorrentes, diarreias e úlceras orais associadas à neutropenia. A despeito da administração de IGIV, aos seis anos de idade P12 foi diagnosticado com aspergilose pulmonar. Meses depois o paciente foi diagnosticado com pneumonia causada por *P. jiroveci*.

Similar ao paciente P10, P11 não apresentou neutropenia, imediatamente antes ou durante a manifestação desta infecção fúngica.

### **3.1.2 Infecções causadas por bactérias extracelulares**

Um paciente (P9) apresentou pioderma e orofaringite aos três meses de idade. Além disso, o P9 foi acometido de otites de repetição e num dos episódios, *Pseudomonas aeruginosa* foi isolada. Aos três anos de idade, ele desenvolveu mastoidite grave seguida de sepse causada por *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter sp.* Infecção causada por *P. aeruginosa* foi descrita previamente em um paciente (Katz et al., 1996), contudo sepse causada por *Klebsiella* e *Acinetobacter* ainda não. Sob tratamento com cefepime e vancomicina o paciente se recuperou e a administração de IGIV foi iniciada. P9 morreu aos oito anos de idade devido a complicações resultantes de leucoencefalopatia multifocal progressiva, uma complicação clínica que foi fatal e previamente descrita em 2 pacientes deficientes de CD40L (Aschermann et al., 2007; Suzuki et al., 2006).

### **3.1.3 Infecções causadas por vírus e outros agentes**

Outros agentes etiológicos foram isolados nos pacientes P3 e P6, a despeito da tratamento com IGIV adequado. Quando P3 apresentava-se com 4 anos de idade apresentou diarreia crônica causada pelo protozoário *Cryptosporidium parvum*, um patógeno comumente observado em pacientes com deficiência CD40L (Levy et al., 1997; Winkelstein et al., 2003). Já o paciente P6 apresentou infecção causada pelo vírus herpes simplex uma característica previamente relatada in pacientes deficientes de CD40L (Winkelstein et al., 2003). Além disso, o P6 desenvolveu condiloma perianal causada pelo vírus do papiloma humano (do inglês, *human papilloma virus* ou HPV), uma característica previamente não descrita em pacientes deficientes de CD40L.

O paciente P11 desenvolveu granuloma pulmonar, contudo o agente etiológico não foi identificado.

## 3.2 Citometria de fluxo

Os experimentos de citometria de fluxo foram realizados utilizando o FACSCanto II (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Para analisar cada população celular, iniciamos a aquisição dos dados através de *gates* baseados no tamanho (FSC, do inglês *forward scatter*) e granulosidade (SSC, do inglês *side scatter*) correspondentes as células de interesse. Quando necessário, marcadores celulares específicos foram utilizados para distinguir as populações celulares.

Os dados obtidos foram analisados usando o *software* FlowJo (Treestar Inc., Ashlan, OR, EUA). Para cada ensaio foi calculada a mediana da intensidade de fluorescência (MFI, do inglês *median fluorescence intensity*).

## 3.3 Análise genético-molecular

### 3.3.1 Obtenção das células mononucleares de sangue periférico

A coleta de sangue ocorreu sempre em condições clínicas estáveis. As amostras de sangue periférico dos pacientes deficientes de CD40L e dos voluntários saudáveis foram coletadas em frascos de polipropileno estéreis contendo heparina. A seguir, o sangue coletado foi diluído volume/volume em solução salina tamponada com fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) (NaCl 0,14 M; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 M; pH 7,2) estéril, e 20 mL do sangue já diluído, foram adicionados vagarosamente em tubo de polipropileno estéril contendo 12,5 mL de Ficoll-Hypaque. Esta mistura foi centrifugada a 900 x g por 30 minutos a 25 °C e a interface contendo a camada de células mononucleares de sangue periférico (do inglês, *peripheral blood mononuclear cells* ou PBMCs) foi coletada e transferida para novos frascos de 50 mL de polipropileno estéreis. Os frascos foram completados com PBS até atingir 50 mL para lavagem da suspensão celular e as amostras foram centrifugadas a 900 x g por 10 minutos à 20 °C. Este procedimento foi repetido mais uma vez. As células mononucleares foram quantificadas numa câmara hemocitométrica, sendo a viabilidade celular verificada pela utilização de azul de trypan 0,4% (Sigma Chemical Co.).



### 3.3.2 Ativação dos Linfócitos T

Visando a avaliação da expressão gênica e protéica do CD40L, alíquotas de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) contendo  $1,0 \times 10^6$  células/100  $\mu$ l de meio RPMI 1640, foram ativadas com PMA (20 ng/ml) e ionóforo de cálcio (ionomicina, 2  $\mu$ g/ml) durante 3 horas conforme previamente descrito (Seyama et al., 1998).

Para esta avaliação o sangue dos pacientes e controles foram coletados em tubos contendo heparina. O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*) não pode ser utilizado, pois é quelante de cálcio e interfere consequentemente na ativação induzida pela ionomicina, resultando em baixa expressão do CD40L (O'Gorman et al., 1997).

### 3.3.3 Expressão protéica do CD40L

Os valores relativos das populações de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup> foram analisados após ativação celular conforme previamente descrito (Seyama et al., 1998). As condições próprias de estimulação foram controladas incluindo na análise a expressão da molécula CD69, um marcador expresso na superfície de linfócitos T ativados.

Após a ativação celular, quatro alíquotas de PBMCs contendo  $10^6$  células/100  $\mu$ l de meio RPMI 1640 foram transferidas para quatro tubos de poliestireno de 5 mL com fundo redondo contendo os seguintes anticorpos monoclonais (Becton Dickinson, Mountain View, CA): Tubo 1, não marcado para servir como controle para discriminar a fluorescência positiva da negativa; Tubo 2, anti-CD3, anti-CD8 e anti-CD69; tubo 3 e tubo 4, anti-CD3, anti-CD8 e anti-CD40L.

Os tubos foram armazenados durante 30 minutos à 4 °C protegidos da luz para a ligação dos anticorpos aos receptores. As suspensões celulares incubadas com os anticorpos, foram lavadas duas vezes adicionando 1 ml PBS nos tubos e os quais foram centrifugados à 900 x g por 5 minutos à 25 °C. As células foram ressuspendidas e fixadas em 300  $\mu$ l de PBS contendo 1% de paraformaldeído e os linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> foram analisados por citometria de fluxo quanto a expressão do CD40L.

### **3.3.4 Extração do RNA total**

O ácido ribonucleico (RNA, do inglês *ribonucleic acid*) total das células foi preparado utilizando o TRIzol Reagent (Life Technologies). Esta técnica baseia-se num procedimento que mantém a integridade do RNA, enquanto ocorre a lise celular que, combinada com a adição de clorofórmio, permite a separação do RNA na fase aquosa. O RNA é recuperado após precipitação com álcool isopropílico (Chomczynski, Sacchi, 1987).

Após ativação das PBMCs, conforme descrito na seção 3.6.1, uma suspensão de  $10\text{-}15 \times 10^6$  células foi disposta em microtubos livres de RNase. As amostras foram centrifugadas a  $900 \times g$  por 10 minutos à  $25^\circ\text{C}$  para decantação das células e o sobrenadante foi descartado. 1 ml da solução de TRIzol foi adicionada ao precipitado de células e homogeneizado seguido de incubação por 5 minutos à  $25^\circ\text{C}$ . Em seguida,  $200 \mu\text{L}$  de clorofórmio para cada ml de TRIzol foi adicionado aos microtubos. Após nova homogeneização vigorosa por 15 segundos e incubação por 3 minutos a  $30^\circ\text{C}$ , a amostra foi centrifugada à  $12000 \times g$  por 15 minutos à  $4^\circ\text{C}$ . No término da centrifugação se formaram três fases na solução. A fase aquosa foi cuidadosamente retirada e transferida para um novo tubo Eppendorf livre de RNase e foi adicionado  $500 \mu\text{L}$  de álcool isopropílico para cada 1 ml de TRIzol adicionado no início do experimento. Em seguida, a solução foi incubada por 10 minutos na temperatura de  $25^\circ\text{C}$  e, após centrifugação à  $12000 \times g$  por 10 minutos à temperatura de  $4^\circ\text{C}$ , o RNA ficou precipitado no fundo do tubo. O sobrenadante foi removido e ao precipitado de RNA foi adicionado 1 ml de etanol 75%, sendo a solução novamente centrifugada à  $7500 \times g$  durante 5 minutos. Após a retirada cuidadosa do etanol por aspiração, os tubos contendo o RNA total foram armazenados durante 5 à 10 minutos em temperatura ambiente, dentro do fluxo laminar, para a evaporação do etanol residual. O RNA foi ressuspenso em  $15\text{-}50 \mu\text{l}$  de água MilliQ ultrapura, tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 1:10.000.

A quantidade e qualidade do RNA extraído foram aferidas espectrofotometricamente no comprimento de onda de 280 nm e 260 nm, utilizando-se o espectrofotômetro DU 70 (Beckman, Fullerton, CA). Após a leitura no espectrofotômetro a integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE, 0,04 mM de Tris, 1 M de ácido

acético e 50 mM de EDTA) corado com brometo de etídio, comparando-se o padrão de corrida eletroforética do RNA extraído com um padrão de massa molecular conhecido. As amostras de RNA foram armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização.

### **3.3.5 Reação de transcrição reversa**

O RNA total extraído das células foi submetido à transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (DNAC) utilizando-se o kit Superscript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. Dois microgramas da amostra de RNA total foram adicionados a um microtubo eppendorf livre de RNase com capacidade de 200  $\mu\text{L}$  numa solução contendo 50  $\mu\text{M}$  de oligo (dT) primer e a solução foi completada para um total de 12  $\mu\text{L}$  com água DEPC 1:10.000. O oligo (dT) hibridiza na cauda 3' poli (A) presente no RNA mensageiro maduro em que o processo de splicing já foi realizado. Assim utilizamos para as análises apenas RNAm já processados.

Este primeiro microtubo foi incubado durante 5 minutos à  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após a incubação com as amostras no termociclador à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , acrescentou-se a cada microtubo contendo o RNA total, oligo (dT) e água DEPC, uma solução total de 8 $\mu\text{l}$  contendo 2  $\mu\text{l}$  de dNTP (2,5 mM de dATP, dCTP, dTTP, dGTP cada), 4  $\mu\text{l}$  de tampão RT (Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM) e 1  $\mu\text{l}$  (5U) da enzima transcriptase reversa. No termociclador as amostras foram incubadas durante 60 minutos numa temperatura de  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após o término, as amostras foram aquecidas por 10 minutos à  $92\text{ }^{\circ}\text{C}$  para inativar a enzima transcriptase reversa e o cDNA produzido foi congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para uso posterior.

### **3.3.6 Sequenciamento do DNAC**

Utilizamos a técnica da transcrição reversa acoplada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, do inglês, *reverse transcriptase-polimerase chain reaction*) para análise das estruturas dos transcritos de CD40L produzidos pelos pacientes conforme previamente descrito (Seyama et al., 1998).

A reação de RT-PCR combina a síntese do cDNA (conforme descrito na seção anterior), a partir de amostras de RNA, seguido do PCR sendo um método rápido e sensível para análise estrutural dos transcritos produzidos. Combinamos pares de *primers* para seqüenciar todo o RNAm do gene do CD40L. Utilizamos um volume final de 25  $\mu$ L, com 2  $\mu$ L de DNA, e 2,5  $\mu$ L de cada par de *primers* apropriados à [0,5 mM] (**Quadro 2**) 0,2  $\mu$ L à [25 mM] de dNTP, 10 mM Tris cloreto (buffer) (pH 8.3), 1,25  $\mu$ L de 50 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,3  $\mu$ L de Taq polimerase [5U] (Invitrogen) no termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf).

Para controle da integridade do cDNA produzido, utilizamos um par de primers para análise dos transcritos da  $\beta$ -actina que é um controle interno de expressão gênica.

Os produtos amplificados foram analisados após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA corados com brometo de etídio.

**Quadro 2** - Primers utilizados na reação de RT-PCR quantitativo-relativo

RNAm	Primer	Sequencia (5'-3')	Temperatura de anelamento	Tamanho do Produto (pb)
CD40L	<i>foward</i>	accaaactctccccgatct	60 <sup>o</sup>	726
	<i>reverse</i>	ctcactggctggatcagtc		
$\beta$ -actina	<i>foward</i>	gtggcatgggtcagaag	60 <sup>o</sup>	552
	<i>reverse</i>	ggccatctctgctcgaa		

*Foward*, amplificação no sentido 5'-3'; *Reverse*, amplificação no sentido 3'-5'; pb, pares de bases.

### 3.3.7 Extração do DNAg

Para detectarmos os defeitos genéticos de cada paciente no DNA genômico (DNAg), este material genético de cada paciente foi extraído utilizando o kit Wizard<sup>TM</sup> Genomic DNA Purification conforme instruções do fabricante. Em microtubos de 1,5 mL contendo 300  $\mu$ L de sangue, foram adicionados 900  $\mu$ L de solução de lise celular misturando o conteúdo do tubo por inversão. A seguir, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 10 minutos e centrifugadas a 15000 x g durante 30 segundos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300  $\mu$ L de solução de lise nucléica e 100  $\mu$ L de solução para precipitação protéica. O conteúdo do tubo foi homogeneizado durante 20 segundos no vórtex. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15000 x g durante 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para

um microtubo de 1,5 mL. O DNAg foi precipitado em 300 µl de isopropanol absoluto e a amostra centrifugada a 15000 x g durante 1 minuto. Após descartar o sobrenadante, o DNAg foi lavado com 300 µl de etanol 70% por meio de centrifugação das amostras a 15000 x g por 5 minutos. A seguir, o sobrenadante foi descartado e os microtubos contendo o DNAg foram mantidos em temperatura ambiente durante 10 minutos para a evaporação do etanol residual. O DNA foi reidratado em 30 a 150 µl de solução de reidratação e incubado em banho maria durante uma hora a 65 °C. Após esta etapa, o DNA foi armazenado a -20 °C até a sua utilização.

A quantidade e qualidade do DNAg foram aferidas espectrofotometricamente no comprimento de onda de 280 nm e 260 nm utilizando o espectrofotômetro DU 70 (Beckman, Fullerton, CA). Após a leitura no espectrofotômetro a integridade do DNAg foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE, 40 mM de Tris básico, 5 mM de ácido acético glacial e 1 mM de EDTA) corados com *SYBR Green I* (Invitrogen) e os produtos gerados foram comparados ao padrão de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

### **3.3.8 Amplificações dos exons e sítios de splicing do CD40LG**

Após a extração do DNA genômico, a região promotora do *CD40LG*, os 5 exons e as regiões de *splicing* foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) conforme previamente descrito (Seyama et al., 1998). Numa reação de 25µl foram adicionados: 100-200 ng de DNAg, 2,5 µl de cada par de oligonucleotídeos apropriados a 0,5 mM, 0,2 µl de dNTP à 25 mM, 2,5 µl de tampão à 10 mM (Tris cloreto-buffer) (pH 8.3), 1,25 µl de MgCl<sub>2</sub> à 50 mM e 0,3 µl de Taq polimerase [5U] (Invitrogen) e a solução foi completada para o volume total de 25 µl com água MilliQ ultrapura. Os oligonucleotídeos para amplificação das regiões de interesse do *CD40LG* estão especificados no **Quadro 3**.

**Quadro 3** - Primers utilizados na reação de PCR e seqüenciamento do *CD40LG*

Região amplificada	Primer	Sequencia (5'-3')	Temperatura de anelamento
<b>Promotor</b>	foward	gatctctgactgggcaatt	54 <sup>o</sup>
	reverse	caaacattatgccacaagac	
<b>Exon 1</b>	foward	ccagaagataccatttc	52 <sup>o</sup>
	reverse	aaggctgtggttcactct	
<b>Exon 2</b>	foward	agctgtattctccttccgaatgac	52 <sup>o</sup>
	reverse	cagtttcccgatctagca	
<b>Exon 3</b>	foward	agccccgtcaaaatgac	52 <sup>o</sup>
	reverse	cctgatgcaacaacactg	
<b>Exon 4</b>	foward	atgagaccgatggaaacagc	60 <sup>o</sup>
	reverse	cagattgcattccacctct	
<b>Exon 5</b>	foward	caagtctctgaaatatgctccaa	60 <sup>o</sup>
	reverse	ccataaggaggatcctagggtta	

*Foward*, amplificação no sentido 5'-3'; *Reverse*, amplificação no sentido 3'-5'.

As condições da reação foram de 2 minutos à 95 °C, então 35 ciclos de 45 segundos à 95 °C para denaturação do DNAg, 30 segundos para anelamento dos primers e 45 segundos à 72 °C para extensão dos segmentos de interesse e uma extensão final de 5 minutos à 72 °C. A reação de PCR foi realizada no termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf). Os primers para amplificação dos exons foram construídos com auxílio do programa (OligoPerfect™ Designer (<http://www.invitrogen.com>)).

Os produtos amplificados foram analisados após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE corados com SYBR Green I e os produtos gerados foram comparados o padrão de massa molecular *Low DNA Mass Ladder*.

### 3.3.9 Reações de seqüenciamento

Para identificarmos as mutações no CD40L, amostras de cDNA e DNAg após serem especificamente amplificadas, foram submetidas a reações de seqüenciamento genético. Após identificação da mutação no paciente, também verificamos a condição de portadora das mães e demais familiares do sexo feminino, permitindo o aconselhamento genético das famílias estudadas. Para tanto, purificamos os produtos de PCR e RT-PCR com o Kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Amersham) conforme as instruções do fabricante. As reações de seqüenciamento foram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo com o kit *DYEnamic ET Dye Terminator* utilizando o MegaBACE 1000, um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a

tecnologia GE Healthcare. As reações de sequenciamento foram realizadas com 4 µL de *DYEnamic ET Terminator reagent premix*, 2,5 µL dos primers específicos a 5 µM (**Quadro 2** e **Quadro 3**) 20 ng do produto de PCR além de 10 µL de água MilliQ. As condições da reação de seqüenciamento foram de 95 °C durante 20 segundos, seguidos de 15 segundos à temperatura específica de cada primer (**Quadro 2** e **Quadro 3**) e 60 °C durante 1 minuto. Estas etapas foram repetidas em 30 ciclos.

As seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados de registros de mutações para a deficiência de CD40L (<http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/>) e estão de acordo com a normatização estabelecida pela “Human Genome Variation Society” (<http://www.hgvs.org/rec.html>).

Para verificarmos se as novas mutações *missenses* não correspondiam a polimorfismos, as mutações identificadas foram avaliadas utilizando o programa MutationTaster (Schwarz et al., 2010). Além disso, as seqüências dos pacientes foram comparadas a seqüências de DNAg de 100 indivíduos controles saudáveis.

### **3.4 Estudo das células dendríticas**

#### **3.4.1 Obtenção de monócitos e diferenciação em células dendríticas**

As PBMCs obtidas conforme descrito no seção **3.6.1** foram quantificadas e ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (SFB) (10%). Denominamos este meio de R-10.

Amostras de  $2 \times 10^6$  das PBMCs foram distribuídas em placas de 12 poços e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 2 horas para aderência dos monócitos as placas. O sobrenadante das culturas contendo linfócitos não-aderentes, foi separado e congelado em nitrogênio líquido, numa concentração de  $1 \times 10^7$  células/ml e num volume final de 900 µl de SFB e 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente os linfócitos foram utilizados nos experimentos em que avaliamos a capacidade estimuladora das DCs.

Conforme previamente descrito (Barbuto et al., 2004) os monócitos aderentes foram cultivados por 5 dias em R-10 suplementado com de IL-4 (50 ng/ml) e GM-CSF (50 ng/ml). No quarto dia, o meio das culturas foram trocados e no quinto dia as células dendríticas imaturas (iDCs, do inglês *imature dendritic cells*) foram obtidas.

### **3.4.2 Cultivo de *Candida albicans* e *Paracoccidioides brasiliensis***

O fungo *C. albicans* (ATCC 90028) foi cultivado conforme previamente descrito (Netea et al., 2002) *overnight* em ágar Sabouraud dextrose (BD Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA). No dia seguinte, na fase exponencial de crescimento leveduriforme, as *C. albicans* foram lavadas com PBS (900 x g por 5 minutos à 25 °C), ressuspensas em 1 ml de PBS e quantificadas numa câmara hemocitométrica.

O fungo *P. brasiliensis* (Pb18) foi cultivado e mantido em meio semi-sólido de Fava Netto à 35 °C conforme previamente descrito (Pina et al., 2006). Após uma semana de cultivo, na fase exponencial de crescimento leveduriforme, os fungos *P. brasiliensis* foram lavados com PBS estéril (900 x g por 5 minutos à 25 °C) quantificados numa câmara hemocitométrica.

### **3.4.3 Ativação das células dendríticas**

Para os experimentos que foram realizados com as DCs, os fungos foram mortos pelo calor à 60 °C durante 30 minutos e quantificados em câmara hemocitométrica. As iDCs foram estimuladas a se tornarem células dendríticas maduras (mDCs, do inglês *mature dendritic cells*) na presença de *C. albicans* (10 fungos/1 célula) ou *P. brasiliensis* (10 fungos/1 célula) durante 48 horas. Um grupo de iDCs permaneceu não estimulado. Para determinação do envolvimento do CD40L no fenótipo e função das DCs, quando indicado, as células foram estimuladas com 1 µg/ml de CD40Ls (Invitrogen).

### **3.4.4 Produção de IL-10, IL12 e pentraxina 3**

Após 48 horas de ativação, conforme descrito acima, o sobrenadante das culturas de DCs foram coletados e analisados através do ensaio de imunoabsorbância ligado à enzima (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando o kit para dosagem das citocinas IL-12p70 e IL-10 e da PTX3 (Becton Dickinson). As dosagens foram realizadas conforme instrução do fabricante e os resultados foram expressos em pg/ml.



### **3.4.5 Fenotipagem das células dendríticas**

Para facilitar o desprendimento das DCs das placas, estas foram dispostas sobre gelo durante 5 minutos e as células coletadas por pipetagem. As DCs coletadas foram transferidas para microtubos e lavadas com 500 microlitros de PBS (900 x g, 25 °C, 5 minutos). A viabilidade celular foi testada através da exclusão de azul de trypan (0,4%). As DCs foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL com fundo redondo e em seguida marcadas com anticorpos monoclonais (Becton Dickinson, Mountain View, CA): anti-CD11c (marcador de DCs mielóides), anti-CD80 (B7-1, molécula co-estimuladora), anti-CD86 (B7-2, molécula co-estimuladora), anti-CD40 (receptor do CD40L), anti-HLA-DR (MHC classe II), anti-HLA-ABC (MHC classe I), anti-CD83, anti-TLR2 anti- TLR4 e anti-CD14. Após adição dos anticorpos, as DCs foram incubadas no escuro durante 30 minutos à 4 °C. Após este período as células foram lavadas duas vezes com 500µl de PBS (900 x g por 5 minutos à 25 °C). As DCs foram ressuspensas em 300 µL de PBS contendo 1% de paraformaldeído e analisadas por citometria de fluxo.

### **3.4.6 Avaliação da capacidade linfoestimuladora das células dendríticas**

Os linfócitos T autólogos, obtidos conforme descrito no **seção 3.7.1**, foram co-cultivados durante 5 dias na presença de iDCs (DCs não estimuladas) ou mDCs (DCs estimuladas com *C. albicans* e *P. brasiliensis* conforme descrito no seção 3.7.3 na proporção de 1 DCs/10 linfócitos em placas de 96 poços (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) num volume final de 300 µL de RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino. Um grupo de linfócitos sem a presença de DCs foi utilizado como parametro de comparação. Antes de serem co-cultivados, os linfócitos T foram marcadas com 5 mM of 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) seguindo as instruções do fabricante.

Após os cinco dias, a proliferação dos linfócitos foi analisada por citometria de fluxo. Imediatamente antes da citometria de fluxo as células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) durante 30 minutos à 4 °C e lavadas 2 vezes com 500 µL de PBS (900 x g por 5 minutos à 25°C) e ressuspensas em PBS contendo 1% de paraformaldeído.

A produção de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-17, fator de crescimento transformante (TGF, do inglês transforming growth factor)- $\beta$  foi avaliada a partir do sobrenadante das co-culturas. Utilizamos os kits de ELISA específicos para cada citocina (Becton Dickinson) conforme instruções do fabricante.

### 3.5 Estudo dos neutrófilos

#### 3.5.1 Ingestão dos fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans* e partículas de zymosan

Nós avaliamos a ingestão dos fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans* e das partículas de zymosan conforme previamente descrito (Hasui et al., 1989). Para realização dos ensaios marcamos amostras de partículas de zymosan e *C. albicans* com isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) conforme instruções do fabricante (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e *P. brasiliensis* com iodeto de propídio (IP) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Os fungos *C. albicans* e o *P. brasiliensis* marcados foram gentilmente doados pelas Prof. Dra. Sonia Jancar Negro e pela Prof. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich, respectivamente.

Para a marcação das partículas de zymosan (20 mg/ml) e das *C. albicans* ( $10^7$  células mortas pelo calor, 60 °C, 30 minutos as amostras foram ressuspensas em microtubos com solução de FITC (5  $\mu$ g/ml) diluído em tampão de carbonato (840mg de NaHCO<sub>3</sub> em 100 mL de água milliQ, pH 9.5) e armazenadas à 37°C durante 30 minutos. Em seguida as amostras foram lavadas duas vezes com tampão carbonato (900 x g, 5 minutos, 4 °C) e duas vezes com PBS contendo Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> (900 x g, 5 minutos, 4 °C). As amostras foram ressuspensas em PBS e armazenadas à - 20 °C até a utilização. Para a marcação do *P. brasiliensis* ( $10^7$  células mortas pelo calor, 60 °C durante 30 minutos) foram ressuspensas em IP (100  $\mu$ g/ml) e armazenados à 37°C durante 30 min. As amostras foram lavadas 3 vezes (900 x g, 5 minutos, 4 °C) e ressuspensas em 1 ml de PBS contendo Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> e armazenadas a - 70 °C. A qualidade das marcações e da técnica descrita abaixo foram confirmadas por citometria de fluxo e microscopia confocal.

Para análise de microscopia confocal, leucócitos de sangue periférico após serem obtidos e submetidos às etapas deste protocolo, foram fixados durante 10

minutos à 4 °C com PBS contendo 4% de paraformaldeído, seguido por 2 lavagens com PBS (900 x g, 5 minutos, 4 °C). O núcleo dos leucócitos foram marcados com 10 µg/ml de 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Molecular Probes Eugene, Oregon, USA) durante 10 minutos à 37 °C , as amostras foram lavadas duas vezes com PBS (900 x g, 5 minutos, 4 °C) e as lâminas para microscopia foram montadas com 1:1 glicerol/PBS. As lâminas foram lacradas com esmalte e armazenadas a 4 °C ao abrigo da luz. As imagens fluorescentes foram obtidas por microscopia confocal conforme descrito por (Manelli-Oliveira, Machado-Santelli, 2001) e utilizando um microscópio confocal de varredura a laser (CLSM-confocal laser scanning microscope) conectado com um microscópio de fluorescência invertido (Zeiss Axiovert 100 M). Utilizamos o software 3D Zeiss LSM 510 para a reconstrução das imagens das células em três dimensões (3D).

Por fim, conforme previamente descrito (Hasui et al., 1989), 100 µL de sangue de cada indivíduo foi lisado com solução de lise de hemáceas (RBC lise solution, Gentra) conforme instruções do fabricante, os leucócitos totais foram quantificados em câmara hemocitométrica e o número de neutrófilos determinado como 60% do valor total dos leucócitos. Em seguida alíquotas de 100 µL de sangue (não lisados) foram incubados na presença de  $5 \times 10^6$  partículas de zymozan,  $1 \times 10^6$  *C. albicans* e  $0,25 \times 10^6$  *P. brasiliensis*. As amostras foram incubadas a 37 °C durante uma hora. Após a incubação, as hemácias foram lisadas com 2 mL de tampão de lise (QUIAGEN). Após a lise celular as células foram centrifugadas a 2400 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e ao tubo contendo o *pellet*, foram adicionados 300 µL de PBS. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo.

### **3.5.2 Atividade fungicida dos neutrófilos**

#### **3.5.2.1 Obtenção dos Neutrófilos**

Os neutrófilos foram isolados através do método de sedimentação com Dextran conforme previamente descrito (de Almeida et al., 2011) seguido por separação em gradiente de densidade Ficoll-Histopaque (1077 g/ml, St. Louis, EUA). Um volume de 10 mL de sangue periférico foi diluído com 15 mL da solução de Dextran 6% (SIGMA) e incubado durante 40 minutos à 37 °C para sedimentação de

hemáceas. A seguir, em tubos cônicos de polipropileno de 50 mL, o sobrenadante contendo PBMCs e Neutrófilos foi adicionado vagarosamente sobre 12,5 mL de Ficoll-Histopaque (SIGMA) e centrifugado a 900 x g durante 30 minutos à 25 °C sem freio. Após o término da centrifugação, a camada contendo as PBMCs foi coletada e transferida para um tubo estéril de polipropileno de 50 mL, foram lavadas duas vezes com PBS (900 x g, durante 10 minutos) e congeladas conforme descrito para os linfócitos na **seção 3.7.1**. Ao precipitado contendo hemáceas e neutrófilos adicionamos 3 mL de água MilliQ estéril gelada (4 °C) e agitamos manualmente com pipeta pauster para a lise das hemáceas. Em seguida adicionamos 3 mL de meio RPMI 1640 e as amostras foram centrifugadas a 900 x g durante 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo os neutrófilos lavado com 30 mL de PBS (900 x g durante 10 minutos à 25 °C). Os neutrófilos obtidos foram quantificados numa câmara hemocitométrica, sendo a viabilidade celular verificada através da exclusão de azul de trypan (0,4%).

### 3.5.2.2 Quantificação da a atividade fungicida dos neutrófilos

A capacidade fungicida de neutrófilos desafiados com *C. albicans* ou *P. brasiliensis* foi avaliada através da contagem de unidades formadoras de colônia (CFU, do inglês *colony forming units*). Após a obtenção dos neutrófilos, proporções de 1 neutrófilo/2 *C. albicans* e 2 neutrófilos/1 *P. brasiliensis* (previamente padronizadas em nosso laboratório) foram distribuídas dispostas em placas de 96 poços com fundo redondo e incubadas durante 2 horas à 37 °C. As placas foram centrifugadas a 900 x g durante 5 minutos à 25 °C e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado de células adicionamos 200 µL de água MilliQ estéril gelada (4 °C) para lisar os neutrófilos, as placas foram centrifugadas (900 x g, 5 minutos, 25 °C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo os fungos foram ressuspensos em 100 µL de PBS. Em seguida a suspensão de *C. albicans* foi diluída 50 vezes em PBS e semeada em Agar Sabouraud dextrose. As CFUs foram quantificadas após 24 horas conforme previamente descrito (Netea et al., 2002). Por sua vez, a suspensão de *P. brasiliensis*, conforme previamente descrito (Pina et al., 2006), foi diluída 20 vezes em PBS e semeadas em meio Agar infusão de cérebro e coração (BHI, do inglês *brain heart infusion*) (Difco, Detroit, MI) suplementado com

4% de soro de cavalo (Instituto Butantan, São Paulo, Brasil), 5% de fator de crescimento, penicilina (0,05 U/ml) e neomicina 20 µg/ml. Após cinco dias incubadas à 37 °C, as CFU foram quantificadas e os dados representados como CFU/ml. É importante lembrarmos que este valor é inversamente proporcional a atividade fungicida dos neutrófilos.

### **3.5.3 Avaliação da explosão respiratória**

Realizamos a avaliação de explosão respiratória foi realizada conforme previamente descrito (Bustamante *et al.*, 2011). Para tanto, 100µl de sangue foram estimulados com PMA (300 ng/ml), zymosan (10 zymosan/1 neutrófilo), *C. albicans* (2 fungos/1 neutrófilo) e *P. brasiliensis* (1 fungo/2 neutrófilos) e amostras de 100 µl de sangue permaneceram não estimuladas. Antes da realização deste experimento o fungo *P. brasiliensis* foi irradiado, conforme previamente descrito (Demicheli *et al.*, 2007; Demicheli *et al.*, 2006). A irradiação possibilita que o *P. brasiliensis* perca a sua capacidade reprodutiva mantendo sua viabilidade, atividade metabólica e perfil antigênico. Os tubos foram incubados a 37 °C durante 1 hora. Ao término deste período adicionamos 300 ng/ml de dihidrorodamina (DHR) em cada microtubo, exceto ao branco da reação e as amostras foram incubadas por 5 minutos à 37 °C. As amostras foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL com fundo redondo, lisadas com tampão de lise de hemáceas conforme descrito acima (seção 3.8.1), seguido por 1 lavagem com 500 µl de PBS estéril (900 x g, 5 minutos 25 °C). Após a lavagem o sobrenadante foi descartado e ao tubo contendo o precipitado de células foram adicionados 300 µl de PBS contendo 1% de paraformaldeído. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

### **3.5.4 Avaliação da expressão do citocromo *b<sub>558</sub>***

O citocromo *b<sub>558</sub>* é uma proteína integral de membrana heterodimérica a qual é composta pelas subunidades gp91phox e p22phox da NADPH oxidase e possui atividade catalítica essencial para a geração da explosão respiratória (Taylor *et al.*, 2006). Analisamos a expressão desse heterodímero na superfície dos neutrófilos por citometria de fluxo. A partir de 100 µl de sangue, as hemáceas foram lisadas com

tampão de lise conforme descrito no **seção 3.8.1** e os leucócitos foram incubados com anticorpo anti-citocromo  $b_{558}$  conjugado com FITC (MBL, International Corporation, Woburn, MA) durante 30 minutos à 4 °C protegidos da luz. Após duas lavagens com 500 µl de PBS (900 x g, 5 minutos 25 °C) o sobrenadante foi descartado e as células fixadas com PBS contendo 1% de paraformaldeído. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

### **3.5.5 Avaliação da função dos PRRs envolvidos com a resposta antifúngica (TLR1, TLR2, TLR6 e dectina 1)**

Avaliamos por citometria de fluxo a expressão da molécula CD62L conforme previamente descrito (von Bernuth et al., 2006). O CD62L é uma molécula transmembrana de adesão do tipo 1 expressa por neutrófilos e que está envolvida no direcionamento dos neutrófilos para o sítio inflamatório através da aderência celular às paredes vasculares. Após a ativação por agonistas dos PRRs, o CD62L é clivado proteoliticamente (Smalley, Ley, 2005).

Selecionamos avaliar a função de PRRs envolvidos com a resposta imune antifúngica e para tanto estimulamos amostras de 100 µl com PAM3CSK4 (agonista de TLR1/2), zymosan (agonista de TLR2/6) ou curdlan (dectina 1). Além disso, estimulamos as amostras com PMA. Após 1 hora de estimulação, as hemáceas foram lisadas utilizando-se solução de lise de hemácias (RBC lise solution, Gentra) conforme descrito no **seção 3.8.1**. Em seguida os leucócitos foram incubados com anticorpo monoclonal anti-CD62L (Becton Dickinson, Mountain View, CA) durante 30 minutos à 4 °C protegidos da luz. Após duas lavagens com 500 µl de PBS (900 x g, 5 minutos 25 °C), o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com PBS contendo 1% de paraformaldeído. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

## **3.6 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os dados foram expressos como mediana e quartis. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GRAPHPAD PRISM 4.03

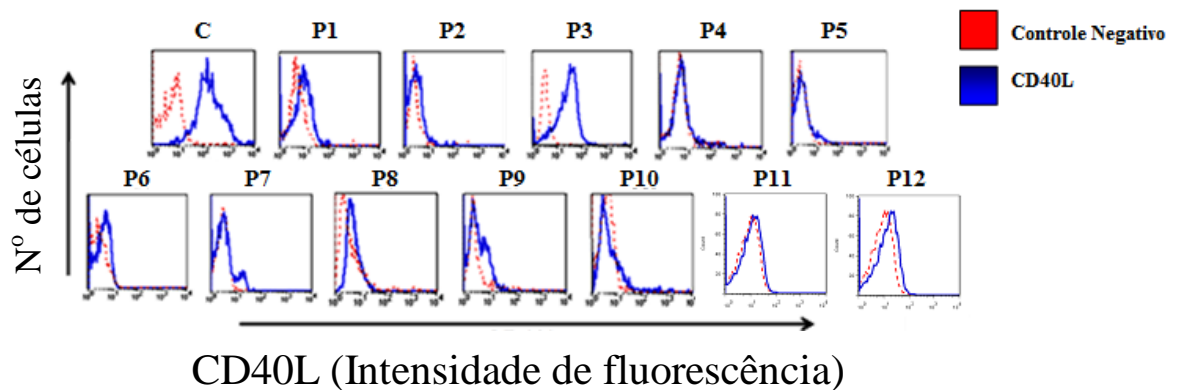
(GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e as diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando  $p < 0.05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Triagem dos pacientes através da avaliação da expressão proteica do CD40L

Identificamos um total de 12 pacientes deficientes de CD40L. Os linfócitos T  $CD3^+CD8^+$  desses pacientes foram incapazes de expressar a proteína o CD40L na membrana plasmática (**Figura 8**). Contudo, um dos pacientes (paciente P3, portador da mutação c.496.C>A, descrita no **seção 4.2**, expressou níveis normais da proteína CD40L. Esta mutação foi previamente caracterizada e resulta na produção do CD40L incapaz de se ligar ao CD40 (Seyama et al., 1998). Este dado está de acordo com o fato de que 32% dos pacientes com mutações no *CD40LG* podem expressar na superfície dos linfócitos T  $CD4^+$  níveis normais da proteína CD40L, quando analisados por citometria de fluxo (Seyama et al., 1998).

**Figura 8** - Expressão do CD40L na superfície dos linfócitos T  $CD3^+CD4^+$  ativados



Após 3 horas de ativação *in vitro* com PMA (20 ng/ml) e ionomicina (2 $\mu$ g/ml), a expressão do CD40L na superfície dos linfócitos T foi analisada. Exceto o paciente P3, os linfócitos dos demais pacientes não expressaram o CD40L. A intensidade de fluorescência da expressão do CD40L na superfície dos linfócitos de cada paciente está demonstrada pelos histogramas. C, controle.

Fonte: Adaptado de: (Cabral-Marques et al., 2012a).



## 4.2 Mutações identificadas no *CD40LG*

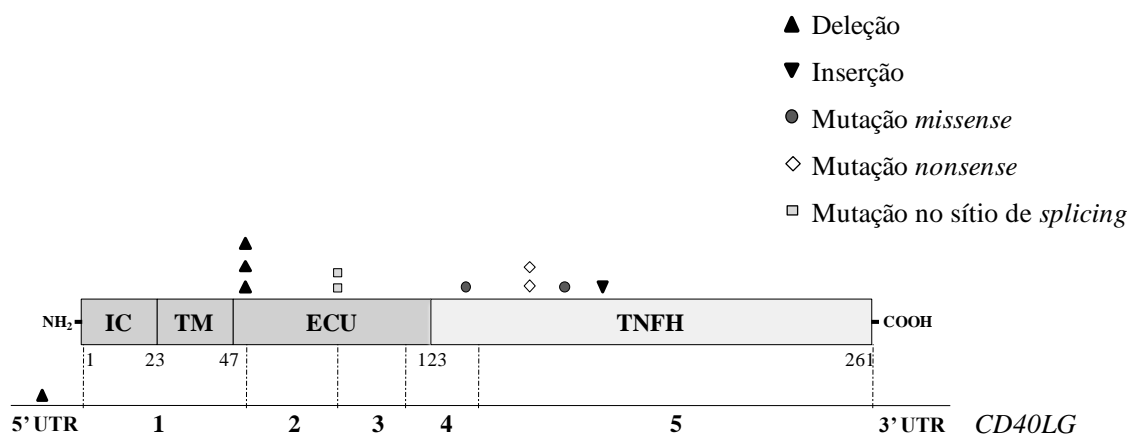
Identificamos um total de oito diferentes mutações no *CD40LG* dos pacientes (**Tabela 4** e **Figura 9**). Quatro mutações previamente descritas e quatro novas. Dentre estas últimas, duas substituições missenses foram identificadas nos pacientes P1 e P2 (**Figura 10A**). Elas afetam aminoácidos conservados entre diferentes espécies e se localizam no domínio homólogo ao fator de necrose tumoral (TNFH, do inglês *tumor necrosis factor homology*). As análises que realizamos utilizando o programa de bioinformática *Mutation Taster* revelaram que estas duas mutações missenses não são polimorfismos. Além disso, elas não foram encontradas em 100 indivíduos brasileiros controles, nem no banco de dados *Ensembl Genome Browser* ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

Uma inserção de 2 adeninas (c.551\_552insAA, p.R165X190) foi encontrada afetando o domínio TNFH no paciente P11 (**Figura 10B**) Essa inserção resulta na geração de um códon de parada prematuro. Já no *CD40LG* do P11 encontramos uma deleção no promotor abrangendo a região -110 à +60 *upstream* do códon de iniciação de transcrição genética (**Figura 10C**) Estudos com mutação sítio-dirigidas sugerem que essa região é essencial para a transcrição gênica do CD40L (Schubert et al., 1995). Este fato foi confirmado pela ausência da expressão gênica (**Figura 10D**) e protéica identificada no P11 (**Figura 8**).

**Tabela 4** - Mutações encontradas no *CD40LG* dos pacientes deficientes de CD40L

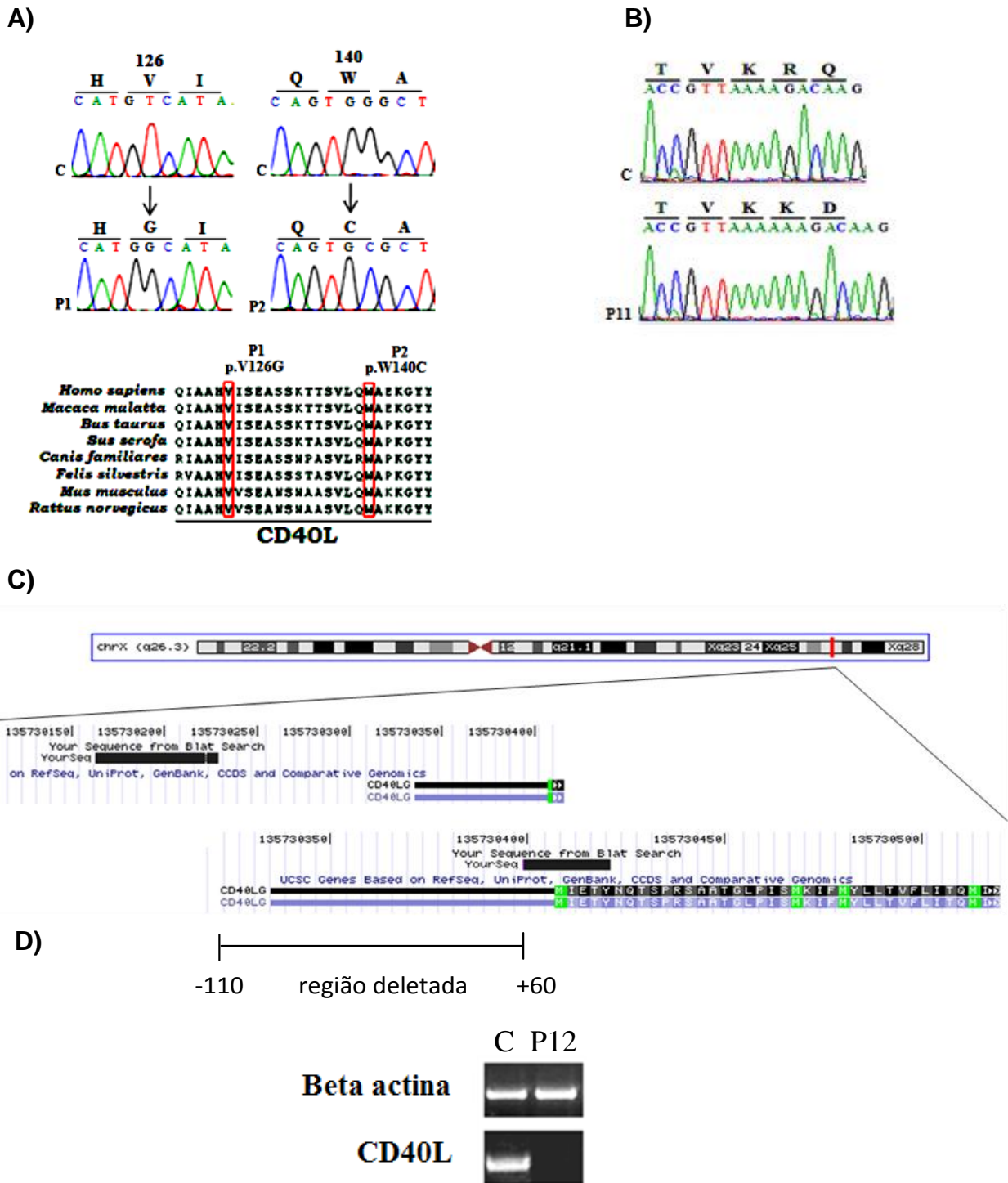
Pt	mutação (cDNA)	Tipo da mutação	Efeito na proteína	Região afetada	Exon afetado	Mutação nova ou descrita	Referências
P1	c. 433T>G	<i>Missense</i>	p.V126G	TNFH	4	Nova	-
P2	c.476 G>C	<i>Missense</i>	p.W140C	TNFH	5	Nova	-
P3	c.496 C>A	<i>Missense</i>	p.T147N	TNFH	5	Descrita	63
P4	c.475G>A	<i>Nonsense</i>	p. W140X	TNFH	5	Descrita	63
P5	c.475G>A	<i>Nonsense</i>	p. W140X	TNFH	5	Descrita	11
P6	c.213_216delATAG	<i>Deleção Frame shift</i>	p.I53fsX65	ECU	2	Descrita	75
P7	c.213_216delATAG	<i>Deleção Frame shift</i>	p.I53fsX65	ECU	2	Descrita	75
P8	c.213_216delATAG	<i>Deleção Frame shift</i>	p.I53fsX65	ECU	2	Descrita	75
P9	c.345_402del	Sítio de splicing	p.D97fsX127	ECU	3	Descrita	63
P10	c.345_402del	Sítio de splicing	p.D97fsX127	ECU	3	Descrita	63
P11	c.550_552insA	inserção	p.R165fsX190	TNFH	5	Nova	-
P12	-	Deleção	-	Promotor	-	Nova	-

Pt, pacientes; TNFH, com homologia ao fator de necrose tumoral; EC, domínio extracelular único. Fonte: Adaptado de: (Cabral-Marques et al., 2012a).

**Figura 9** - Mutações identificadas no *CD40LG*

(A) Representação esquemática da proteína CD40L e do *CD40LG* demonstrando o tipo da mutação identificada e a localização de cada uma delas. IC, domínio intracelular; TM, domínio transmembrana; ECU, domínio extracelular único, TNFH, domínio com homologia ao fator de necrose tumoral.

Figura 10 - Novas mutações identificadas no *CD40LG*



(A) Cromatogramas demonstrando as novas mutações missense encontradas nos pacientes P1 e P2. Ambas se localizam em regiões conservadas da proteína. Os códons e respectivos aminoácidos estão demonstrados acima dos cromatogramas. (B) Inserção de 2 adeninas no exon 5 identificada no P12. (C) Imagem obtida a partir da análise BLAT (<http://genome.ucsc.edu/>) demonstrando a deleção da região promotora -110\_+60 *upstream* do códon (ATG) de iniciação do *CD40LG*. (D) A importância desta deleção foi confirmada pela ausência de expressão gênica do *CD40L* identificada por RT-PCR. C, controle.

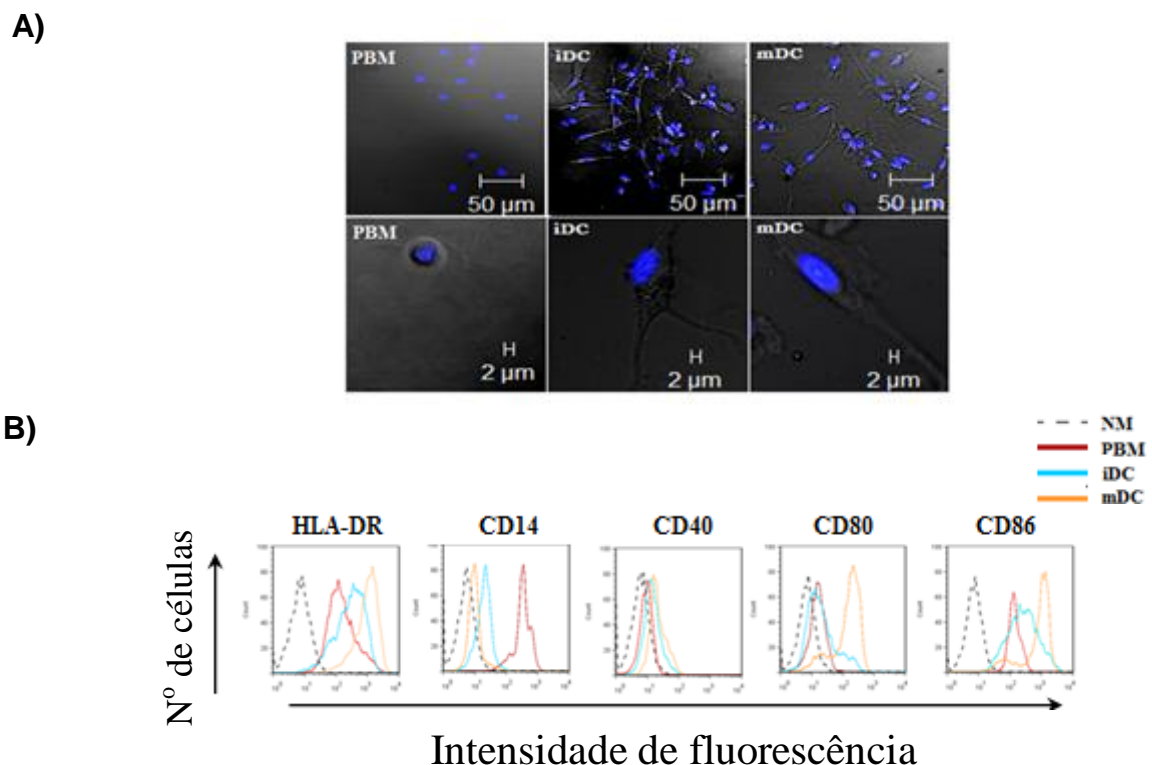
Fonte: Adaptado de: (Cabral-Marques et al., 2012a).

### 4.3 Estudo das células dendríticas dos pacientes deficientes de CD40L

Devido ao papel essencial das DCs como APCs no desencadeamento da resposta imune celular mediada por linfócitos T, nós geramos DCs derivadas de monócitos de pacientes deficientes de CD40L e estudamos o fenótipo e a função dessas células em resposta aos fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans*.

Conforme demonstrado na **Figura 11**, observamos que quando cultivados na presença de IL-4 e GM-CSF, os monócitos adquirem a morfologia de células dendríticas (**Figura 11A**). Baseados no padrão de expressão das moléculas HLA-DR, CD14, CD40, CD80 e CD86 as populações de monócitos, iDCs e mDCs (ativadas com CD40Ls) foram geradas com sucesso (**Figura 11B**).

**Figura 11** - Morfologia e padrão da expressão das moléculas HLA-DR, CD14, CD40, CD80 e CD86 na superfície de células dendríticas

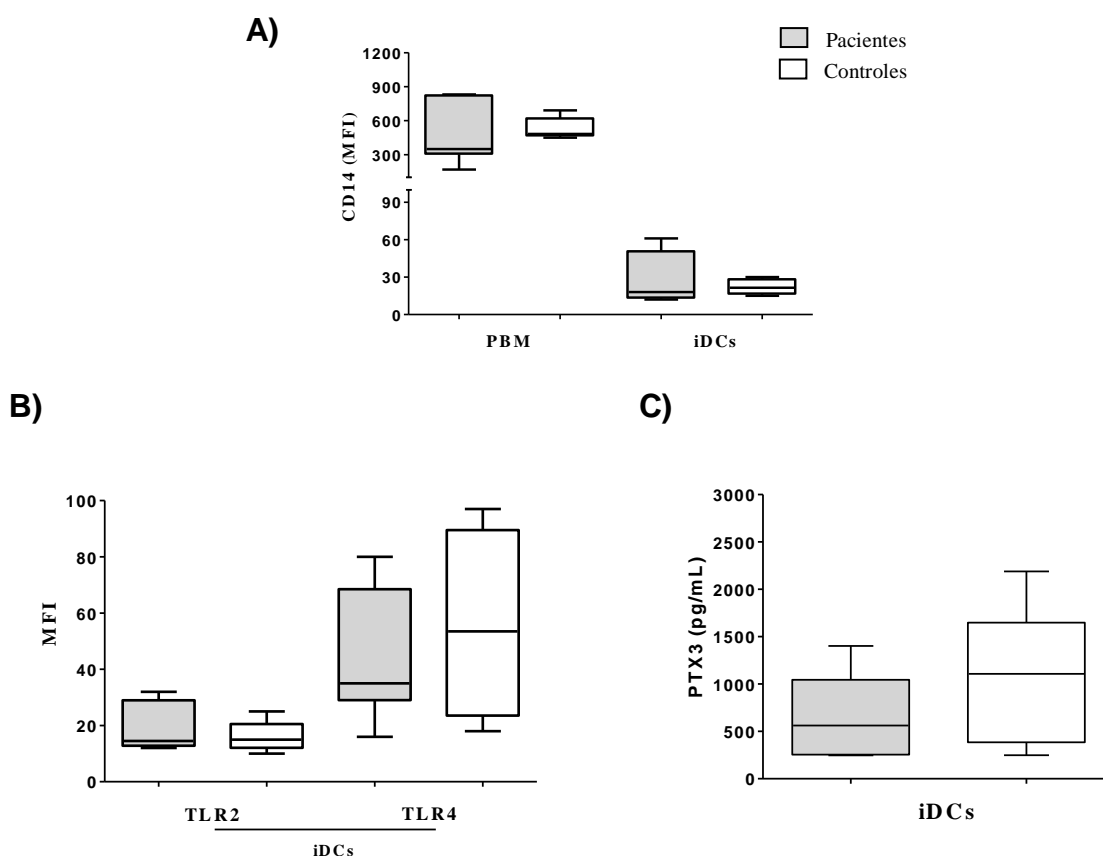


Após cinco dias de cultivo na presença de GM-CSF e IL-4, as iDCs foram geradas. As iDCs foram ativadas por 2 dias adicionais na presença de CD40Ls. **(A)** As células foram marcadas com DAPI e a morfologia dos PBM isolados, iDCs e mDCs tratadas com CD40Ls foram analisadas por microscopia confocal. **(B)** O padrão de expressão dos marcadores indicados foi analisado por citometria de fluxo. *NM*, Não Marcado; *PBM*, monócitos de sangue periférico, *iDCs*, células dendríticas imaturas; *mDCs*, células dendríticas maduras.

### 4.3.1 Alteração fenotípica das iDCs dos pacientes deficientes de CD40L pode ser revertida pelo CD40Ls exógeno

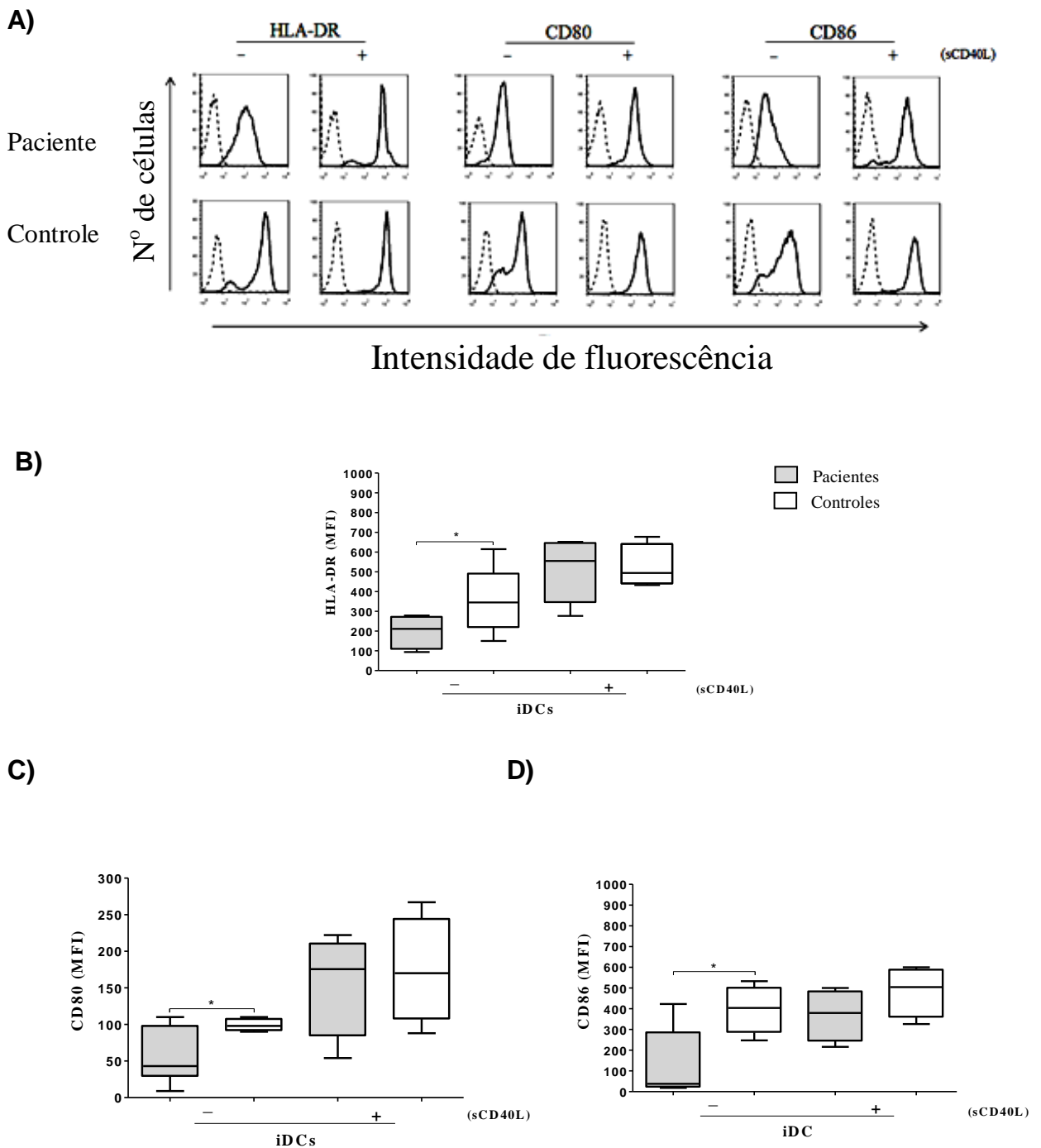
A caracterização fenotípica das DCs dos pacientes deficientes de CD40L demonstrou que as iDCs desses indivíduos em relação aos PBM, apresentam *downregulation* da molécula CD14 (**Figura 12A**). Também observamos expressão normal das moléculas TLR2 e TLR4 (**Figura 12B**). Além disso, as iDCs dos pacientes e controles secretam concentrações similares da proteína PTX3 (**Figura 12C**).

**Figura 12** - Expressão e secreção normal de PRRs pelas iDCs dos pacientes deficientes de CD40L



(A) A fenotipagem das iDCs derivadas dos monócitos na presença de GM-CSF e IL-4 revelou *downregulation* normal da molécula CD14. (B) As iDCs demonstraram expressão normal das moléculas TLR2 e TLR4 e (C) secreção de quantidades normais da PTX3 quando comparado com as células dos controles. ( $P < 0.05$ ;  $n=5$ , Mann-Whitney). *MFI*, média da intensidade de fluorescência. Fonte: Adaptado de: (Cabral-Marques et al., 2012b)

**Figura 13** - Expressão reduzida das moléculas HLA-DR, CD80 e CD86 na superfície das iDCs dos pacientes deficientes de CD40L



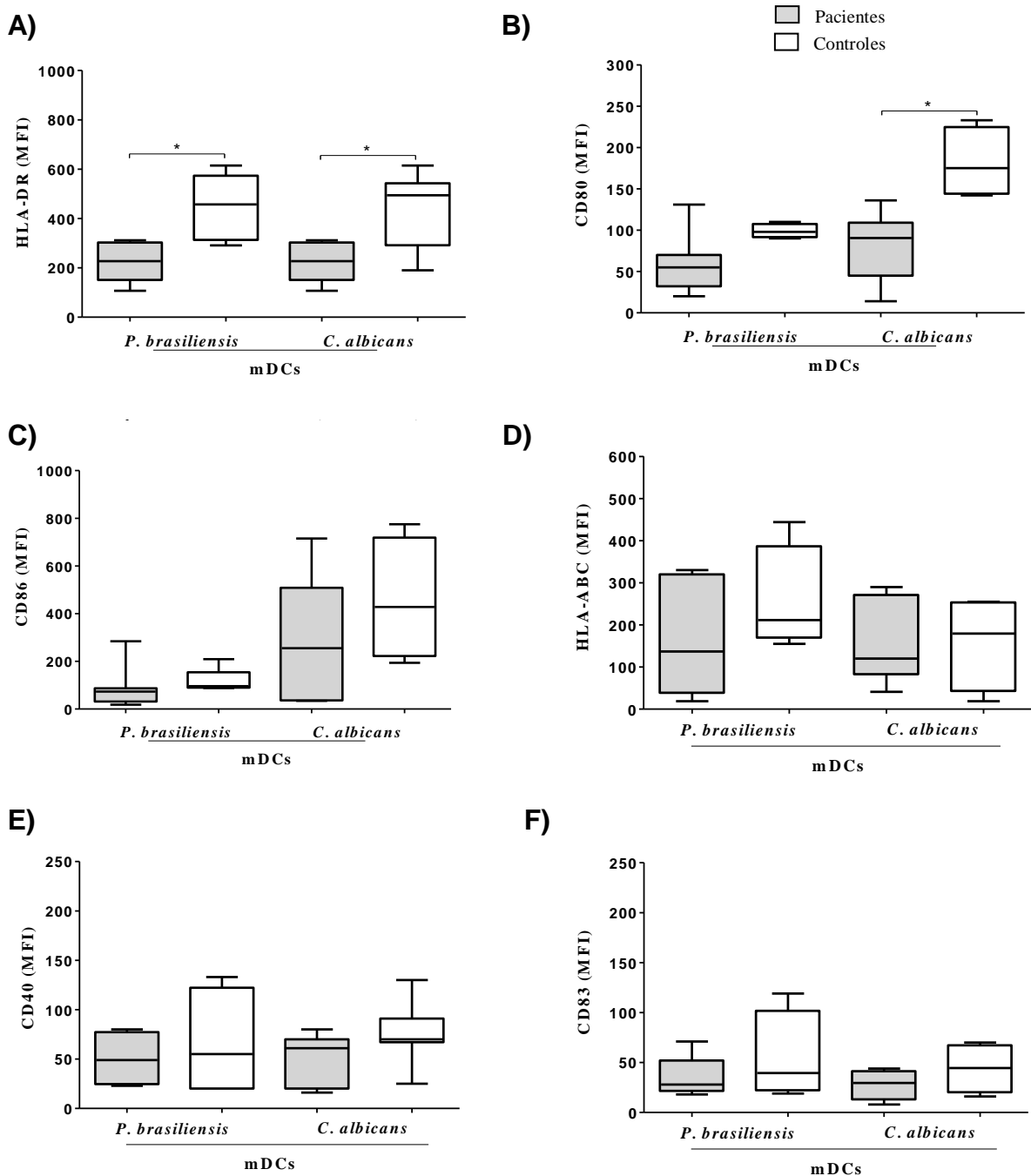
Estão representadas nos gráficos as médias da intensidade de fluorescência (MFI) das moléculas analisadas. As iDCs dos pacientes foram geradas a partir de PBMs na presença de GM-CSF e IL-4. **(A)** Histogramas representativos da expressão das moléculas HLA-DR, CD80 e CD86 na superfície das DCs. As análises demonstraram reduzida expressão das moléculas **(B)** HLA-DR, **(C)** CD80 e **(D)** CD86. Esses defeitos foram revertidos pelo CD40Ls exógeno. Diferenças estatísticas estão demonstradas pelo (\*). (P<0.05; n=5, Mann-Whitney).  
 Fonte: Adaptado de: (Cabral-Marques et al., 2012b).

Analisamos a expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 e da molécula HLA-DR, as quais são essenciais para a ativação dos linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> (Cella *et al.*, 1996). Quando comparado com os indivíduos controles, observamos que a expressão dessas moléculas foi reduzida (**Figura 13**). A importância da interação CD40L-CD40 para a expressão dessas moléculas foi confirmada pelo fato da adição do CD40Ls exógeno as culturas das DCs dos pacientes gerou células com fenótipo semelhante as células dos indivíduos controles.

#### **4.3.2 Expressão reduzida das moléculas HLA-DR e CD80 na superfície das mDCs dos pacientes deficientes de CD40L**

Para avaliarmos o fenótipo das mDCs dos pacientes deficientes de CD40L em resposta aos fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans*, co-cultivamos as iDCs desses indivíduos com esses microorganismos durante 48h. Novamente identificamos expressão reduzida das moléculas HLA-DR e CD80 na superfície das mDCs dos pacientes em relação as mDCs dos indivíduos controles (**Figura 14A, B**). Já a expressão da molécula CD86 (**Figura 14C**), embora de alguma forma reduzida, não demonstrou ser estatisticamente significativa. Notoriamente, após estimulação com o *P. brasiliensis*, a expressão da molécula CD86 na superfície das mDCs dos pacientes e dos controles foram reduzidas quando comparado aos níveis de expressão na superfície das iDCs (**Figura 13D**). Além disso, não observamos diferenças significativas na expressão das moléculas HLA-ABC, CD40 e CD83 (**Figura 14D, E, F**).

**Figura 14** - Expressão reduzida das moléculas HLA-DR e CD80 na superfície das mDCs dos pacientes deficientes de CD40L



Para obter as mDCs, iDCs foram cultivadas durante 48 horas na presença dos fungos *P. brasiliensis* ou *C. albicans* na proporção de 1 DC/10 fungos. As análises realizadas por citometria de fluxo demonstraram expressão reduzida das moléculas (A) HLA-DR, (B) CD80 ao passo que a expressão das moléculas (C) CD86, (D) HLA-ABC (E) CD40 e (F) CD83 foi normal. Diferenças estatísticas estão demonstradas pelo (\*). (P>0.05; n=5, Mann-Whitney).

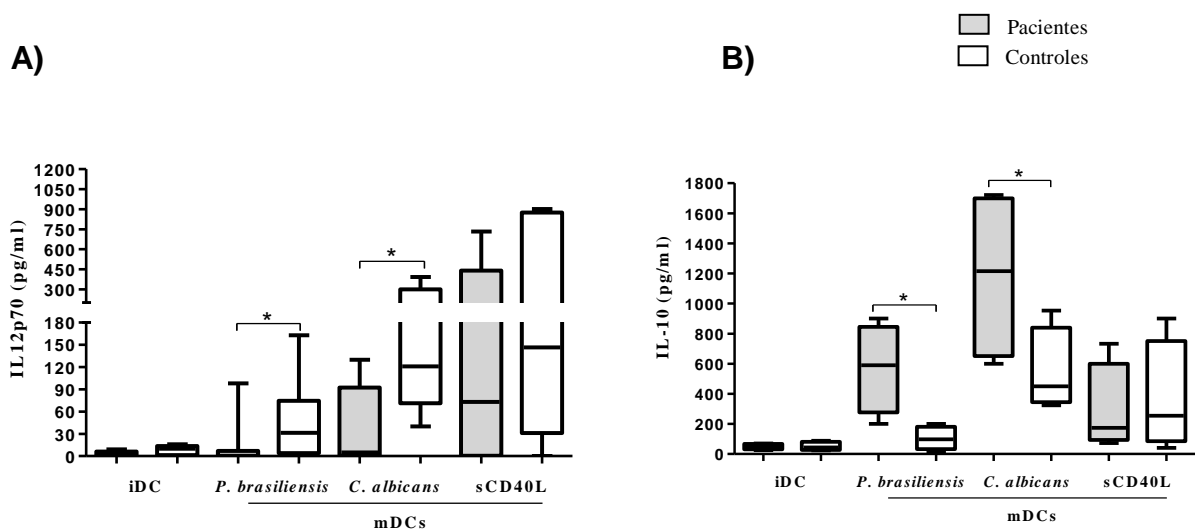
Fonte: Adaptado de: (Cabral-Marques et al., 2012b).



### 4.3.3 Células dendríticas dos pacientes deficientes de CD40L apresentam desequilíbrio na produção de IL-12 e IL-10.

Nós avaliamos a capacidade das DCs dos pacientes deficientes de CD40L de produzir as citocinas IL-12 e IL-10. Após 48h em cultura a produção dessas citocinas por iDCs foi reduzida para ambos os grupos (controles e pacientes). Por outro lado na presença dos fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans*, as mDCs dos pacientes produziram baixas concentrações de IL-12 (**Figura 15A**) e altas concentrações de IL-10 (**Figura 15B**) quando comparado com as mDCs dos indivíduos controles. As mDCs dos pacientes ativadas com CD40Ls, produziram concentrações de IL-12 e IL-10 similares aquelas produzidas pelas células dos indivíduos controles.

**Figura 15** - Produção de IL-12 e IL-10 pelas mDCs dos pacientes deficientes de CD40L



(A) Após 48 horas de cultura com *P. brasiliensis* e *C. albicans*, as mDCs dos pacientes deficientes de CD40L produzem baixas concentrações de IL-12, (B) ao passo que a produção de IL-10 foi elevada quando comparado com as mDCs dos indivíduos controles. Em resposta a ativação com CD40Ls a as mDC dos pacientes produzem IL-12 e IL10 normalmente. As dosagens de citocinas foram realizadas através de ELISA e os dados demonstrados em pg/ml Diferenças estatísticas estão demonstradas pelo (\*).(P<0.05; n=5, Mann-Whitney).

Fonte: Adaptado de: (Cabral-Marques et al., 2012b).

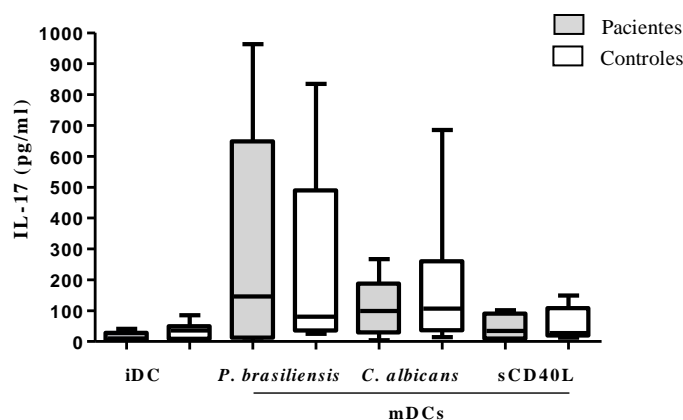
#### 4.3.4 Avaliação funcional das células dendríticas nas co-culturas com linfócitos T

Analizamos nas co-culturas, a capacidade das iDCs e das mDCs (estimuladas com *C. albicans* e *P. brasiliensis*) em induzir a ativação dos linfócitos T autólogos. Analizamos nas co-culturas a produção da citocina IL-17, a linfoproliferação das células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, bem como a produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 e TGF- $\beta$ .

##### 4.3.4.1 DCs dos pacientes deficientes de CD40L induzem produção normal de IL-17

Detectamos concentrações similares de IL-17 nos sobrenadantes das co-culturas das iDCs ou mDCs com os linfócitos T autólogos dos pacientes e dos indivíduos controles (**Figura 16**).

**Figura 16** - DCs dos pacientes deficientes de CD40L induzem a produção de IL-17



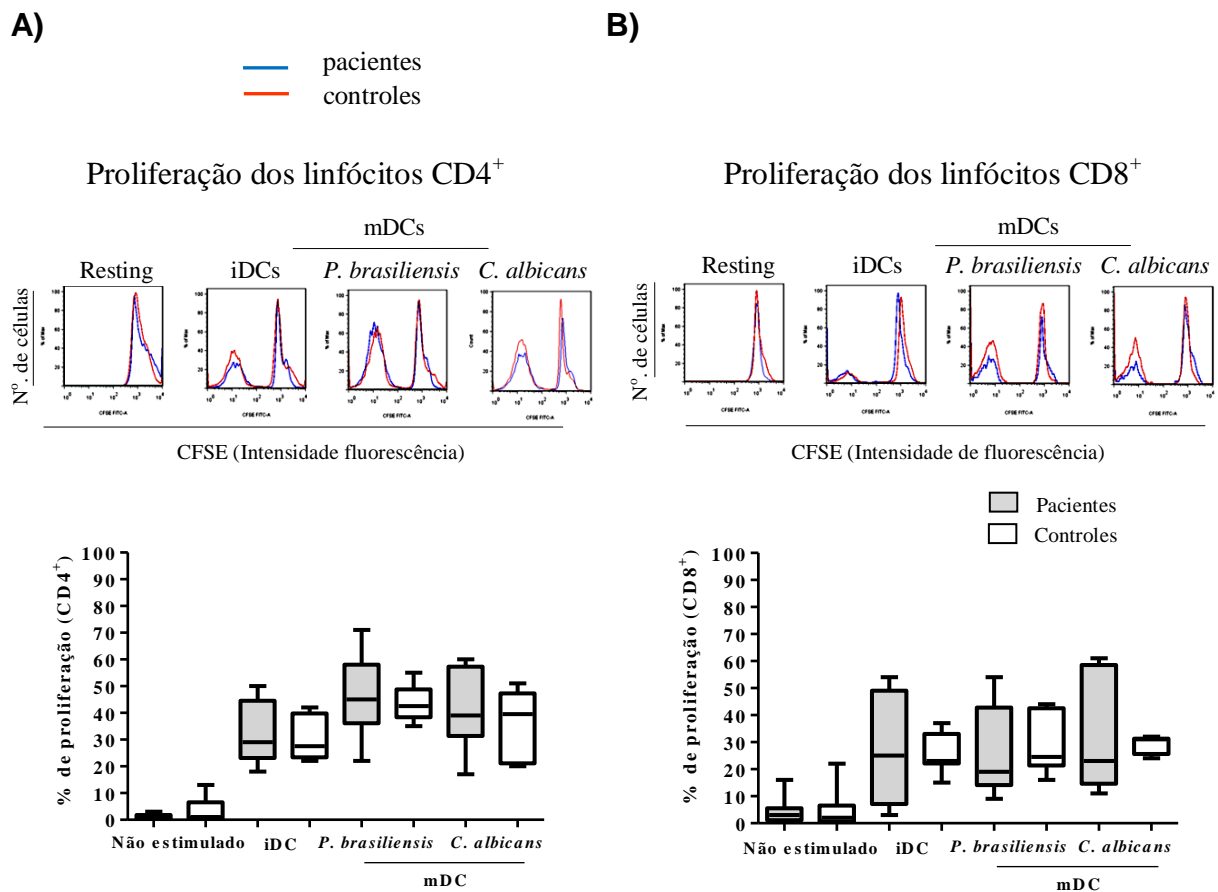
As concentrações de IL-17 nas co-culturas de linfócitos T autólogos com as iDCs ou mDCs dos pacientes foram similares as concentrações observadas nas co-culturas das células dos controles. As dosagens foram realizadas por ELISA ( $P < 0,05$ ;  $n = 5$ , Mann-Whitney).

Fonte: Adaptado de: (Cabral-Marques et al., 2012b)

4.3.4.2 Células dendríticas dos pacientes deficientes de CD40L induzem a proliferação de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>

Após cinco dias de co-cultura entre iDCs ou mDCs com os linfócitos T autólogos, as células foram obtidas e a proliferação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foi analisada por citometria de fluxo. A proliferação basal dos linfócitos T (sem a presença de DCs) dos pacientes e indivíduos controles, bem como a proliferação induzida pelas iDCs e mDCs foram similares (**Figura 17**).

**Figura 17** - Linfoproliferação normal nas co-culturas das iDCs ou mDCs com linfócitos T autólogos



Após cinco dias analisamos a linfoproliferação das células (A) CD4<sup>+</sup> e (B) CD8<sup>+</sup> dos pacientes comparadas com as células dos indivíduos controles, e observamos proliferação normal. Os ensaios de proliferação foram analisados por citometria de fluxo. (P>0.05; n=5, Mann-Whitney).  
 Fonte: Adaptado de: (Cabral-Marques et al., 2012b).

#### 4.3.4.3 mDCs dos pacientes deficientes de CD40L induzem um desvio do padrão de resposta Th1 para Th2

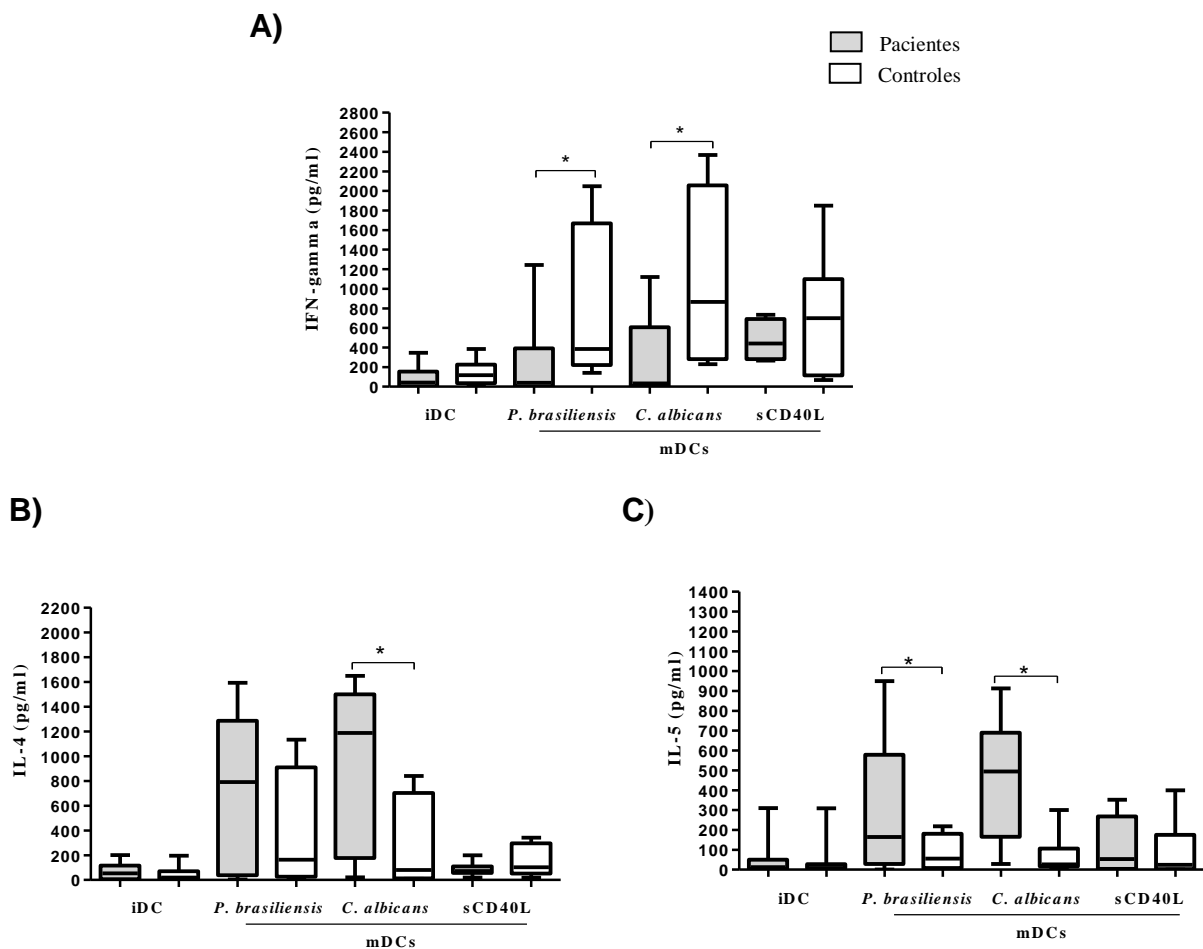
Observamos que as concentrações das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-5 foram similarmente reduzidas quando os linfócitos T autólogos foram estimulados pelas iDCs dos pacientes e dos controles. Contudo, quando os linfócitos T foram estimulados pelas mDCs pulsadas com os fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans*, identificamos reduzida concentração do IFN- $\gamma$  (citocina considerada do padrão Th1) (**Figura 18A**) e elevadas concentrações de IL-4 e IL-5 (citocinas consideradas do padrão Th2) (**Figura 18B e C**) no sobrenadante das co-culturas dos pacientes deficientes de CD40L quando comparado com as co-culturas dos indivíduos controles.

As concentrações das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-5 nas co-culturas das células dos pacientes e dos controles foram similares quando as mDCs ativadas com CD40Ls foram co-cultivadas com os linfócito T autólogos.

Para determinar o papel do CD40L no equilíbrio da resposta Th1 e Th2, analisamos se a ativação das DCs com o CD40Ls exógeno e *C. albicans* poderia restaurar a capacidade estimuladora das mDCs (pulsadas apenas com *C. albicans*). Conforme demonstrado na **Figura 19**, quando comparado com as co-culturas das células dos indivíduos controles, concentrações similares de IFN- $\gamma$  e IL-4 foram observadas nas co-culturas das células dos pacientes e dos controles.

Diferenças nas concentrações de TGF- $\beta$  não foram observadas nas co-culturas das células dos pacientes e dos controles (**Figura 20**).

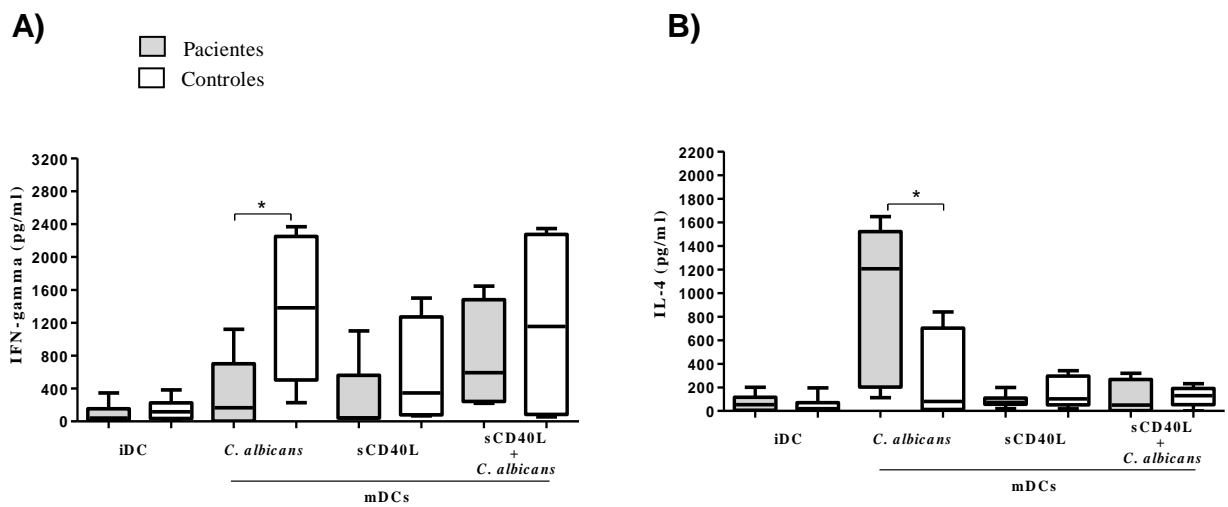
**Figura 18** - mDCs dos deficientes de CD40L induzem um desvio do padrão de resposta Th1 para Th2



Observamos concentrações reduzidas das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-5 nas co-culturas dos linfócitos autólogos com as iDCs dos pacientes e dos controles. Quando os linfócitos T foram estimulados com mDCs pulsadas pelos fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans* observamos baixas concentrações de IFN- $\gamma$  (A). Contudo as concentrações de IL-4 (B) e IL-5 (C) foram elevadas nas co-culturas dos pacientes em relação as co-culturas dos controles. Após os linfócitos serem estimulados pelas mDCs ativadas pelo CD40Ls, as concentrações das citocinas foram similares nas co-culturas das células dos pacientes e dos controles. As dosagens de citocinas foram realizadas através de ELISA e os dados demonstrados em pg/ml. Diferenças estatísticas estão demonstradas pelo (\*). (P<0.05; n=5, Mann-Whitney).

Fonte: Adaptado de: (Cabral-Marques et al., 2012b).

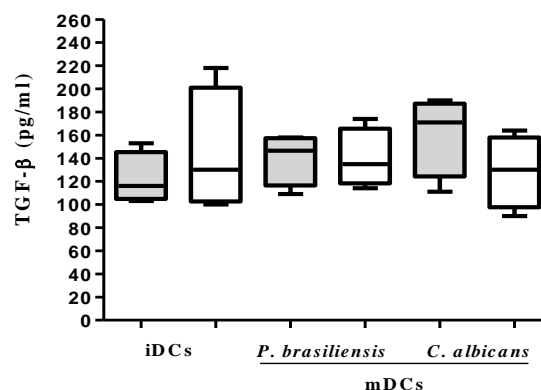
**Figura 19** - O desequilíbrio na produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 após ativação com mDCs é restaurada pelo CD40Ls exógeno



Observamos que as iDCs dos pacientes e controles induzem similarmente baixa produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 quando em co-cultura com os linfócitos T autólogos. Já as mDCs dos pacientes estimuladas pelo fungo *C. albicans* induziram baixa concentração de IFN- $\gamma$  e alta concentração de IL-4 quando comparado com as mDCs dos controles. As mDCs estimuladas com CD40Ls ou CD40Ls + *C. albicans* induziram concentrações de IFN- $\gamma$  (A) e IL-4 (B) similares nas co-culturas das células dos pacientes comparado com as dos controles. As dosagens de citocinas foram realizadas através de ELISA e os dados demonstrados em pg/ml. Diferenças significativas são demonstradas pelo (\*). (P<0,05, n=5, Mann-Whitney).

Fonte: adaptado de: (Cabral-Marques et al., 2012b).

**Figura 20** - Produção normal de TGF- $\beta$  pelas co-culturas com iDCs



Após cinco dias em co-cultura com linfócitos T autólogos, as iDCs e mDCs dos pacientes induziram produção de TGF- $\beta$  similar as concentrações observadas no sobrenadante das co-culturas das células dos controles. A dosagem de TGF- $\beta$  foi realizada através de ELISA e os dados demonstrados em pg/ml. (P>0.05; n=5, Mann-Whitney)

Fonte: Adaptado de: (Cabral-Marques et al., 2012b).

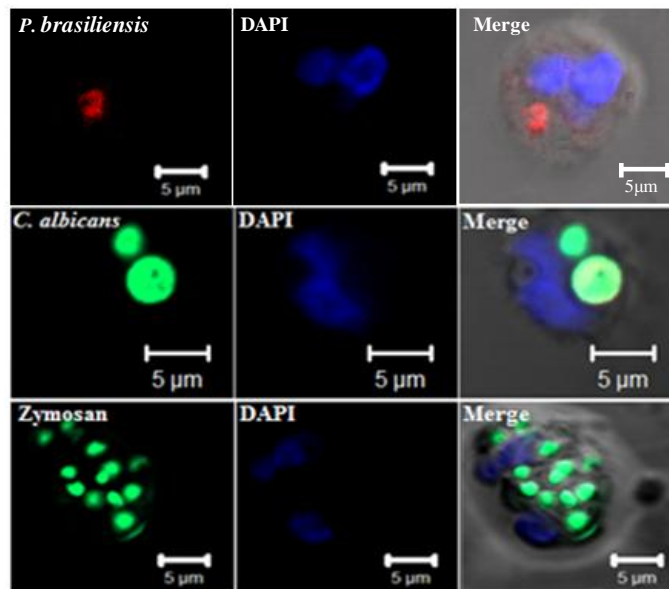
### **4.3.5 Análise da função dos neutrófilos**

#### *4.3.5.1 Neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L ingerem normalmente os fungos *P. brasiliensis*, *C. albicans* e as partículas de zymosan*

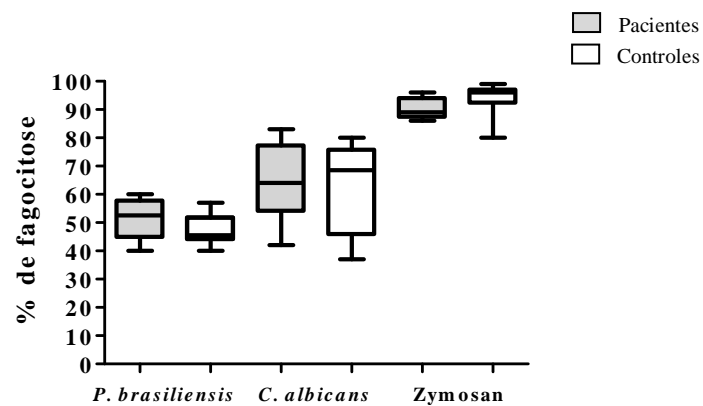
Considerando a importância dos neutrófilos no controle das infecções fúngicas, nós analisamos a função desses fagócitos obtidos a partir do sangue dos pacientes deficientes de CD40L. Observamos que os neutrófilos dos pacientes foram capazes de ingerir normalmente os fungos *P. brasiliensis*, *C. albicans* ou partículas de zymosan (**Figura 21**).

**Figura 21** - Os neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L ingerem normalmente os fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans* e as partículas de zymosan

A)



B)



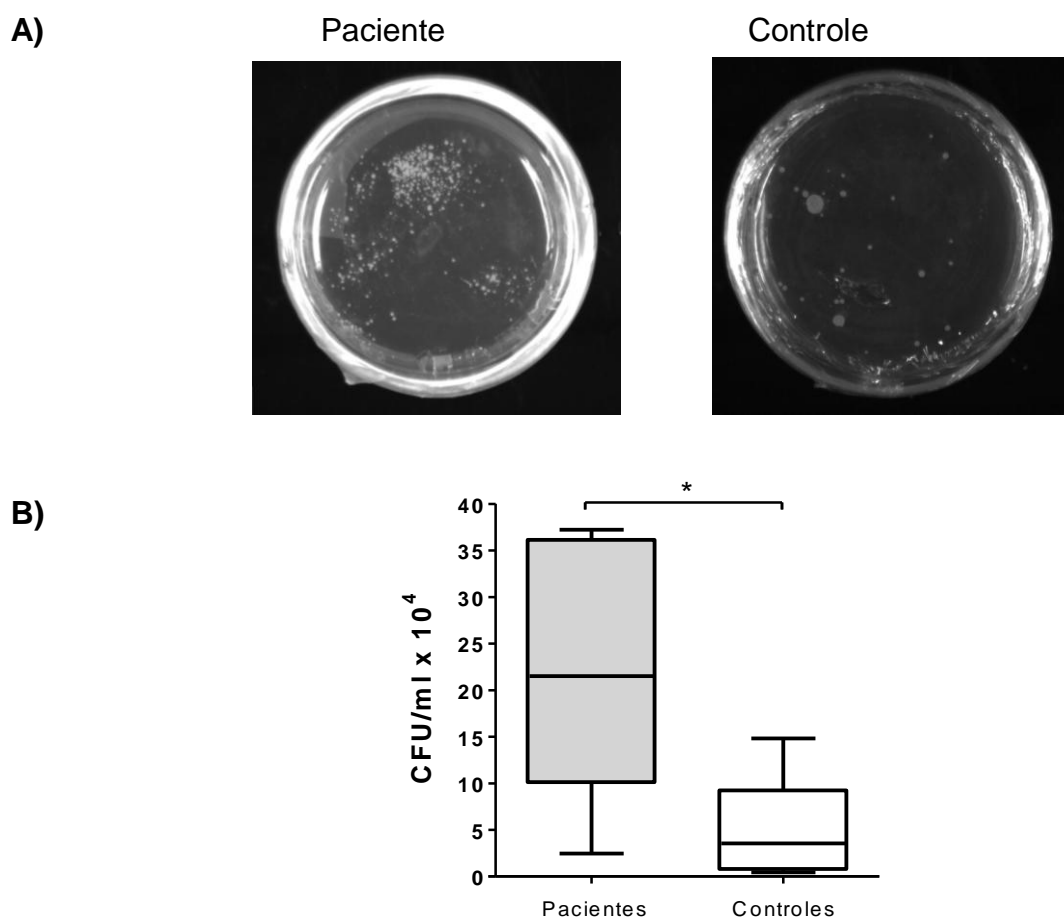
Após uma hora de incubação com *P. brasiliensis* marcado com P.I ou *C. albicans* ou zymosan marcados com FITC, a ingestão dos fungos e das partículas foi analisada (A). Imagens obtidas por microscopia confocal demonstrando a presença do *P. brasiliensis*, *C. albicans* ou zymosan no interior dos neutrófilos. (B) Análises por citometria de fluxo demonstraram que a porcentagem de ingestão pelos neutrófilos dos pacientes e controles foram similares ( $P < 0,05$ ;  $n = 5$ , Mann-Whitney).



#### 4.3.6 Neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L apresentam falhas na atividade fungicida

Uma vez verificado que os neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L ingerem normalmente os fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans* e as partículas de zymosan, nos questionamos sobre a capacidade dessas células de desencadear a atividade fungicida. Observamos que os neutrófilos dos pacientes quando desafiados com o fungo *P. brasiliensis* apresentaram atividade fungicida significativamente reduzida (**Figura 22**).

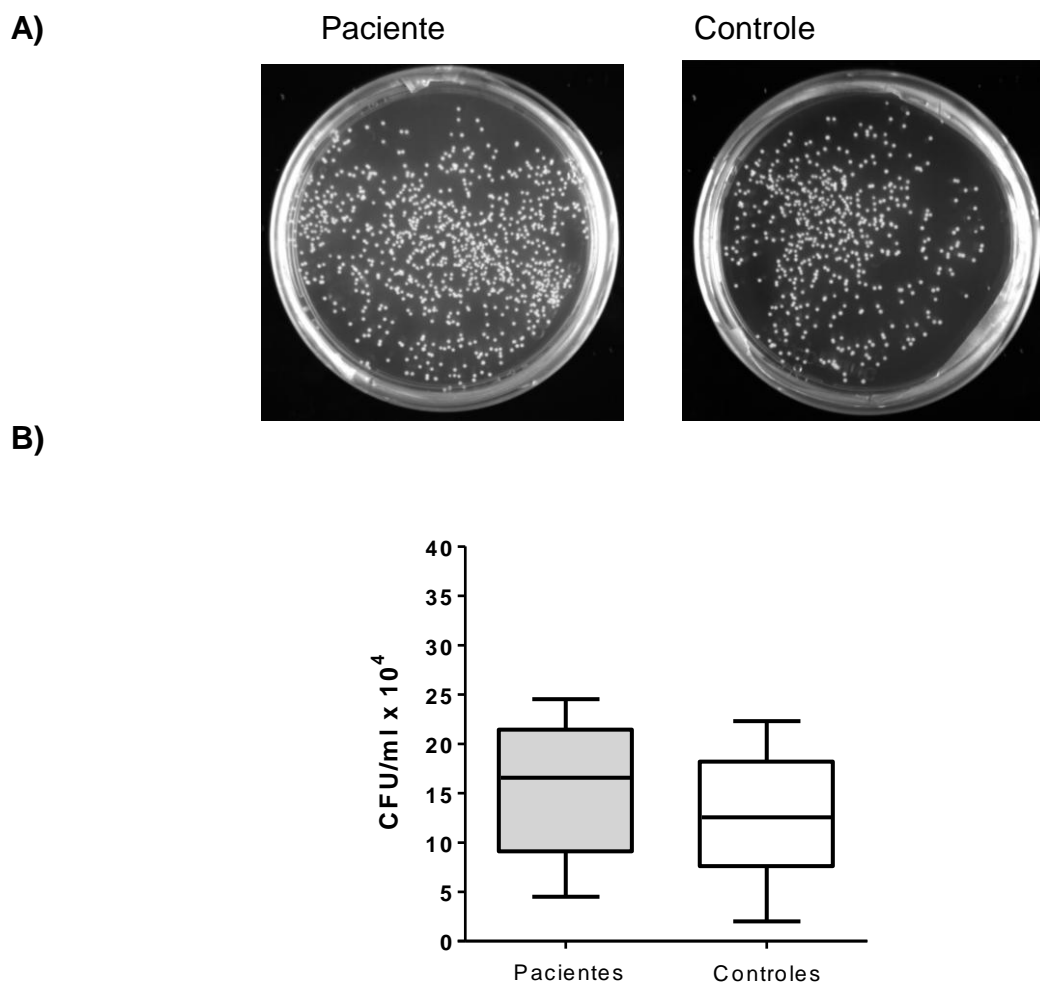
**Figura 22** - Atividade fungicida reduzida em resposta ao fungo *P. brasiliensis*



Os neutrófilos foram desafiados durante duas horas com o fungo *P. brasiliensis* na proporção de 2 neutrófilos/ 1 *P. brasiliensis* e as unidades formadoras de colônias (CFU) foram quantificadas. **(A)** imagem representativa das placas de petri analisadas. **(B)** Gráficos das quantificações das CFU/ml. Diferenças significativas são demonstradas pelo (\*). (  $P < 0,05$ ,  $n = 6$ , Mann-Whitney).

Considerando a ocorrência de candidíase em pacientes deficientes de CD40L, também avaliamos os neutrófilos dos pacientes em relação a atividade fungicida quando desafiados com *C. albicans*. Observamos que, embora discretamente reduzida, a atividade candidacida dos neutrófilos dos pacientes não atingiu significância estatística (**Figura 23**).

**Figura 23** - Atividade fungicida normal em resposta ao fungo *C. albicans*

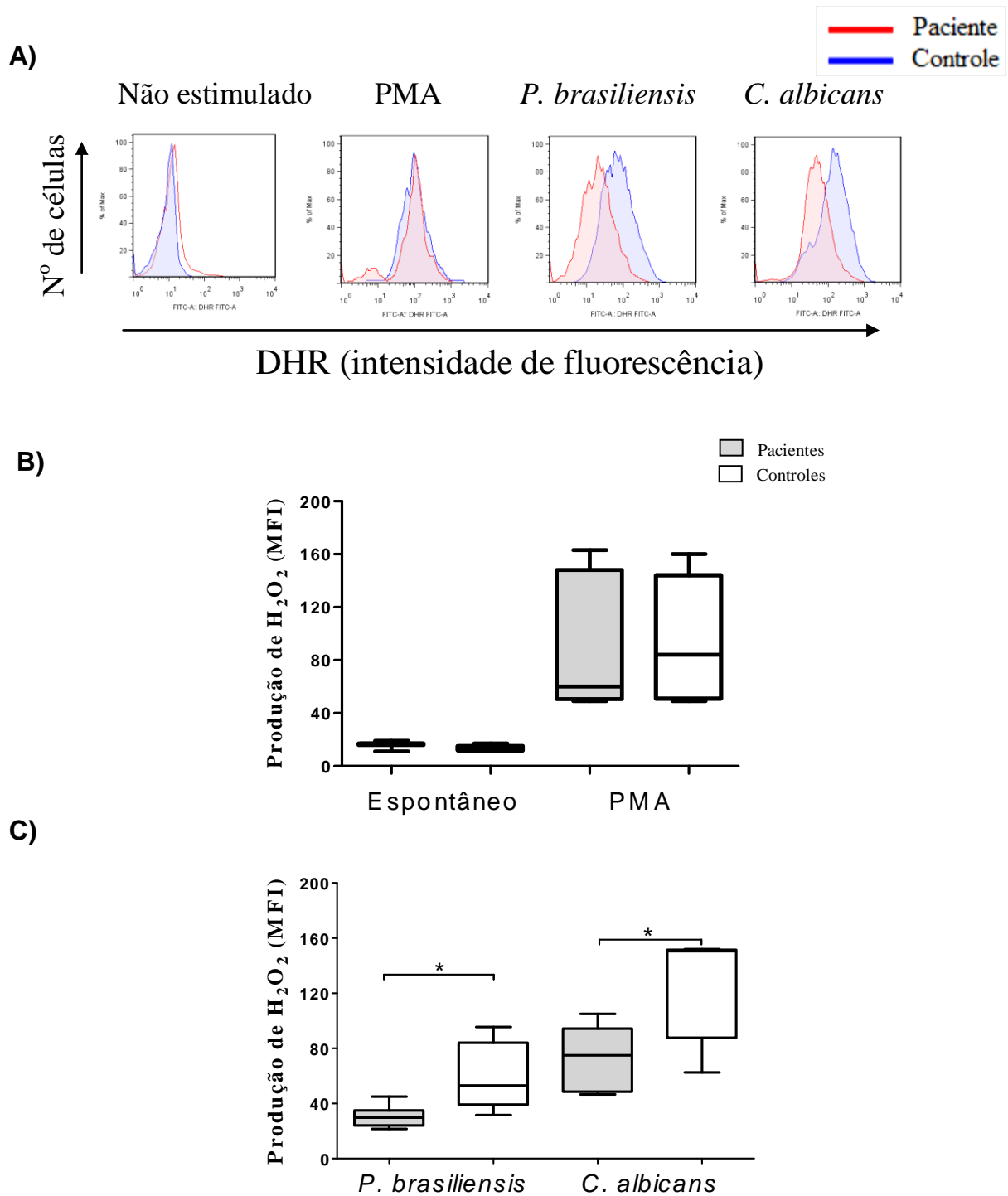


Os neutrófilos foram desafiados durante duas horas com o fungo *C. albicans* na proporção de 1 neutrófilo/ 2 *C. albicans* e as unidades formadoras de colônias (CFU) foram quantificadas. **(A)** imagem representativa das placas de petri analisadas. **(B)** Gráficos das quantificações das CFU. ( $P > 0,05$ ,  $n=6$ , Mann-Whitney).

#### **4.3.7 Falhas na explosão respiratória de neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L em resposta aos fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans***

Avaliamos a explosão respiratória dos neutrófilos dos pacientes através da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Conforme observado após ativação com PMA, os neutrófilos dos pacientes apresentam a explosão respiratória normal quando comparado com os indivíduos controles (**Figura 24B**). Contudo, ao serem desafiados com os fungos *C. albicans* e *P. brasiliensis*, os neutrófilos dos pacientes apresentaram explosão respiratória reduzida (**Figura 24C**).

**Figura 24** - Neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L apresentam falhas na explosão respiratória

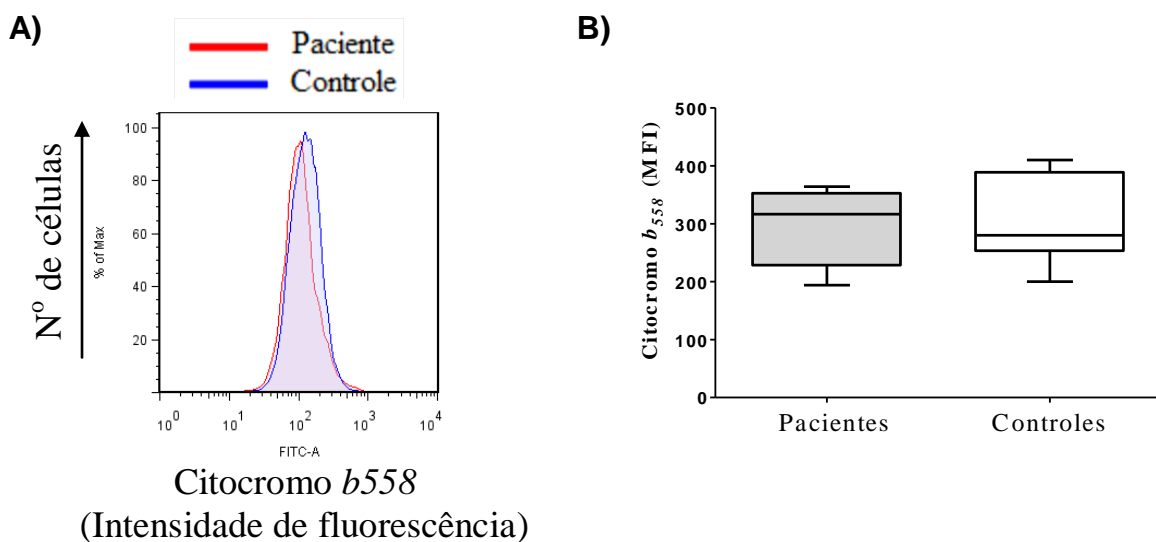


Após uma hora de ativação *in vitro*, os neutrófilos foram incubados na presença de 400 ng/ml de DHR e a produção de  $H_2O_2$  foi avaliada. **(A)** Histogramas representativos da produção de  $H_2O_2$ . **(B)** Produção espontânea de  $H_2O_2$  ou em resposta ao PMA. **(C)** Produção de  $H_2O_2$  em resposta ao *P. brasiliensis* ou *C. albicans*. Os resultados estão expressos pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI). Diferenças significativas são demonstradas pelo (\*). ( $P < 0,05$ ,  $n=5$ , Mann-Whitney).

#### 4.3.8 Neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L expressam o citocromo $b_{558}$ normalmente

Avaliamos a expressão do citocromo  $b_{558}$ , que é um heterodímero composto pelas moléculas gp91 $phox$  e p22 $phox$ , essencial para o desencadeamento da explosão respiratória (Taylor et al., 2006). Detectamos que os neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L expressam normalmente o citocromo  $b_{558}$  na superfície celular (**Figura 25**).

**Figura 25** - Expressão normal do citocromo  $b_{558}$  na superfície dos neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L



Leucócitos do sangue periférico foram obtidos e a expressão do citocromo  $b_{558}$  na superfície dos neutrófilos foi analisada por citometria de fluxo. (**A**) Histograma e (**B**) gráfico demonstrando a expressão normal do citocromo  $b_{558}$  na superfície dos neutrófilos dos pacientes em relação aos neutrófilos dos controles. Os resultados estão expressos pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI). ( $P > 0,05$ ,  $n = 5$ , Mann-Whitney).

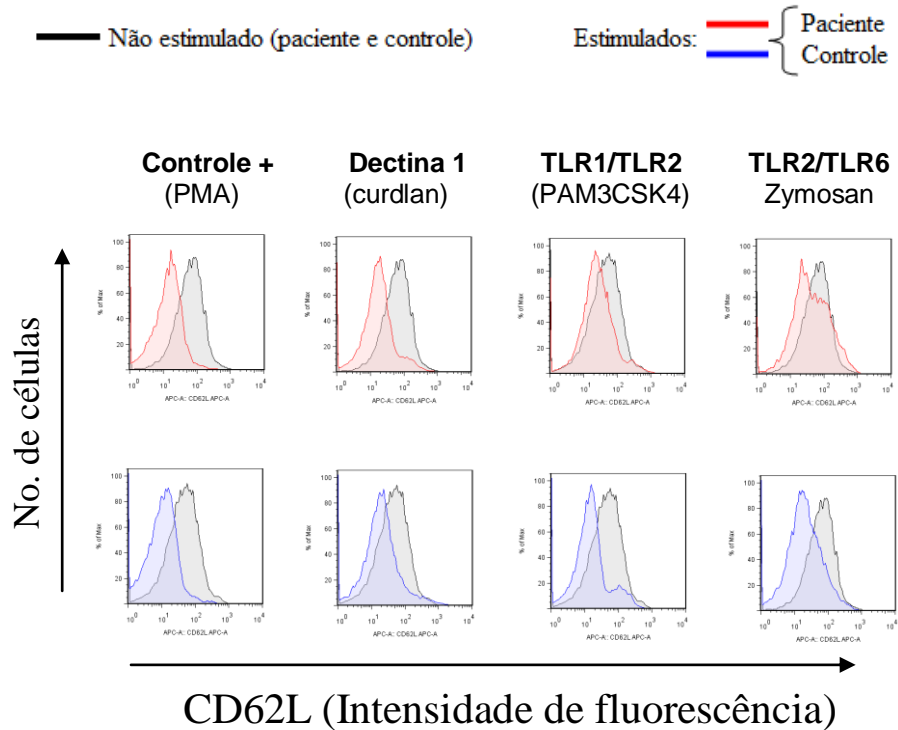
#### **4.3.9 Neutrófilos dos deficientes de CD40L apresentam possíveis falhas na sinalização via PRRs**

Nos questionamos quais outros mecanismos nos ajudariam a entender a reduzida atividade fungicida apresentada pelos neutrófilos dos pacientes. A falha na explosão respiratória especificamente aos fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans*, nos sugeriu que mecanismos especificamente envolvidos na interação neutrófilos-fungos poderiam estar prejudicados. Desta forma selecionamos avaliar a sinalização via PRRs que estão envolvidos com a resposta imune antifúngica.

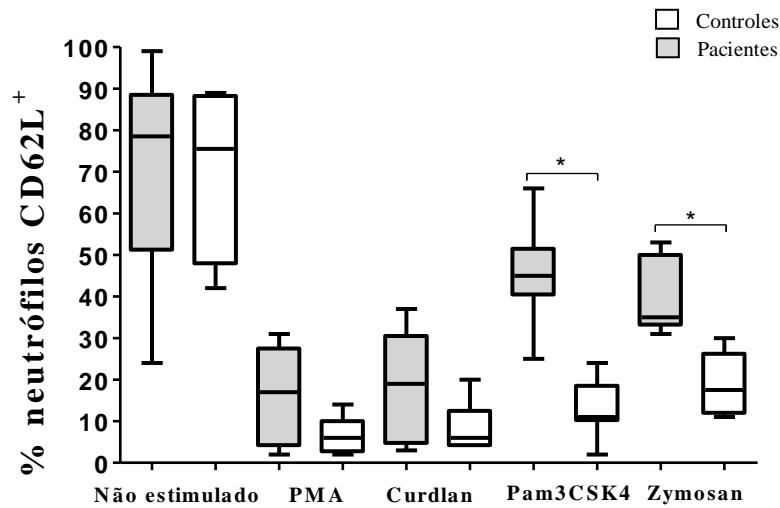
Detectamos que os neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L apresentam sinalização normal em resposta ao PMA e curdlan (agonista de dectina 1). Contudo, os neutrófilos dos pacientes apresentaram falhas significativas no *shedding* da molécula CD62L em resposta ao PAM3CSK4 (agonista do heterodímero TLR1/TLR2) e zymosan (agonista do heterodímero TLR2/TLR6) quando comparados aos neutrófilos dos indivíduos controles (**Figura 26**).

**Figura 26** - Neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L apresentam falhas na ativação via TLR1/2 e TLR2/TLR6

**A)**



**B)**



(A) Histogramas representativos das análises da sinalização via PRRs e (B) gráfico demonstrando o *shedding* da molécula CD62L. Da esquerda para direita podemos observar a eleva expressão da molécula CD62L na superfície dos neutrófilos não estimulados. Seguindo observamos que o *shedding* da molécula CD62L ocorreu normalmente apartir da superfície dos neutrófilos uma hora após a ativação com PMA e curdlan (agonista de dectina 1) quando comparado com os neutrófilos dos controles. Não obstante, falhas no *shedding* em resposta ao PAM3CK4 (agonista do TLR1/TLR2) e zymosan (agonista do TLR2/TLR6) foram identificadas. Diferenças significativas estão demonstradas pelo (\*). ( $P > 0,05$ ,  $n=5$ , Mann-Whitney).

## 5 DISCUSSÃO

Descrevemos aqui neste trabalho um grupo de pacientes brasileiros deficientes de CD40L apresentando além das infecções descritas previamente, a ocorrência de PCM, aspergilose invasiva, condiloma causado pelo HPV e sepse causada simultaneamente por *Klebsiella sp.* e *Acinetobacter sp.* Além disso, a incidência das infecções fúngicas nos pacientes brasileiros foi mais alta (83%) do que nos pacientes até então descritos por estudos desenvolvidos no hemisfério norte (32%-42%) (Levy et al., 1997; Winkelstein et al., 2003).

Infecções fúngicas ocorrem em todo o mundo e podem apresentar diferentes padrões de incidência, características epidemiológicas e agentes etiológicos dependendo da região geográfica e condições socioeconômicas locais. Nossos achados estão de acordo com a observação de que a incidência de infecções fúngicas, de maneira geral na América Latina, é comumente mais elevada do que na América do Norte e Europa (Nucci et al., 2010). Além disso, nossas observações expandem o espectro das manifestações clínicas da deficiência de CD40L, fato relevante para o cuidado médico com esses pacientes.

Tendo em vista a necessidade de um diagnóstico preciso da deficiência de CD40L para investigarmos mecanismos imunopatológicos subjacentes a suscetibilidade às infecções fúngicas nesta IDP, realizamos a análise genético molecular dos pacientes com histórico clínico da HIGM. Amostras de um total de 27 pacientes do sexo masculino oriundos de diferentes estados do Brasil com histórico clínico de HIGM nos foram encaminhadas. Dez desses 27 pacientes apresentaram expressão protéica do CD40L e sequência genética do *CD40LG* normais. Seis outros pacientes apresentaram expressão reduzida do CD40L e a análise genética do *CD40LG* está atualmente sendo realizada em nosso laboratório. Por outro lado, oito diferentes mutações no *CD40LG* foram identificadas em 12 pacientes pertencentes a 10 diferentes famílias. Nessas famílias 30 mulheres portadoras do gene mutado em heterozigose e 25 não portadoras foram caracterizadas (**Figura 7**). Essa análise genético-molecular nos permitiu o aconselhamento genético das famílias e permitirá a triagem dos futuros recém-nascidos. Este fato sem dúvida redundará na redução das taxas de mortalidade nessas famílias e numa melhor qualidade de vida desses indivíduos. Por exemplo, as crianças dessas famílias



poderão até mesmo receber um diagnóstico pré-natal da deficiência de CD40L e serem encaminhadas mais rapidamente para o transplante de medula óssea.

A variabilidade dos fenótipos apresentados por cada paciente portador de uma IDP reflete tanto o efeito das diferentes mutações dentro de um gene causador de uma IDP, quanto à complexidade genética e epigenética do organismo humano em interação com os fatores ambientais. Não conseguimos estabelecer uma relação genótipo-fenótipo em nosso grupo de pacientes, devido à variabilidade dos históricos clínicos mesmo entre os pacientes portadores da mesma mutação. Embora o Registro Europeu para a deficiência de CD40L tenha descrito um total de 239 pacientes com deficiência de CD40L e 210 mutações únicas que afetam diferentes domínios de CD40L (<http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/>), até agora uma relação genótipo-fenótipo ainda permanece por ser estabelecida. A descrição de novos casos e novas mutações no *CD40LG* é extremamente útil para que no futuro talvez, essa relação possa ser alcançada.

Estudar pacientes portadores de IDPs como modelo para a compreensão dos mecanismos que regulam a resposta imune humana representa uma oportunidade única. Em particular, o estudo da HIGM tem esclarecido os complexos mecanismos moleculares que controlam a troca de classe de imunoglobulinas e o processo de hipermutação somática. Contudo a função da interação CD40L-CD40 na regulação da resposta imune aos fungos, permanece pouco esclarecida.

Jain e colaboradores (Jain et al., 1999) deram os primeiros passos para explicar os mecanismos imunopatológicos responsáveis pela suscetibilidade as infecções fúngicas apresentada pelos pacientes deficientes de CD40L. Esses estudiosos demonstraram que os pacientes apresentam falhas na maturação pós-tímica dos linfócitos T, incluindo reduzido número de linfócitos T de memória no sangue periférico e falhas na secreção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  pelos PBMCs dos pacientes após estimulação com PHA e anti-CD3.

Neutropenia é uma anormalidade hematológica observada em pacientes deficientes de CD40L (Rezaei et al., 2009) e poderíamos argumentar que essa seria por si só é uma explicação para a suscetibilidade às infecções fúngicas apresentada por esses pacientes. Contudo, a frequência dos episódios de neutropenia apresentados variam de indivíduo para indivíduo, nem todos os deficientes de CD40L manifestam essa característica, e mesmo quando com concentrações

normais de neutrófilos eles são suscetíveis a infecções fúngicas (Levy et al., 1997; Winkelstein et al., 2003). Nossos dados corroboram este fato. Neutropenia foi identificada em sete dos pacientes que estudamos (P2, P3, P4, P5, P6, P10 e P12), contudo, esses indivíduos não apresentaram neutropenia detectável antes ou durante a manifestação de infecções fúngicas. O mecanismo responsável pela neutropenia nesse grupo de pacientes ainda são desconhecidos. Contudo sugere-se que ela pode ser resultado de auto-anticorpos contra os neutrófilos ou defeitos na granulopoiese (Aghamohammadi et al., 2009; Mavroudi, Papadaki, 2011).

Com objetivo de compreendermos melhor os mecanismos imunopatológicos subjacentes a susceptibilidade às infecções fúngicas nos pacientes deficientes de CD40L, estudamos as DCs desses indivíduos. Avaliamos a resposta dessas células frente aos fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans*. Nossos dados demonstraram que as iDCs dos pacientes apresentam *downregulation* normal da molécula CD14 quando comparadas aos monócitos. Além disso, as iDCs geradas expressaram normalmente as moléculas TLR2 e TLR4 e produziram normalmente a proteína PTX3, porém apresentaram redução na expressão das moléculas HLA-DR, CD80 e CD86. Quando as iDCs foram estimuladas a se tornarem mDCs na presença dos fungos *P. brasiliensis* ou *C. albicans*, elas demonstraram reduzida expressão das moléculas CD80 e HLA-DR, e notavelmente produziram quantidades reduzidas de IL-12 e elevadas de IL-10. As co-culturas das mDCs com os linfócitos T autólogos resultou em falhas na produção de IFN- $\gamma$ , ao passo que a produção de IL-4 e IL-5 foram elevadas. Por outro lado, a capacidade das DCs de induzir a proliferação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e a produção de TGF- $\beta$  e IL-17 foram normais. Esses achados sugerem que falhas parciais na maturação de DCs podem contribuir para a susceptibilidade às infecções fúngicas apresentada pelos pacientes deficientes de CD40L.

A possibilidade de que as diferenças observadas no fenótipo e na função das DCs dos pacientes (com idade entre 4 e 18 anos) e controles (adultos entre 22 - 32 anos) sejam devido a disparidade na idade entre os dois grupos é improvável. Nenhuma diferença no fenótipo e função de DCs, bem como na imunidade celular mediada por linfócitos T, foram observadas em crianças a partir de 3 anos de idade quando comparado com indivíduos adultos (Upham et al., 2002).

O reconhecimento dos PAMPs pelas DCs é um passo importante para a maturação dessas células. Estudos demonstram que os receptores TLR2 e TLR4 estão envolvidos no reconhecimento de *C. albicans* e *P. brasiliensis* (Romani, 2004). No entanto, a nossa observação de que as iDCs dos pacientes deficientes de CD40L expressam normalmente os receptores TLR2 e TLR4 e produzem normalmente a molécula PTX3 sugere que o reconhecimento dos PAMPs fúngicos pelas DCs é normal. Contudo, nem falhas na sinalização intracelular via TLR2 ou TLR4, ou na expressão e sinalização de outras moléculas (demais TLRs e CLRs) podem ser descartadas.

As moléculas CD80/CD86 e HLA-DR expressas na superfície das DCs se ligam respectivamente as moléculas CD28 e ao receptor de linfócitos T (TCR, *do inglês T-cell receptor*) e transmitem sinais importantes de ativação (Sperling, Bluestone, 1996) para o linfócito T. A reduzida expressão das moléculas CD80/CD86 e HLA-DR apresentada pelas DCs dos pacientes deficientes de CD40L, sugere falhas no desenvolvimento das DCs resultando em ineficiente capacidade de transmitir sinais ativadores e co-estimuladores para os linfócitos T. Essas falhas podem ter contribuído com a deficiente ativação dos linfócitos T autólogos observada nas co-culturas com as DCs. Esses dados reforçam o envolvimento da interação CD40L-CD40 na maturação das DCs uma vez que Fontana e colaboradores (Fontana et al., 2003) também demonstraram expressão reduzida do CD80/CD86 e HLA-DR na superfície das iDCs dos pacientes deficientes de CD40.

Vários fatores regulam a função dos linfócitos T ativados, incluindo o antígeno apresentado, as moléculas co-estimuladoras e as citocinas presentes no microambiente no momento da ativação celular. Neste contexto um dos papéis centrais das DCs na iniciação da resposta imune mediada pelos linfócitos T, é através da produção de IL-12 e consequente indução da produção de IFN- $\gamma$  (Trinchieri, 1993). A produção de IL-12 pelas DCs pode ser mediada pelos linfócitos T (incluindo a participação da interação CD40L-CD40) ou de forma T-independente através do reconhecimento direto dos PRRs pelas DCs (Takenaka et al., 1997). O fato das mDCs dos pacientes deficientes de CD40L produzirem concentrações reduzidas de IL-12p70 e elevadas de IL-10 em resposta a estimulação com os fungos *C. albicans* e *P. brasiliensis*, sugere um papel não redundante da interação CD40L-CD40 na indução da produção de IL-12p70 e no controle da produção de IL-

10. Esses dados vão ao encontro dos achados que demonstraram reduzida produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  pelos PBMCs de pacientes de CD40L ao serem estimulados com *Toxoplasma gondii*, um defeito que pode ser revertido pelo CD40Ls exógeno (Subauste et al., 1999). Neste mesmo sentido, Fontana e colaboradores (Fontana et al., 2003) avaliaram DCs de dois pacientes deficientes de CD40 e observaram que após serem estimuladas com LPS+IFN- $\gamma$ , as mesmas secretam quantidades reduzidas de IL-12 e elevadas concentrações de IL-10.

Associadas a falha no eixo IL-12/IFN- $\gamma$  observamos no sobrenadante das cocultura de DCs e linfócitos T dos pacientes deficientes de CD40L, altas concentrações das citocinas IL-4 e IL-5. Esse padrão de citocinas é associado a suscetibilidade à infecções fúngicas (Romani, 1997). Esta associação é atribuída ao fato da resposta imune antifúngica coordenada pelo IFN- $\gamma$  ser suprimida pelas citocinas IL-4 e IL-5 tanto ao nível indutor quanto na sua ação efetora (Romani, 1997). Nossos dados sugerem que a interação CD40L-CD40 exerce um papel não redundante na regulação da produção dessas citocinas e direciona a resposta imune para um padrão de resposta Th1. O mecanismo como a interação CD40L-CD40 regula intracelularmente o balanço Th1/Th2 ainda permanece por ser esclarecido. A produção do IFN- $\gamma$  e das citocinas IL-4 e IL-5 são respectivamente coordenadas pelos fatores de transcrição T-box expresso em células T (T-bet, do inglês, T-box expressed in T-cells) e GATA-3 (Chakir et al., 2003). Por sua vez, o próprio IFN- $\gamma$  via STAT1 (Afkarian et al., 2002) e as citocinas do padrão Th2 via STAT6 (Zhu et al., 2001) retroalimentam a diferenciação Th1 e Th2, respectivamente. Desta forma, uma hipótese ainda a ser testada, é se a interação CD40L-CD40 regula a função dos fatores de transcrição T-bet/STAT1 e GATA3/STAT6.

Além da importância da ativação do eixo IL-12/IFN- $\gamma$  na resposta imune antifúngica, estudos recentes em humanos revelam *in natura* um papel crucial para a IL-17 na resposta imune contra o fungo *C. albicans* (Puel et al., 2011). A geração de células Th17 ocorre de forma dependente da interação APC-linfócitos T (Vautier et al., 2010). Experimentos com murinos sugerem que a interação CD40L-CD40 está envolvida na regulação da produção de IL-17 (Iezzi et al., 2009; Katzman et al., 2011). Embora nenhuma relação entre CD40L-CD40 e a geração de Th17 tenha sido descrita em seres humanos, os estudos realizados com camundongos são contraditórios. Katzman e colaboradores (Katzman et al., 2011) demonstraram que a

ausência da interação CD40L-CD40 resulta em aumento da porcentagem de linfócitos produtores de IL-17. Entretanto, Iezzi e colaboradores (Iezzi et al., 2009) observaram redução dos níveis dos linfócitos Th17. Nossos resultados demonstrando produção normal de IL-17 nas co-culturas de mDCs e linfócitos T autólogos de pacientes deficientes de CD40L sugerem que em seres humanos, a interação CD40L-CD40 não está envolvida na resposta imune de células Th17. Porém, não sabemos se em outros contextos imunológicos e experimentais a interação CD40L-CD40 seja necessária a produção de IL-17 e mesmo talvez outros mecanismos ainda desconhecidos compensem a ausência desta interação durante a produção da IL-17. A mesma linha de raciocínio é válida para outras funções cujo o envolvimento da interação CD40L-CD40 foi previamente demonstrado e aqui observamos inalteradas. Por exemplo, estudos anteriores demonstraram que a interação CD40L-CD40 regula negativamente a produção de TGF- $\beta$  (Lutgens et al., 2000) e induz a proliferação dos linfócitos T (Yellin, Thienel, 2000). Contudo observamos que as DCs dos pacientes deficientes de CD40L induziram normalmente a produção de TGF- $\beta$  (uma potente citocina antiinflamatória) e a proliferação dos linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.

Uma vez identificado a disfunção na interação DCs-linfócitos T, que são importantes células mediadoras da resposta imune, desejamos verificar a função dos neutrófilos dos pacientes. Por sua vez, essas últimas, são uma das principais células que exercem função efetora na proteção e eliminação das infecções fúngicas. Além disso, o papel protetor dos neutrófilos na resposta imune contra os fungos *P. brasiliensis* (Pina et al., 2006) e *C. albicans* (Kolotila, Diamond, 1990) é bem documentada.

Observamos que os neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L são capazes de ingerir normalmente os fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans* e as partículas de zymosan. Entretanto, os neutrófilos dos pacientes apresentaram reduzida atividade fungicida quando desafiados com o *P. brasiliensis*, mas atividade candidicida normal. Subjacentes a este padrão de resposta, observamos que a ativação da explosão respiratória dos neutrófilos foi normal em resposta a estimulação com PMA, por outro lado reduzida após ativação com ambos os fungos (*P. brasiliensis* e *C. albicans*). A falha na ativação da explosão respiratória não foi consequência da reduzida expressão do citocromo *b<sub>558</sub>*, nem de falhas na sinalização

via o receptor delectina 1. Contudo, observamos falhas na sinalização via os heterodímeros TLR1/TLR2 e TLR2/TLR6.

Considerando a pouca idade dos pacientes estudados, a técnica que utilizamos para avaliar a ingestão de microorganismos pelos neutrófilos dos pacientes nos permite analisar esta função em apenas poucas amostras de 100µl de sangue. A desvantagem desta técnica é que ela não consegue distinguir os fungos ou partículas de zymosan aderentes na membrana celular do neutrófilo daqueles que foram englobadas (Hasui et al., 1989). Solucionar esta limitação demandaria avaliar a função fagocítica dos neutrófilos de cada paciente por microscopia. Contudo para este propósito, necessitaríamos um volume de sangue muito maior. Por outro lado, a realização da ingestão dos fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans* e das partículas de zymosan pelos neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L diretamente em amostras de sangue periférico, nos possibilita levar em consideração algumas condições de opsonização naturalmente produzidas pelo organismo. Porém o tratamento através da reposição de Ig pode mascarar a real capacidade fagocítica dos neutrófilos num contexto imunológico em que opsonização mediada pelos anticorpos é necessária.

A observação de que os neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L são capazes de ingerir normalmente os fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans* e as partículas de zymosan, sugere que a capacidade intrínseca de ingerir os fungos em questão não está afetada nesses indivíduos. Porém supomos que antes de serem tratados através da reposição de Ig, a capacidade fagocítica dos neutrófilos dependente do processo de opsonização esteja prejudicada *in vivo*. Anticorpos promovem o reconhecimento dos fungos através de vários receptores (Brown, 2011) e a função dessas moléculas durante as infecções fúngicas incluem a prevenção da aderência, neutralização de toxinas, opsonização e a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (Casadevall et al., 2002). Contudo, a ausência de manifestação de infecções fúngicas em pacientes com IDPs predominantemente de anticorpos, sugere que *in vivo*, as funções mediadas pelos anticorpos na resposta imune antifúngica são compensadas por outros fatores.

Encontramos que os neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L apresentaram atividade fungicida reduzida quando desafiados com *P. brasiliensis* e normal quando desafiados com *C. albicans*. Essa é uma questão que abre toda uma

gama de oportunidades investigativas sobre a resposta imune dos neutrófilos na deficiência de CD40L. Este fato revela quão complexos e redundantes são os mecanismos microbicidas apresentados pelos neutrófilos em si e pelo sistema imune humano como um todo. Diferenças na atividade fungicida dos neutrófilos de pacientes com DGC e dos deficientes da mieloperoxidase (MPO) também são observadas de acordo com a espécie de fungo. Os neutrófilos desses dois grupos de pacientes apresentam atividade candidicida normal em resposta as espécies *C. pseudotropicalis* e *C. parapsilosis* e falham em resposta a *C. albicans* (Lehrer, 1972). Contudo, os neutrófilos desses dois grupos de indivíduos ingerem normalmente as três espécies de *Candida* acima descritas.

O fato dos neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L terem apresentado atividade candidicida similar a dos indivíduos controles está de acordo com os achados de Netea e colaboradores (Netea et al., 2002). Camundongos deficientes de CD40L ou camundongos selvagens tratados com anticorpo bloqueador anti-CD40 apresentaram maior carga de *C. albicans* nos rins apenas nas fases tardias da infecção (após 15 dias que os camundongos foram inoculados com as *C. albicans*). Os neutrófilos desses animais demonstraram *in vitro*, atividade candidicida normal, porém, os macrófagos apresentaram resposta reduzida. Por outro lado, modelos murinos deficientes de CD40L nunca foram desafiados com o *P. brasiliensis* para que possamos estabelecer qualquer comparação.

Outro dado ao encontro de nossas observações foram demonstrados por Gohman-Yahr e colaboradores (Gohman-Yahr et al., 1980). Esses estudiosos compararam a capacidade dos neutrófilos de pacientes com PCM em digerir os fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans*. Eles observaram que os neutrófilos dos pacientes são capazes de ingerir normalmente ambos os fungos. Contudo, ao passo que os neutrófilos dos pacientes falharam em digerir o *P. brasiliensis* a digestão de *C. albicans* ocorreu normalmente.

Também não podemos deixar de argumentar que a reduzida atividade fungicida em resposta ao *P. brasiliensis*, mas não ao fungo *C. albicans* pode ser pelo menos teoricamente explicada no âmbito experimental ou mesmo por diferenças na biologia de cada fungo e suas relações com o hospedeiro. No primeiro caso, uma vez que a atividade candidicida dos neutrófilos de indivíduos controles aumenta à medida que a proporção *C. albicans*/neutrófilos diminui (Kolotila, Diamond, 1990), se

aumentássemos esta última, talvez chegaríamos numa proporção em que os neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L apresentariam atividade candidicida reduzida em comparação com os neutrófilos dos indivíduos controles. No segundo caso, se tivéssemos utilizado uma cepa de *P. brasiliensis* menos virulento (por exemplo Pb265) (Kurokawa et al., 2005) talvez não tivéssemos observado as falhas na atividade fungicida entre os neutrófilos dos pacientes e indivíduos controles. O mesmo raciocínio é válido se tivéssemos desafiados os neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L com uma cepa mais virulenta de *C. albicans* (por exemplo a ATCC 43001) (Wiederhold et al., 2011). Talvez os neutrófilos desses indivíduos não teriam sido capazes de desencadear uma atividade candidicida similar ao dos neutrófilos controles.

Ao encontro da argumentação acima, diferenças fenotípicas (não determinadas estruturalmente), mas que se evidenciam pela opacidade das *C. albicans* cepa WO-1, resultam em diferenças na resistência e sobrevivências das *C. albicans* (Kolotila, Diamond, 1990). Enquanto as cepas mais opacas de *C. albicans* WO-1 induzem uma produção de EROs mais elevada e são mais suscetíveis à morte induzida por concentrações mais baixas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as cepas menos opacas induzem uma produção reduzida deste ERO e são menos suscetíveis a morte.

Estudos demonstram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sozinho é letal tanto ao fungo *P. brasiliensis* (McEwen et al., 1984) quanto a *C. albicans* (Kolotila, Diamond, 1990), embora sinergise com outros EROs para realizar uma atividade fungicida mais eficaz. De acordo a atividade fungicida dos neutrófilos em resposta a *C. albicans* (Thompson, Wilton, 1992) e *P. brasiliensis* (Rodrigues et al., 2007) é reduzida de forma dose-dependente na presença da catalase exógena. Considerando este fato decidimos investigar a capacidade dos neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L em produzir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A peroxidação induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> danifica as camadas lipídicas estruturais dos fungos sendo este um importante mecanismo fungicida (Dantas et al., 2008). Reconhecidamente esse é um dos mecanismos fungicidas necessários a proteção do hospedeiro conforme demonstrado pela suscetibilidade as infecções fúngicas apresentadas pelos pacientes portadores de DGC e da deficiência de MPO (Lehrer, 1972). Observamos que tanto em resposta ao *P. brasiliensis* quanto em resposta ao fungo *C. albicans*, a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi reduzida no interior dos neutrófilos, mas não totalmente abolida.



Nos questionamos se de fato a redução parcial na explosão respiratória dos neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L compromete *in vivo* a resposta antifúngica. Porém o fato de pacientes com DGC apresentando defeitos que eliminam apenas parcialmente a produção de EROs serem suscetíveis à infecções fúngicas graves (Kuhns et al., 2010; Matute et al., 2009; Roesler et al., 2012), sugere que sim. Ao encontro desses dados, os neutrófilos de camundongos B10.A (suscetíveis) quando comparados com os A/J (resistentes), produzem  $H_2O_2$  similarmente em resposta ao PMA. Porém os neutrófilos dos camundongos B10.A apresentam produção reduzida de  $H_2O_2$  em resposta ao *P. brasiliensis* e este fato foi associado à falhas na atividade fungicida (Meloni-Bruneri et al., 1996).

Do ponto de vista técnico, o método que utilizamos para mensurar a produção de  $H_2O_2$  (dihidrorodamina, DHR) é reconhecidamente válido para se detectar defeitos na explosão respiratória (Kuhns et al., 2010; Matute et al., 2009; Roesler et al., 2012). Esta técnica se baseia no fato da molécula DHR-123 penetrar nas células e na presença de  $H_2O_2$  ser oxidada sendo convertida em rodamine-123. Esta última é excitável por um comprimento de onda de 488 nm e emite uma fluorescência de 515 nm (Rothe et al., 1988) que pode ser analisada no citômetro de fluxo e o resultado é fornecido em MFI. O MFI é um valor semiquantitativo que não é capaz de quantificar analiticamente as concentrações de  $H_2O_2$ . Não sabemos se as concentrações de  $H_2O_2$  produzidas pelos neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L são as necessárias fisiologicamente para matar os fungos em questão. Por isso, além de nossas análises através da técnica do DHR, precisamos determinar por uma técnica quantitativa analítica o valor exato da produção  $H_2O_2$  pelos neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L.

Uma subsequente pergunta que precisávamos responder foi: por que os neutrófilos de pacientes deficientes de CD40L ativam normalmente a explosão respiratória em resposta ao PMA, porém falham quando são estimulados com os fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans*? A ativação normal em resposta ao PMA sugeriu que o defeito não seja intrínseco à NADPH oxidase. De acordo observamos adicionalmente expressão normal do citocromo  $b_{558}$  na superfície dos neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L. Talvez defeitos na expressão dos demais componentes da NADPH oxidase possam ocorrer. Porém devido à produção normal de  $H_2O_2$  em resposta ao PMA, achamos que essa hipótese seja pouco provável.

Acreditamos ser mais provável que os neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L apresentem falhas na fosforilação da p47phox e/ou falhas na translocação dos componentes citosólicos da NADPH oxidase para a membrana plasmática em consequência de defeitos funcionais em outras moléculas que poderiam regular os mecanismos de ativação da NADPH oxidase.

PRRs têm sido relacionados a regulação funcional da NADPH oxidase (Aliprantis et al., 2001; Jann et al., 2011; Villamon et al., 2004). A transdução de sinal via TLRs e CLRAs em humanos depende da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B o qual, pelo menos em parte, é regulado pela interação CD40L-CD40 (Kingeter, Lin, 2012; Picard et al., 2011; Verstrepen et al., 2008). Conectamos este fato com os dados apresentados por Song e colaboradores (Song *et al.*, 2011a) (**seção 1.2**) demonstrando que neutrófilos e macrófagos de murinos deficientes de CD40 apresentaram defeitos nas respostas imunes dependentes da ativação do NF- $\kappa$ B. A partir daí hipotetizamos que a sinalização via TLRs e/ou CLRAs em neutrófilos e macrófagos de humanos deficientes de CD40L ou CD40 talvez apresentassem falhas na ativação do NF- $\kappa$ B.

Observamos reduzido *shedding* da molécula CD62L em resposta ao PAM3CSK4 (agonista do heterodímero TLR1/2) e zymosan (agonista do heterodímero TLR2/6). Todavia detectamos *shedding* normal em resposta ao PMA e ao curdlan (agonista de dectina 1). Os TLRs transduzem sinais que envolvem a participação das proteínas quinases associadas aos receptores de interleucina-1 (IRAKs, do inglês Interleukin-1 receptor associated kinases), MyD88, p38 e PI3K (van de Veerdonk et al., 2008) mas indispensavelmente requerem a ativação do NF- $\kappa$ B. Contudo, a dectina 1 além de ativar o NF- $\kappa$ B, também transduz sinais por vias independentes do NF- $\kappa$ B, tais como a das MAPKs e do fator nuclear das células T ativadas (NFAT, do inglês nuclear factor of activated T-cells). Este fato talvez justifique as diferenças que observamos. Porém não podemos descartar a possibilidade de que as falhas no *shedding* tenha ocorrido não por falhas na sinalização intracelular, mas sim por redução na expressão dos TLRs que podem talvez ser regulados pela interação CD40L-CD40. Um possível mecanismo seja o fato da interação CD40L-CD40 induzir a produção de GM-CSF e G-CSF na medula óssea e por sua vez essas citocinas estão envolvidas no aumento da expressão do TLR2 na superfície dos neutrófilos (Kurt-Jones et al., 2002).

Não sabemos se as falhas na sinalização via os dímeros TLR1/TLR2 e TLR2/TLR6 se correlacionam a redução na produção de  $H_2O_2$ . Até que ponto essas vias são compensadas por outras vias alternativas é uma questão a ser testada. Estudos caracterizando defeitos nos TLRs em humanos ainda são incipientes. Em camundongos eles demonstram um papel importante do TLR2 na ativação da NADPH e na defesa contra os fungos (Jann et al., 2011), contudo poucas evidências em humanos corroboram *in vivo* o envolvimento dos TLRs na resposta imune antifúngica. Até o momento, mutações no TLR2 foram apenas identificadas em pacientes com suscetibilidade a micobactérias (Kang, Chae, 2001; Yim et al., 2004). Já polimorfismos no TLR1 e TLR6 (Kesh et al., 2005) foram associadas a suscetibilidade à aspergiloses em alguns indivíduos. Até o momento a única deficiência de TLRs em humanos bem caracteriza é a deficiência de TLR3 (Zhang et al., 2007).

O que podemos especular baseados nesses dados é que falhas na sinalização via TLR1/TLR2 e TLR2/TLR6 redundariam em defeitos na explosão respiratória por consequência de falhas na translocação dos componentes citosólicos da NADPH oxidase para a membrana ou na fosforilação da p47phox, sem afetar a capacidade dos neutrófilos de ingerir microrganismos. Embora os TLRs estejam envolvidos com a ingestão de fungos, este processo pode ocorrer normalmente mesmo na ausência deles (Bellocchio et al., 2004). Este fato pode ser justificado pois além dos TLRs, a ingestão de fungos envolve diferentes receptores incluindo o receptor do complemento 3 (CR3), FCγR, DC-SIGN, e outros (Romani et al., 2002).

Tomados em conjunto, nossos dados demonstram que defeitos na maturação de células dendríticas e de neutrófilos de pacientes deficientes de CD40L são mecanismos imunopatológicos subjacentes as infecções fúngicas desenvolvidas por estes pacientes. Esses dados expandem o conhecimento dos mecanismos de suscetibilidade e resistência à doenças infecciosas. Eles demonstram em humanos um papel central da interação CD40L-CD40 na resposta imune antifúngica e na ontogenia das DCs e dos neutrófilos. Por esta razão reafirmamos que terminologia síndrome de X-HIGM não transmite a verdadeira conotação do papel central da interação CD40L-CD40 no desenvolvimento da resposta imune.

Do ponto de vista translacional e clínico, acreditamos que nossos achados contribuirão para o delineamento de novas terapias que modulem a interação CD40L-CD40 no combate às IFI. Em particular, temos que considerar a curva de sobrevivência dos deficientes de CD40L a despeito da reposição de Ig (**Figura 2**) e que novas modalidades terapêuticas precisam ser investigadas. Por exemplo, estudos futuros que explorem o papel ativador do IFN- $\gamma$ , G-CSF, GM-CSF (Roilides et al., 2003) sobre DCs e fagócitos dos deficientes de CD40L, são necessários e poderão minimizar a morbidade e mortalidade consequentes a infecções fúngicas que acometem esses indivíduos.

## 6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos a partir de estudos *in vitro* com células oriundas de pacientes deficientes de CD40L nos permitem concluir que:

a) *Análise do histórico clínico:*

- ✓ A interação CD40L exerce um papel central na imunidade contra as infecções fúngicas. Além disso, a alta suscetibilidade as infecções fúngicas, incluindo aquelas aqui descritas pela primeira vez (*P. brasiliensis* e *Aspergillus sp*), sugerem que esses pacientes devem ser monitorados para esses patógenos, especialmente se eles vivem em regiões tropicais da América Latina.

b) *Análise genético-molecular:*

- ✓ As mutações identificadas foram heterogeneamente distribuídas ao longo do *CD40LG*;
- ✓ A identificação das mutações possibilitou um diagnóstico preciso da deficiência de CD40L, o aconselhamento genético das famílias estudadas e possibilitará a seleção dos futuros recém-nascidos nestas famílias estudadas. Este fato evitará no futuro, mortes prematuras dos pacientes que serão tratados profilaticamente antes de desenvolver os graves sintomas da deficiência de CD40L.

c) *Estudo das DCs:*

- ✓ Fenotipicamente as iDCs de dos pacientes deficientes de CD40L apresentaram expressão reduzida das moléculas HLA-DR, CD80 e CD86. Um defeito que pode ser revertido pelo CD40Ls exógeno. Já em resposta a estimulação com *C. albicans* e *P. brasiliensis* a expressão das moléculas HLA-DR e CD80 foram reduzidas, ao passo que a expressão das moléculas CD40, CD83, CD86 e HLA-ABC foram normais;
- ✓ Funcionalmente as DCs dos pacientes deficientes de CD40L são capazes de induzir a linfoproliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, estimular a produção das citocinas IL-17 e TGF- $\beta$  nas co-culturas de células dendríticas e linfócitos T foram normais; A indução do desenvolvimento da resposta imune celular pelas células dendríticas a qual é coordenada pelo eixo IL-12/IFN- $\gamma$  foi reduzida e a produção

de IL-4 e IL-5 (citocinas do padrão Th2) aumentada. A estimulação das DCs com CD40Ls exógenos foi capaz de reverter as falhas funcionais analisadas.

d) *Estudo dos neutrófilos*

- ✓ Os neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L ingerem normalmente os fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans* e as partículas de zymozan;
- ✓ Os neutrófilos dos pacientes apresentam reduzida atividade fungicida quando desafiados com *P. brasiliensis* mas não com *C. albicans*;
- ✓ Os neutrófilos dos pacientes possuem capacidade intrínseca de desencadear a explosão respiratória, conforme observado em resposta a estimulação com PMA. Contudo, produzem baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando estimulados com os fungos *P. brasiliensis* e *C. albicans*.
- ✓ A expressão do citocromo *b<sub>558</sub>* foi normalmente identificada na superfície dos neutrófilos;
- ✓ O *shedding* da molécula CD62L a partir da superfície celular dos neutrófilos, em resposta ao agonista do receptor dectina 1 (curdlan) foi normal. Contudo, o reduzido *shedding* da molécula CD62L em resposta ao PAM3CSK4 e zymosan sugere que a sinalização via os heterodímeros TLR1/TLR2 e TLR2/TLR6 está prejudicada nos neutrófilos.

**REFERÊNCIAS<sup>1</sup>**

Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TLMurphy KM. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol.* 2002;3:549-57.

Aghamohammadi A, Parvaneh N, Rezaei N, Moazzami K, Kashef S, Abolhassani H, Imanzadeh A, Mohammadi JHammarstrom L. Clinical and laboratory findings in hyper-IgM syndrome with novel CD40L and AICDA mutations. *J Clin Immunol.* 2009;29:769-76.

Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Fischer A, Franco JL, Geha RS, Hammarstrom L, Nonoyama S, Notarangelo LD, Ochs HD, Puck JM, Roifman CM, Seger RTang ML. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol.* 2011;2:54.

Al-Karaawi ZM, Manfredi M, Waugh AC, McCullough MJ, Jorge J, Scully CPorter SR. Molecular characterization of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17:44-9.

Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WCSpriggs MK. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med.* 1993;178:669-74.

Aldrich RA, Steinberg AGCampbell DC. Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. *Pediatrics.* 1954;13:133-9.

Aliprantis AO, Weiss DSZychlinsky A. Toll-like receptor-2 transduces signals for NF-kappa B activation, apoptosis and reactive oxygen species production. *J Endotoxin Res.* 2001;7:287-91.

Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H, Jenkins NA, Copeland NG, Bedell MA, Edelhoff S, Disteché CM, Simoneaux DKet al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science.* 1993;259:990-3.

Antachopoulos C, Walsh TJRoilides E. Fungal infections in primary immunodeficiencies. *Eur J Pediatr.* 2007;166:1099-117.

Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CRet al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature.* 1992;357:80-2.

---

<sup>1</sup> De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [Cited 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

- Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S, Bajorath J, Grosmaire LS, Stenkamp R, Neubauer M et al. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell*. 1993;72:291-300.
- Aschermann Z, Gomori E, Kovacs GG, Pal E, Simon G, Komoly S, Marodi L, Liles Z. X-linked hyper-IgM syndrome associated with a rapid course of multifocal leukoencephalopathy. *Arch Neurol*. 2007;64:273-6.
- Banchereau J, Schuler-Thurner B, Palucka AK, Schuler G. Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell*. 2001;106:271-4.
- Barbuto JA, Ensina LF, Neves AR, Bergami-Santos P, Leite KR, Marques R, Costa F, Martins SC, Camara-Lopes LHB, Zaid AC. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53:1111-8.
- Barrozo LV, Mendes RP, Marques SA, Benard G, Silva MEB, Bagagli E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *Int J Epidemiol*. 2009;38:1642-9.
- Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Rossi G, Mambula SS, Vecchi A, Mantovani A, Levitz SM, Romani L. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol*. 2004;172:3059-69.
- Berrington JE, Flood TJ, Abinun M, Galloway AC, Cant AJ. Unsuspected *Pneumocystis carinii* pneumonia at presentation of severe primary immunodeficiency. *Arch Dis Child*. 2000;82:144-7.
- Berton G, Zeni L, Cassatella MA, Rossi F. Gamma interferon is able to enhance the oxidative metabolism of human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986;138:1276-82.
- Bjorck P, Banchereau J, Flores-Romo L. CD40 ligation counteracts Fas-induced apoptosis of human dendritic cells. *Int Immunol*. 1997;9:365-72.
- Blumental S, Mouy R, Mahlaoui N, Bougnoux ME, Debre M, Beaute J, Lortholary O, Blanche S, Fischer A. Invasive mold infections in chronic granulomatous disease: a 25-year retrospective survey. *Clin Infect Dis*. 2011;53:e159-69.
- Bousfiha A, Picard C, Boisson-Dupuis S, Zhang SY, Bustamante J, Puel A, Jouanguy E, Ailal F, El-Baghdadi J, Abel LC, Casanova JL. Primary immunodeficiencies of protective immunity to primary infections. *Clin Immunol*. 2010;135:204-9.
- Bozza S, Montagnoli C, Gaziano R, Rossi G, Nkwanyuo G, Bellocchio S, Romani L. Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi. *Vaccine*. 2004;22:857-64.



Brown GD. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:1-21.

Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics.* 1952;9:722-8.

Burtin P. [An example of atypical agammaglobulinemia (a case of severe hypogammaglobulinemia with increase of the beta-2 macroglobulin)]. *Rev Fr Etud Clin Biol.* 1961;6:286-9.

Cabral-Marques O, Arslanian C, Ramos RN, Morato M, Schimke L, Soeiro Pereira PV, Jancar S, Ferreira JF, Weber CW, Kuntze G, Rosario-Filho NA, Costa Carvalho BT, Bergami-Santos PC, Hackett MJ, Ochs HD, Torgerson TR, Barbuto JACondino-Neto A. Dendritic cells from X-linked hyper-IgM patients present impaired responses to *Candida albicans* and *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Allergy Clin Immunol.* 2012b;129:778-86.

Cabral-Marques O, Schimke LF, Pereira PV, Falcai A, de Oliveira JB, Hackett MJ, Errante PR, Weber CW, Ferreira JF, Kuntze G, Rosario-Filho NA, Ochs HD, Torgerson TR, Carvalho BTCondino-Neto A. Expanding the clinical and genetic spectrum of human CD40L deficiency: the occurrence of paracoccidioidomycosis and other unusual infections in Brazilian patients. *J Clin Immunol.* 2012a;32:212-20.

Carbone E, Ruggiero G, Terrazzano G, Palomba C, Manzo C, Fontana S, Spits H, Karre KZappacosta S. A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *J Exp Med.* 1997;185:2053-60.

Casadevall A, Feldmesser MPirofski LA. Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5:386-91.

Cech P, Stalder H, Widmann JJ, Rohner AMiescher PA. Leukocyte myeloperoxidase deficiency and diabetes mellitus associated with *Candida albicans* liver abscess. *Am J Med.* 1979;66:149-53.

Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia AAiber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med.* 1996;184:747-52.

Chakir H, Wang H, Lefebvre DE, Webb JScott FW. T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3. *J Immunol Methods.* 2003;278:157-69.

Chaudhuri J, Khuong CAIt FW. Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature.* 2004;430:992-8.

Chomczynski PSacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-9.

- Cocks BG, de Waal Malefyt R, Galizzi JP, de Vries JE, Aversa G. IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. *Int Immunol*. 1993;5:657-63.
- Colombo AL, Tobon A, Restrepo A, Queiroz-Telles FN, Ucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol*. 2011;49:785-98.
- Cunningham-Rundles C. Key aspects for successful immunoglobulin therapy of primary immunodeficiencies. *Clin Exp Immunol*. 2011;164 Suppl 2:16-9.
- Dadgostar H, Zarnegar B, Hoffmann A, Qin XF, Truong U, Rao G, Baltimore D, Cheng G. Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:1497-502.
- Dang PM, Dewas C, Gaudry M, Fay M, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidalo MA, El Benna J. Priming of human neutrophil respiratory burst by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) involves partial phosphorylation of p47(phox). *J Biol Chem*. 1999;274:20704-8.
- Dantas AS, Andrade RV, de Carvalho MJ, Felipe MSC, Campos EG. Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*: assessing catalase and cytochrome c peroxidase. *Mycol Res*. 2008;112:747-56.
- de Almeida AC, Cabral Marques O, Arslanian C, Condino-Neto A, Ximenes VF. 4-fluoro-2-methoxyphenol, an apocynin analog with enhanced inhibitory effect on leukocyte oxidant production and phagocytosis. *Eur J Pharmacol*. 2011;660:445-53.
- de Oliveira-Junior EB, Bustamante J, Newburger PE, Condino-Neto A. The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scand J Immunol*. 2011;73:420-7.
- Demicheli MC, Goes AM, de Andrade AS. Ultrastructural changes in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells attenuated by gamma irradiation. *Mycoses*. 2007;50:397-402.
- Demicheli MC, Reis BS, Goes AM, de Andrade AS. *Paracoccidioides brasiliensis*: attenuation of yeast cells by gamma irradiation. *Mycoses*. 2006;49:184-9.
- DiSanto JP, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Fischer A, de Saint Basile G. CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature*. 1993;361:541-3.
- Doni A, Michela M, Bottazzi B, Peri G, Valentino S, Polentarutti N, Garlanda C, Mantovani A. Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma. *J Leukoc Biol*. 2006;79:797-802.
- Edry EM, Melamed D. Class switch recombination: a friend and a foe. *Clin Immunol*. 2007;123:244-51.

El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidal MA, Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2005;53:199-206.

Ermert D, Zychlinsky A, Urban C. Fungal and bacterial killing by neutrophils. *Methods Mol Biol*. 2009;470:293-312.

Ezekowitz RA, Sieff CA, Dinauer MC, Nathan DG, Orkin SH, Newburger PE. Restoration of phagocyte function by interferon-gamma in X-linked chronic granulomatous disease occurs at the level of a progenitor cell. *Blood*. 1990;76:2443-8.

Ferrari S, Giliani S, Insalaco A, Al-Ghonaïm A, Soresina AR, Loubser M, Avanzini MA, Marconi M, Badolato R, Ugazio AG, Levy Y, Catalan N, Durandy A, Tbakhi A, Notarangelo LD, Plebani A. Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:12614-9.

Fleming RV, Walsh TJ, Anaissie EJ. Emerging and less common fungal pathogens. *Infect Dis Clin North Am*. 2002;16:915-33, vi-vii.

Flores-Romo L, Björck P, Duvert V, van Kooten C, Saeland SB,ANCHEREAU J. CD40 ligation on human cord blood CD34+ hematopoietic progenitors induces their proliferation and differentiation into functional dendritic cells. *J Exp Med*. 1997;185:341-9.

Fontana S, Moratto D, Mangal S, De Francesco M, Vermi W, Ferrari S, Facchetti F, Kutukculer N, Fiorini C, Duse M, Das PK, Notarangelo LD, Plebani A, Badolato R. Functional defects of dendritic cells in patients with CD40 deficiency. *Blood*. 2003;102:4099-106.

Freudenthal PS, Steinman RM. The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:7698-702.

Fries KM, Sempowski GD, Gaspari AA, Blieden T, Looney RJ, Phipps RP. CD40 expression by human fibroblasts. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995;77:42-51.

Fuleihan R, Ramesh N, Loh R, Jabara H, Rosen RS, Chatila T, Fu SM, Stamenkovic IG, Geha RS. Defective expression of the CD40 ligand in X chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:2170-3.

Galy AH, Spits H. CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *J Immunol*. 1992;149:775-82.

Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*. 2003;197:1107-17.

Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, Salustri A, De Acetis M, Nota R, Maccagno A, Riva F, Bottazzi B, Peri G, Doni A, Vago L, Botto M, De Santis R, Carminati P, Siracusa G, Altruda F, Vecchi A, Romani LMantovani A. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature*. 2002;420:182-6.

Gaspari AA, Sempowski GD, Chess P, Gish JPhipps RP. Human epidermal keratinocytes are induced to secrete interleukin-6 and co-stimulate T lymphocyte proliferation by a CD40-dependent mechanism. *Eur J Immunol*. 1996;26:1371-7.

Gauchat JF, Henchoz S, Fattah D, Mazzei G, Aubry JP, Jomotte T, Dash L, Page K, Solari R, Aldebert Det al. CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. *Eur J Immunol*. 1995;25:863-5.

Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G, Aubry JP, Brunner T, Blasey H, Life P, Talabot D, Flores-Romo L, Thompson Jet al. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature*. 1993;365:340-3.

Gaweco AS, Wiesner RH, Yong S, Krom R, Porayko M, Chejfec G, McClatchey KDVan Thiel DH. CD40L (CD154) expression in human liver allografts during chronic ductopenic rejection. *Liver Transpl Surg*. 1999;5:1-7.

Goihman-Yahr M, Essenfled-Yahr E, de Albornoz MC, Yarzabal L, de Gomez MH, San Martin B, Ocanto A, Gil FConvit J. Defect of in vitro digestive ability of polymorphonuclear leukocytes in paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*. 1980;28:557-66.

Gordon J, Millsum MJ, Guy GRLedbetter JA. Resting B lymphocytes can be triggered directly through the CDw40 (Bp50) antigen. A comparison with IL-4-mediated signaling. *J Immunol*. 1988;140:1425-30.

Graf D, Korthauer U, Mages HW, Senger GKroczek RA. Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. *Eur J Immunol*. 1992;22:3191-4.

Graf D, Muller S, Korthauer U, van Kooten C, Weise CKroczek RA. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol*. 1995;25:1749-54.

Grammer AC, Bergman MC, Miura Y, Fujita K, Davis LSLipsky PE. The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses. *J Immunol*. 1995;154:4996-5010.

Guerra-Maranhao MC, Costa-Carvalho BT, Nudelman V, Barros-Nunes P, Carneiro-Sampaio MM, Arslanian C, Nagao-Dias ATSoledade D. Response to polysaccharide antigens in patients with ataxia-telangiectasia. *J Pediatr (Rio J)*. 2006;82:132-6.

Hage CA, Goldman MWheat LJ. Mucosal and invasive fungal infections in HIV/AIDS. *Eur J Med Res*. 2002;7:236-41.

- Hasui M, Hirabayashi Y, Kobayashi Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. *J Immunol Methods*. 1989;117:53-8.
- Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus GK, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998;391:591-4.
- Hirohata S, Jelinek D, Lipsky PE. T cell-dependent activation of B cell proliferation and differentiation by immobilized monoclonal antibodies to CD3. *J Immunol*. 1988;140:3736-44.
- Hollenbaugh D, Grosmaire LS, Kullas CD, Chalupny NJ, Braesch-Andersen S, Noelle RJ, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *EMBO J*. 1992;11:4313-21.
- Holmes B, Page AR, Good RA. Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J Clin Invest*. 1967;46:1422-32.
- Hostoffer RW, Berger M, Clark HT, Schreiber JR. Disseminated *Histoplasma capsulatum* in a patient with hyper IgM immunodeficiency. *Pediatrics*. 1994;94:234-6.
- Iezzi G, Sonderegger I, Ampenberger F, Schmitz N, Marsland BJ, Kopf M. CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:876-81.
- Imai K, Morio T, Zhu Y, Jin Y, Itoh S, Kajiwara M, Yata J, Mizutani S, Ochs HD, Nonoyama S. Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood*. 2004;103:456-64.
- Imai K, Slupphaug G, Lee WI, Revy P, Nonoyama S, Catalan N, Yel L, Forveille M, Kavli B, Krokan HE, Ochs HD, Fischer AD, Durandy A. Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol*. 2003;4:1023-8.
- Jain A, Atkinson TP, Lipsky PE, Slater JE, Nelson DL, Strober W. Defects of T-cell effector function and post-thymic maturation in X-linked hyper-IgM syndrome. *J Clin Invest*. 1999;103:1151-8.
- Jann NJ, Schmalzer M, Ferracin F, Landmann R. TLR2 enhances NADPH oxidase activity and killing of *Staphylococcus aureus* by PMN. *Immunol Lett*. 2011;135:17-23.
- Jo EK, Kim HS, Lee MY, Iseki M, Lee JH, Song CH, Park JK, Hwang TJ, Kook H. X-linked hyper-IgM syndrome associated with *Cryptosporidium parvum* and *Cryptococcus neoformans* infections: the first case with molecular diagnosis in Korea. *J Korean Med Sci*. 2002;17:116-20.

- Kang TJChae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001;31:53-8.
- Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WCPober JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:4342-6.
- Katz F, Hinshelwood S, Rutland P, Jones A, Kinnon CMorgan G. Mutation analysis in CD40 ligand deficiency leading to X-linked hypogammaglobulinemia with hyper IgM syndrome. *Hum Mutat.* 1996;8:223-8.
- Katzman SD, Gallo E, Hoyer KKAbbas AK. Differential requirements for Th1 and Th17 responses to a systemic self-antigen. *J Immunol.* 2011;186:4668-73.
- Kavli B, Andersen S, Otterlei M, Liabakk NB, Imai K, Fischer A, Durandy A, Krokan HESlupphaug G. B cells from hyper-IgM patients carrying UNG mutations lack ability to remove uracil from ssDNA and have elevated genomic uracil. *J Exp Med.* 2005;201:2011-21.
- Kennedy MK, Picha KS, Fanslow WC, Grabstein KH, Alderson MR, Clifford KN, Chin WAMohler KM. CD40/CD40 ligand interactions are required for T cell-dependent production of interleukin-12 by mouse macrophages. *Eur J Immunol.* 1996;26:370-8.
- Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, Giese T, Endres SHartmann G. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 2003;170:4465-74.
- Kesh S, Mensah NY, Peterlongo P, Jaffe D, Hsu K, M VDB, O'Reilly R, Pamer E, Satagopan JPapanicolaou GA. TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1062:95-103.
- Khan SY, Kelher MR, Heal JM, Blumberg N, Boshkov LK, Phipps R, Gettings KF, McLaughlin NJSilliman CC. 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.* 2006;108:2455-62.
- Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo AHollenbaugh D. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J Immunol.* 1995;155:4917-25.
- Kingeter LMLin X. C-type lectin receptor-induced NF-kappaB activation in innate immune and inflammatory responses. *Cell Mol Immunol.* 2012;9:105-12.
- Kobayashi SDeLeo FR. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2009;1:309-33.
- Koho H, Paulie S, Ben-Aissa H, Jonsdottir I, Hansson Y, Lundblad MLPerlmann P. Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the

human urinary bladder. I. Determination of the selectivity of six antibodies by cell ELISA and immunofluorescence. *Cancer Immunol Immunother.* 1984;17:165-72.

Kolotila MPDiamond RD. Effects of neutrophils and in vitro oxidants on survival and phenotypic switching of *Candida albicans* WO-1. *Infect Immun.* 1990;58:1174-9.

Korthauer U, Graf D, Mages HW, Briere F, Padayachee M, Malcolm S, Ugazio AG, Notarangelo LD, Levinsky RJKroczeck RA. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature.* 1993;361:539-41.

Kuhns DB, Alvord WG, Heller T, Feld JJ, Pike KM, Marciano BE, Uzel G, DeRavin SS, Priel DA, Soule BP, Zarembek KA, Malech HL, Holland SMGallin JI. Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med.* 2010;363:2600-10.

Kurokawa CS, Lopes CR, Sugizaki MF, Kuramae EE, Franco MFPeracoli MT. Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2005;47:257-62.

Kurt-Jones EA, Mandell L, Whitney C, Padgett A, Gosselin K, Newburger PEFinberg RW. Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood.* 2002;100:1860-8.

Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lotvall J, Sjostrand M, Gruenert DC, Skoogh BELinden A. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol.* 1999;162:2347-52.

Lazaar AL, Amrani Y, Hsu J, Panettieri RA, Jr., Fanslow WC, Albelda SMPure E. CD40-mediated signal transduction in human airway smooth muscle. *J Immunol.* 1998;161:3120-7.

Lehrer RI. Functional aspects of a second mechanism of candidacidal activity by human neutrophils. *J Clin Invest.* 1972;51:2566-72.

Lekstrom-Himes JAGallin JI. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med.* 2000;343:1703-14.

Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C, Fischer A, Tovo P, Bordignon P, Resnick I, Fasth A, Baer M, Gomez L, Sanders EA, Tabone MD, Plantaz D, Etzioni A, Monafò V, Abinun M, Hammarstrom L, Abrahamsen T, Jones A, Finn A, Klemola T, DeVries E, Sanal O, Peitsch MCNotarangelo LD. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *J Pediatr.* 1997;131:47-54.

Lutgens E, Cleutjens KB, Heeneman S, Koteliansky VE, Burkly LCDaemen MJ. Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:7464-9.

Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JSLibby P. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth

muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:1931-6.

Manelli-Oliveira RMachado-Santelli GM. Cytoskeletal and nuclear alterations in human lung tumor cells: a confocal microscope study. *Histochem Cell Biol*. 2001;115:403-11.

Manis JP, Tian MAlt FW. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol*. 2002;23:31-9.

Marcinkowski M, Bauer K, Stoltenburg-Didinger G, Vogel MVersmold H. Fatal aspergillosis with brain abscesses in a neonate with DiGeorge syndrome. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19:1214-6.

Matute JD, Arias AA, Wright NA, Wrobel I, Waterhouse CC, Li XJ, Marchal CC, Stull ND, Lewis DB, Steele M, Kellner JD, Yu W, Meroueh SO, Nauseef WMDinauer MC. A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood*. 2009;114:3309-15.

Mavroudi IPapadaki HA. The role of CD40/CD40 ligand interactions in bone marrow granulopoiesis. *ScientificWorldJournal*. 2011;11:2011-9.

McEwen JG, Bedoya V, Patino MM, Salazar MERestrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol*. 1987;25:165-75.

McEwen JG, Sugar AM, Brummer E, Restrepo AStevens DA. Toxic effect of products of oxidative metabolism on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Microbiol*. 1984;18:423-8.

McWhirter SM, Pullen SS, Holton JM, Crute JJ, Kehry MRAIber T. Crystallographic analysis of CD40 recognition and signaling by human TRAF2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:8408-13.

Meloni-Bruneri LH, Campa A, Abdalla DS, Calich VL, Lenzi HL, Burger E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. *J Leukoc Biol*. 1996;59:526-33.

Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Normas para pesquisa envolvendo seres humanos (Res. CNS n.o 196/96 e outras). 2003;2. ed. ampl;1.<sup>a</sup> reimpressão.

Morejon KM, Machado AAMartinez R. Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: a case-control study. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80:359-66.

Netea MG, Meer JW, Verschueren IKullberg BJ. CD40/CD40 ligand interactions in the host defense against disseminated *Candida albicans* infection: the role of macrophage-derived nitric oxide. *Eur J Immunol*. 2002;32:1455-63.



- Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, Ledbetter JAAruffo A. 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*. 1992;89:6550-4.
- Notarangelo LD, Lanzi G, Peron SDurandy A. Defects of class-switch recombination. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:855-64.
- Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobon AM, Restrepo AColombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis*. 2010;51:561-70.
- O'Gorman MR, Zaas D, Paniagua M, Corrochano V, Scholl PRPachman LM. Development of a rapid whole blood flow cytometry procedure for the diagnosis of X-linked hyper-IgM syndrome patients and carriers. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;85:172-81.
- O'Sullivan BThomas R. Recent advances on the role of CD40 and dendritic cells in immunity and tolerance. *Curr Opin Hematol*. 2003;10:272-8.
- Ohkawara Y, Lim KG, Xing Z, Glibetic M, Nakano K, Dolovich J, Croitoru K, Weller PFJordana M. CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. *J Clin Invest*. 1996;97:1761-6.
- Paganelli R, Scala E, Ansotegui IJ, Ausiello CM, Halapi E, Fanales-Belasio E, D'Offizi G, Mezzaroma I, Pandolfi F, Fiorilli M, Cassone AAiuti F. CD8+ T lymphocytes provide helper activity for IgE synthesis in human immunodeficiency virus-infected patients with hyper-IgE. *J Exp Med*. 1995;181:423-8.
- Pappas PG. Opportunistic fungi: a view to the future. *Am J Med Sci*. 2010;340:253-7.
- Pedroza LA, Kumar V, Sanborn KB, Mace EM, Niinikoski H, Nadeau K, Vasconcelos Dde M, Perez E, Jyonouchi S, Jyonouchi H, Banerjee PP, Ruuskanen O, Condino-Neto AOrange JS. Autoimmune regulator (AIRE) contributes to Dectin-1-induced TNF-alpha production and complexes with caspase recruitment domain-containing protein 9 (CARD9), spleen tyrosine kinase (Syk), and Dectin-1. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:464-72, 472 e1-3.
- Peron S, Metin A, Gardes P, Alyanakian MA, Sheridan E, Kratz CP, Fischer ADurandy A. Human PMS2 deficiency is associated with impaired immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med*. 2008;205:2465-72.
- Pfaller MADiekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36:1-53.
- Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lo P, Terry N, Reid PSFord RJ. A CD40 Signalosome anchored in lipid rafts leads to constitutive activation of NF-kappaB and autonomous cell growth in B cell lymphomas. *Immunity*. 2002;16:37-50.
- Picard C, Casanova JLPuel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or IkappaBalph deficiency. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24:490-7.

Pina A, Saldiva PH, Restrepo LE, Calich VL. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *J Leukoc Biol.* 2006;79:1202-13.

Pinchuk LM, Klaus SJ, Magaletti DM, Pinchuk GV, Norsen J, Clark EA. Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation. *J Immunol.* 1996;157:4363-70.

Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, Migaud M, Israel L, Chrabieh M, Audry M, Gumbleton M, Toulon A, Bodemer C, El-Baghdadi J, Whitters M, Paradis T, Brooks J, Collins M, Wolfman NM, Al-Muhsen S, Galicchio M, Abel L, Picard C, Casanova JL. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science.* 2011;332:65-8.

Pullen SS, Dang TT, Crute JJ, Kehry MR. CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs. *J Biol Chem.* 1999;274:14246-54.

© QIAGEN. 2009, all rights reserved.

Available at: <https://www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=90>

Renner ED, Rylaarsdam S, Anover-Sombke S, Rack AL, Reichenbach J, Carey JC, Zhu Q, Jansson AF, Barboza J, Schimke LF, Leppert MF, Getz MM, Seger RA, Hill HR, Belohradsky BH, Torgerson T, Ochs HD. Novel signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations, reduced T(H)17 cell numbers, and variably defective STAT3 phosphorylation in hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122:181-7.

Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O, Catalan N, Forveille M, Dufourcq-Labreze R, Gennery A, Tezcan I, Ersoy F, Kayserili H, Ugazio AG, Brousse N, Muramatsu M, Notarangelo LD, Kinoshita K, Honjo T, Fischer A, Durandy A. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell.* 2000;102:565-75.

Rezaei N, Moazzami K, Aghamohammadi A, Klein C. Neutropenia and primary immunodeficiency diseases. *Int Rev Immunol.* 2009;28:335-66.

Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* 1999;283:1183-6.

Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peracoli M, Soares AM. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol.* 2007;45:27-33.

Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Kortjens HC. Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends Microbiol.* 2004;12:44-9.

- Roesler J, Segerer F, Morbach H, Kleinert S, Thieme S, Rosen-Wolff ALiese JG. P67-phox (NCF2) lacking exons 11 and 12 is functionally active and leads to an extremely late diagnosis of chronic granulomatous disease (CGD). *PLoS One*. 2012;7:e34296.
- Roilides E, Lyman CA, Panagopoulou PChanock S. Immunomodulation of invasive fungal infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2003;17:193-219.
- Roilides E, Walsh TJ, Pizzo PARubin M. Granulocyte colony-stimulating factor enhances the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils. *J Infect Dis*. 1991;163:579-83.
- Romani L. The T cell response against fungal infections. *Curr Opin Immunol*. 1997;9:484-90.
- Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:1-23.
- Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:275-88.
- Romani L, Bistoni FPucetti P. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends Microbiol*. 2002;10:508-14.
- Rothe G, Oser AValet G. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften*. 1988;75:354-5.
- Rothman P, Li SCAIt FW. The molecular events in heavy chain class-switching. *Semin Immunol*. 1989;1:65-77.
- Saeland S, Duvert V, Caux C, Pandrau D, Favre C, Valle A, Durand I, Charbord P, de Vries JBanchereau J. Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD34+ hematopoietic cells. *Exp Hematol*. 1992;20:24-33.
- Schrader CE, Linehan EK, Mochegova SN, Woodland RTStavnezer J. Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG. *J Exp Med*. 2005;202:561-8.
- Schubert LA, King G, Cron RQ, Lewis DB, Aruffo AHollenbaugh D. The human gp39 promoter. Two distinct nuclear factors of activated T cell protein-binding elements contribute independently to transcriptional activation. *J Biol Chem*. 1995;270:29624-7.
- Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke MSeelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010;7:575-6.
- Sender LY, Gibbert K, Suezzer Y, Radeke HH, Kalinke UWaibler Z. CD40 ligand-triggered human dendritic cells mount interleukin-23 responses that are further enhanced by danger signals. *Mol Immunol*. 2010;47:1255-61.

- Seyama K, Nonoyama S, Gangsaas I, Hollenbaugh D, Pabst HF, Aruffo AOchs HD. Mutations of the CD40 ligand gene and its effect on CD40 ligand expression in patients with X-linked hyper IgM syndrome. *Blood*. 1998;92:2421-34.
- Sifuentes-Osornio J, Corzo-Leon DEPonce-de-Leon LA. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep*. 2012;6:23-34.
- Smalley DM Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med*. 2005;9:255-66.
- Song Z, Jin R, Yu S, Nanda A, Granger DN Li G. Crucial role of CD40 signaling in vascular wall cells in neointimal formation and vascular remodeling after vascular interventions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;32:50-64.
- Sperling A Bluestone JA. The complexities of T-cell co-stimulation: CD28 and beyond. *Immunol Rev*. 1996;153:155-82.
- Stavnezer J. Molecular processes that regulate class switching. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000;245:127-68.
- Steinman RM, Lustig DS Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J Exp Med*. 1974;139:1431-45.
- Subauste CS, Wessendarp M, Sorensen R U Leiva LE. CD40-CD40 ligand interaction is central to cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii*: patients with hyper IgM syndrome have a defective type 1 immune response that can be restored by soluble CD40 ligand trimer. *J Immunol*. 1999;162:6690-700.
- Suzuki H, Takahashi Y Miyajima H. Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating X-linked hyper-IgM syndrome in an adult. *Intern Med*. 2006;45:1187-8.
- Takenaka H, Maruo S, Yamamoto N, Wysocka M, Ono S, Kobayashi M, Yagita H, Okumura K, Hamaoka T, Trinchieri G Fujiwara H. Regulation of T cell-dependent and -independent IL-12 production by the three Th2-type cytokines IL-10, IL-6, and IL-4. *J Leukoc Biol*. 1997;61:80-7.
- Tan JKO'Neill HC. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J Leukoc Biol*. 2005;78:319-24.
- Taylor RM, Baniulis D, Burritt JB, Gripentrog JM, Lord CI, Riesselman MH, Maaty WS, Bothner BP, Angel TE, Dratz EA, Linton GF, Malech HL Jesaitis AJ. Analysis of human phagocyte flavocytochrome b(558) by mass spectrometry. *J Biol Chem*. 2006;281:37045-56.
- Thompson HL Wilton JM. Interaction and intracellular killing of *Candida albicans* blastospores by human polymorphonuclear leucocytes, monocytes and monocyte-derived macrophages in aerobic and anaerobic conditions. *Clin Exp Immunol*. 1992;87:316-21.

- Trinchieri G. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunol Today*. 1993;14:335-8.
- Upham JW, Lee PT, Holt BJ, Heaton T, Prescott SL, Sharp MJ, Sly PD, Holt PG. Development of interleukin-12-producing capacity throughout childhood. *Infect Immun*. 2002;70:6583-8.
- Valent P, Majdic O, Maurer D, Bodger M, Muhm MB, Bettelheim P. Further characterization of surface membrane structures expressed on human basophils and mast cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1990;91:198-203.
- van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, van der Meer JW, Gow NA, Netea MG. Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11:305-12.
- Vautier S, Sousa Mda G, Brown GD. C-type lectins, fungi and Th17 responses. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21:405-12.
- Verstrepen L, Bekaert T, Chau TL, Tavernier J, Chariot A, Beyaert R. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:2964-78.
- Villamon E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE, Fradelizi D, Gil ML. Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes Infect*. 2004;6:1-7.
- Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol*. 2001;166:249-55.
- von Bernuth H, Ku CL, Rodriguez-Gallego C, Zhang S, Garty BZ, Marodi L, Chapel H, Chrabieh M, Miller RL, Picard C, Puel AC, Casanova JL. A fast procedure for the detection of defects in Toll-like receptor signaling. *Pediatrics*. 2006;118:2498-503.
- von Vietinghoff S, Ley K. Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *J Immunol*. 2008;181:5183-8.
- Vonderheide RH. Prospect of targeting the CD40 pathway for cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2007;13:1083-8.
- Wagner DH, Jr., Stout R, Suttles J. Role of the CD40-CD40 ligand interaction in CD4+ T cell contact-dependent activation of monocyte interleukin-1 synthesis. *Eur J Immunol*. 1994;24:3148-54.
- Walsh TJ, Hiemenz JW, Anaissie E. Recent progress and current problems in treatment of invasive fungal infections in neutropenic patients. *Infect Dis Clin North Am*. 1996;10:365-400.
- Wiederhold NP, Najvar LK, Bocanegra RA, Kirkpatrick WR, Patterson TF. Caspofungin dose escalation for invasive candidiasis due to resistant *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:3254-60.

- Winkelstein JA, Marino MC, Ochs H, Fuleihan R, Scholl PR, Geha R, Stiehm ER, Conley ME. The X-linked hyper-IgM syndrome: clinical and immunologic features of 79 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2003;82:373-84.
- Xia Y, Dai J, Lu P, Huang Y, Zhu Y, Zhang X. Distinct effect of CD40 and TNF-signaling on the chemokine/chemokine receptor expression and function of the human monocyte-derived dendritic cells. *Cell Mol Immunol*. 2008;5:121-31.
- Yanagawa Y, Onoe K. Distinct regulation of CD40-mediated interleukin-6 and interleukin-12 productions via mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB-inducing kinase in mature dendritic cells. *Immunology*. 2006;117:526-35.
- Yellin MJ, Thienel U. T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: potential roles of CD154-CD40 interactions and costimulatory molecules. *Curr Rheumatol Rep*. 2000;2:24-31.
- Yim JJ, Ding L, Schaffer AA, Park GY, Shim YS, Holland SM. A microsatellite polymorphism in intron 2 of human Toll-like receptor 2 gene: functional implications and racial differences. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004;40:163-9.
- Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, Segal D, Sancho-Shimizu V, Lorenzo L, Puel A, Picard C, Chappier A, Plancoulaine S, Titeux M, Cognet C, von Bernuth H, Ku CL, Casrouge A, Zhang XX, Barreiro L, Leonard J, Hamilton C, Lebon P, Heron B, Vallee L, Quintana-Murci L, Hovnanian A, Rozenberg F, Vivier E, Geissmann F, Tardieu M, Abel LC, Casanova JL. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science*. 2007;317:1522-7.
- Zhu J, Guo L, Watson CJ, Hu-Li J, Paul WE. Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J Immunol*. 2001;166:7276-81.

**APÊNDICE**

# Expanding the Clinical and Genetic Spectrum of Human CD40L Deficiency: The Occurrence of Paracoccidioidomycosis and Other Unusual Infections in Brazilian Patients

Otavio Cabral-Marques · Lena-Friederike Schimke · Paulo Vítor Soeiro Pereira · Angela Falcai · João Bosco de Oliveira · Mary J. Hackett · Paolo Ruggero Errante · Cristina Worm Weber · Janaíra Fernandes Ferreira · Gisele Kuntze · Nelson Augusto Rosário-Filho · Hans D. Ochs · Troy R. Torgerson · Beatriz Tavares Costa Carvalho · Antonio Condino-Neto

Received: 16 August 2011 / Accepted: 16 November 2011 / Published online: 23 December 2011  
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

**Abstract** CD40 ligand (CD40L) deficiency or X-linked hyper-IgM syndrome (X-HIGM) is a well-described primary immunodeficiency in which *Pneumocystis jiroveci* pneumonia is a common clinical feature. We have identified an unusual high incidence of fungal infections and other not yet described infections in a cohort of 11 X-HIGM patients from nine unrelated Brazilian families. Among these, we describe the first case of paracoccidioidomycosis (PCM) in

X-HIGM. The molecular genetic analysis of CD40L was performed by gene sequencing and evaluation of CD40L protein expression. Nine of these 11 patients (82%) had fungal infections. These included fungal species common to CD40L deficiency (*P. jiroveci* and *Candida albicans*) as well as *Paracoccidioides brasiliensis*. One patient presented with PCM at age 11 years and is now doing well at 18 years of age. Additionally, one patient presented with a

O. Cabral-Marques · L.-F. Schimke · P. V. S. Pereira · A. Falcai · P. R. Errante · A. Condino-Neto (✉)  
Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences,  
University of São Paulo,  
1730 Lineu Prestes Avenue,  
São Paulo, São Paulo ZIP 05508-000, Brazil  
e-mail: condino@icb.usp.br

M. J. Hackett · H. D. Ochs · T. R. Torgerson  
Department of Pediatrics,  
University of Washington School of Medicine and Seattle  
Children's Hospital,  
Seattle, WA, USA

J. B. de Oliveira  
Department of Laboratory Medicine, Clinical Center,  
National Institutes of Health,  
Bethesda, MD, USA

C. W. Weber  
Pediatric Allergy & Immunology Clinic,  
Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

J. F. Ferreira  
Albert Sabin Hospital,  
Fortaleza, Ceará, Brazil

G. Kuntze  
Pequeno Príncipe Hospital,  
Curitiba, Paraná, Brazil

N. A. Rosário-Filho  
Department of Pediatrics,  
Federal University of Paraná Medical School,  
Curitiba, Paraná, Brazil

B. T. C. Carvalho  
Division of Allergy and Clinical Immunology and Rheumatology,  
Department of Pediatrics,  
Federal University of São Paulo Medical School,  
São Paulo, São Paulo, Brazil



simultaneous infection with *Klebsiella* and *Acinetobacter*, and one with condyloma caused by human papilloma virus. Molecular analysis revealed four previously described CD40L mutations, two novel missense mutations (c.433 T>G and c.476 G>C) resulting in the absence of CD40L protein expression by activated CD4<sup>+</sup> cells and one novel insertion (c.484\_485insAA) within the TNFH domain leading to a frame shift and premature stop codon. These observations demonstrated that the susceptibility to fungal infections in X-HIGM extends beyond those typically associated with X-HIGM (*P. jiroveci* and *C. albicans*) and that these patients need to be monitored for those pathogens.

**Keywords** *Paracoccidioides brasiliensis* · CD40 ligand · primary immunodeficiency · X-linked hyper-IgM syndrome

## Introduction

Congenital susceptibility to fungal infections is most frequently observed in primary immunodeficiency disorders associated with deficiency or dysfunction of T cells or phagocytes (APECED, STAT1, IL-17R, and STAT3 deficiencies) [1–4]. Mutations in CD40 ligand (CD40L; CD154, MIM #300386), a surface protein expressed by activated CD4<sup>+</sup> T cell deficiency, is a well-defined T cell defect that causes the X-linked hyper-IgM syndrome (X-HIGM) [5–9]. In addition to extracellular and intracellular bacterial infections, patients with X-HIGM are susceptible to fungal infections, particularly *Pneumocystis jiroveci* pneumonia, and infections with *Candida albicans*, *Cryptococcus* and *Histoplasma* [10–12]. Interestingly, the majority of these infections occur within the first 5 years of life and are much less common thereafter [11–13].

In humans, the effective immune response against fungi is dependent on both innate and adaptive responses. Appropriate activation of phagocytic cells and particularly the production of reactive oxygen intermediate by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase are important for the control of fungal infections [14]. The activation of this system is coordinated by the interleukin (IL)-12/interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) axis, which is triggered by CD40/CD40L interaction [15] and mediated by Th1 cells. On the other hand, the humoral immune response orchestrated by antibodies plays an essential role in the defense against extracellular bacteria as illustrated by the increased susceptibility to these infections by patients with predominantly antibody deficiencies [16]. In this context, the CD40–CD40L interaction plays an important role by facilitating the expression of activation-induced cytidine deaminase and other proteins involved in the class switch recombination and somatic hypermutation of immunoglobulin (Ig) variable region genes [17].

Here we report the clinical features and molecular defects of a cohort of X-HIGM patients identified in Brazil, with a high incidence of fungal infections (82%) compared to the incidence described in Europe and North America (34% to 57%) [11, 13]. The spectrum of fungal infections in our patients includes species that have never been described in X-HIGM such as paracoccidioidomycosis (PCM). In addition, we observed a patient who developed sepsis by being simultaneously infected with *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* sp. and a case of condyloma caused by human papilloma virus (HPV) and extended the number of known CD40L mutations by four.

## Methods

**Subjects** Between 2006 and 2011, we identified 11 patients from nine unrelated families with CD40L deficiency in our clinic. The criteria for diagnosing CD40L deficiency complied with the International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies [16], based on characteristic clinical criteria and confirmed by the lack of CD40L expression by activated T cells and the presence of mutation in the CD40L gene. Informed consent was obtained from all patients or their parents, and blood was collected under institutional guidelines. The study was approved by the Ethics Committee at the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, according to the Helsinki Convention and the Brazilian Department of Health.

**Cell Culture and Activation** Peripheral blood mononuclear cells were isolated from heparinized blood after Ficoll-Hypaque sedimentation and cultured ( $1 \times 10^6$  cells/well) for 5 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in flat-bottomed microtiter plates in a final volume of 200  $\mu$ l of RPMI 1640 (Gibco Laboratories), supplemented with 10% fetal calf serum, 1% glutamine, and antibiotics, with or without phorbol myristate acetate (15 ng/ml, Sigma Laboratories, St. Louis, MO, USA) and calcium ionophore (ionomycin, 300 ng/ml, Sigma Laboratories).

**Lymphocyte Counts and CD40L Expression** T (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) and B (CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>) cell counts were determined by flow cytometry analysis using specific monoclonal antibodies. CD40L expression was assessed on the surface of resting and activated CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells using the monoclonal antibody TRAP1 (Mouse IgG1) as previously described [18]. Activation of cells was confirmed by staining CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells with specific antibodies to CD69 (Becton Dickinson, BD) (data not shown). Prior to flow cytometry, samples were washed and fixed in 1% paraformaldehyde. The results obtained were analyzed using FlowJo software (Treestar Inc., Ashlan, OR, USA).

**Sequence Analysis of CD40L Gene** Genomic DNA (gDNA) was isolated from EDTA blood using the Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega). All five exons of the CD40L gene, including the exon–intron boundaries, were individually amplified by polymerase chain reaction (PCR), as previously described [18]. Primers are available upon request. PCR products were purified using the GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions. PCR products were sequenced on a MegaBACE 1000 sequencer using the DYEnamic ET Dye Terminator kit (Thermo Sequenase™ II DNA Polymerase). The observed sequences were compared with the CD40L mutation registry (<http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/>), and structural analysis of missense mutations was performed based on the crystal structure of the protein (PDB 1ALY). CD40L complementary DNA (cDNA) was also sequenced as previously described [18]. To provide evidence that the two novel missense mutations identified are not single-nucleotide polymorphisms (SNPs), we evaluated both mutations using MutationTaster, a bioinformatic method to evaluate disease-causing potential of sequence alterations [19] and sequenced gDNA from 100 healthy Brazilian controls.

## Results

### Patient Baseline Characteristics

We enrolled 11 male patients ranging in age from 1 to 23 years in whom a diagnosis of X-HIGM syndrome was suspected. All patients came from nonconsanguineous Brazilian families (Fig. 1). Median age at time of disease onset was 6 months

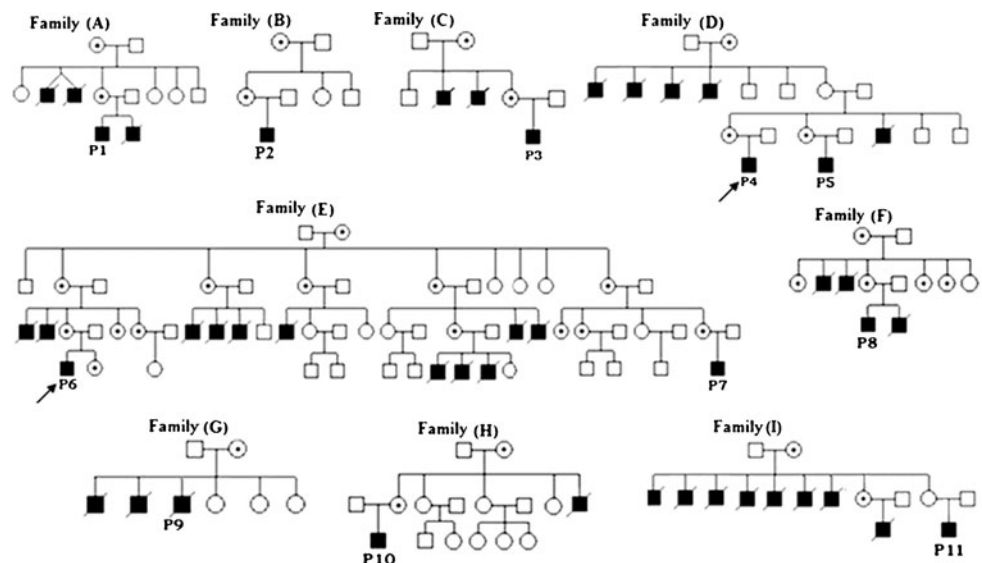
(ranging from 1 to 7 months). The median age at the time of X-HIGM diagnosis was 2 years (ranging from 5 months to 6 years).

### High Incidence of Fungal Infections and the Occurrence of Paracoccidioidomycosis

Nine of 11 (82%) patients in this cohort presented with fungal infections, many of which were being unusual or severe (Table 1). Six patients had *P. jiroveci* pneumonia, an infection that typically occurs in young (under the age of 5 years) CD40L-deficient patients [11]; three patients had infections caused by *C. albicans* which were either of an unusual type or particularly severe: P5 was diagnosed with severe candida esophagitis, P6 with oral and perianal candidiasis, and P9 with persistent cutaneous candidiasis on the scalp (Fig. 2a). It is important to note that at the time of the candidiasis, P5 and P6 but not P9 were treated prophylactically with trimethoprim–sulfamethoxazole to prevent *P. jiroveci* pneumonia, but no other antibiotics were used. None presented with neutropenia at the time the *Candida* diagnosis was established.

At the age of 6 months, patient P10, born and living in Sao Paulo city, was diagnosed with X-HIGM while presenting with *P. jiroveci* pneumonia, recurrent otitis media, and sinusitis. At the age of 11 years while on intravenous immunoglobulin (IVIG) treatment, he presented with mild prolonged fever and cough. Chest CT scans showed mediastinal lymphadenopathy and a lymph node biopsy confirmed tubercloid granulomatous inflammation as a consequence of *Paracoccidioides brasiliensis* within multinuclear cells (Fig. 2b). In addition, bone marrow biopsy revealed hypoplasia and tubercloid granuloma, a clinical feature compatible with the acute form of PCM. It is important to note that P10 did not

**Fig. 1** Patients' pedigrees. Black squares represent males with recurrent, severe infections. Black squares with slashes indicate deceased individuals. All female carriers, represented by circles with dots, were clinically and immunologically healthy



**Table I** Infections observed in Brazilian patients with X-HIGM

Pt	Birth year	Fungi	Infections and pathogens		
			Bacteria	Other etiologic agents	Other infections associated with unidentified pathogens
1 <sup>a</sup>	2008	Pneumonia— <i>P. jiroveci</i>			Pneumonia
2 <sup>a</sup>	1987	Pneumonia— <i>P. jiroveci</i>	Urinary tract infection— <i>E. coli</i>		Otitis, tonsillitis
3 <sup>a</sup>	2007	Pneumonia— <i>P. jiroveci</i>		Diarrhea— <i>C. parvum</i>	Pneumonia
4 <sup>a</sup>	2007				Pharyngitis, laryngitis, otitis, pneumonia
5 <sup>a</sup>	2003	<i>Candida</i> esophagitis			
6 <sup>a</sup>	2005	Oral and perianal candidiasis		Condyloma—HPV, herpes simplex	Otitis, sinusitis, pneumonia
7 <sup>a</sup>	1997	Pneumonia— <i>P. jiroveci</i>			Otitis, sinusitis, pneumonia
8 <sup>a</sup>	2006	Pneumonia— <i>P. jiroveci</i>			sepsis, pneumonia
9 <sup>b</sup>	2002	Cutaneous candidiasis on the scalp	Sepsis— <i>Klebsiella pneumoniae</i> , sepsis— <i>Actinobacter</i> sp., otitis— <i>P. aeruginosa</i>		Pneumonia
10 <sup>a</sup>	1993	PCM— <i>P. brasiliensis</i> , pneumonia— <i>P. jiroveci</i>			
11 <sup>a</sup>	2009				Pulmonary granuloma pneumonia

PCM paracoccidioidomycosis, Pt patient, UP unidentified pathogen, HPV human papillomavirus

<sup>a</sup> Alive

<sup>b</sup> Dead

present with neutropenia 6 months before or during PCM. He was treated with an 8-month course of itraconazol and recovered.

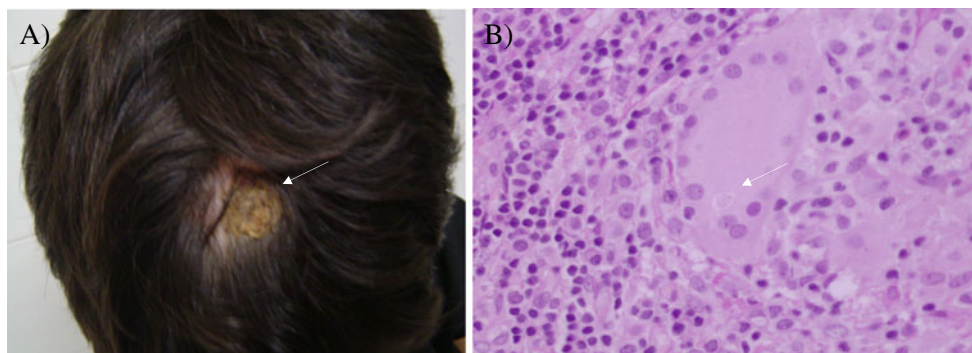
**Extracellular Bacterial Infections**

One patient (P9) presented with local pyoderma and oropharyngitis beginning at 3 months of age followed by recurrent otitis and mastoiditis. One of the pathogens causing otitis was *Pseudomonas aeruginosa*. At the age of 3 years, he developed severe mastoiditis followed by sepsis caused by *K. pneumoniae* and *Acinetobacter* sp., leading to the

diagnosis of X-HIGM syndrome. Under treatment with cefepime and vancomycin, he fully recovered and IVIG therapy was started. P9 died at 8 years of age due to complications resulting from progressive multifocal leukoencephalopathy.

**Other Isolated Etiologic Agents**

Other etiologic agents causing infections were isolated in P3 and P6 while on adequate IVIG prophylaxis. The protozoan *Cryptosporidium parvum*, a relatively common pathogen observed in CD40L-deficient patients [11], caused chronic



**Fig. 2** Paracoccidioidomycosis and cutaneous candidiasis in CD40L-deficient patients. **a** Picture of persistent candidiasis on the scalp of P9. **b** Histopathologic characteristics of a lymph node biopsy of patient

P10. Hematoxylin–eosin-stained specimen showing the tuberculoid granulomatous inflammation with *Paracoccidioides brasiliensis* within a multinucleated cell

diarrhea in P3 at 4 years of age. P6 presented with a herpes simplex virus infection, which has been previously reported in X-HIGM patients [13]. In addition, he had perianal condyloma caused by HPV.

#### Laboratory and Immunologic Findings

Patient lymphocyte counts ( $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD8^+$ ,  $CD19^+CD40^+$ ) were similar to healthy controls (Table II). Neutropenia was identified in six patients (P2, P3, P4, P5, P6, and P10). In P3, P4, and P11, neutropenia was associated with recurrent oral or esophageal ulcers but not with other clinical features. Neutropenia was effectively treated with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in all patients except P4. Despite presenting persistent neutropenia, P4 did not have fungal infections.

All patients had low serum levels of IgG and IgA (Table II). Serum IgM was elevated in patients P1, P2, P7, P9, P10, and P11, but was normal in patients P3, P4, and P6 and reduced in patients P5 and P8.

#### Molecular Genetic Analysis of CD40L

Expression of the CD40L protein on the surface of activated  $CD3^+CD4^+$  T cells was impaired in all patients except for P3, who had an expression level similar to the healthy control (Fig. 4). Seyama et al. [18] used a CD40–Ig fusion protein to demonstrate that the c.496 C>A mutation identified in P3 affects binding of CD40 to CD40L on activated T cells.

Sequence analysis of the CD40L gene revealed three novel mutations. These are two missense mutations, one in exon 4 (c.433 T>G, p.V126G, P1), the other in exon 5 (c.476 G>C, p.W140C, P2), and an insertion of 2 base pairs (c.551\_552insAA, p.R165X190) within the tumor necrosis factor homologous (TNFH) domain found in one patient (P11) (Table III, Fig. 3b). MutationTaster analysis indicated no SNPs for these altered regions and neither of these two mutations was found in 100 healthy Brazilian control subjects. Furthermore, comparative analysis of the CD40L protein from different species showed that the two novel base pair substitutions affect conserved amino acids within the CD40L TNFH domain (Fig. 3a). These amino acid residues are essential for the CD40L structure, thereby abolishing expression of the CD40L protein on the surface of activated  $CD3^+CD4^+$  T cells (Fig. 3a).

The insertion found in P11 leads to a frame shift mutation with the creation of a premature stop codon resulting in an unstable truncated protein (Fig. 3b). The other four unique mutations identified in the remaining eight patients have been described previously (Table III) and their consequences in CD40L expression are demonstrated in Fig. 4.

#### Discussion

Common clinical features of CD40L-deficient patients include infections caused by extracellular and intracellular bacterial and fungal pathogens. Pneumonia caused by the commensal fungus *P. jiroveci* is a well-recognized

**Table II** Laboratorial features in X-HIGM patients

Patient	Neutropenia	Lymphocytes subsets <sup>a</sup> (%)			Serum Ig levels (before IVIG <sup>a</sup> )			
		$CD3^+$		$CD19^+CD40^+$	Age (years)	IgG	IgA	IgM
		$CD4^+$	$CD8^+$					
1	–	51	36	7	<1	164	21	111
2	+	37	27	5	2	10	9	320
3	+	63	12	13	1	100	6	92
4	+	55	35	7	2	210	6	90
5	+	43	20	7	2	230	24	51.6
6	+	31	23	19	1	90	10	95
7	–	43	12	13	3	270	7	180
8	–	52	23	7	1	44.7	5.2	53
9	–	55	23	19	2	22	5	362
10	+	40	23	6	6	250	5	400
11	–	11	21	31	<1	149	25	107

Persistent neutropenia was observed in P4 and the other patients presented intermittent neutropenia

Ig immunoglobulin, IVIG intravenous immunoglobulin therapy

<sup>a</sup> Reference values of IVIG and lymphocyte subsets according to Guerra-Maranhao et al. [52]

**Table III** Mutations in CD40L

Pt	cDNA mutation	Type of mutation	Affected domain	Affected Exon	Novel or known	References
P1	c. 433 T>G	Missense	TNFH	4	Novel	–
P2	c.476 G>C	Missense	TNFH	5	Novel	–
P3	c.496 C>A	Missense	TNFH	5	Known	[18]
P4	c.475 G>A	Nonsense	TNFH	5	Known	[9]
P5	c.475 G>A	Nonsense	TNFH	5	Known	[9]
P6	c.213_216delATAG	Frame shift deletion	EC	2	Known	[42]
P7	c.213_216delATAG	Frame shift deletion	EC	2	Known	[39]
P8	c.213_216delATAG	Frame shift deletion	EC	2	Known	[39]
P9	c.345_402del	Splice site	EC	3	Known	[18]
P10	c.345_402del	Splice site	EC	3	Known	[18]
P11	c.551_552insAA	Frame shift insertion	TNFH	5	Novel	–

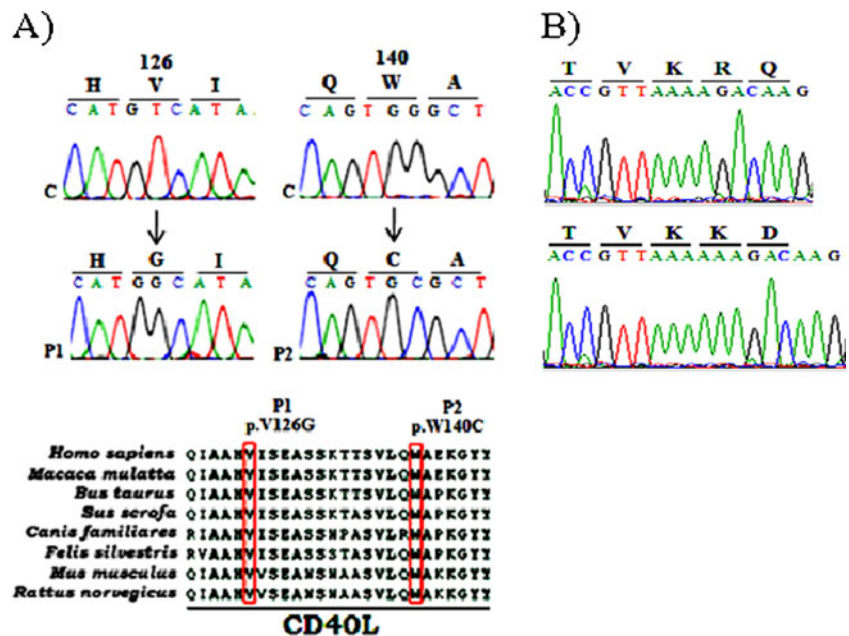
*TNFH* tumor necrosis factor homology domain, *EC* extracellular

complication in CD40L deficiency with incidence rates ranging from 32% to 42% [11, 13]. However, reports of other fungal infections are rare: *Candida* in two patients [12, 20], *Cryptococcus* in one patient [21], and *Histoplasma* in one patient [10]. While candidiasis and *P. jirovecii* infections usually occur during the first 5 years of life, the patients developing cryptococcosis and histoplasmosis and the Brazilian patient developing *P. brasiliensis* where 12, 19, and 11 years, respectively.

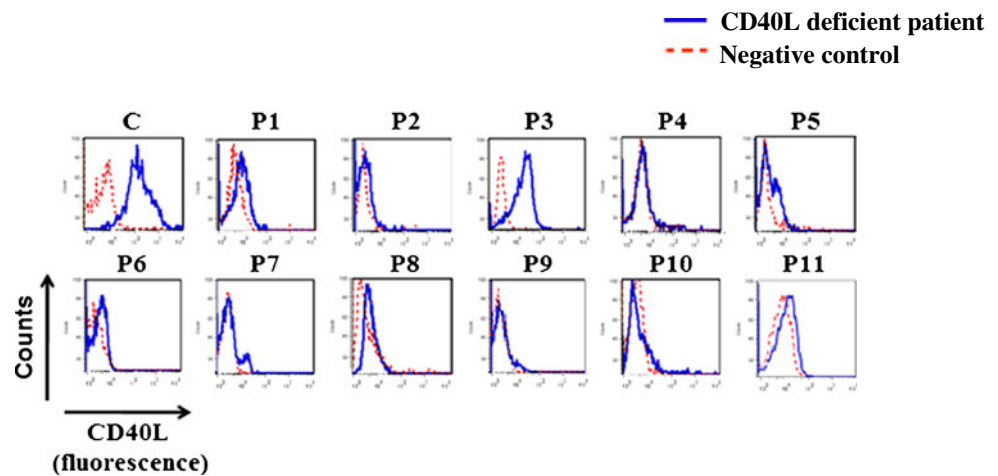
In this study, we identified a high rate of fungal infections (82%) in a cohort of 11 CD40L-deficient patients from Brazil, none of which had neutropenia at the time of presentation. These infections were caused by a broad range of fungal pathogens including *P. jirovecii*, *C. albicans*, and, not previously reported, one patient with *P. brasiliensis*

infection. These observations suggest a possible underlying mechanism responsible for the occurrence of fungal infections which remains to be investigated. The reason for the high incidence of fungal infections and the occurrence of PCM described in this cohort of X-HIGM patients agrees with distinct epidemiological features and unique etiologic agents associated with the geographic and socioeconomic conditions in Latin America [22]. For example, in Brazil, the incidence of *Candida* infections is almost ten times higher than that reported in North America and Europe [22]. Accordingly, we identified three X-HIGM patients with severe *Candida* infections. *P. brasiliensis* is a fungus that causes the most important endemic systemic mycosis in South America [23]. Interestingly, both patients with primary immunodeficiency presenting with PCM are Brazilian. One is

**Fig. 3** Novel mutations in CD40L-deficient patients. **a** The missense mutations affect conserved amino acids in the CD40L TNF homology domain (TNFH) of different species and are located at the binding sites with CD40 receptor. **b** The insertion of two adenines (p.R165X190) found in the CD40L gene of P11 results in a frame shift mutation creating a premature stop codon



**Fig. 4** Defective CD40L protein expression. Flow cytometry histograms showing CD40L expression on the surface of activated CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells from patients (P1–P11) demonstrating a lack of protein expression in all but one patient (P3) who expresses a nonfunctional protein as previously demonstrated [18]. Histogram C shows data from a healthy control



a patient with a mutation in the beta 1 subunit of the IL-12/IL-23 receptor [24] and the second is the patient (P10) described here. Both patients live in São Paulo, a huge urban area where the incidence of PCM is much lower than in rural regions. The actual incidence and prevalence of PCM is poorly known because reporting this disease is not mandatory in most South American countries, and its distribution is highly variable even in endemic areas [25]. However, some isolated studies reported the PCM average incidence from one to four new cases per 100,000 habitants per year in Brazil [26], whereas in other South American countries, it has been estimated an average incidence of 0.5 cases per 100,000 habitants per year with lower rates being described in Colombia [27, 28].

PCM is an infection acquired by inhalation of airborne propagules produced by fungal mycelium, which then transform into pathogenic yeast [29]. After *P. brasiliensis* invades the host via the respiratory tract, it persists in macrophages causing granuloma formation and disseminates through the reticuloendothelial system [30]. This pathogenesis of persistent *P. brasiliensis* inside macrophages and granuloma formation in lymph nodes and bone marrow was observed in our patient. Two different clinical forms of PCM can be distinguished: an acute, juvenile form and a chronic, adult form [31, 32]. The clinical picture of the acute form reveals a severe disease with reticuloendothelial system organ hypertrophy, bone marrow dysfunction, and septic episodes. The lungs are seldom the primary focus of infection but fungal pathogens can be proven in pulmonary secretions assuming some lung involvement [33]. The disease develops within a few weeks or months and is more frequently reported in children and young adults below 25 years of age [31, 34]. On the other hand, the chronic form results from infection usually acquired during the first two decades of the life staying clinically silent and causing disease in adults, mostly men of 30 to 50 years of age, by reactivation of a latent endogenous focus [32]. The disease

progresses slowly with symptoms of cough, expectoration, weight loss, and fever. A characteristic of the chronic form is pulmonary manifestation; however, it can also occur as a multifocal form with fungal spread to more than one organ or tissue such as the oral mucosa, skin, lymph nodes [35–37], central nervous system, and gastrointestinal and ocular manifestations [38–40].

To eradicate PCM, an efficient Th1 immune response is required, characterized by the production of IFN- $\gamma$  and subsequent activation of phagocytic cells [41]. By enhancing cytochrome *b* expression by phagocytes, IFN- $\gamma$  is believed to potentiate the oxidative respiratory burst in macrophages and polymorphonuclear leukocytes, a process responsible for many of the microbicidal, tumoricidal, and inflammatory activities of these cells [27, 28]. In accordance, *P. brasiliensis*-pulsed mDCs from CD40L-deficient patients induce a Th2-skewed T cell response characterized by lower IFN- $\gamma$  and higher IL-4 and IL-5 production compared to healthy subjects [42], an immunological milieu associated with increased susceptibility to fungal infections in humans [43].

The inability to eliminate extracellular bacterial and viral pathogens is also a common clinical feature of patients with X-HIGM and other well-defined humoral immunodeficiencies [11, 44]. However, only one CD40L-deficient patient has been reported with infections caused by *K. pneumonia* and *Acinetobacter* sp. and of condyloma associated with HPV infections in patients with CD40L deficiency. *K. pneumonia* and *Acinetobacter* sp. are two gram-negative bacteria present in the gastrointestinal flora of immunocompetent individuals, causing worldwide nosocomial infections in newborns and in patients with AIDS [46, 47]. Among primary immunodeficient patients, *Klebsiella* sp. infections were only reported in chronic granulomatous disease [48] and X-linked agammaglobulinemia [49]. HPV infections were described in patients with hypogammaglobulinemia, highlighting the role of the antibody in controlling some

viral pathogens. The success of vaccines against HPV in protecting women against HPV infection and cervical cancer [50] underlines the importance of adaptive immunity in the protection against this virus. HPV infections were also observed in patients with autosomal-dominant mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 [51], but the underlying mechanism involved in this susceptibility still needs to be clarified.

In conclusion, our data highlight the key role of the CD40/CD40L signaling pathway in mediating immunity against fungal and bacterial infections. It demonstrates that defects in this pathway cause susceptibility to a much broader array of pathogens than those traditionally associated with X-HIGM (i.e., *P. jirovecii*). Therefore, we suggest that patients with CD40L deficiency especially if living in tropical areas should be monitored for these pathogens.

**Acknowledgments** The authors thank FAPESP (grant 2008/06635-0 to OCM and grant 2008/55700-9 to ACN), CNPq, and Jeffrey Modell Foundation for financial support and the patients and their families for their participation in this study.

## References

- Liu L, Okada S, Kong XF, Kreins AY, Cypowij S, Abhyankar A, Toubiana J, Itan Y, Audry M, Nitschke P, Masson C, Toth B, Flatot J, Migaud M, Chrabieh M, Kochetkov T, Bolze A, Borghesi A, Toulon A, Hiller J, Eyerich S, Eyerich K, Gulacsy V, Chernyshova L, Chernyshov V, Bondarenko A, Maria Cortes Grimaldo R, Blancas-Galicia L, Madrigal Beas IM, Roesler J, Magdorf K, Engelhard D, Thumerelle C, Burgel PR, Hoernes M, Drexel B, Seger R, Kusuma T, Jansson AF, Sawalle-Belohradsky J, Belohradsky B, Jouanguy E, Bustamante J, Bue M, Karin N, Wildbaum G, Bodemer C, Lortholary O, Fischer A, Blanche S, Al-Muhsen S, Reichenbach J, Kobayashi M, Rosales FE, Lozano CT, Kilic SS, Oleastro M, Etzioni A, Traidl-Hoffmann C, Renner ED, Abel L, Picard C, Marodi L, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL. Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med*. 2011;208:1635–48.
- Puel A, Cypowij S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, Migaud M, Israel L, Chrabieh M, Audry M, Gumbleton M, Toulon A, Bodemer C, El-Baghdadi J, Whitters M, Paradis T, Brooks J, Collins M, Wolfman NM, Al-Muhsen S, Galicchio M, Abel L, Picard C, Casanova JL. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science*. 2011;332:65–8.
- Ryan KR, Hong M, Arkwright PD, Gennery AR, Costigan C, Dominguez M, Denning D, McConnell V, Cant AJ, Abinun M, Spickett GP, Lilić D. Impaired dendritic cell maturation and cytokine production in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with or without APECED. *Clin Exp Immunol*. 2008;154:406–14.
- Schimke K, Chubb SA, Davis WA, Davis TM. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene-A antibodies do not predict complications or death in type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study. *Atherosclerosis*. 2010;212:321–6.
- Fuleihan R, Ramesh N, Geha RS. Role of CD40–CD40L interaction in Ig-isotype switching. *Curr Opin Immunol*. 1993;5:963–7.
- Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H, Jenkins NA, Copeland NG, Bedell MA, Edelhoff S, Disteche CM, Simoneaux DK, et al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science*. 1993;259:990–3.
- Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S, Bajorath J, Grosmaire LS, Stenkamp R, Neubauer M, et al. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell*. 1993;72:291–300.
- DiSanto JP, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Fischer A, de Saint Basile G. CD40 ligand mutations in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature*. 1993;361:541–3.
- Fuleihan R, Ramesh N, Loh R, Jabara H, Rosen RS, Chatila T, Fu SM, Stamenkovic I, Geha RS. Defective expression of the CD40 ligand in X chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:2170–3.
- Hostoffer RW, Berger M, Clark HT, Schreiber JR. Disseminated *Histoplasma capsulatum* in a patient with hyper IgM immunodeficiency. *Pediatrics*. 1994;94:234–6.
- Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C, Fischer A, Tovo P, Bordignon P, Resnick I, Fasth A, Baer M, Gomez L, Sanders EA, Tabone MD, Plantaz D, Etzioni A, Monafó V, Abinun M, Hammarstrom L, Abrahamsen T, Jones A, Finn A, Klemola T, DeVries E, Sanal O, Peitsch MC, Notarangelo LD. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *J Pediatr*. 1997;131:47–54.
- Nonoyama S, Shimadzu M, Toru H, Seyama K, Nunoi H, Neubauer M, Yata J, Och HD. Mutations of the CD40 ligand gene in 13 Japanese patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Hum Genet*. 1997;99:624–7.
- Winkelstein JA, Marino MC, Ochs H, Fuleihan R, Scholl PR, Geha R, Stiehm ER, Conley ME. The X-linked hyper-IgM syndrome: clinical and immunologic features of 79 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2003;82:373–84.
- Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:1–23.
- Al-Muhsen S, Casanova JL. The genetic heterogeneity of mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122:1043–51. quiz 1052–1043.
- Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Hammarstrom L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck J, Roifman C, Seger R, Wedgwood J. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124:1161–78.
- Stavnezer J. Complex regulation and function of activation-induced cytidine deaminase. *Trends Immunol*. 2011;32:194–201.
- Seyama K, Nonoyama S, Gangsaas I, Hollenbaugh D, Pabst HF, Aruffo A, Ochs HD. Mutations of the CD40 ligand gene and its effect on CD40 ligand expression in patients with X-linked hyper IgM syndrome. *Blood*. 1998;92:2421–34.
- Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010;7:575–6.
- Kraakman EM, Bontrop RE, Groenestein R, Jonker M, Haaijman JJ, Hart BA. Characterization of the natural immune response of rhesus monkey CD4+ve T cells to the bacterial antigen streptolysin O (SLO). *J Med Primatol*. 1995;24:306–12.
- Jo EK, Kim HS, Lee MY, Iseki M, Lee JH, Song CH, Park JK, Hwang TJ, Kook H. X-linked hyper-IgM syndrome associated with *Cryptosporidium parvum* and *Cryptococcus neoformans* infections: the first case with molecular diagnosis in Korea. *J Korean Med Sci*. 2002;17:116–20.
- Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobon AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis*. 2010;51:561–70.
- Benard G, Duarte AJ. Paracoccidioidomycosis: a model for evaluation of the effects of human immunodeficiency virus infection on the natural history of endemic tropical diseases. *Clin Infect Dis*. 2000;31:1032–9.

24. Moraes-Vasconcelos D, Grumach AS, Yamaguti A, Andrade ME, Fieschi C, de Beaucoudrey L, Casanova JL, Duarte AJ. *Paracoccidioides brasiliensis* disseminated disease in a patient with inherited deficiency in the beta1 subunit of the interleukin (IL)-12/IL-23 receptor. *Clin Infect Dis*. 2005;41:e31–37.
25. Barrozo LV, Mendes RP, Marques SA, Benard G, Silva ME, Bagagli E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *Int J Epidemiol*. 2009;38:1642–9.
26. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho Fde Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39:297–310.
27. Bellissimo-Rodrigues F, Machado AA, Martinez R. Paracoccidioidomycosis epidemiological features of a 1,000-cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85:546–50.
28. Rolon PA. Paracoccidioidomycosis: an epidemic in the Republic of Paraguay, the center of South America. *Mycopathologia*. 1976;59:67–80.
29. McEwen JG, Bedoya V, Patino MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol*. 1987;25:165–75.
30. Morejon KM, Machado AA, Martinez R. Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: a case–control study. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80:359–66.
31. Bethlehem EP, Capone D, Maranhao B, Carvalho CR, Wanke B. Paracoccidioidomycosis. *Curr Opin Pulm Med*. 1999;5:319–25.
32. Ferreira MS. Paracoccidioidomycosis. *Paediatr Respir Rev*. 2009;10:161–5.
33. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev*. 1993;6:89–117.
34. Fonseca ER, Pardal PP, Severo LC. Paracoccidioidomycosis in children in Belem, Para. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32:31–3.
35. Pereira PM, Akel PB, Lima LL, Kimura EN, Jalkh AP. Multifocal paracoccidioidomycosis: a diagnostic challenge due to late cutaneous manifestation. *An Bras Dermatol*. 2011;86:149–52.
36. Brazao-Silva MT, Andrade MF, Franco T, Ribeiro RI, Silva Wdos S, Faria G, Faria PR, Cardoso SV, Loyola AM. Paracoccidioidomycosis: a series of 66 patients with oral lesions from an endemic area. *Mycoses*. 2011;54:e189–195.
37. Marques SA. Fungal infections of the mucous membrane. *Dermatol Ther*. 2010;23:243–50.
38. Gasparetto EL, Liu CB, de Carvalho Neto A, Rogacheski E. Central nervous system paracoccidioidomycosis: imaging findings in 17 cases. *J Comput Assist Tomogr*. 2003;27:12–7.
39. Goldani LZ. Gastrointestinal paracoccidioidomycosis: an overview. *J Clin Gastroenterol*. 2011;45:87–91.
40. Odashiro AN, Odashiro PR, Fernandes PI, Leite LV, Odashiro M, Maloney S, Fernandes BF, Di Cesare S, Burnier Jr MN. Eyelid and conjunctival paracoccidioidomycosis simulating carcinoma. *Int Ophthalmol*. 2011;31:63–7.
41. Costa DL, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Bordon AP, Tavian EG, Peracoli MT, Soares AM. Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated human neutrophils. *Microbiol Immunol*. 2007;51:73–80.
42. Cabral Marques, O., C. Arslanian, R. Nalio Ramos, M. Morato, Paulo Vitor Soeiro, Sonia Jancar MD, Janaíra Fernandes Ferreira, Cristina Worm Weber, Gisele Kuntze, Nelson Augusto Rosario, Beatriz Tavares Costa Carvalho, Patricia Cruz Bergami-Santos, Mary J. Hackett, Hans D. Ochs, Troy R. Torgerson, Jose Alexandre Marzagão Barbuto, and Antonio Condino-Neto. Dendritic cells from X-linked Hyper IgM patients demonstrate defective responses to the fungal pathogens *Candida albicans* and *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 (in press).
43. Romani L. The T cell response against fungal infections. *Curr Opin Immunol*. 1997;9:484–90.
44. Rezaei N, Hedayat M, Aghamohammadi A, Nichols KE. Primary immunodeficiency diseases associated with increased susceptibility to viral infections and malignancies. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:1329–41. e1322; quiz 1342–1323.
45. Banatvala N, Davies J, Kanariou M, Strobel S, Levinsky R, Morgan G. Hypogammaglobulinaemia associated with normal or increased IgM (the hyper IgM syndrome): a case series review. *Arch Dis Child*. 1994;71:150–2.
46. Jeena P, Thompson E, Nchabeleng M, Sturm A. Emergence of multi-drug-resistant *Acinetobacter anitratus* species in neonatal and paediatric intensive care units in a developing country: concern about antimicrobial policies. *Ann Trop Paediatr*. 2001;21:245–51.
47. Omwandho CO, Gruessner SE, Tinneberg HR. Early pregnancy loss and neonatal deaths associated with *Klebsiella pneumonia* infection: a mini review of possible occupational health risk. *Arch Gynecol Obstet*. 2006;273:258–60.
48. Soler-Palacin P, Margareto C, Llobet P, Asensio O, Hernandez M, Caragol I, Espanol T. Chronic granulomatous disease in pediatric patients: 25 years of experience. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2007;35:83–9.
49. Jacobs ZD, Guajardo JR, Anderson KM. XLA-associated neutropenia treatment: a case report and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2008;30:631–4.
50. Jain N, Euler GL, Shefer A, Lu P, Yankey D, Markowitz L. Human papillomavirus (HPV) awareness and vaccination initiation among women in the United States, National Immunization Survey-Adult 2007. *Prev Med*. 2009;48:426–31.
51. Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, Klotman ME, Diaz GA. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet*. 2003;34:70–4.
52. Guerra-Maranhao MC, Costa-Carvalho BT, Nudelman V, Barros-Nunes P, Carneiro-Sampaio MM, Arslanian C, et al. Response to polysaccharide antigens in patients with ataxia-telangiectasia. *J Pediatr (Rio J)*. 2006;82(2):132–6.



# Dendritic cells from X-linked hyper-IgM patients present impaired responses to *Candida albicans* and *Paracoccidioides brasiliensis*

Otávio Cabral Marques, MSc,<sup>a,g</sup> Christina Arslanian, BSc,<sup>a</sup> Rodrigo Nalio Ramos, MSc,<sup>a</sup> Mariana Morato, MSc,<sup>a</sup> LenaFriederike Schimke, MD,<sup>a,g</sup> Paulo Vitor Soeiro Pereira, MSc,<sup>a</sup> Sonia Jancar, MD, PhD,<sup>a</sup> Janaína Fernandes Ferreira, MD,<sup>b</sup> Cristina Worm Weber, MD,<sup>c</sup> Gisele Kuntze, MD,<sup>d</sup> Nelson Augusto Rosario-Filho, MD, PhD,<sup>e</sup> Beatriz Tavares Costa Carvalho, MD,<sup>f</sup> Patricia Cruz Bergami-Santos, PhD,<sup>a</sup> Mary J. Hackett, BSc,<sup>g</sup> Hans D. Ochs, MD,<sup>g</sup> Troy R. Torgerson, MD, PhD,<sup>g</sup> Jose Alexandre Marzagão Barbuto, MD, PhD,<sup>a\*</sup> and Antonio Condino-Neto, MD, PhD<sup>a\*</sup> São Paulo, Fortaleza, Caxias do Sul, and Curitiba, Brazil, and Seattle, Wash

**Background:** Patients with X-linked hyper-IgM syndrome (X-HIGM) due to CD40 ligand (CD40L) mutations are susceptible to fungal pathogens; however, the underlying susceptibility mechanisms remain poorly understood.

**Objective:** To determine whether monocyte-derived dendritic cells (DCs) from patients with X-HIGM exhibit normal responses to fungal pathogens.

**Methods:** DCs from patients and controls were evaluated for the expression of costimulatory (CD80 and CD86) and MHC class II molecules and for their ability to produce IL-12 and IL-10 in response to *Candida albicans* and *Paracoccidioides brasiliensis*. We also evaluated the ability of *C albicans*- and *P brasiliensis*-pulsed mature DCs to induce autologous T-cell proliferation, generation of T helper (T<sub>H</sub>) 17 cells, and production of IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-5, and IL-17.

**Results:** Immature DCs from patients with X-HIGM showed reduced expression of CD80, CD86, and HLA-DR, which could be reversed by exogenous trimeric soluble CD40L. Most important, mature DCs from patients with X-HIGM differentiated by coculturing DCs with fungi secreted minimal amounts of IL-12 but substantial amounts of IL-10 compared with mature DCs from normal individuals. Coculture of mature DCs from X-HIGM patients with autologous T cells led to low IFN- $\gamma$  production, whereas IL-4 and IL-5 production was

increased. T-cell proliferation and IL-17 secretion were normal. Finally, *in vitro* incubation with soluble CD40L reversed the decreased IL-12 production and the skewed T<sub>H</sub>2 pattern response.

**Conclusion:** Absence of CD40L during monocyte/DC differentiation leads to functional DC abnormalities, which may contribute to the susceptibility to fungal infections in patients with X-HIGM. (J Allergy Clin Immunol 2012;129:778-86.)

**Key words:** CD40 ligand deficiency, fungal infections, dendritic cells, X-linked hyper-IgM syndrome, primary immunodeficiency

Most primary immunodeficiency disorders are characterized by an unusual susceptibility to particular infectious pathogens. In general, the class of pathogen points toward the type of immunological defect that is present; for example, extracellular bacterial pathogens are typically associated with a humoral immune deficiency, whereas the occurrence of opportunistic infections raises the suspicion of a cellular immune deficiency. Fungal infections are found predominantly in patients with innate, combined, or more complex immune disorders such as chronic granulomatous disease, myeloperoxidase deficiency, congenital neutropenias, defects in the IFN- $\gamma$ /IL-12 axis, hyper-IgE syndromes, severe combined immunodeficiency, or Wiskott-Aldrich syndrome.<sup>1</sup>

Dendritic cells (DCs) are professional antigen-presenting cells (APCs) that initiate and modulate the immune response.<sup>2</sup> They are present in most tissues and recognize different pathogen-associated molecular patterns.<sup>3</sup> After DCs recognize, capture, and process antigens, they mature and display large numbers of HLA-DR-peptide complexes on their cell surface, thereby instructing antigen-specific T cells to trigger immune responses. This phenomenon is also observed during fungal infections.<sup>4</sup>

X-linked hyper-IgM syndrome (X-HIGM), caused by mutations in the *CD40 ligand* (*CD40L*) gene, is unique in that it primarily affects the development of normal humoral immunity but also predisposes affected patients to fungal infections without a well-defined cellular immune defect.<sup>5-9</sup> CD40L (CD154) is inducible and expressed on the surface of activated CD4<sup>+</sup> T cells or released in a soluble form.<sup>10,11</sup> It has pleiotropic functions in the immune response, activating both B cells and APCs. *In vivo* and *in vitro* murine studies demonstrate that CD40L is

From <sup>a</sup>the Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo; <sup>b</sup>the Albert Sabin Hospital, Fortaleza; <sup>c</sup>the Pediatric Allergy and Immunology Clinic, Caxias do Sul; <sup>d</sup>the Pequeno Príncipe Hospital, Curitiba; <sup>e</sup>the Department of Pediatrics, Federal University of Paraná Medical School, Curitiba; <sup>f</sup>the Department of Pediatrics, Division of Allergy-Immunology and Rheumatology, Federal University of São Paulo, São Paulo; <sup>g</sup>the Department of Pediatrics, University of Washington School of Medicine and Seattle Children's Hospital, Seattle.

\*These authors contributed equally to this work.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—grant 2008/06635-0 to O.C.M., grant 2008/55700-9 to A.C.N., and grant 2009/54599-5 to J.A.M.B.—and by the Jeffrey Modell Foundation.

Disclosure of potential conflict of interest: The authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication April 6, 2011; revised September 11, 2011; accepted for publication October 11, 2011.

Available online December 10, 2011.

Corresponding author: Antonio Condino-Neto, MD, PhD, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 1730 Lineu Prestes Ave, São Paulo, SP 05508-000, Brazil. E-mail: condino@icb.usp.br.  
0091-6749/\$36.00

© 2011 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology  
doi:10.1016/j.jaci.2011.10.026

#### Abbreviations used

APCs:	Antigen-presenting cells
CD40L:	CD40 ligand
DCs:	Dendritic cells
iDCs:	Immature DCs
mDCs:	Mature DCs
PTX3:	Pentraxin 3
sCD40L:	Soluble CD40 ligand
X-HIGM:	X-linked hyper-IgM syndrome

involved in IL-12 production by APCs, which express CD40 constitutively, and enhances the expression of MHC class I and class II molecules and costimulatory molecules CD80 and CD86, which cooperate for T-cell-mediated immunity coordinated by IFN- $\gamma$ .<sup>12,13</sup>

Previous work has demonstrated defective postthymic T-cell maturation and effector function in human CD40L deficiency,<sup>14</sup> but the mechanistic basis of these defects remains to be clarified. Because DCs play a critical role in the development of T-cell-mediated immune responses, and defective T-cell function contributes to susceptibility to opportunistic infections such as fungal infections, we hypothesized that DC function could be impaired in patients with X-HIGM and affect T-cell responses. The aim of this work was, therefore, to investigate DC function in patients with CD40L deficiency.

## METHODS

### Subjects

We studied 5 Brazilian patients (age range: 4-18 years) from 5 unrelated families with a clinical and genetic diagnosis of X-HIGM according to the criteria of the International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies.<sup>15</sup> In addition to recurrent bacterial infections, all the patients presented with fungal infections (*Pneumocystis jirovecii* pneumonia, candidiasis, or paracoccidioidomycosis) that were either uncommon or particularly severe. The patients were never neutropenic, neither immediately before nor during the fungal infections. Informed consent was obtained from all patients or from their parents, and blood was collected under institutional guidelines. The study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo. All data obtained from the patients were compared with data obtained from young adult healthy male controls ranging in age from 22 to 29 years.

### DC generation

Immature DCs (iDCs) were obtained as described by Barbuto et al.<sup>16</sup> Briefly, PBMCs were isolated from heparinized blood after Ficoll-Hypaque sedimentation and adherent monocytes were cultured for 5 days in the presence of GM-CSF and IL-4. The nonadherent cells, mainly lymphocytes, were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  to be used in the lymphocyte stimulation assays. Mature DCs (mDCs) were obtained by activating the adherent iDCs with *Paracoccidioides brasiliensis* (cultivated as previously described),<sup>17</sup> *Candida albicans* (a clinical isolate from Sanset Medical Laboratory, Mogi das Cruzes, São Paulo, Brazil), or soluble CD40L (sCD40L) (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Invitrogen, Carlsbad, Calif) for 48 hours. *P brasiliensis* and *C albicans* were heat killed at  $60^{\circ}\text{C}$  for 60 minutes, counted, and adjusted to a DC/fungus ratio of 1:10. After 2 days of incubation, cell viability was determined by Trypan blue exclusion and mDCs were harvested and phenotyped. Based on the expression pattern of HLA-DR, CD14, CD11c, CD40, CD80, CD86, and CD83, this approach was successful in generating homogeneous populations of iDCs and mDCs.

### Phenotyping of DCs

iDCs or mDCs were removed from the 6-well cell culture plates and washed with PBS-containing 0.5% BSA. The expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, CD14, CD40, CD86, CD80, CD83, and MHC class I and II molecules was assessed with cell surface staining by using specific, fluorophore-conjugated monoclonal antibodies (Becton Dickinson, Mountain View, Calif) and analyzed as previously described.<sup>18</sup>

### Lymphocyte stimulation assay

To measure the ability of mDCs to activate autologous T lymphocytes, the adherent iDCs and *C albicans*- or *P brasiliensis*-pulsed mDCs were harvested by using cold medium and counted; their viability was determined by Trypan blue exclusion as previously described.<sup>14</sup> iDCs or mDCs were cocultured with autologous T cells at a ratio of 1:10 (DCs/lymphocytes) for 5 days and T-cell proliferation and cytokine production (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-17, and TGF- $\beta$ ) were determined. Prior to coculture, lymphocytes were stained with 5 mM 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (Molecular Probes, Eugene, Ore) following the manufacturer's instructions. After labeling, lymphocytes were cocultured either with iDCs or with *P brasiliensis*- or *C albicans*-pulsed mDCs at a ratio of 1:10 (DCs/lymphocytes), for 5 days at  $37^{\circ}\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ , in 96-well round-bottom plates (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) in a final volume of 300  $\mu\text{L}$  of RPMI 1640, supplemented with 10% FCS. Immediately before flow cytometry, cells were stained with anti-CD4 and anti-CD8 (Becton Dickinson).

### Evaluation of $\text{T}_\text{H}17$ function

$\text{T}_\text{H}17$  cells were analyzed as previously described.<sup>19</sup> Briefly, PBMCs and nonadherent cells containing mainly lymphocytes from patients and healthy controls were stimulated overnight with 10 ng/mL of phorbol 12-myristate 13-acetate plus 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of ionomycin (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) and *C albicans*-pulsed DCs at a ratio of 1:10 (DCs/lymphocytes), respectively. For both situations, the cells were cultivated in the presence of GolgiPlug (BD Biosciences, San Jose, Calif). After cell-surface staining with phycoerythrin-conjugated anti-CD4 (eBioscience, San Diego, Calif), cells were fixed, permeabilized (Cytofix/Cytoperm, BD Biosciences), and stained with Alexa Fluor 647-conjugated anti-IL-17-A (eBioscience). Flow cytometric studies were performed on a BD FACSCanto II Cytometer and analyzed by using FlowJo software (Treestar, Inc, Ashland, Ore). The IL-17 release is described below.

### Analysis of cytokine and pentraxin 3 release

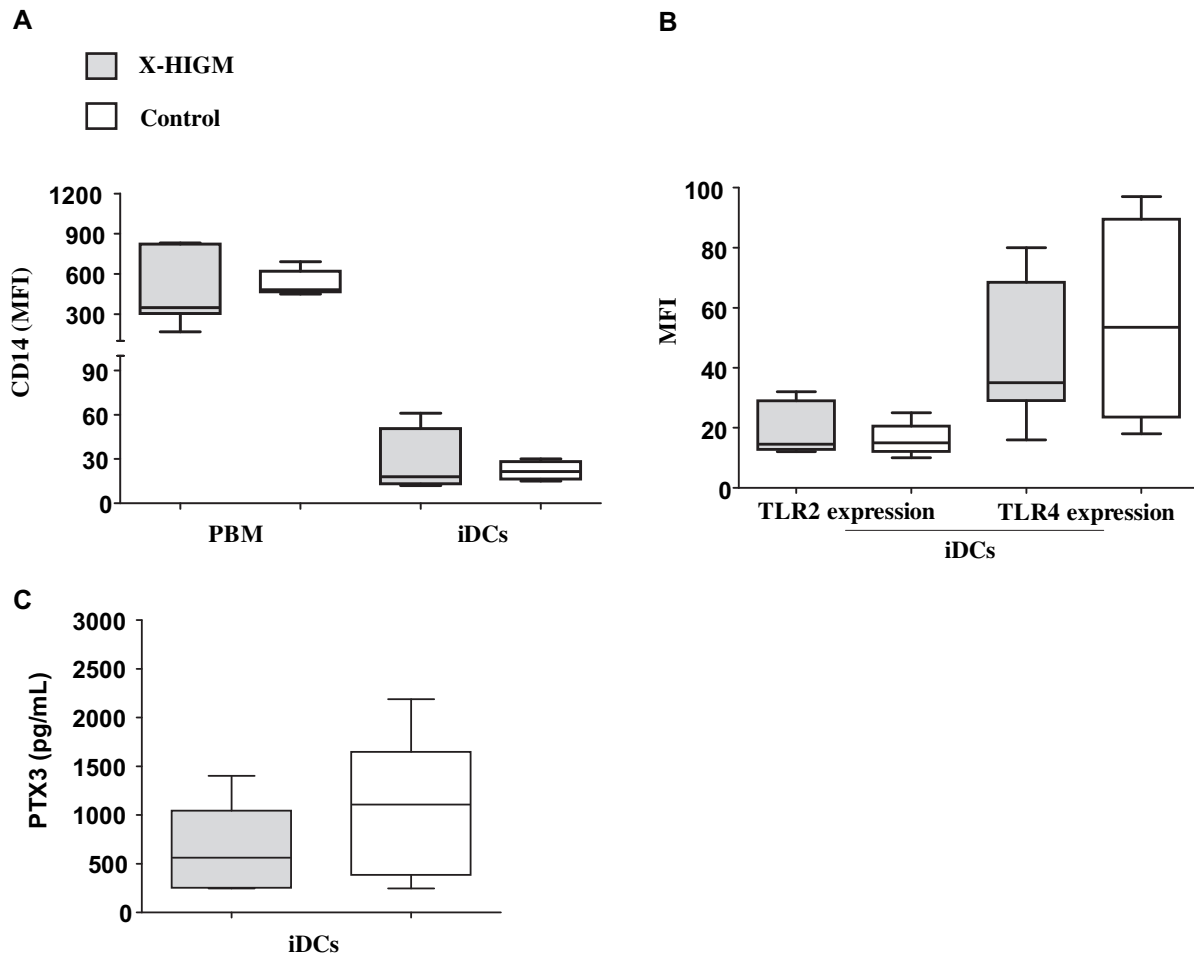
DC culture supernatants were evaluated for the presence of pentraxin 3 (PTX3), IL-12p70, and IL-10 after 48-hour activation by *C albicans* or *P brasiliensis*. T cell/DC culture supernatants were evaluated for the presence of IL-17, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-5 after 5 days of coculture. PTX3 and cytokine levels were measured by using ELISA, according to the manufacturer's instructions (Becton Dickinson).

### Statistical analysis

Statistical significance was assessed by using the nonparametric Mann-Whitney test. Data were expressed as median and 25th and 75th percentiles. The statistical analyses were performed by using the GraphPad PRISM 4.03 software (GraphPad Software, San Diego, Calif), and differences with a *P* value of less than .05 were considered significant.

## RESULTS

Because of the essential role that DCs play as professional APCs in triggering cell-mediated immune responses that are essential for controlling fungal infections, we generated monocyte-derived DCs from patients with X-HIGM and studied their differentiation and function.



**FIG 1.** Normal expression and secretion of pattern recognition receptors by iDCs from patients with X-HIGM. Flow cytometric analysis of iDCs derived from peripheral blood monocytes (PBMs) in the presence of GM-CSF and IL-4 showed the expected CD14 downregulation (**A**). X-HIGM iDCs demonstrate normal expression of TLR2 and TLR4 (**B**) and secrete normal amounts of PTX3 compared with normal controls (**C**) ( $P < .05$ ;  $n = 5$ , Mann-Whitney test). *MFI*, Mean fluorescence intensity.

### iDCs from CD40L-deficient patients express normal TLR2, TLR4, and CD14 but reduced CD80, CD86, and HLA-DR that can be reversed by treating iDCs with sCD40L

Because of previous reports suggesting an important role for CD14 and TLRs 2 and 4 in the immune response against fungi,<sup>20-22</sup> we evaluated their expression on peripheral blood monocytes and iDCs by flow cytometry using specific antibodies. iDCs from CD40L-deficient patients showed the expected downregulation of CD14 as in healthy controls (Fig 1, A). Expression of TLR2 and TLR4 was also similar among patients and controls (Fig 1, B). PTX3, the unique humoral

pattern-recognition receptor that plays a nonredundant function in innate resistance to fungal infections, is predominantly produced by DCs and is regulated in part by CD40L-CD40 signaling.<sup>23,24</sup> We therefore investigated the production of PTX3 by iDCs from patients with X-HIGM, which was similar to that in normal controls (Fig 1, C).

Because CD40L has been reported to modulate the expression of CD80, CD86, and HLA-DR,<sup>10</sup> we analyzed the expression of these molecules. iDCs from patients with X-HIGM showed reduced levels of HLA-DR, CD80, and CD86 expression compared with normal controls (Fig 2, A and B). The importance of CD40L-CD40 interaction for the phenotype of DCs was confirmed by the

**FIG 2.** DCs from CD40L-deficient patients express reduced CD80, CD86, and HLA-DR levels that can be restored to normal levels by stimulation with sCD40L. Flow cytometric analysis of iDCs showing that cells from patients with X-HIGM express reduced levels of HLA-DR, CD80, and CD86 (**A** and **B**). mDCs incubated with sCD40L show expression of costimulatory and HLA-DR molecules at levels similar to those in normal controls (Fig 2, A and B). mDCs incubated with *C albicans* and *P brasiliensis* exhibit reduced expression of HLA-DR and CD80 but normal levels of CD86 (**C**) relative to normal controls. Significant differences are denoted by asterisk ( $P < .05$ ;  $n = 5$ , Mann-Whitney test). *MFI*, Mean fluorescence intensity.

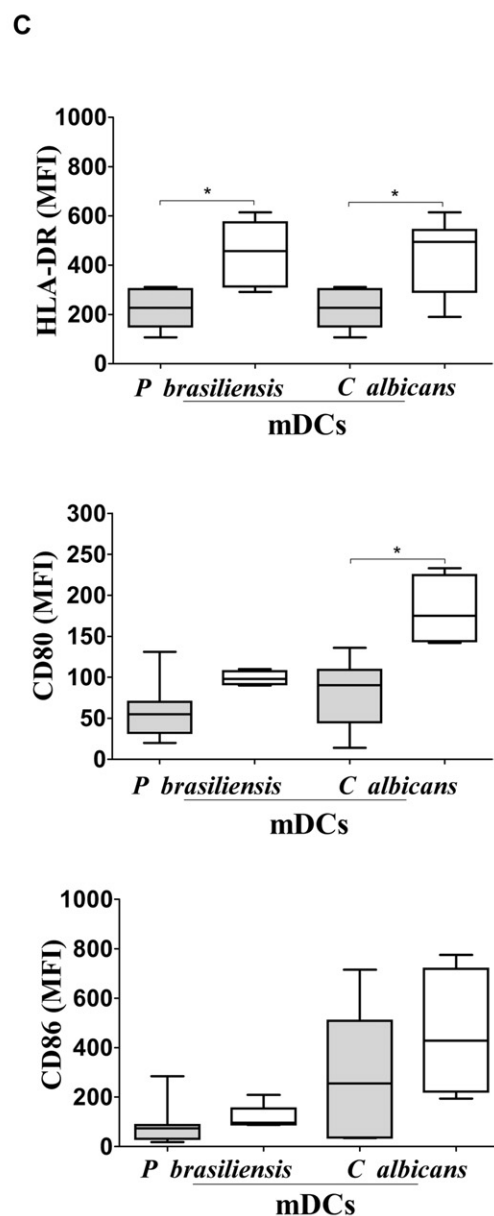
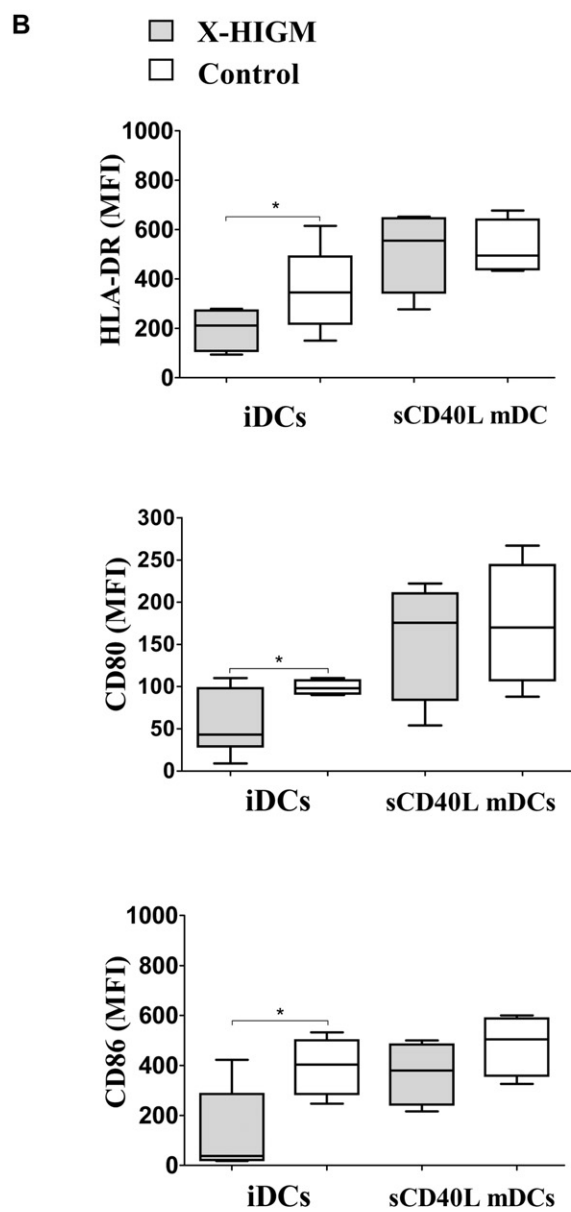
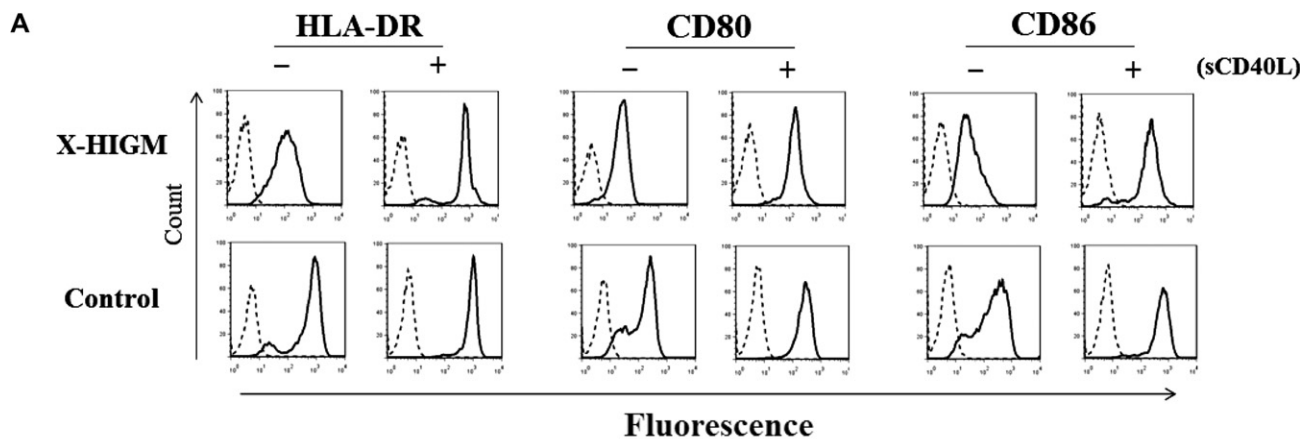
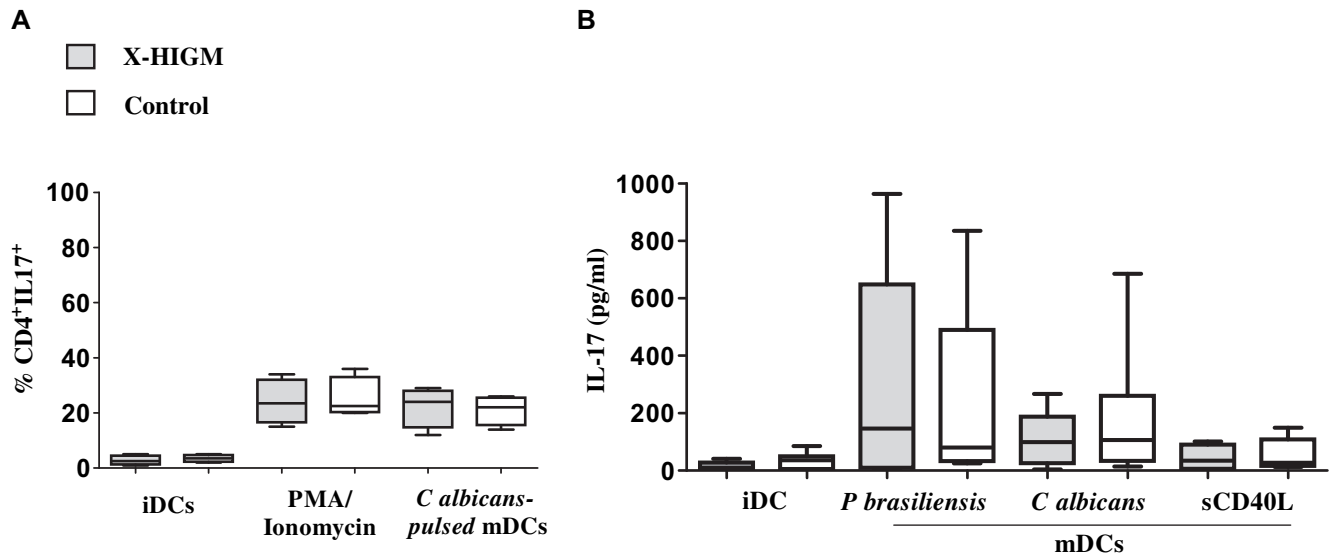


FIG 2. (Continued).



**FIG 3.** DCs from CD40L-deficient patients induced normal  $T_H17$  cell generation. Patients with X-HIGM showed a percentage of  $T_H17$  cells similar to that in normal controls after stimulation of T cells with iDCs, phorbol 12-myristate 13-acetate plus ionomycin, or *C. albicans*-pulsed mDCs (A). The levels of IL-17 in cocultures of T cells with *C. albicans*- or *P. brasiliensis*-pulsed mDCs from patients with X-HIGM were also similar to those of normal controls (B) ( $P > .05$  in all situations;  $n = 5$ , Mann-Whitney test). PMA, Phorbol 12-myristate 13-acetate.

fact that the addition of sCD40L to the culture upregulated costimulatory (CD80/CD86) and HLA-DR molecules on mDCs from patients with X-HIGM to normal levels (Fig 2, A and B).

To determine whether maturation of iDCs increases the expression of costimulatory and HLA-DR molecules, we stimulated iDCs with heat-killed *C. albicans* or *P. brasiliensis* for 48 hours. The resulting mDCs from patients with X-HIGM showed persistently decreased expression of HLA-DR and CD80 molecules compared with normal controls (Fig 2, A and B), but the expression of CD86 although somewhat reduced was not significantly affected (Fig 2, C). Notably, after stimulation with *P. brasiliensis*, CD86 expression was downregulated on mDCs from patients with X-HIGM and from healthy controls, an observation that agrees with previous reports.<sup>25</sup>

In addition, normal expression of CD40, CD83, and HLA-ABC molecules was found on the surface of mDCs from patients with X-HIGM (data not shown).

### DCs from CD40L-deficient patients promote normal generation of $T_H17$ cells

Recent studies demonstrated a crucial role for IL-17 in the human immune response against *C. albicans*,<sup>26</sup> and experiments in mice suggest that CD40L-CD40 interaction is involved in the regulation of IL-17 production.<sup>27,28</sup> To address the possibility that a defect in the generation of  $T_H17$  cells underlies the susceptibility of patients with X-HIGM to fungal pathogens, we quantified the percentage of  $T_H17$  cells and the secretion of IL-17 in the coculture of patient DCs with autologous T cells. We detected a similar percentage of  $T_H17$  cells between patients with X-HIGM and normal controls after activation of PBMCs with phorbol 12-myristate 13-acetate and ionomycin (Fig 3, A). No differences were observed in the percentage of  $T_H17$  cells when T cells were stimulated by mDCs pulsed with *C. albicans* from

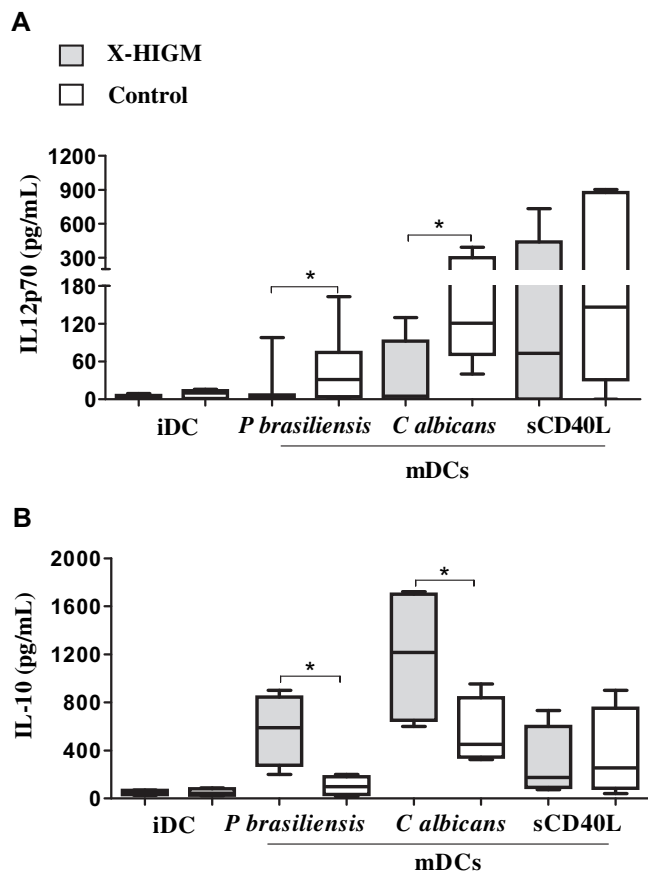
CD40L-deficient patients (Fig 3, A). In order to assess whether DCs from patients with X-HIGM are able to induce the secretion of IL-17 by  $T_H17$  cells, we measured IL-17 levels in coculture supernatants of *C. albicans*- or *P. brasiliensis*-pulsed mDCs with autologous T cells (Fig 3, B). IL-17 levels were similar in coculture supernatants from patients with X-HIGM and normal controls. Addition of sCD40L did not increase IL-17 production (Fig 3, B).

### mDCs from CD40L-deficient patients show imbalanced production of IL-12/IL-10

We tested the ability of *P. brasiliensis*- or *C. albicans*-pulsed mDCs from patients with X-HIGM to produce IL-12 and IL-10. After 48 hours of culture, X-HIGM mDCs produced significantly less IL-12 (Fig 4, A) and significantly more IL-10 compared with the amounts produced by mDCs from normal control subjects (Fig 4, B). sCD40L was however able to restore IL-12 production by X-HIGM DCs to levels similar to those in normal controls (Fig 4, A).

### DCs from CD40L-deficient patients induce similar levels of lymphocyte proliferation compared with normal controls

We tested the ability of DCs from CD40L-deficient patients to induce autologous T-cell proliferation. After 5 days of coculture, cells were harvested and the proliferation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was evaluated by flow cytometry using a 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester dye-dilution approach. Lymphocyte proliferation induced by autologous X-HIGM and normal control iDCs was similar for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (Fig 5, A and B). Similar results were obtained when autologous T cells were cocultivated with *P. brasiliensis*- or *C. albicans*-pulsed mDCs (Fig 5, A and B).



**FIG 4.** IL-12 and IL-10 production by X-HIGM mDCs. mDCs from patients with X-HIGM secrete decreased IL-12 but increased IL-10 in response to *P brasiliensis* and *C albicans*. After sCD40L stimulation of X-HIGM mDCs, IL-12 and IL-10 secretions were restored to a pattern similar to that observed in healthy controls (**A** and **B**). Significant differences are denoted by asterisk ( $P < .05$ ;  $n = 5$ , Mann-Whitney test).

### mDCs from CD40L-deficient patients induce a $T_H2$ -skewed T-cell response

CD40L has been shown to be important for IL-12/IFN- $\gamma$  ( $T_H1$ ) production in response to different opportunistic pathogens.<sup>29</sup> Notably, the protective immune response against fungi induced by IL-12/IFN- $\gamma$  can be suppressed by IL-4, IL-5, and IL-10 ( $T_H2$  pattern).<sup>30</sup> To determine whether the differences observed in mDC cytokine production lead to altered APC function, we evaluated T-cell cytokine production by using an autologous coculture system. We observed that coculture of *P brasiliensis*- and *C albicans*-pulsed mDCs from CD40L-deficient patients with the non-adherent cell fraction containing mainly T cells led to lower IFN- $\gamma$  production (Fig 6, A) and higher IL-4 and IL-5 production compared with normal controls (Fig 6, B and C). However, although somewhat increased, the levels of IL-4 were not statistically affected when the T cells were cocultured with *P brasiliensis*-pulsed mDCs from CD40L-deficient patients (Fig 6, B). Nevertheless, the cytokine patterns were similar in X-HIGM and control cocultures when mDCs were stimulated with sCD40L, strongly suggesting that the CD40L-CD40 interaction contributes to the balance of  $T_H1$  and  $T_H2$  cells (Fig 6). In contrast, we observed no significant difference in TGF- $\beta$  production in cocultures of *P brasiliensis*- or *C albicans*-pulsed mDCs and autologous T cells from patients with X-HIGM and controls (data not shown).

### The skewed $T_H2$ pattern response of CD40L-deficient patients can be reversed by exogenous sCD40L

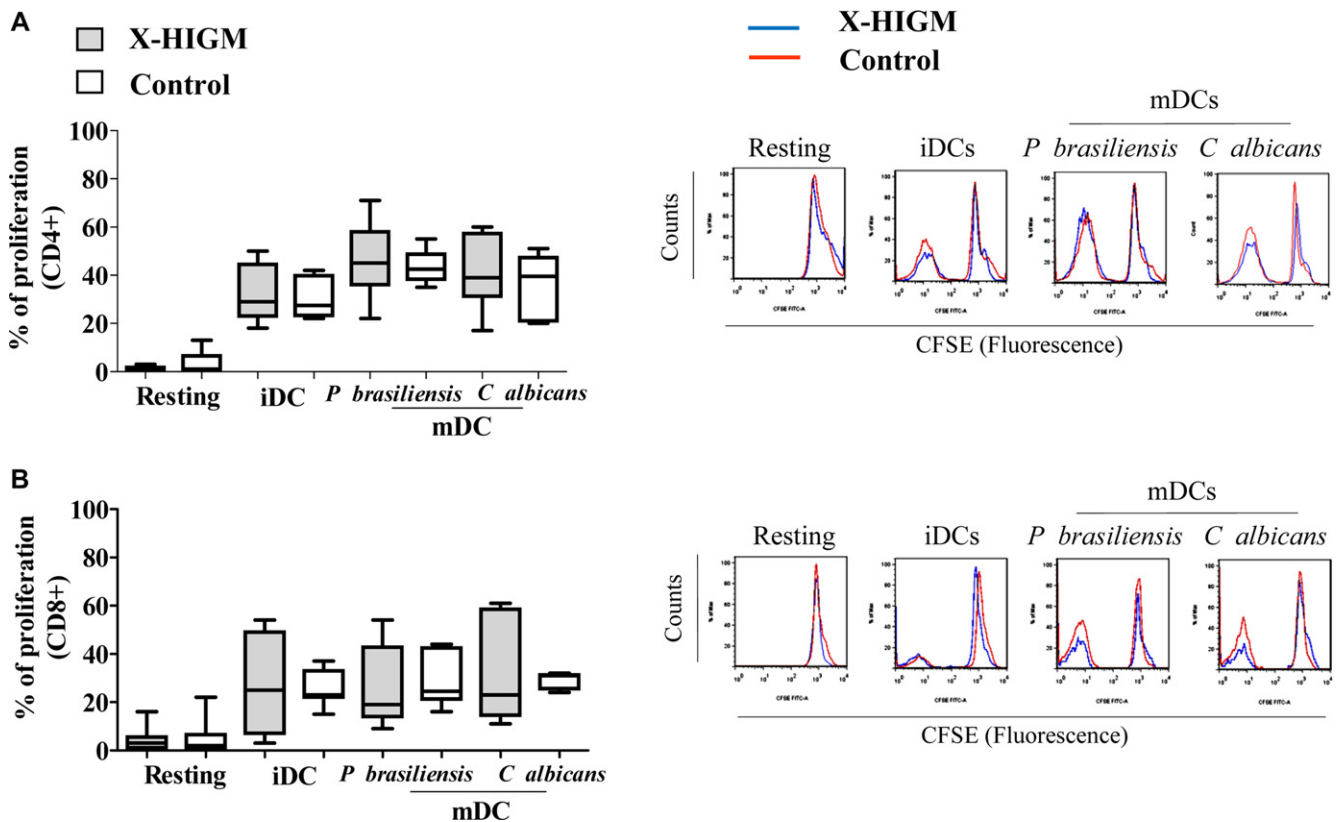
To further address the role of CD40L in balancing  $T_H1$ / $T_H2$  responses, we determined whether sCD40L could reverse the impaired IFN- $\gamma$  production observed in response to *C albicans* in patients with X-HIGM. As shown in Fig 7, stimulation of X-HIGM T-cell/mDC cocultures with exogenous sCD40L and *C albicans* caused normal production of IFN- $\gamma$  and IL-4.

### DISCUSSION

To better understand whether impaired cross-talk between APCs and T cells contributes to the observed T-cell dysfunction in CD40L deficiency, we investigated the differentiation and function of DCs from patients with X-HIGM. We found that iDCs from these patients have normal expression of TLR2 and TLR4, normal production of PTX3, and CD14 downregulation that was similar to that observed in cells from normal controls. However, iDCs from these patients had reduced cell-surface expression of CD80, CD86, and HLA-DR. When DCs were activated with *C albicans* or *P brasiliensis*, X-HIGM mDCs were found to have reduced CD80 and HLA-DR expression, and most important, exhibited markedly reduced IL-12 production and increased IL-10 production when compared with normal controls. Coculture of mDCs with autologous T cells resulted in significantly reduced IFN- $\gamma$  production whereas IL-4 and IL-5 production was increased. In contrast, the ability to induce CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells to proliferate, and generate TGF- $\beta$  and IL-17, was comparable in mDCs from patients with X-HIGM and normal controls. These observations suggest that the maturation of DCs in patients with X-HIGM is partially impaired and may directly contribute to their susceptibility to fungal infections. The possibility that the differences we observed between patients with X-HIGM (age range: 4-18 years) and young adult controls are age related is unlikely since no differences in the phenotype and function of DCs and T-cell-mediated immunity were observed between children older than age 3 years and adults.<sup>31</sup>

HLA-DR and CD80/CD86 expressed on professional APCs such as DCs bind to the T-cell receptor and to CD28 on T cells to provide the costimulatory signals required to induce T-cell activation.<sup>32</sup> The reduced expression of HLA-DR and CD80/CD86 by iDCs and mDCs derived from CD40L-deficient patients suggests defective costimulatory signaling and as a result, ineffective T-cell activation. Our data suggest that exposure to CD40L during the development of monocytes and DCs contributes to appropriate expression of molecules that are crucial for T-cell-derived activation and costimulation.<sup>13</sup> These findings are also in accordance with those from Fontana et al<sup>18</sup> who demonstrated reduced expression of CD80/CD86 and HLA-DR on iDCs from CD40-deficient patients.

Recent studies in humans revealed a crucial role for IL-17 in the immune response to *C albicans*, a process that requires APC-T-cell cross-talk.<sup>33</sup> Although no relationship between CD40L-CD40 interaction and  $T_H17$  polarization has been described in humans, this issue has been addressed recently in mice, with contradictory results. Katzman et al<sup>28</sup> reported that the absence of CD40L-CD40 interaction results in a markedly increased percentage of IL-17-producing cells, whereas Iezz et al<sup>27</sup> observed reduced numbers of  $T_H17$  cells. Interestingly, we found a normal percentage of  $T_H17$  cells and IL-17 secretion in



**FIG 5.** X-HIGM DCs induce normal CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation in coculture. iDCs and *P brasiliensis*- or *C albicans*-pulsed mDCs from patients with X-HIGM (blue) showed a normal capacity to induce CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation compared with healthy control cells (red) (A and B) ( $P > .05$  in all situations;  $n = 5$ , Mann-Whitney test). CFSE, 5,6-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester.

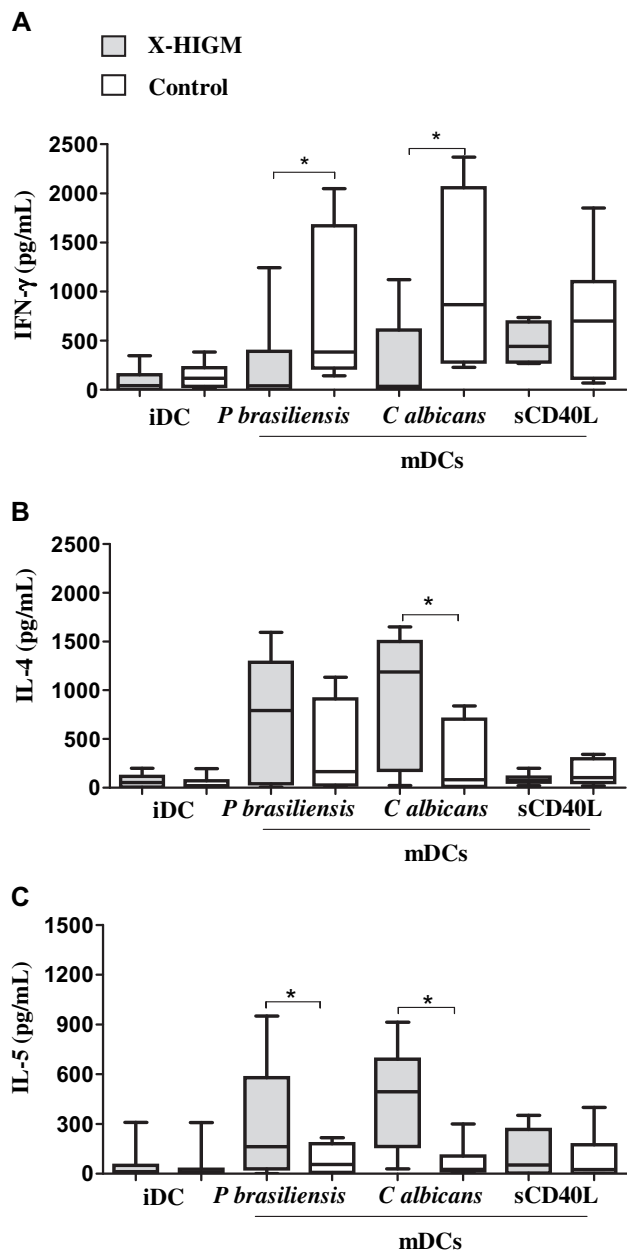
X-HIGM, suggesting that in humans, CD40L-CD40 interaction is either not involved in the generation of T<sub>H</sub>17 cells or other yet unknown mechanisms compensate for the absence of CD40L-CD40 interaction. In addition, we found normal phosphorylation of STAT3, a transcription factor essential for T<sub>H</sub>17 cell differentiation,<sup>19</sup> in CD4<sup>+</sup> T cells in the cocultures of *C albicans*-pulsed mDCs with T cells from patients with X-HIGM (data not shown).

DCs are essential for the initiation of specific immune responses to fungal infections by producing IL-12 and inducing the generation of IFN- $\gamma$ , which is essential for cell-mediated immune responses.<sup>4</sup> Production of IL-12 by DCs can be initiated either by a T-cell-dependent pathway primarily induced by CD40L-CD40 interaction or by a T-cell-independent pathway induced by direct recognition of microbial products through pattern recognition receptors.<sup>34</sup> Our findings that DCs from CD40L-deficient patients produce markedly reduced amounts of IL-12p70 but higher concentrations of IL-10 in response to stimulation with *C albicans* and *P brasiliensis* strongly suggest that CD40L has a nonredundant role in inducing IL-12p70 production and downregulating IL-10.

Previously, a T<sub>H</sub>2 pattern of cytokine production (predominance of IL-4, IL-5, and IL-10 and decreased IL-12 and IFN- $\gamma$ ) has been associated with increased susceptibility to fungal infections in humans.<sup>30</sup> Furthermore, antifungal immune responses coordinated by IFN- $\gamma$  can be suppressed at both the inductive and effector levels, particularly by T<sub>H</sub>2 inhibitory cytokines (IL-10, IL-4, IL-5).<sup>30</sup> Our data strongly suggest an essential role for

CD40L-CD40 interaction in driving the protective cellular immune response against fungal infections. As expected from the decreased IL-12 and increased IL-10 production by mDCs, the generation of IFN- $\gamma$  by X-HIGM T cells in coculture was markedly reduced. In addition, IL-4 production in response to *C albicans* and IL-5 production in response to *C albicans* and *P brasiliensis* were increased in cultures of patient cells. The restoration of a normal pattern of cytokine production by sCD40L stimulation of the X-HIGM DCs confirms the important role of CD40L-CD40 interactions in these physiologic processes. Notably, sCD40L does not affect the proliferation of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells, T<sub>H</sub>17 generation, or TGF- $\beta$  production when T cells from patients with X-HIGM were cocultured with autologous DCs.

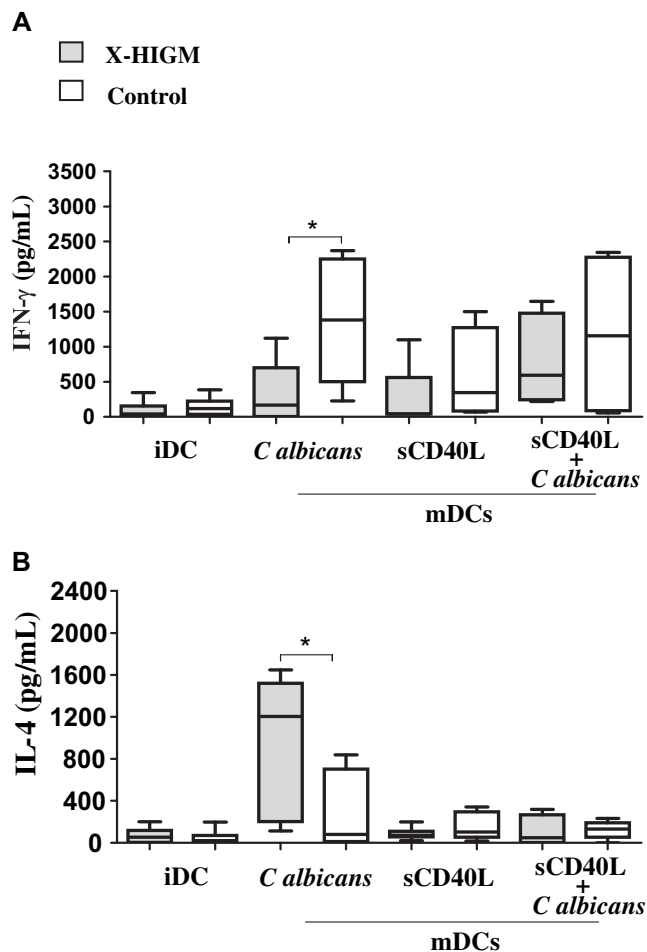
Our data support and extend observations made by other groups, who used different *in vitro* systems to address the involvement of CD40L-CD40 in driving the T-cell-mediated immune response. Jain et al<sup>14</sup> demonstrated reduced IL-12 production by PBMCs from CD40L-deficient patients when stimulated with PHA, LPS, anti-CD3, or *Staphylococcus aureus*, Cowan's strain I. Similarly, Subauste et al<sup>35</sup> demonstrated impaired IL-12 and IFN- $\gamma$  production by *Toxoplasma gondii*-stimulated PBMCs from 3 patients with X-HIGM, which could be reversed by sCD40L. Furthermore, they demonstrated that neutralization of IL-12 almost completely ablated the stimulatory effect of CD40L on IFN- $\gamma$  production. Similar data were obtained by Fontana et al<sup>18</sup> who evaluated DCs from 2 patients with CD40 deficiency and found low levels of IL-12 but high levels of IL-10 in



**FIG 6.** In cocultures, mDCs from CD40L-deficient patients skew T-cell response to a  $T_H2$  pattern. Lower levels of IFN- $\gamma$  and higher IL-4 and IL-5 production (A-C) were detected in cells from patients with X-HIGM. This was reversed to a pattern similar to that in normal controls when X-HIGM mDCs were matured in the presence of sCD40L. Significant differences are denoted by asterisk ( $P < .05$ ;  $n = 5$ , Mann-Whitney test).

the supernatants of DC cultures. In addition, LPS + IFN- $\gamma$ -activated mDCs from CD40-deficient patients induced impaired allogenic T-cell immune response, which was reversed by blocking IL-10 with an anti-IL-10 neutralizing antibody.

In conclusion, the functional impairment of DCs from patients with X-HIGM shown here provides potential pathophysiologic insights to explain the increased fungal susceptibility observed in patients with defective CD40L-CD40 signaling. Our data suggest that the impaired interaction of DCs and T cells results in ineffective T-cell-mediated immune responses without affecting T-cell proliferation as demonstrated by coculture experiments of



**FIG 7.** The imbalanced production of IFN- $\gamma$  and IL-4 is reversed by exogenous sCD40L. Supernatants of T cells cocultured with *C albicans*-pulsed mDCs from patients with X-HIGM showed reduced level of IFN- $\gamma$ , which was upregulated by exogenous sCD40L (A), while increased level of IL-4 was downregulated (B). Significant differences are denoted by asterisk ( $P < .05$ ;  $n = 5$ , Mann-Whitney test).

autologous DCs and T cells. Finally, impaired CD40L-CD40 interaction during the development of monocytes and DCs affect their differentiation and costimulatory receptor expression, skewing the induced T-cell responses to a  $T_H2$  pattern.

We thank FAPESP, CNPq, and the Jeffrey Modell Foundation for financial support and the patients and their families for their participation in this study. We are also grateful to Prof Vera L.G. Calich, PhD, and Claudia Feriotti, MSc, for the donation of *P brasiliensis*.

**Clinical implications:** This work suggests that the absence of CD40L impairs DC differentiation and may contribute to the increased susceptibility of patients with X-HIGM to life-threatening fungal infections.

**REFERENCES**

1. Antachopoulos C, Walsh TJ, Roilides E. Fungal infections in primary immunodeficiencies. *Eur J Pediatr* 2007;166:1099-117.
2. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.



3. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2001;166:249-55.
4. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 2004;4:1-23.
5. Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H, Jenkins NA, Copeland NG, et al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* 1993;259:990-3.
6. Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S, et al. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* 1993;72:291-300.
7. DiSanto JP, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Fischer A, de Saint Basile G. CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993;361:541-3.
8. Fuleihan R, Ramesh N, Loh R, Jabara H, Rosen RS, Chatila T, 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* 1993;90:2170-3.
9. Korthauer U, Graf D, Mages HW, Briere F, Padayachee M, Malcolm S, et al. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993;361:539-41.
10. Hollenbaugh D, Grosmaire LS, Kullas CD, Chalupny NJ, Braesch-Andersen S, Noelle RJ, et al. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *EMBO J* 1992;11:4313-21.
11. Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A. 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* 1992;89:6550-4.
12. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998;188:373-86.
13. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109-18.
14. Jain A, Atkinson TP, Lipsky PE, Slater JE, Nelson DL, Strober W. Defects of T-cell effector function and post-thymic maturation in X-linked hyper-IgM syndrome. *J Clin Invest* 1999;103:1151-8.
15. Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, et al. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1161-78.
16. Barbuto JA, Ensina LF, Neves AR, Bergami-Santos P, Leite KR, Marques R, et al. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:1111-8.
17. Loures FV, Pina A, Felonato M, Calich VL. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol* 2009;183:1279-90.
18. Fontana S, Moratto D, Mangal S, De Francesco M, Vermi W, Ferrari S, et al. Functional defects of dendritic cells in patients with CD40 deficiency. *Blood* 2003;102:4099-106.
19. Renner ED, Rylaarsdam S, Anover-Sombke S, Rack AL, Reichenbach J, Carey JC, et al. Novel signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations, reduced T(H)17 cell numbers, and variably defective STAT3 phosphorylation in hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:181-7.
20. Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. The role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* 2002;185:1483-9.
21. Villamon E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE, Ferrandiz ML, Fradelizi D, et al. Toll-like receptor 2 is dispensable for acquired host immune resistance to *Candida albicans* in a murine model of disseminated candidiasis. *Microbes Infect* 2004;6:542-8.
22. Wang JE, Warris A, Ellingsen EA, Jorgensen PF, Flo TH, Espevik T, et al. Involvement of CD14 and Toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect Immun* 2001;69:2402-6.
23. Doni A, Michela M, Bottazzi B, Peri G, Valentino S, Polentarutti N, et al. Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma. *J Leukoc Biol* 2006;79:797-802.
24. Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, Salustri A, De Acetis M, Nota R, et al. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* 2002;420:182-6.
25. Mamoni RL, Blotta MH. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 2006;35:207-16.
26. Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 2011;332:65-8.
27. Izzi G, Sonderegger I, Ampenberger F, Schmitz N, Marsland BJ, Kopf M. CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:876-81.
28. Katzman SD, Gallo E, Hoyer KK, Abbas AK. Differential requirements for Th1 and Th17 responses to a systemic self-antigen. *J Immunol*;186:4668-73.
29. Romani L, Puccetti P, Bistoni F. Interleukin-12 in infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:611-36.
30. Romani L. The T cell response against fungal infections. *Curr Opin Immunol* 1997;9:484-90.
31. Upham JW, Lee PT, Holt BJ, Heaton T, Prescott SL, Sharp MJ, et al. Development of interleukin-12-producing capacity throughout childhood. *Infect Immun* 2002;70:6583-8.
32. Sperling AI, Bluestone JA. The complexities of T-cell co-stimulation: CD28 and beyond. *Immunol Rev* 1996;153:155-82.
33. Vautier S, Sousa Mda G, Brown GD. C-type lectins, fungi and Th17 responses. *Cytokine Growth Factor Rev*;21:405-12.
34. Takenaka H, Maruo S, Yamamoto N, Wysocka M, Ono S, Kobayashi M, et al. Regulation of T cell-dependent and -independent IL-12 production by the three Th2-type cytokines IL-10, IL-6, and IL-4. *J Leukoc Biol* 1997;61:80-7.
35. Subauste CS, Wessendarp M, Sorensen RU, Leiva LE. CD40-CD40 ligand interaction is central to cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii*: patients with hyper-IgM syndrome have a defective type 1 immune response that can be restored by soluble CD40 ligand trimer. *J Immunol* 1999;162:6690-700.